



HAL
open science

Contrôle moléculaire de la croissance sous déficit hydrique : analyse cinématique et régulation de l'expression des aquaporines TIP1 dans l'apex de la racine du peuplier

Rémy Merret

► **To cite this version:**

Rémy Merret. Contrôle moléculaire de la croissance sous déficit hydrique : analyse cinématique et régulation de l'expression des aquaporines TIP1 dans l'apex de la racine du peuplier. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10069 . tel-01746372

HAL Id: tel-01746372

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746372>

Submitted on 29 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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UFR Sciences et Technologies – Secteur Biologie
École Doctorale : Sciences et Ingénierie Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Département de Formation Doctorale : Biologie Végétale et Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de docteur en Biologie Végétale et
Forestière de l'Université Henri Poincaré Nancy 1
par

Rémy MERRET

**Contrôle moléculaire de la croissance
sous déficit hydrique :
Analyse cinématique et régulation de l'expression des
aquaporines *TIP1* dans l'apex de la racine du peuplier**

Sous la direction de :
M.B. Bogeat-Triboulot (CR), I. Hummel (CR) et E. Dreyer (DR)

Soutenue publiquement le 10 Novembre 2010 devant la commission d'examen :

Dr WK. SILK	Pr, University of California, Davis	Rapporteur
Dr S. SAKR	Pr, Université d'Angers	Rapporteur
Dr M. CHALOT	Pr, Université de Nancy	Examineur
Dr F. CHAUMONT	Pr, Université de Louvain	Examineur
Dr V. LEGUE	MC, Université de Nancy	Examineur
Dr E. DREYER	DR, INRA Nancy	Examineur
Dr M.B. BOGEAT-TRIBOULOT	CR, INRA Nancy	Invitée

Après un grand nombre d'années passées sur les bancs universitaires, mes remerciements vont à tous ceux, et ils sont nombreux, qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la rédaction de cette thèse. Je vais essayer de n'oublier personne et des les faire apparaître de manière chronologiques pour éviter certaines jalousies. Mes premiers remerciements vont tout naturellement à *ma famille* qui sans elle je ne serais là aujourd'hui. Je remercie très chaleureusement *mes parents* qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Vous avez su me guider jusqu'à cette étape ultime, merci à vous !

Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes qui m'ont initié à la recherche.

- Un grand merci au **Professeur Annick Hourmant** qui fut la première à m'accueillir au sein d'un laboratoire de recherche.
- Merci à **Bénédicte** qui m'a fait découvrir les joies de travailler avec une nouvelle espèce modèle (vive *Ectocarpus* !). Tu m'as appris à rester humble dans la recherche.
- Mes pensées vont ensuite à **Andréa** qui m'a donné goût à la microscopie confocale et aux joies de la fluorescence. Je me souviendrais toujours des manip à 6h du matin dans le labo à Etienne, sacré canon à particules !!! Merci à toi Andréa d'être toujours présente pour répondre à mes mails de bon matin ! Je reviendrais au 4, tu peux me croire ! Merci par ailleurs au grand **Professeur Thomas J. Bach**, Mr HMGR.

Je tiens maintenant à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin au bon déroulement de cette thèse.

- Je remercie tout d'abord la **Région Lorraine** et le **département EFPA** qui ont financé ces trois années de thèse.
- Je tiens bien entendu à remercier **Marie-Béa, Irène et Erwin** ou *Erwin, Béa et Irène*, ou encore *Irène, Erwin et Béa*, (pour classer tout le monde en 1^{er}) d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Merci à vous trois pour tout ce que vous m'avez apporté.
- Je souhaite remercier tout particulièrement les membres de mon comité de thèse qui m'ont suivi et conseillé pendant ces trois années. Merci au **Professeur François Chaumont, Bruno Moulia, Valérie Legué, Annegret Kohler et David Cohen**.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

- Merci aux **Professeurs S. Sark et W.K. Silk** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et de faire le trajet (parfois de très très loin) pour juger mon travail.
- Merci au **Professeurs Michel Chalot et François Chaumont**, ainsi que le **Dr. Valérie Legué** d'avoir acceptés d'être examinateurs de cette thèse.

Je vais maintenant m'attarder sur un certain nombre de personnes que je dois personnellement remercier. Une liste par ordre alphabétique permet d'éviter de nouvelles jalousies. Je remercie donc : **Adeline**, qu'est ce qu'on a rigolé au Microtome !! Merci à toi d'avoir toujours été là pour écouter mes malheurs, jouer avec la paraffine et l'Ottix++. Bon je vais finir pas l'avouer, tu fais des meilleures coupes que moi. Mais je ne m'avoue pas vaincu si vite !!! **André, dit Grand Chef (par le titre). Bruno, Mr Biomécanique des Arbres**, un immense Merci à toi et ta grande pédagogie. Tu m'as fais découvrir le monde caché de la cinématique. Nos discussions furent toujours enrichissantes et agréables. J'ai découvert grâce à toi le vrai sens de l'expression « Biologie intégrative ». **Caroline, Miss Fac**. Ton café restera toujours aussi léger à mon goût. Merci à toi pour ces cafés de bon matin. **Cyril, le fameux Cyril** ! Heureusement que tu as été là pour maintenir ma réputation de Breton. Je garderais en tête ce duo de poker arrosé au Havana. Et puis ce périple et quel périple, où on a failli ne jamais y revenir, enfermés à vie dans une prison polo-biélorussienne. Merci pour ces années de franche déconnade. Promis, on se revoit à ton retour des terres australiennes, que je sois ici ou ailleurs ! Bonne route mon ami, c'est à ton tour maintenant ! **Commerciaux**, merci

à ces nombreux commerciaux, avec qui j'ai passé des heures au téléphone pour au final être toujours gagnant. Merci de m'avoir appris le sens de la négociation et du marchandage !!! Mr Résine, j'attends toujours mon produit. **David**, on n'a pas encore réussi à conclure ensemble, mais je ne perds pas espoir. A l'heure d'aujourd'hui, tu me dois toujours un verre et je l'attends !! Un immense merci pour ces parties de franche rigolade que tu as su fournir tout au long de cette thèse. Je garde un excellent souvenir de ces pauses café mais surtout de notre travail sur les fameuses AQP. **Didier**, merci beaucoup d'avoir accepté de relire mon manuscrit avant son dépôt. Merci pour tous tes conseils que tu as fourni tout au long de cette thèse. **Erwin dit Grand Chef (par la taille)**, je tenais à te remercier d'avoir accepté d'être encadrant de cette thèse. Tu as su, malgré tes nombreuses responsabilités, être disponible pour discuter et m'aider à surmonter mes doutes. **Irène**. C'est la fête Irène !!!! Voilà mon périple s'achève. Merci à toi, je te dois tellement. Merci pour toutes ces tartes, gâteaux, mirabelles et être restée soyeuse de mon état de santé surtout en fin de thèse. **Jacqueline, dit Jama**. Un grand merci à toi pour ces pauses café toujours brillantes mais joyeuses. Merci pour les nombreuses sondes du pH mètre, nos allés retours dans le bunker (mmmmm, un délice !!!!). Merci pour tous ces ragots !!! **Kayouski et Kamok**. Merci **François** de m'avoir fait apprécier ces spiritueux d'exception. **Marie-Béa**, je ne m'appelle toujours pas Pierre ni David, mais Rémy. Merci d'avoir réussi à me supporter pendant ces trois longues années. Ce parcours fut très difficile, mais je te remercie pour ces trois années enrichissantes. Je ne me dis pas écophysiologiste, mais j'y ai goûté grâce à toi. **Marion, seconde miss ragot**. Merci d'avoir sauvé ces muscardins de la noyade suite à l'inondation à Hesse !!! Bonne route à toi, je continue à faire suivre les ragots via Jacqueline. **Miss mi-temps**. Merci à vous, et promis je vous embête plus, quoique **Momo et Léna**, Smeunemeu Merci smeucoup. Neumeu beaucoup. Signé le Nain ! **Nathalie de la cantine**, Merci pour ces suppléments de frites et de m'avoir laissé joué avec le lave-vaisselle version XXL, un moment unique. **Pascal, ou de son joli nom Obelbarbix**. Ben dis donc ! Tu viens plus aux soirées ? Oh t'a loupé, on a fait une soirée cigare !!! Qu'es ce qu'on a tiré, laisse tombé !!! Merci pour toutes ces années d'avoir été là pour m'aider à m'échapper de cet enfer. Merci de m'avoir fait découvrir le Corne d'Or et son kébab. Merci pour nos gavages au Bouche à Oreille, nos soirées cigares, poker, poème, pour cet excellent voyage polonais à la découverte des mets arrosés. A très vite, jte frais une TAAAAARRRRTTTTTE !!!!! **Pauline, Blandine, Jennifer et Silvère**. Merci d'avoir réussi à me supporter dans ce bureau malgré ma fâcheuse habitude de parler à moi même. Bonne route à tous ! **Rosine**, merci à vous et l'équipe administrative d'avoir répondu présent pour tous mes problèmes administratifs et de commandes. **Patrick Gross, le bricoleur. Rana, la princesse. Raph**. Obi-wan a aujourd'hui terminé sa formation. Depuis plusieurs années, tu suis mes traces et tu finiras par dépasser le maître. Merci à toi pour toutes ces années mon ami (5 ans déjà !!!). Jeune Padawan, c'est à ton tour de briller !!! **Jérem, Mr Spartine**. A toi de jouer maintenant Boy !!! **Valérie**, durant ces trois années, tu m'as suivi sur différents aspects (Microtome, Comité de thèse, TP 6.09). Merci pour tout ce que tu as apporté pendant ces trois années. Tu as toujours su être disponible pour mes innombrables interrogations. Je me souviendrais toujours de cette préparation de TP 6.09. On a réussi à le faire ce fameux Western !!! Merci ! **Yves**, je tiens à te remercier de m'avoir accepté comme moniteur à l'UHP pendant ces trois années. J'ai particulièrement apprécié travailler avec toi pour la préparation des TP, des TD et la correction des copies. Tu m'as conforté dans mon choix de poursuite professionnel. Merci encore. Par la même occasion, je tiens à remercier **Yvonne et Maryline**, merci d'avoir joué le jeu de la course effrénée jusqu'à la cantine. Je terminerais ces remerciements par un merci tout particulier à **Mr. WUE** ! Nos premières rencontres furent très difficiles à cause de la barrière de la langue. J'ai mis trois ans à essayer de te comprendre : Tu restes, à ce jour, un mystère pour moi mais promis je ne t'oublierais pas ! Et puis pour terminer, Merci à tous ce que je n'ai pas encore cité dont la liste est encore longue.

Abréviations

ABA : Acide abscissique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

APL : Altered Phloem Development

ARN : Acide Ribonucléique

ARNi : ARN interférent

ATP : Adenosine Tri-Phosphate

CDK : Cyclin-Dependant Kinase

CESA : Cellulose Synthase

GFP : Green Fluorescent Protein

GIP : GlpF-LIKE INTRINSIC PROTEINS

HIP : HYBRID INTRINSIC PROTEINS

KRP : Kinase-Related Protein

Lp : conductivité hydraulique membranaire

MIP : MAJOR INTRINSIC PROTEIN

NIP : NODULIN26- LIKE INTRINSIC PROTEIN

PCR : Réaction de polymérisation en chaine (Polymerase Chain Reaction)

PEG : Polyéthylène Glycol

Pf : perméabilité (osmotique) à l'eau

pH : potentiel hydrogène

PIP : PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN

PME : pectine méthylestérase

REGR : vitesse d'allongement relatif (Relative Elemental Growth Rate)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

SIP : SMALL INTRINSIC PROTEINS

TIP : TONOPLAST INTRINSIC PROTEINS

XEH : Xyloglucan endohydrolase

XET : Xyloglucan endotransglucosylase

XIP : UNCATEGORIZED X INTRINSIC PROTEINS

XTH : Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase

Listes des figures et tableaux

- Figure 1** : Organisation des différents tissus en couches cellulaires dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*.
- Figure 2** : Zone de croissance d'un apex de racine.
- Figure 3** : Les étapes de la mitose.
- Figure 4** : Formation du phragmoplaste et de la plaque cellulaire lors de la cytokinèse.
- Figure 5** : Régulations des étapes du cycle cellulaire.
- Figure 6** : Rôles de l'auxine dans la transition G1/S du cycle cellulaire.
- Figure 7** : Régulations hormonales du taux de différenciation des cellules méristématiques.
- Figure 8** : Synthèse des microfibrilles de cellulose.
- Figure 9** : Modes d'action des pectines méthylestérases (PME).
- Figure 10** : Induction du relâchement de la paroi primaire par l'auxine.
- Figure 11** : Expansion anisotrope contrôlée par le réseau de microtubules.
- Figure 12** : Compartimentation subcellulaire et voies de circulation de l'eau.
- Figure 13** : Structure d'une aquaporine.
- Figure 14** : Assemblage des aquaporines en tétramères.
- Figure 15** : Localisation subcellulaire des aquaporines.
- Figure 16** : Modèle hypothétique du rôle des modifications post-traductionnelles et des signaux de ciblage dans le trafic intracellulaire de AtPIP2;1.
- Figure 17** : Niveau d'accumulation des transcrits *ZmPIPs* le long de la racine du maïs.
- Figure 18** : Localisation des transcrits *ZmTIP1s* dans la racine du maïs.
- Figure 19** : Trafic symplasmique dans la zone de croissance d'*Arabidopsis thaliana*.
- Figure 20** : Reconstitution de l'expérience de Sachs (1882) sur une racine de potimarron.
- Figure 21** : Méthodes pour décrire la croissance.
- Figure 22** : Caractérisation de la croissance.
- Figure 23** : Analyse cinématique permettant l'accès à la vitesse de production cellulaire.
- Figure 24** : Description eulérienne ou lagrangienne d'une propriété dans la zone en croissance.
- Figure 25** : Pré-culture et suivi de la croissance globale de la racine.
- Figure 26** : Principe du logiciel Kineroot.
- Figure 27** : Etapes successives de la quantification des transcrits par PCR quantitative.
- Figure 28** : Principe de la technologie SybrGreen pour quantifier les transcrits.

Figure 29 : Analyse de la croissance en condition témoin.

Figure 30 : Analyse de la croissance sous stress osmotique modéré.

Figure 31 : Analyse de la croissance sous stress osmotique fort.

Figure 32 : Expression relative des gènes au sein des échantillons.

Figure 33 : Densité d'ARN total par millimètre (quantité mesurée dans chaque segment d'un millimètre) le long de l'apex de la racine du peuplier (ng mm⁻¹) après 75 h à 87 h de culture.

Figure 34 : Densités des transcrits PtTIP1 du peuplier au sein de l'apex de la racine en condition témoin.

Figure 35 : Densités des transcrits PtTIP1 du peuplier au sein de l'apex de la racine sous stress modéré (PEG 100 g L⁻¹).

Figure 36 : Densités des transcrits PtTIP1 du peuplier au sein de l'apex de la racine sous stress fort (PEG 200 g L⁻¹).

Figure 37 : Profils de densité de transcrits de PtTIP1;4 et Profils de REGR le long de l'apex.

Figure 38 : Profils de densité de transcrits de PtPIP2;6 et PtAPL le long de l'apex.

Figure 39 : Arbre phylogénétique des TIP1s de *Populus trichocarpa*, d'*Arabidopsis thaliana*, d'*Oryza sativa* et de *Zea mays*.

Figure 40 : Graphique représentant les valeurs moyennes de Ct du gène PtTIP1;2 mesurées à 75 et 78 h en fonction des valeurs moyennes de Ct mesurées à 84 et 87 h.

Figure 41 : Graphique représentant les densités moyennes d'ARN total (ng mm⁻¹) mesurées à 75 et 78 h en fonction des densités moyennes mesurées à 84 et 87 h.

Figure 42 : Vitesse d'accumulation d'ARN total le long de l'apex (ng mm⁻¹ h⁻¹).

Figure 43 : Vitesse d'accumulation de transcrits PtTIP1s le long de l'apex en condition témoin (u.a. mm⁻¹ h⁻¹).

Figure 44 : Vitesse d'accumulation de transcrits PtTIP1s le long de l'apex en condition stress modéré (u.a. mm⁻¹ h⁻¹).

Figure 45 : Vitesse d'accumulation de transcrits PtTIP1s le long de l'apex en condition stress fort (u.a. mm⁻¹ h⁻¹).

Figure 46 : Vitesse d'accumulation des transcrits PtPIP2;6 le long de l'apex dans les trois états de croissance (u.a. mm⁻¹ h⁻¹).

Figure 47 : Vitesse d'accumulation des transcrits PtAPL le long de l'apex dans les trois états de croissance (u.a. mm⁻¹ h⁻¹).

Figure 48 : Trajectoires de croissance.

Figure 49 : Trajectoires de croissance d'une particule.

Figure 50 : Représentations lagrangiennes de la vitesse d'accumulation des transcrits *PtTIP1;4* dans les trois états de croissance.

Figure 51 : Représentations lagrangiennes des vitesses d'accumulation des transcrits *PtAPL* et *PtPIP2;6* dans les trois états de croissance.

Tableau 1 : Plan des expérimentations.

Tableau 2 : Liste des gènes et amorces utilisés.

Tableau 3 : Contribution de chaque *PtTIP1s* par rapport à la population des *TIP1s* dans chaque segment de l'apex (%) en condition témoin.

Tableau 4 : Contribution de chaque *PtTIP1s* par rapport à la population globale des *TIP1s* dans chaque segment de l'apex (%) après 75 ou 78 h de stress modéré.

Tableau 5 : Contribution de chaque *PtTIP1s* par rapport à la population globale des *TIP1s* dans chaque segment de l'apex (%) après 75 ou 78 h de stress fort.

Sommaire

Introduction	1
I- Contrôles moléculaires de la croissance	4
I.1- Contrôles moléculaires de la division cellulaire	5
I.1.1- Contrôles de la mitose	5
I.1.2- Contrôles du cycle cellulaire	6
I.1.3- Contrôles hormonaux du taux de différenciation des cellules méristématiques	8
I.2- Expansion cellulaire : contrôles moléculaires des propriétés pariétales	9
I.2.1- Biosynthèse de la paroi primaire	9
I.2.2- Relâchement de la paroi	10
I.2.3- Rôle des microtubules dans l'expansion cellulaire	11
I.3- Expansion cellulaire : contrôles moléculaires de la conductivité hydraulique membranaire	13
I.3.1- Famille des aquaporines : classification et structure	13
I.3.2- Sélectivité du pore et statut ouvert/fermé du canal (Channel gating)	14
I.3.3- Localisation des aquaporines et adressage	16
I.3.4- Aquaporines et expansion cellulaire	17
I.3.5- Alimentation en eau de la zone en croissance	20
II- La cinématique, un outil pour décrire et analyser la croissance	23
II.1- La racine : un milieu continu	24
II.2- Analyse spatiale et temporelle d'une propriété au sein d'un organe en croissance	25
II.2.1- Caractérisation de la croissance	25
II.2.2- Détermination de la vitesse de variation d'une propriété au sein d'un organe en croissance	27
II.2.3- Précédentes utilisations de l'équation de continuité pour analyser la croissance	28
II.2.4- Spécifications eulérienne et lagrangienne d'une propriété	29
Objectifs	31
Matériel et Méthodes	36
I- Matériel végétal, conditions de pré-culture et de culture	37
II- Mesure de la croissance des racines	38
II.1- Suivi de la croissance	38

II.2- Détermination du profil de vélocité	38
III- Quantification de la densité de transcrits _____	39
III.1- Quantification des transcrits à haute résolution dans la zone de croissance de la racine	39
III.2- Expression normalisée et densité de transcrits	41
IV- Méthodes numériques _____	42
IV.1- Détermination du profil de REGR	42
IV.2- Détermination de la trajectoire de croissance	43
IV.3- Equation de continuité.....	43
IV.4- Traitements statistiques	44
<i>Résultats et Discussion</i> _____	45
I- Comment s'affranchir de l'hétérogénéité des paramètres de croissance le long de l'apex de la racine pour analyser la régulation de l'expression d'un gène ? _____	46
II- Croissance de la racine du peuplier sous déficit hydrique _____	62
II.1- Croissance en condition témoin	63
II.2- Croissance sous stress osmotique.....	64
II.2.1- Stress osmotique modéré.....	64
II.2.2- Stress osmotique fort.....	65
II.3- Discussion.....	65
III- Densités de transcrits le long de l'apex sous déficit hydrique _____	70
III.1- Densité de transcrits le long de l'apex	71
III.1.1- Expression normalisée des gènes.....	71
III.1.2- Densité d'ARN total le long de l'apex.....	72
III.1.3- Contribution relative des PtTIP1s le long de l'apex	73
III.1.4- Densité de transcrits PtTIP1 le long de l'apex.....	73
III.1.5- Densité des transcrits PtPIP2;6 et PtAPL le long de l'apex.....	75
III.2- Discussion	76
IV- Description spatiale et temporelle de la régulation de l'expression des gènes dans la zone de croissance sous déficit hydrique _____	80
IV.1- Description spatiale de la régulation de l'expression des gènes.....	81
IV.1.1- Stabilité temporelle de la densité de transcrits	81
IV.1.2- Description spatiale de la vitesse d'accumulation d'ARN total	82
IV.1.3- Description spatiale de la régulation de l'expression des PtTIP1s	82

IV.1.4- Description spatiale de la régulation de l'expression de PtPIP2;6 et PtAPL	83
IV.2- Description temporelle de la régulation de l'expression des gènes	84
IV.2.1- Trajectoire de croissance	84
IV.2.2- Représentation lagrangienne de la régulation de l'expression des gènes	86
IV.3- Discussion	87
<i>Synthèse et Perspectives</i>	90
<i>Références</i>	95
<i>Annexes</i>	118

Introduction

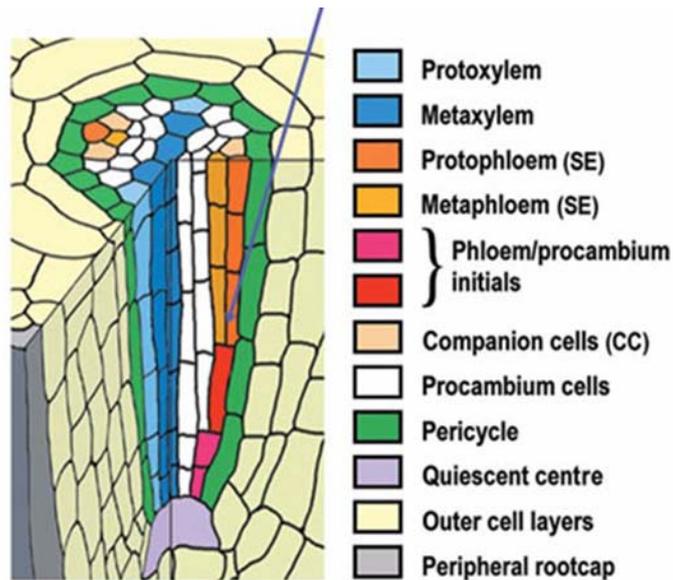


Figure 1 : Organisation des différents tissus en couches cellulaires dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*. Au cours de la croissance de la racine, les cellules méristématiques par des divisions concentriques génèrent des files de cellules qui constituent les différentes couches cellulaires. Les cellules les plus apicales sont inactives et constituent le centre quiescent. (Bonke *et al.*, 2003)

La croissance est l'ensemble des processus biologiques qui se traduisent par une augmentation irréversible des dimensions et du poids d'un individu ou des organes qui le composent. La croissance résulte de deux processus, la division cellulaire (mérèse) et l'expansion cellulaire (auxèse). Chez les végétaux supérieurs, la division cellulaire a lieu au niveau de régions spécialisées, les méristèmes. Le méristème primaire de la racine est histogène (Figure 1) : dans un plan radial, l'activité de division organise des couches cellulaires concentriques, distinguant les cellules qui au cours de leur maturation constitueront les différents tissus de la racine. De l'extérieur vers l'intérieur, ces tissus sont l'épiderme, le cortex, l'endoderme et le péricycle qui entourent le cylindre central. Alors que l'activité de division produit des cellules indifférenciées, l'expansion cellulaire post-mitotique constitue la première étape de différenciation cellulaire en impliquant vacuolisation et expansion cellulaire (Perrot-Rechenmann, 2010).

Ma thèse porte sur les contrôles moléculaires de la croissance en longueur de la racine. Dans une première partie introductive, je vais présenter, de façon non exhaustive, des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des processus cellulaires fondamentaux, division et expansion cellulaire. Mon objectif est de montrer que ces processus sont finement régulés et impliquent l'interaction de nombreux acteurs moléculaires. Pour illustrer mon propos, j'ai choisi de présenter quelques contrôles de la division cellulaire, en me focalisant sur le cycle cellulaire, son contrôle par les complexes cycline/kinases et par l'action des hormones sur le déroulement du cycle. Je présenterai ensuite les contrôles moléculaires impliqués dans la régulation de l'expansion cellulaire. Lockhart (1965) a établi un modèle biophysique de l'expansion cellulaire prenant en compte les aspects hydraulique et mécanique. L'augmentation relative de volume (assimilée au flux d'eau entrant) est fonction d'une force motrice, la pression de turgescence, et est contrôlée par l'extensibilité des parois et la conductivité hydraulique membranaire (L_p). Ainsi, j'illustrerai les contrôles moléculaires impliqués dans la régulation des propriétés pariétales, en particulier l'extensibilité des parois. L'accent sera ensuite porté sur les aquaporines, acteurs majeurs de la régulation de la conductivité hydraulique membranaire, et sur lesquelles portent spécifiquement mes travaux de recherche. Enfin, l'expansion cellulaire requiert une entrée massive d'eau qui doit être soutenue par un flux d'eau en direction de la zone en croissance. L'origine de ce flux sera discutée.

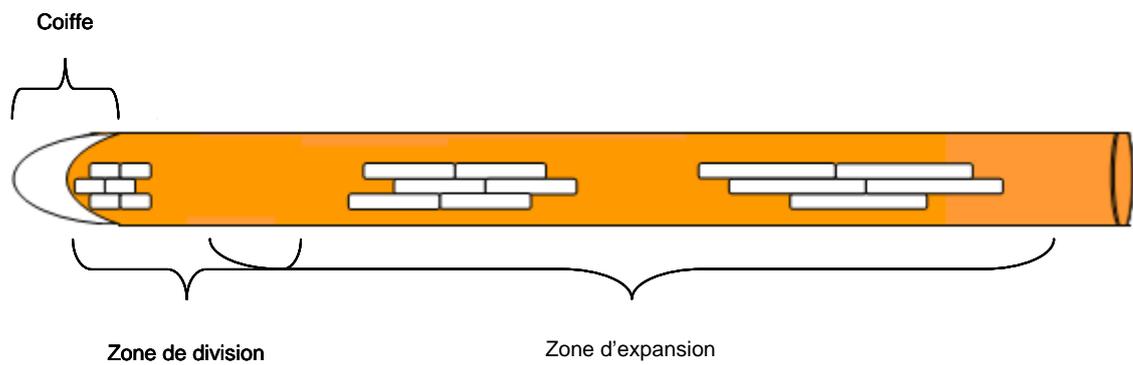


Figure 2 : Zone de croissance d'un apex de racine. La zone de croissance de la racine est constituée de deux zones chevauchantes, une zone de division et une zone d'expansion. Au-delà de la zone de croissance, les cellules ont atteint leur taille finale. La différenciation tissulaire a lieu dans la zone de maturation.

Dans la deuxième partie de l'introduction, j'exposerai les outils mathématiques, issus de la mécanique des fluides, qui permettent de décrire et analyser la croissance en considérant la racine comme un milieu continu. Je présenterai les méthodes de mesure et les paramètres permettant de caractériser la croissance. La croissance de la racine a lieu essentiellement dans les premiers millimètres proches de l'apex (Sachs, 1882). Hormis pour les premiers millimètres apicaux, la zone de croissance est assimilable à un cylindre de diamètre quasi constant. La zone de croissance peut être arbitrairement divisée, en regard du processus cellulaire prépondérant, en deux zones, une zone apicale de division et une zone d'expansion (Figure 2). Je présenterais un formalisme de la mécanique des fluides, l'équation de continuité, qui permet de calculer la dérivée matérielle d'une propriété, c'est-à-dire d'analyser la régulation d'une propriété au sein d'une zone en croissance. Cette seconde partie introductive met en évidence la nécessité d'utiliser ce formalisme pour analyser une propriété dans une zone de croissance, qui permet alors de décrire dans l'espace et le temps les variations de cette propriété.

I- Contrôles moléculaires de la croissance

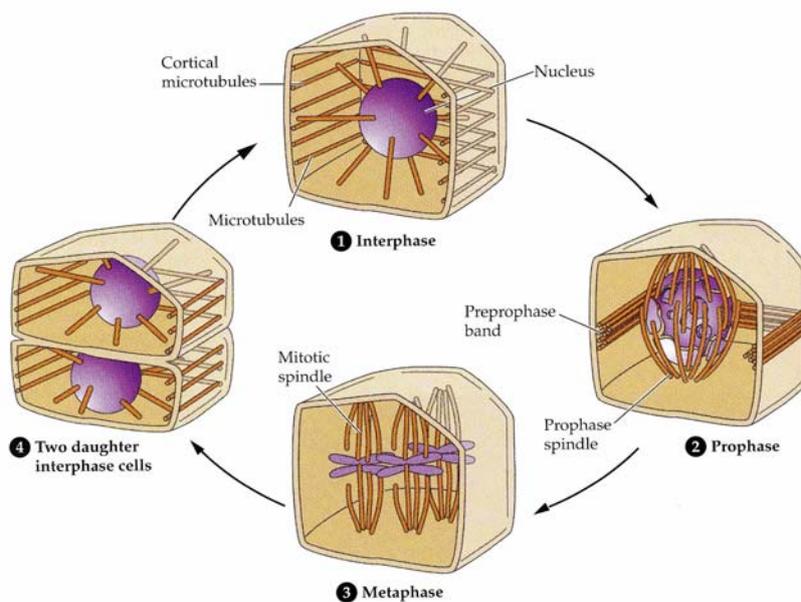


Figure 3 : Les étapes de la mitose. (Buchanan *et al.*, 2002)

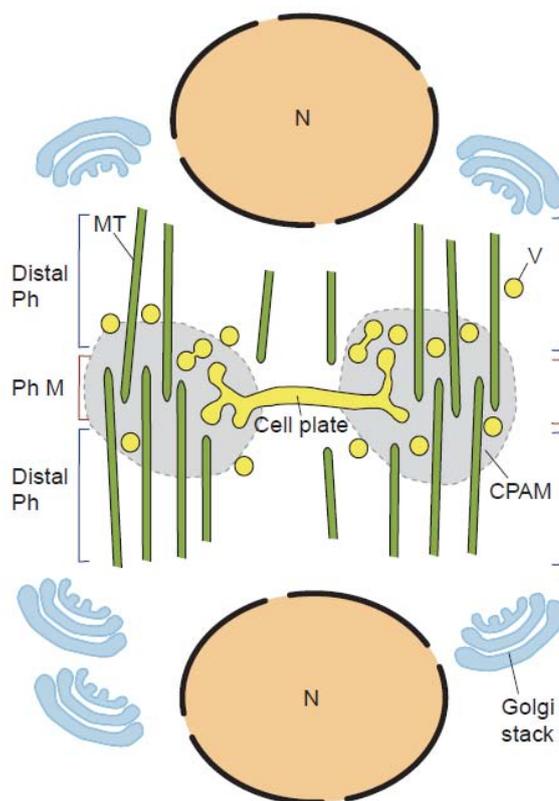


Figure 4 : Formation du phragmoplaste et de la plaque cellulaire lors de la cytokinèse.

N : noyau, MT : microtubules, V : vésicule, Ph : phragmoplaste, Ph M : phragmoplaste médian, Ph Distal : phragmoplaste distal, Cell plate : plaque cellulaire, CPAM : Matrice d'assemblage de la plaque cellulaire. (Otegui *et al.*, 2005).

1.1- Contrôles moléculaires de la division cellulaire

Le méristème apical de la racine est très organisé, cette structure comprend le centre quiescent, entouré d'un anneau de cellules initiales (Dolan *et al.*, 1993, Aeschbacher *et al.*, 1994, Figure 1). Le centre quiescent, composé de cellules qui se divisent peu fréquemment, est considéré comme un réservoir de cellules souches - pour renouveler des cellules initiales endommagées-, et comme le centre d'organisation du patron cellulaire (van den Berg *et al.*, 1997). Les cellules initiales sont localisées à la base apicale des files cellulaires (Doerner, 2000) et ont un caractère embryonnaire. Elles sont totipotentes et présentent une forte activité mitotique. La cellule initiale se divise et génère une nouvelle cellule initiale et une cellule fille qui subira un petit nombre de divisions, avant de se différencier (van den Berg *et al.*, 1997).

1.1.1- Contrôles de la mitose

La mitose se déroule en quatre étapes définies sur des critères cytologiques (Stern et Hotta, 1973 ; Figure 3). Plusieurs classes de molécules sont nécessaires à l'établissement de la compétence pour la mitose et au déroulement des quatre phases majeures. Les contrôles moléculaires de la mitose demeurent cependant peu étudiés chez les plantes (Doerner, 2000).

- *Prophase* : le matériel génétique se condense (par l'intermédiaire de protéines de cohésion, SCC1P, Gottschling et Berg, 1998), l'enveloppe nucléaire se dissout (suite à la phosphorylation des protéines situées à la face interne de la membrane nucléaire). Des fragments de membrane nucléaire forment des vésicules baignant dans le cytoplasme. Les microtubules (fibres constitutives du cytosquelette) sont réorganisés en un anneau cortical de préprophase (sur le plan de division cellulaire) et en un fuseau de prophase qui interagit avec les chromatides au niveau des kinétochores (complexes protéiques étroitement associés à l'ADN centromérique).

- *Métaphase* : l'anneau de préprophase disparaît. Le fuseau mitotique de microtubules positionne les chromosomes sur le plan équatorial de la cellule.

- *Anaphase* : les chromatides sœurs se séparent de façon synchrone (sous l'action de la topoisomérase) et migrent vers les pôles (sous l'effet mécanique du fuseau mitotique).

- *Télophase* : le fuseau mitotique disparaît. Des microtubules et des filaments d'actine néoformés, associés à des protéines motrices, respectivement de type kinesine et myosine, constituent le phragmoplaste. L'enveloppe nucléaire se forme autour des chromosomes décondensés.

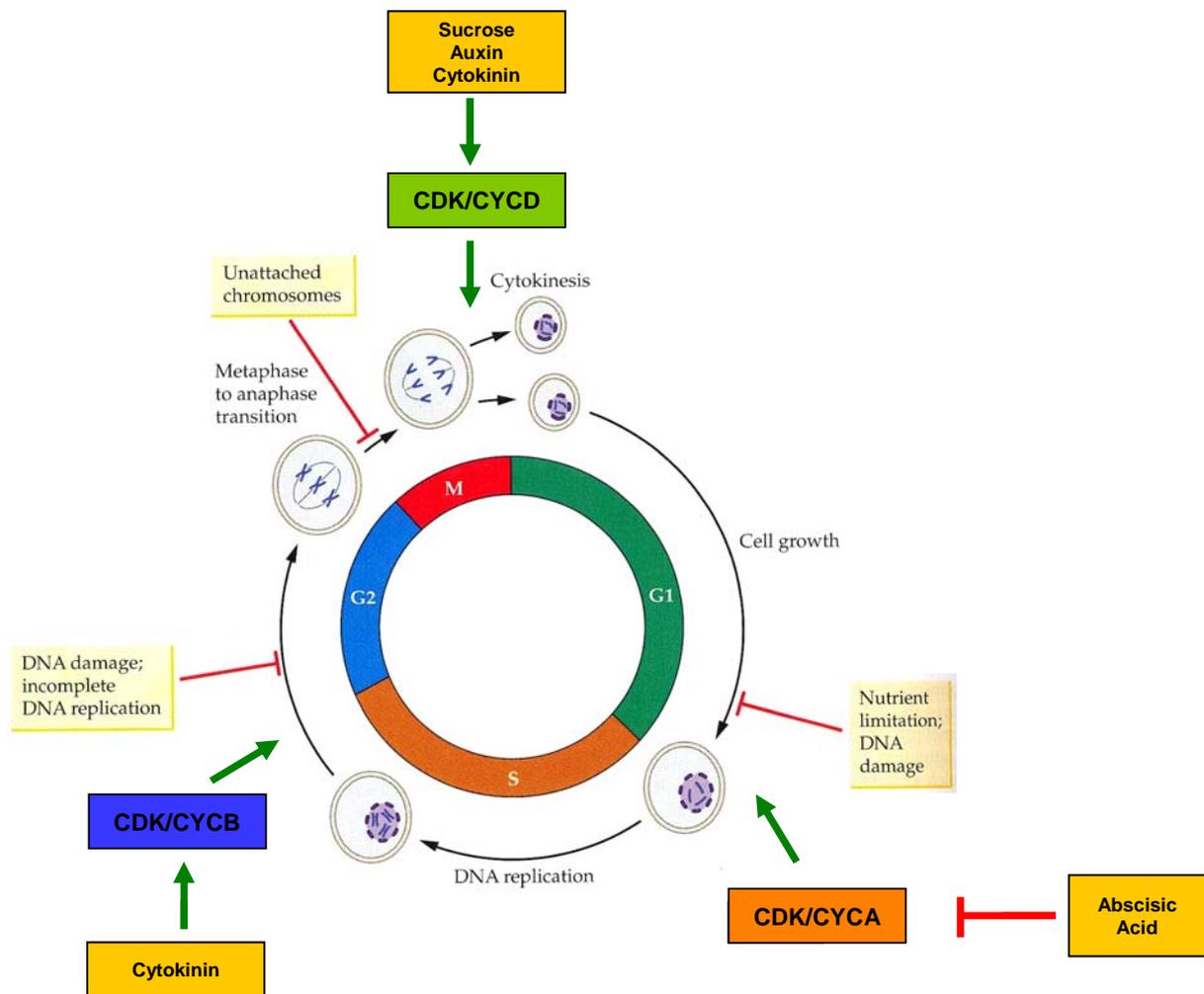


Figure 5: Régulations des étapes du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire se déroule en 4 étapes successives qui sont chacune sous le contrôle de complexe cyclin/cyclin-dépendant kinase CDK/CYC. Le passage de la phase G1 à S est assuré par le complexe CDK/CYCA. Ce complexe est inhibé en présence d'acide abscissique. La transition de la phase S à G2 est contrôlée par le complexe CDK/CYCB qui est induit en présence de cytokinine. La phase M est contrôlée par le complexe CDK/CYCD. Ce complexe est régulé par le saccharose, l'auxine et la cytokinine. (Adapté de Buchanan *et al.*, 2002).

• *Cytokinèse* : la plaque cellulaire, qui est un réseau tubulo-vésiculaire, se forme au plan équatorial de la cellule par fusion des vésicules de l'appareil de Golgi (Mayer et Jürgens, 2004). Cette plaque apparaît sous la forme d'un disque équidistant des deux noyaux. Son expansion est provoquée par la translocation latérale des microtubules du phragmoplaste et implique une fusion soutenue des vésicules de Golgi (Figure 4). Par son expansion centrifuge, la plaque rejoint la membrane de la cellule, séparant ainsi le cytoplasme en deux parts égales et la cellule mère en deux cellules filles. Des plasmodesmes primaires se forment entre les cellules filles par la constriction du réticulum endoplasmique au sein de la plaque cellulaire en croissance. Les microtubules reviennent en position corticale (Otegui *et al.*, 2005). Un trafic vésiculaire soutenu permet l'apport des constituants de base (polysaccharides et protéines, entre autre), nécessaires à la formation de la lamelle moyenne et de la paroi primaire.

1.1.2- Contrôles du cycle cellulaire

De la fin d'une mitose à la fin de la suivante, les cellules subissent un ensemble de phénomènes, correspondant au cycle cellulaire (Figure 5). Au cours du cycle cellulaire, les cellules exécutent deux événements fondamentaux: la réplication de l'ADN (phase S, pour synthèse) et le partage rigoureusement égal des chromosomes entre les deux cellules filles (phase M, pour mitose). Entre ces événements, il y a deux phases intermédiaires du cycle (Gap), les phases G1 (pré-synthèse, durant laquelle le volume cellulaire augmente) et G2 (post-synthèse et mise en place de la machinerie cellulaire nécessaire à la duplication de l'ADN). Hors de la zone de division, les cellules sont, en majorité, bloquées en phase G1 du cycle cellulaire (Beeckman *et al.*, 2001). L'ordre immuable de la succession des quatre phases du cycle, et l'obtention de deux cellules filles rigoureusement identiques (surveillance de l'ADN) repose sur la mise en jeu de systèmes de régulation (Jacobs, 1995).

La progression du cycle cellulaire dépend de la formation et de l'activation de différentes kinases hétérodimériques, constituées d'une sous-unité catalytique, CDK (Cyclin-Dependant Kinase) et d'une sous-unité régulatrice, la cycline (Loyer *et al.*, 2005). D'autres molécules interviennent dans différents mécanismes de surveillance, inhibant les CDK si l'étape précédente n'est pas terminée ou si une "réparation" est nécessaire (par exemple les Kinase-Related Proteins, KRP, Wang *et al.*, 2008). Plusieurs CDK interviennent tout au long du cycle selon un ordre déterminé (Dewitte et Murray, 2003) : lors du déclenchement de la réplication de l'ADN (en phase G1 et transition G1-S), lors de la réplication (en phase S), et lors du déclenchement et de l'exécution de la mitose (en phase G2 et transition G2-M).

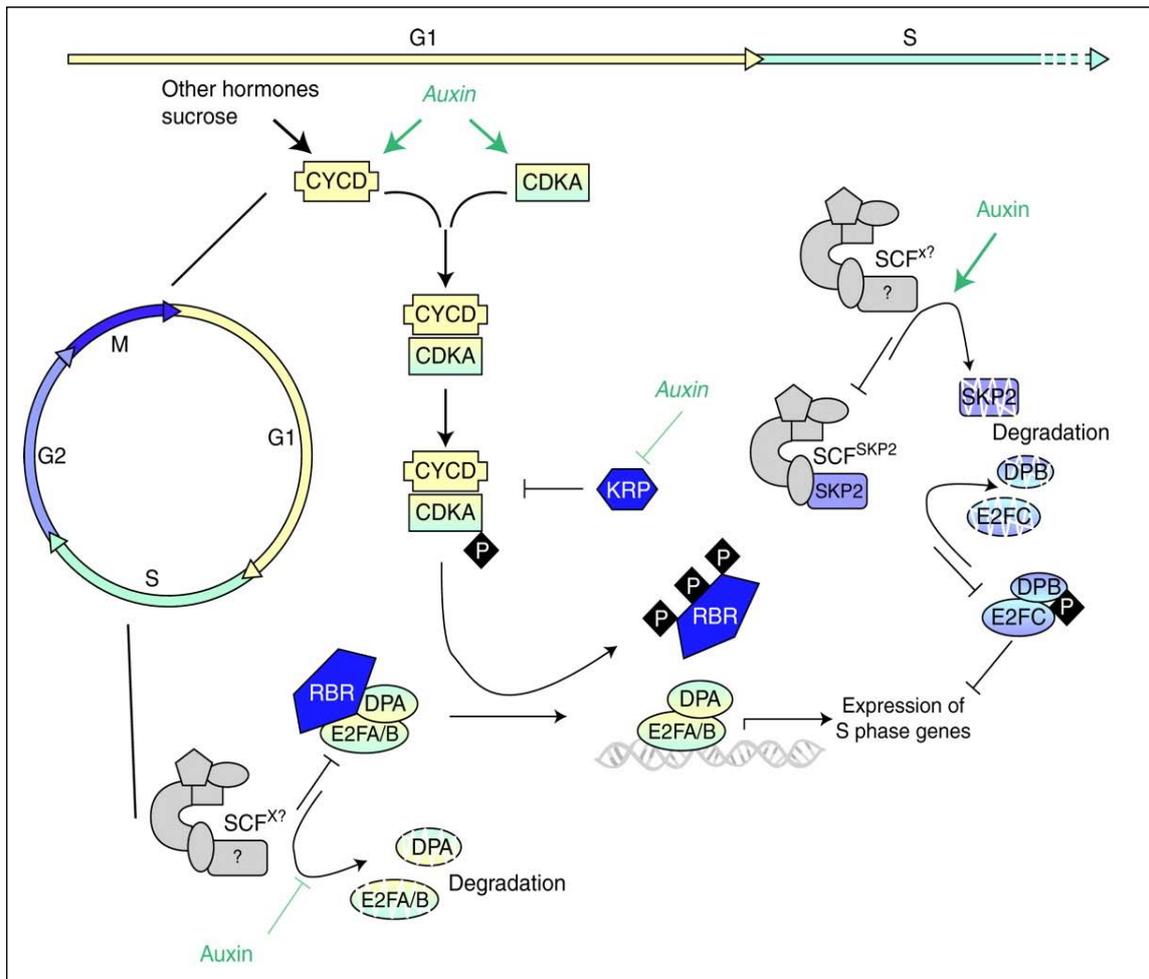


Figure 6 : Rôles de l'auxine dans la transition G1/S du cycle cellulaire. Le cycle est divisé en quatre phases: la réplication de l'ADN (S), la mitose (M), et deux phases Gap (G1 et G2, entre M/S, et S/M, respectivement). Pendant la phase G1, l'expression des cyclines de type D et des cyclines dépendant kinase (CDKA) est induite par divers signaux dont l'auxine. Le complexe CDKA/CYCD est activé par phosphorylation, mais peut être bloqué par des inhibiteurs de CDK, les KRP. L'auxine peut réduire l'expression de certains KRPs. Le complexe CDKA/CYCD phosphorylé provoque la phosphorylation du répresseur de transcription (RBR) favorisant ainsi l'expression des gènes essentiels pour le début de la phase S sous le contrôle du complexe E2FA/B et DPA. En fin de phase S, le complexe E2FC/DPB inhibent l'expression de ces gènes. La dégradation d'E2FC/DPB se déroule au cours de la phase S par le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{SKP2}. L'auxine stimulerait cette dégradation, et agirait donc indirectement sur la régulation de l'expression des gènes de la phase S (Perrot-Rechenmann, 2010).

L'activation des CDK dépend de leur association avec une cycline et de leur degré de phosphorylation (Jacobs, 1995). Les CDK catalysent la phosphorylation de protéines lors des événements du cycle cellulaire, tels que la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, la compaction des chromosomes et la réplication de l'ADN. L'activité CDK permet le transfert du groupement γ - phosphate de l'ATP vers une sérine ou une thréonine de la protéine cible si ces acides aminés sont dans une séquence consensus, spécifiquement reconnue par la kinase. La phosphorylation modifie la conformation des protéines cibles (Loyer *et al.*, 2005), et donc leurs propriétés (activation, inhibition, changement de partenaire d'interaction). Les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique, ce sont des protéines régulatrices nécessaires aux CDK pour que ces dernières soient actives. Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis l'identification de sept classes de CDK, nommées de A à G, et de sept classes de cyclines, nommées cycline A, B, C, D, H, P, T (Umeda *et al.*, 2005).

La progression du cycle cellulaire est affectée par les régulateurs de croissance, tels que les hormones et le saccharose (Figure 5). Un inhibiteur des CDK, ICK (inhibitor/interactor of cdc2 kinase), est induit en présence d'acide abscissique (ABA) bloquant ainsi le passage de la phase G1 à la phase S (Figure 5). L'ABA joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire notamment lors de déficit hydrique. Ainsi, la concentration en ABA, qui augmente dans la racine en réponse au déficit hydrique, stoppe le cycle cellulaire en phase G1 (Wang *et al.*, 1998). L'auxine joue un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire, elle agirait sur plusieurs cibles du cycle mais la compréhension de son action reste encore parcellaire. Lors de la transition G1/S, les sites d'action de l'auxine sont nombreux (Figure 6). Par exemple, l'auxine induirait l'expression de *CDKA;1* chez *Arabidopsis thaliana* (Hemerly *et al.*, 1993) et/ou réprimerait l'expression des *KRP* (KIP-related protein), inhibiteur des CDKs, dans les cellules de la racine (Richard *et al.*, 2001 ; Himanen *et al.*, 2002). L'auxine affecte aussi la régulation post-transcriptionnelle de certains composants du cycle cellulaire. Chez des cellules de tabac en suspension, l'auxine jouerait un rôle dans l'assemblage des complexes cyclin/CDK (Harashima *et al.*, 2007). D'autres hormones, les cytokinines, seraient aussi impliquées dans l'assemblage des complexes CDK/CYC-B ou D (Zhang *et al.*, 1996).

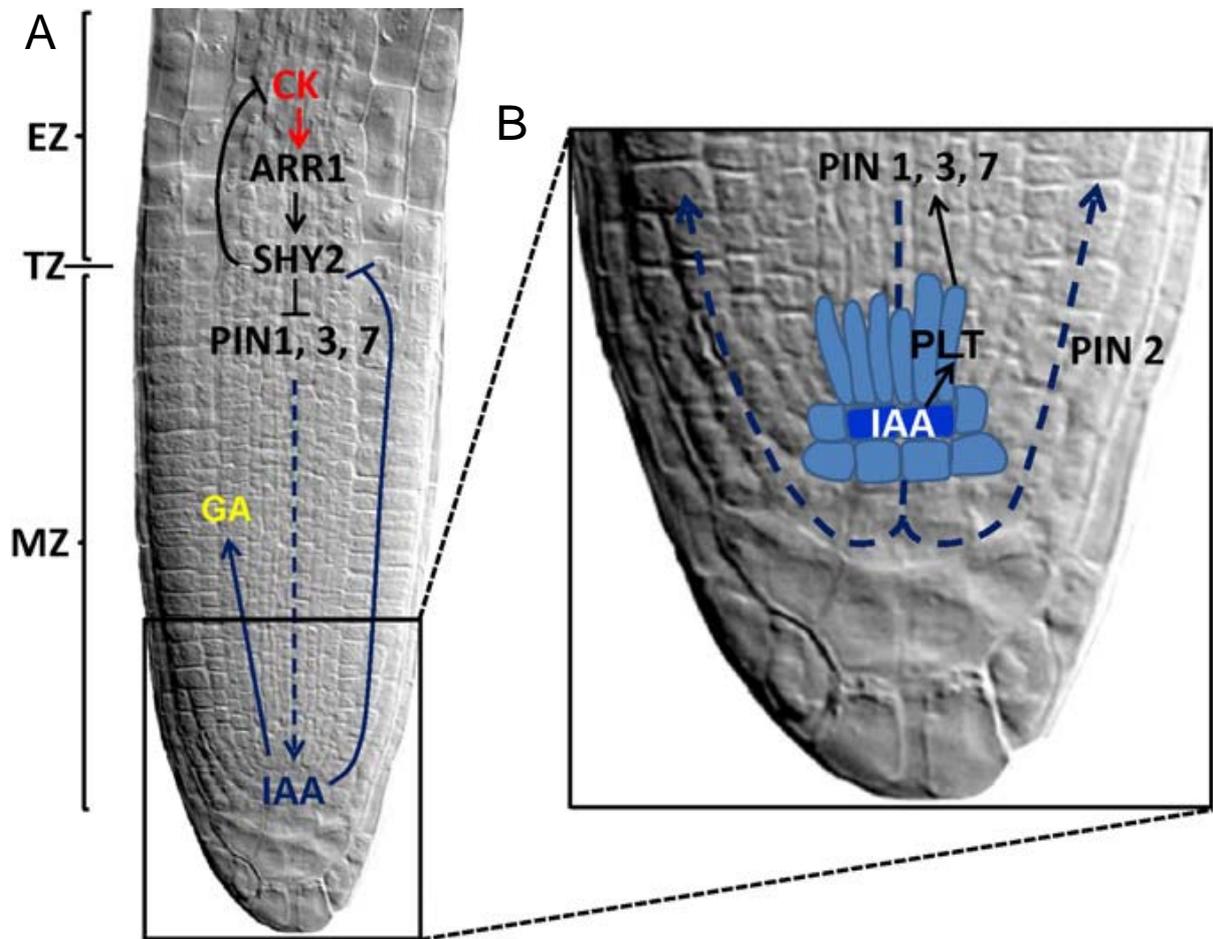


Figure 7 : Régulations hormonales du taux de différenciation des cellules méristématiques. **A.** Les cytokinines (CK) sont produites dans la zone d'expansion. Les cytokinines activent via les protéines ARR (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR) l'expression de *SHY2*. *SHY2* module la distribution de l'auxine (IAA), en réprimant l'expression des transporteurs d'auxine, *PIN*. Le transport d'auxine par les protéines *PIN* entraîne une accumulation d'auxine près du centre quiescent et des cellules voisines. L'auxine inhibe alors l'expression de *SHY2* au niveau de la zone de transition et régule la biosynthèse de l'acide gibbérellique (GA). **B.** *PIN1*, *PIN3* et *PIN7* transportent l'auxine jusqu'au centre quiescent. L'auxine stimule alors l'expression des facteurs de transcription, *PLETHORA* (*PLT*) qui stimulent à leur tour l'expression des transporteurs *PINs*. Les flèches en pointillés représentent les flux d'auxine. (Galinha *et al*, 2009).

1.1.3- Contrôles hormonaux du taux de différenciation des cellules méristématiques

La régulation de la croissance de la racine implique une interaction complexe, illustrée sur la Figure 7, des différentes voies de signalisation hormonale. L'auxine joue un rôle central dans la croissance des racines en organisant et maintenant l'activité de division au niveau du méristème (Benjamins et Scheres, 2008). Ceci est illustré par la diversité des phénotypes de mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en auxine (Hamann *et al.*, 2002 ; Blilou *et al.*, 2005). Le gradient de concentration d'auxine, qui culmine au niveau du méristème, résulte de l'activité des transporteurs PIN (Galinha *et al.*, 2009 ; Blilou *et al.*, 2005 ; Sabatini *et al.*, 1999 ; Grieneisen *et al.*, 2007). Le centre quiescent est établi durant l'embryogenèse à la suite de l'accumulation d'auxine (Friml *et al.*, 2003 ; Weijers *et al.*, 2006). Après la germination, l'accumulation d'auxine, au niveau du centre quiescent, agit comme « un repère de position », stimulant l'expression de facteurs de transcription, comme *SCARECROW* et *PLETHORA*, qui régulent la structuration et la taille du méristème (Blilou *et al.*, 2005, Sabatini *et al.*, 1999).

Les cytokinines ont longtemps été considérées comme des inhibiteurs de la croissance de la racine (Medford *et al.*, 1989 ; Mason *et al.*, 2005). En effet, les mutants déficients en cytokinines présentent des racines plus longues et des méristèmes ayant un nombre de cellules plus important, ce qui suggère que les cytokinines inhibent la prolifération cellulaire (Werner *et al.*, 2003 ; Miyawaki *et al.*, 2006). Récemment, il a été montré que le taux de cytokinines, en modifiant le gradient auxinique, provoque la différenciation cellulaire et contrôle la taille de la zone de division (Dello Ioio *et al.*, 2007, Ruzicka *et al.*, 2009). Cette interaction auxine/cytokinine résulterait d'un circuit de régulation simple, dépendant de l'abondance d'un répresseur de la signalisation auxinique, *SHY2* (Dello Ioio *et al.*, 2008). Les cytokinines favorisent la transcription de *SHY2* via les protéines ARR (*Arabidopsis Response Regulator*) tandis que l'auxine favorise la dégradation des protéines *SHY2* (Dello Ioio *et al.*, 2008 ; Tian *et al.*, 2002 ; Maraschin Fdos *et al.*, 2009). *SHY2* module la distribution de l'auxine, en réprimant l'expression des *PINs* et régule le gradient auxinique de manière cytokinine-dépendante (Dello Ioio *et al.*, 2008 ; Miyawaki *et al.*, 2004).

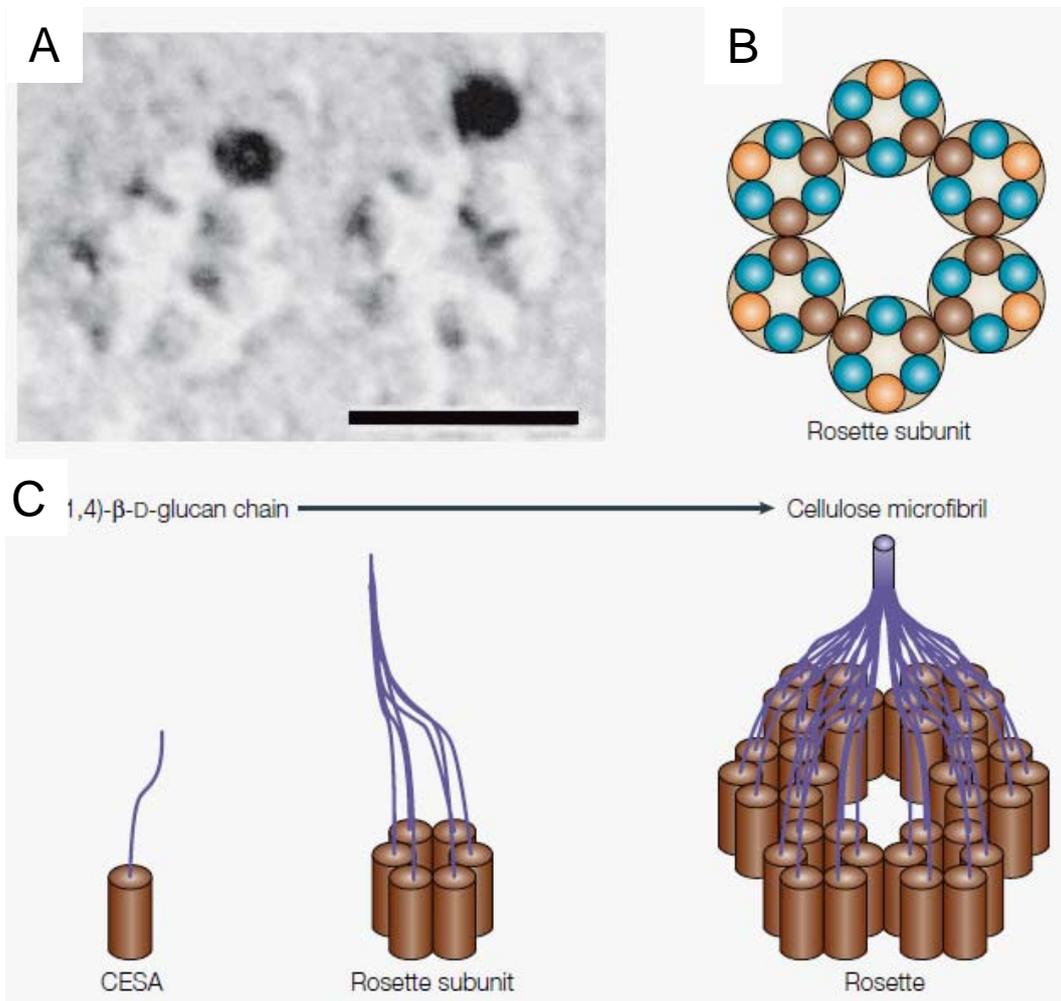


Figure 8 : Synthèse des microfibrilles de cellulose. **A.** Marquage par anticorps des CESA, localisées en rosettes hexamériques sur la membrane plasmique. Barre d'échelle, 30 nm. **B.** Modèle d'une rosette hexamérique formée de 6 sous unités, chacune est formée par 3 protéines CESA différentes (α , orange; β , brun, γ , vert). **C.** Modèle expliquant la synthèse des microfibrilles de cellulose. Chaque protéine CESA est capable de synthétiser une chaîne de (1,4)- β -D-glucane. Dans ce modèle, 36 chaînes de (1,4)- β -D-glucane sont formées par la rosette. (Cosgrove, 2005).

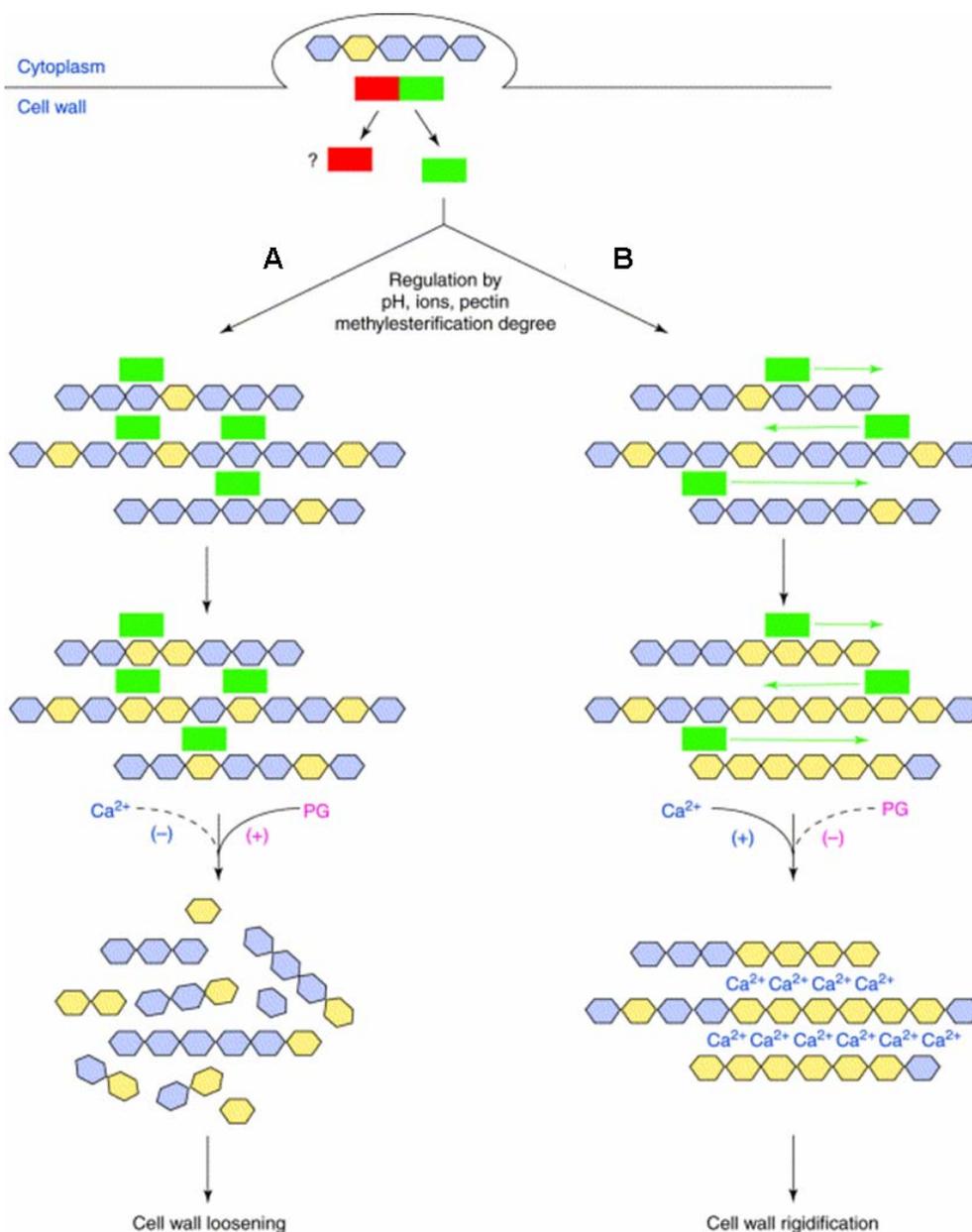
1.2- Expansion cellulaire : contrôles moléculaires des propriétés pariétales

Une des caractéristiques de la cellule végétale est d'être entourée par une paroi primaire pectocellulosique assez rigide, qui lui confère sa géométrie. La paroi primaire relie les cellules entre-elles, empêchant leur coulissement. L'augmentation des dimensions d'une cellule implique un accroissement de la surface pariétale avec une néosynthèse de composants de la paroi. S'il ne se produisait qu'une extension sans insertion de nouvelles macromolécules, la paroi s'affinerait au cours de l'expansion.

1.2.1- Biosynthèse de la paroi primaire

La paroi primaire est essentiellement composée de polysaccharides, sous forme de microfibrilles de cellulose et d'une matrice complexe d'hémicelluloses et de pectines (Cosgrove, 2005). Les microfibrilles de cellulose sont assemblées à la surface de la membrane plasmique. La synthèse de cellulose est catalysée par les cellulose synthases (CESA). Ces enzymes sont concaténées en sous-unités hexamériques, elles-mêmes assemblées en une rosette hexamérique localisée dans la membrane plasmique (Figure 8A). Chaque sous-unité hexamérique est formée par 3 isoformes CESA différentes (Figure 8B). Chez *Arabidopsis thaliana*, la synthèse de la paroi primaire requiert l'intervention de CESA1, CESA3 et CESA6 (Arioli *et al.*, 1998 ; Fagard *et al.*, 2000). Le substrat primaire des CESA est l'UDP-glucose, qui peut être synthétisé localement dans la membrane plasmique par une isoforme de sucrose synthase. Chaque protéine CESA synthétise une chaîne de (1,4)- β -D-glucane qui spontanément forme un faisceau de microfibrilles de 4 nm de diamètre (Figure 8C). Chaque microfibrille est assez longue pour parcourir la circonférence de la cellule à plusieurs reprises (Cosgrove, 2005). En raison de leur forte résistance à la traction élevée, les microfibrilles de cellulose sont les principaux déterminants de la rigidité pariétale. En outre, étant structurellement filamenteuses et en partie alignées en rangées parallèles, les microfibrilles de cellulose sont les principaux déterminants de l'orientation de l'expansion cellulaire : les cellules s'allongent difficilement dans la direction parallèle à la spirale de cellulose (Lloyd et Chan, 2004 ; Baskin, 2005 ; Cosgrove, 2005 ; Marga *et al.*, 2005 ; Kutschera et Niklas, 2007).

Entre les microfibrilles, la matrice de la paroi primaire est principalement constituée de pectines et d'hémicelluloses. Les polysaccharides de la matrice sont synthétisés dans l'appareil de Golgi et empaquetés dans des vésicules de sécrétion. Ces dernières fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les polysaccharides, qui sont directement intégrés à la paroi primaire. Contrairement aux microfibrilles de cellulose, les hémicelluloses sont



TRENDS in Plant Science

Figure 9 : Modes d'action des pectines méthylestérases (PME). Selon les propriétés de la paroi primaire, les PME (vert) peuvent soit **A.** favoriser l'action d'enzymes telles que les endopolygalacturonases (PG) et contribuer ainsi au relâchement de la paroi cellulaire, soit **B.** augmenter le nombre de groupements carboxyle (déméthylestérifiés) présents sur les molécules de pectine, qui interagissent avec les ions bivalents (Ca^{2+}), contribuant à la rigidification la paroi cellulaire. Les acides galacturoniques méthylestérifiés et déméthylestérifiés sont représentés en bleu et en jaune respectivement (Micheli, 2001).

ramifiées et cette caractéristique structurale, ainsi que leur capacité à se lier à cellulose, permet la constitution d'un réseau dense de microfibrilles de cellulose et d'hémicelluloses (Willats *et al.*, 2001 ; Cosgrove 2005). Plus généralement, à travers des interactions non-covalentes avec les microfibrilles de cellulose, la matrice contribue aux propriétés mécaniques et à la dynamique de la paroi primaire.

1.2.2- Relâchement de la paroi

Pour permettre une expansion cellulaire, il est nécessaire de « relâcher » la paroi primaire, c'est-à-dire la rendre extensible. La paroi étant composée de plusieurs types de molécules, plusieurs enzymes induisent ou limitent ce relâchement (Cosgrove, 1999). Les hémicelluloses principalement composées de xyloglucanes, peuvent être la cible des xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases (XTH) et des endo-(1,4)- β -D-glucanases (aussi appelées « cellulases ») (Fry *et al.*, 1992 ; Rose *et al.*, 2002). Les XTHs peuvent présenter deux activités distinctes, une activité d'endotransglucosylase (XET) ou une activité d'endohydrolase (XEH) (Rose *et al.*, 2002). Ces activités rompent les liaisons entre les glucanes et la cellulose et contribuent au relâchement de la paroi (Cosgrove, 2005).

Le relâchement de la paroi primaire est aussi sous le contrôle d'enzymes pH-dépendantes, appelées expansines. Le pH de la paroi primaire des cellules en croissance se situe généralement entre 4,5 et 6, optimum d'activité des expansines (Cosgrove, 1997). Lorsque les cellules sont exposées à une forte quantité d'expansines ou lorsque les gènes codant des expansines sont surexprimés, le taux de croissance cellulaire est augmenté (Fleming *et al.*, 1997; Pien *et al.*, 2001). A l'inverse, la diminution de l'expression des gènes codant les expansines diminue l'expansion des cellules (Cho et Cosgrove 2000; Choi *et al.*, 2003). Les expansines n'hydrolysent pas les polymères de la paroi, mais jouent un rôle dans l'affaiblissement des liaisons hydrogène entre les polysaccharides pariétaux et les microfibrilles de cellulose. Elles permettent ainsi un relâchement de la paroi et l'écartement des microfibrilles les unes par rapport aux autres (McQueen-Mason et Cosgrove, 1994, 1995; Cosgrove, 2005).

Les pectine méthylestérases (PME) peuvent aussi jouer un rôle important dans le relâchement de la paroi. Les pectines représentent un tiers de toutes les macromolécules de la paroi cellulaire (Willats *et al.*, 2001). Les pectines sont riches en acide galacturonique (Figure 9). Lorsque les pectines sont déposées au niveau de la paroi primaire, elles sont méthylestérifiées à 70-80% (Ridley *et al.*, 2001). Les PME suppriment les groupements méthyl-ester provoquant un affaiblissement des liaisons entre les résidus acides qui peuvent

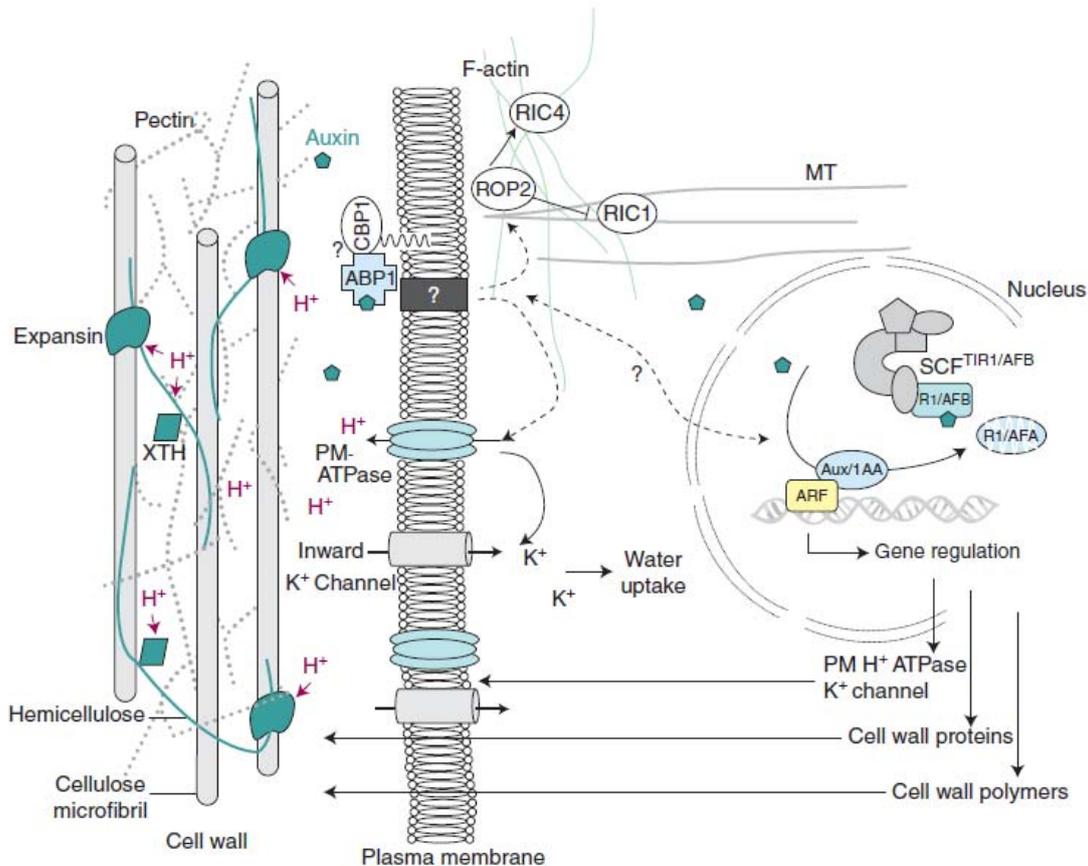


Figure 10 : Induction du relâchement de la paroi primaire par l'auxine. L'auxine est perçue par le récepteur ABP1, qui interagit avec des protéines membranaires inconnues associées à la membrane plasmique (un candidat potentiel est la protéine CBP1) (Shimomura 2006), déclenchant plusieurs cascades de signalisation. Une première cascade activerait les pompes à protons H^+ /ATPases, provoquant l'acidification de l'espace extracellulaire et l'activation des protéines associées à la paroi primaire comme les expansines et les endotransglycosylases xyloglucan/hydrolase (XTH). L'activation des pompes H^+ /ATPases induit également une hyperpolarisation de la membrane plasmique et l'activation des canaux K^+ , essentiel à l'absorption d'eau nécessaire à l'expansion. Une deuxième cascade potentiel entrainerait l'activation des facteurs de transcription AUX/IAA qui induirait l'expression des gènes codant des pompes H^+ /ATPases, des protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi. Ces facteurs de transcription peuvent être dégradés dans le noyau par le complexe E3 Ubiquitin Ligase $SCF^{TIR1/AFB}$. Une dernière cascade de signalisation est envisagée. Cette signalisation induirait la modulation des enzymes GTPases ROP (ROP2, RIC1, RIC4) qui agirait sur les réseaux d'actine et de microtubule (Perrot-Rechenmann 2010).

alors fixer le calcium ou des peptides. Dans ce scénario, compatible avec les données obtenues dans le tube pollinique et les hypocotyles, les PME rigidifient la paroi cellulaire et bloquent l'expansion (Jiang *et al.*, 2005 ; Derbyshire *et al.*, 2007 ; Röckel *et al.*, 2008). En revanche, en l'absence de calcium, la dé-méthylestérisation par les PME rendrait la paroi cellulaire plus extensible. Les PME agiraient donc comme des enzymes dont l'impact sur la rigidité pariétale dépendrait de la présence d'autres effecteurs. Pour ajouter en complexité, les PME constituent une famille multigénique, et chaque isoforme présenterait une activité dépendante du pH et du degré de méthylestérisation du substrat (Willats *et al.*, 2001).

Comme pour le contrôle de la division, les hormones jouent aussi un rôle dans le relâchement des parois. Un lien étroit entre le relâchement des parois et l'auxine a été montré (Figure 10), mais le mécanisme moléculaire déclenchant le relâchement des parois reste hypothétique. L'auxine serait perçue par le récepteur de l'auxine ABP1 (Auxin Binding Protein 1), qui interagirait avec des protéines inconnues associées à la membrane plasmique (un candidat potentiel serait la protéine CBP1, C-terminal peptide-binding protein 1, Shimomura, 2006). Cela activerait des pompes H⁺/ATPase, provoquant l'acidification de l'espace extracellulaire et l'activation des protéines de type expansines et XTH, qui, comme nous venons de le voir, interviennent dans le relâchement de la paroi primaire en agissant sur le réseau de polysaccharides de la paroi. L'activation de pompes induirait également une hyperpolarisation de la membrane plasmique et l'activation des canaux entrants K⁺, essentiels pour l'homéostasie cellulaire. L'auxine agirait aussi sur les microfilaments d'actine et les microtubules impliqués dans la polarité cellulaire (Xu et Scheres, 2005). L'auxine induit l'expression d'*AUXIN RESPONSIVE FACTORS* (ARF), qui stimuleraient en cascade la transcription des gènes codant différents composants de la paroi, des pompes H⁺/ATPase et canaux K⁺.

1.2.3- Rôle des microtubules dans l'expansion cellulaire

Bien que la pression de turgescence soit non directionnelle, l'expansion des cellules est anisotrope. En 1962, Green fut le premier à poser l'hypothèse d'une expansion anisotrope des cellules en croissance nécessitant un alignement précis du cytosquelette, notamment des microtubules, avec les microfibrilles de cellulose de la paroi. Il a mis en évidence qu'un traitement des cellules à la colchicine (agent désorganisateur des microtubules) désorganise les microfibrilles de cellulose et l'expansion des cellules. L'observation directe, par Ledbetter et Porter en 1963, d'un co-alignement des microtubules et des microfibrilles de cellulose a

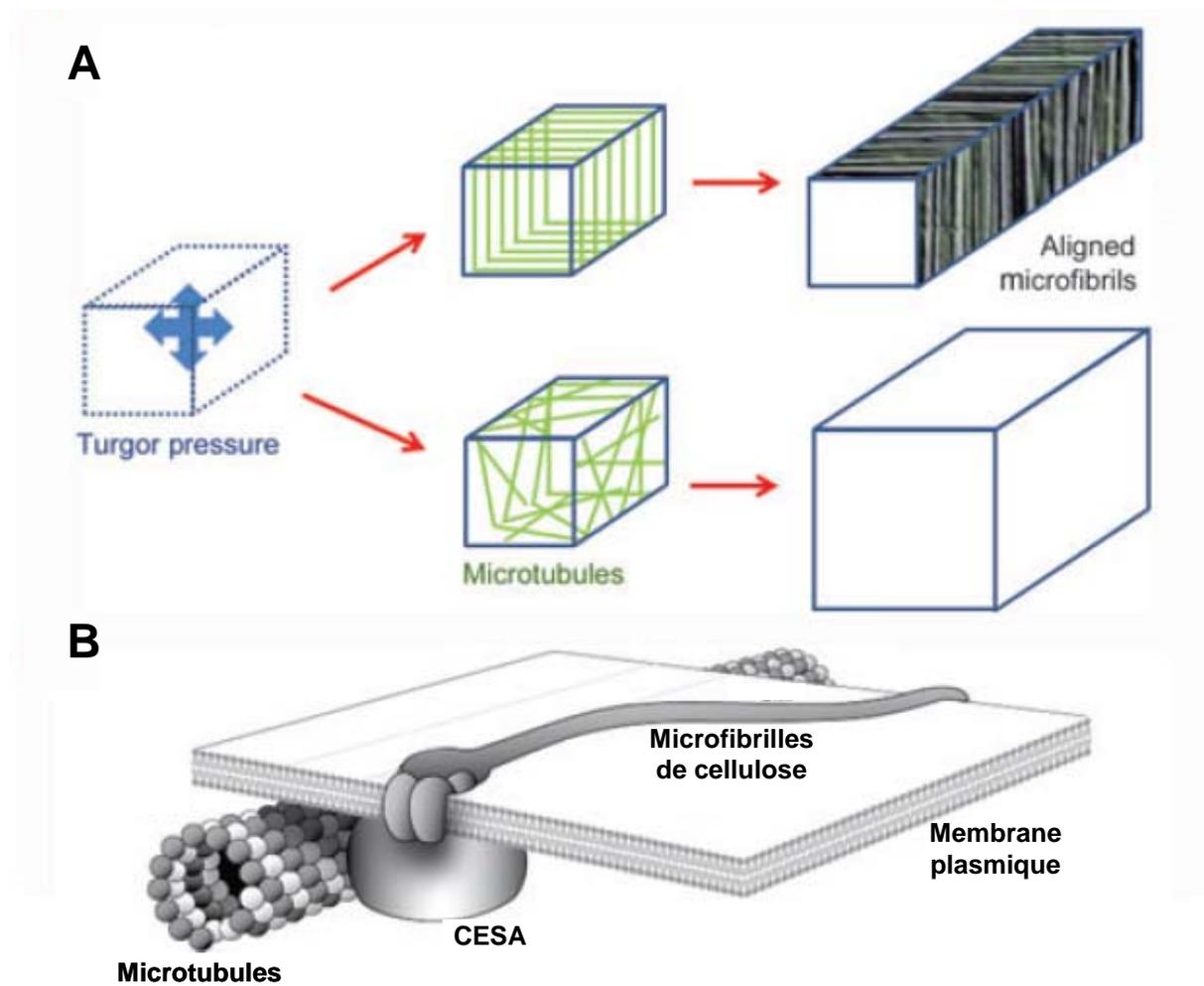


Figure 11 : Expansion anisotrope contrôlée par le réseau de microtubules. A. Effets de l’alignement des microtubules sur l’anisotropie. Bien que la pression de turgescence soit uniforme, l’alignement des microtubules permet la croissance anisotrope des cellules. **B.** Schéma de biosynthèse des microfibrilles de cellulose. Les cellulose synthase (CESA) placées sur la membrane plasmique près des microtubules synthétisent des microfibrilles de cellulose dans la direction similaire à celle des microtubules. (Adapté d’Hamant et Traas, 2010).

fourni les premières données pour confirmer un modèle de biosynthèse de la paroi cellulaire dans lequel l'alignement des microtubules détermine la direction de la synthèse des microfibrilles de cellulose (Figure 11). Le co-alignement des microtubules et des microfibrilles de cellulose dans la couche interne de la paroi primaire restreint l'expansion radiale et favorise l'expansion anisotrope des cellules de manière perpendiculaire à l'alignement des microfibrilles de cellulose. Cette hypothèse de co-alignement est soutenue par des expériences d'imagerie cellulaire dans lesquelles les cellulose synthases (CESA) et les microtubules corticaux sont colocalisés (Paredez *et al.*, 2006). De nombreuses études montrent l'importance des microtubules comme élément de structuration de l'alignement des microfibrilles de cellulose et de la croissance anisotrope (Baskin, 2005). Plusieurs études récentes renforcent l'idée que la production et/ou l'entretien du réseau de microtubules incluraient d'autres points de régulation de la machinerie de biosynthèse de la cellulose (revue par Hamant et Traas, 2010).

Une rétroaction de la machinerie de synthèse de la cellulose sur le réseau cortical de microtubules a aussi été proposée. Les cellules de tabac BY-2, traitées avec un inhibiteur de la synthèse de la cellulose, l'isoxaben, seraient incapables d'expansion anisotrope (Fisher et Cyr 1998). Des mutants affectés dans la synthèse de la cellulose, avec une expression modifiée de *cesa6* et *Korrigan*, seraient affectés dans l'orientation des microtubules : les cellules épidermiques des racines des mutants sont très allongées, et affichent des écarts d'orientation par rapport aux témoins (Paredez *et al.*, 2006). La modification de la conformation des microtubules chez un mutant « knock-out » *cesa2* d'*Arabidopsis thaliana* apporte un soutien supplémentaire à l'hypothèse d'une régulation du réseau de microtubules dépendante de celle des protéines CESA (Chu *et al.*, 2007). En outre, un traitement à la cellulase induit uniquement un gonflement cellulaire, sans incidence sur l'alignement des microtubules corticaux (Paredez *et al.*, 2006). Ce résultat indique que l'alignement des microtubules ne serait pas perturbé par une modification de l'association microtubules/microfibrilles de cellulose, mais surtout suggère la présence d'un facteur couplant l'activité CESA et la stabilisation du réseau de microtubules (Paredez *et al.*, 2006).

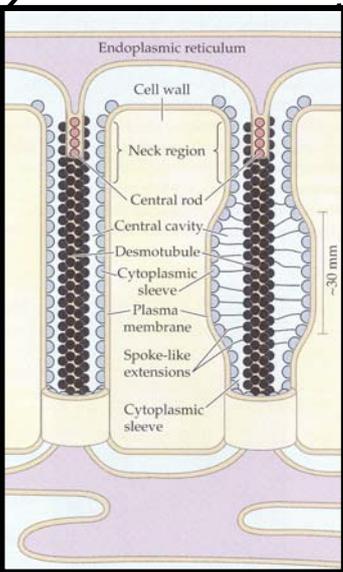
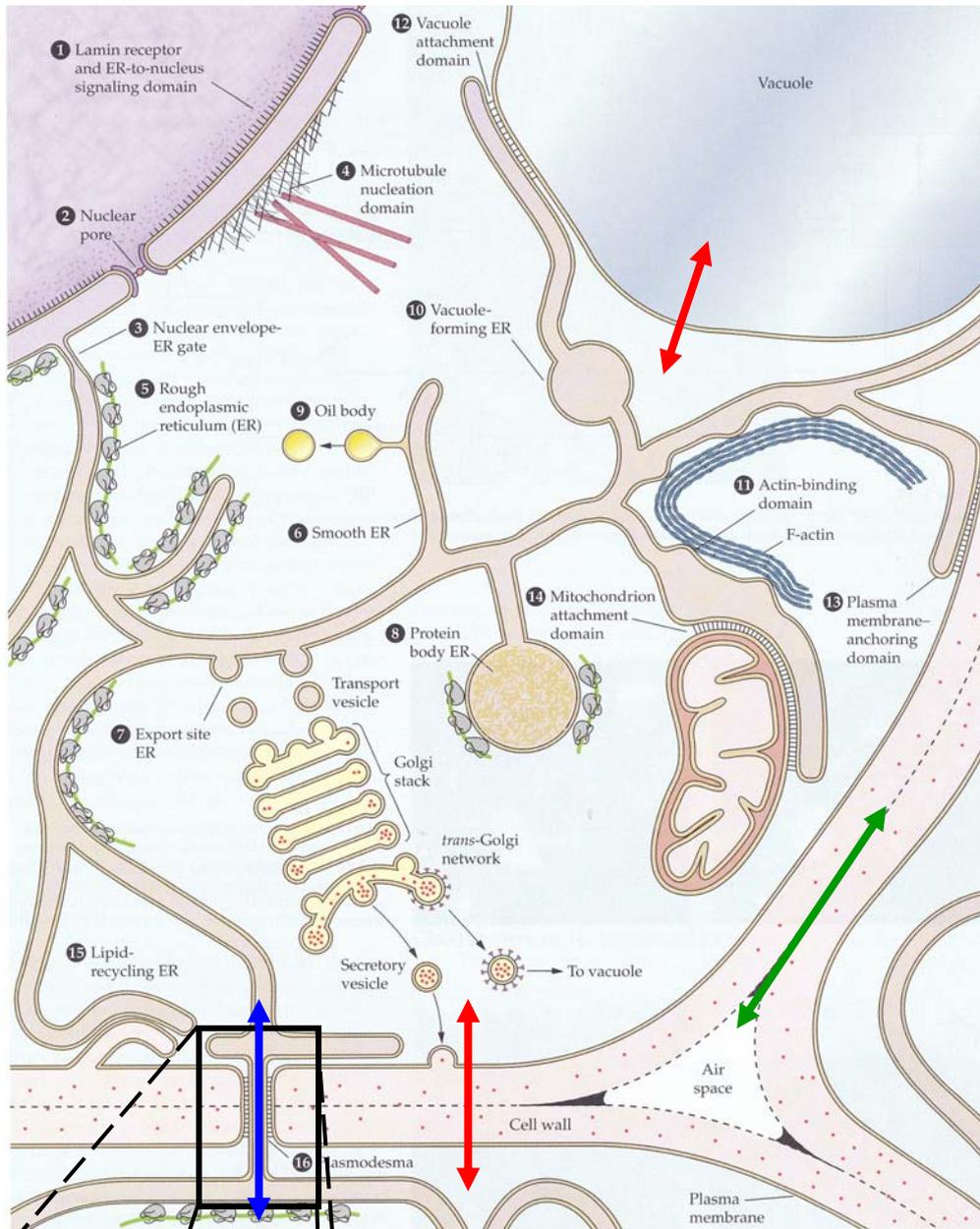


Figure 12 : Compartimentation subcellulaire et voies de circulation de l'eau. Les flèches symbolisent les voies de circulation de l'eau : Voie apoplasmique (vert), voie transmembranaire (rouge), voie symplasmique (bleu). L'encart présente la structure d'un plasmodesme. A travers ces plasmodesmes, les cellules sont interconnectées par le réseau du réticulum endoplasmique et le cytoplasme. (Adapté de Buchanan *et al.*, 2002).

1.3- Expansion cellulaire : contrôles moléculaires de la conductivité hydraulique membranaire

L'augmentation relative de volume cellulaire (assimilée au flux d'eau entrant) est fonction de la pression de turgescence (force motrice de l'expansion) et est limitée par l'extensibilité des parois et par la conductivité hydraulique de la membrane, L_p (Lockhart, 1965). L'importance de L_p en tant que « limiteur » de l'expansion cellulaire a été fortement discuté et reste en débat (Cosgrove, 1993 ; Boyer, 1985 ; Boyer, 1988 ; Pritchard *et al.*, 2000 ; Fricke, 2002 ; Boyer et Silk, 2004). Pour entrer dans la cellule en croissance, l'eau provenant de l'apoplasme doit traverser la membrane plasmique (voie transmembranaire). L'eau provenant d'une cellule adjacente pourra soit emprunter la voie symplasmique (via les plasmodesmes), soit la voie transmembranaire (Figure 12). En ce qui concerne la voie transmembranaire, l'eau peut diffuser au travers de la bicouche lipidique de la membrane. Néanmoins, la forte perméabilité de la plupart des membranes, y compris celle de la vacuole (tonoplaste), ne peut être expliquée par un simple phénomène de diffusion. Alors que les bases biophysiques du transfert de l'eau à travers les membranes ont été énoncées dans les années 1950, la découverte en 1992 de structures protéiques formant des canaux à eau, les « aquaporines », a lancé un nouveau champ de recherche (Preston *et al.*, 1992 ; Maurel, 2007). Les nombreuses avancées dans la compréhension de la structure et du fonctionnement des aquaporines démontrent le rôle des aquaporines dans le transfert de l'eau à travers les membranes et dans la gestion de l'équilibre hydrique de toute cellule vivante.

1.3.1- Famille des aquaporines : classification et structure

Les aquaporines font partie de la famille des protéines intra-membranaires, (MIP, MAJOR INTRINSIC PROTEIN), qui facilitent le transfert bidirectionnel de l'eau et de certains petits solutés à travers les membranes. Chez les végétaux, les aquaporines ont été initialement réparties en quatre classes. Chez *Arabidopsis thaliana*, la plus importante des classes, avec 13 isoformes, est celle des PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEINS (PIPs), subdivisées en deux clades phylogénétiques, PIP1 et PIP2. Chez *Populus trichocarpa*, les TONOPLAST INTRINSIC PROTEINS (TIPs) sont plus nombreuses que chez *A. thaliana* (17 versus 10 isoformes, respectivement). La 3^{ème} classe contient les NODULIN26- LIKE INTRINSIC PROTEINS (NIPs), initialement caractérisées dans les nodules de légumineuses, avec 9 isoformes chez *A. thaliana* et 11 isoformes chez *P. trichocarpa*. La 4^{ème} classe, les SMALL INTRINSIC PROTEINS (SIPs), comprend 3 isoformes chez *A. thaliana* et 6 chez

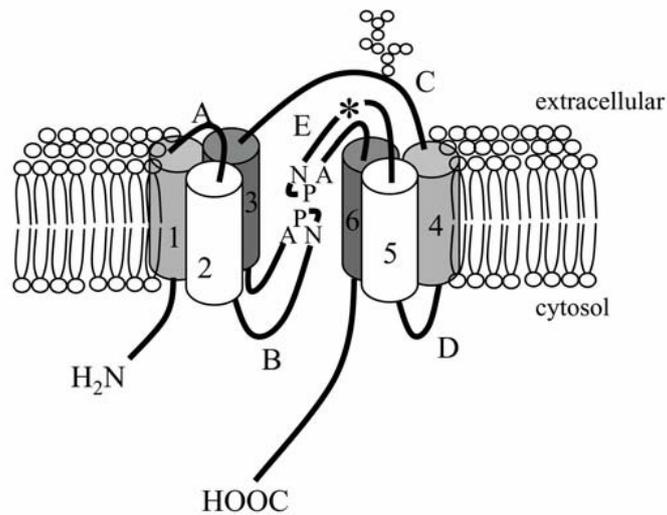


Figure 13 : Structure d'une aquaporine. Les six domaines transmembranaires (1-6) sont reliés par cinq boucles (A-E) et délimitent un pore central. Les motifs conservés, NPA, interagissent dans la région la plus étroite du canal. Un site de N-glycosylation se trouve dans la boucle extracellulaire (C). L'astérisque indique la position du résidu cystéine qui est responsable de la sensibilité au mercure. (Zardoya, 2005).

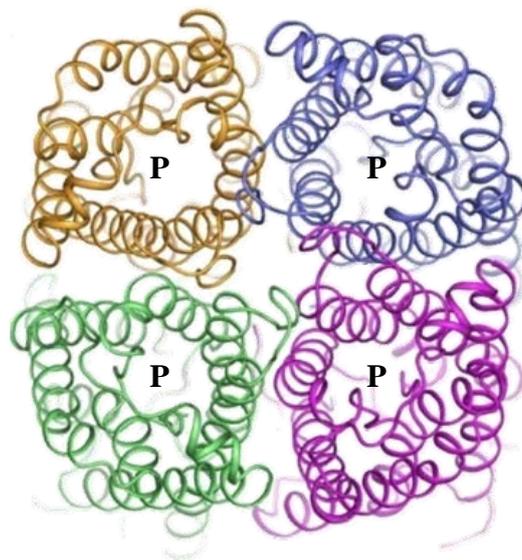


Figure 14 : Assemblage des aquaporines en tétramère. Les aquaporines s'assemblent sur les membranes en tétramère constituant une supramolécule contenant 4 pores (P). (Törnroth *et al.*, 2006).

P. trichocarpa (Gupta et Sankararamakrishnan, 2009). Lors de l'annotation de la famille chez la mousse modèle *Physcomitrella patens*, d'autres classes d'aquaporines ont été trouvées : celle des homologues des aquaglycéroporines bactériennes (GlpF-LIKE INTRINSIC PROTEINS, GIPs), celle des HYBRID INTRINSIC PROTEINS (HIPs), et celle des UNCATEGORIZED X INTRINSIC PROTEINS (XIPs) (Danielson et Johanson 2008). Des homologues XIPs ont été identifiés chez des végétaux supérieurs, notamment la pomme de terre et le peuplier, ce dernier présentant 6 isoformes (Sade *et al.*, 2008 ; Tuskan *et al.*, 2006 ; Gupta et Sankararamakrishnan, 2009). La détermination cristallographique aux rayons X de la structure 3D montre une structure hautement conservée des aquaporines microbiennes, animales et végétales (Fujiyoshi *et al.*, 2002 ; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Une aquaporine est une protéine monomérique de 23 à 31 kDa formant un canal dans les membranes plasmiques ou intracellulaires (Figure 13). Cette structure comporte six domaines transmembranaires inclinés dans le plan de la membrane et délimitant un pore central. Ces domaines transmembranaires sont reliés par cinq boucles (A-E) dont trois sont extracellulaires (A, C, E). Les boucles B et E présentent chacune un motif conservé Asparagine-Proline-Alanine (NPA). Des constriction du pore central sont générées d'une part par la proximité des deux motifs NPA et d'autre part un motif conservé aromatique/Arginine (Ar/R). Les extrémités N-terminale et C-terminale sont toutes deux exposées au cytosol. Des projections de structure déterminées par cryo-microscopie électronique montrent que les PIP et les TIP s'assemblent en tétramères dans leurs membranes natives (Figure 14), (Daniels *et al.*, 1999 ; Fotiadis *et al.*, 2001). Cette structure quaternaire résulte d'interactions hydrophobes entre monomères.

1.3.2- Sélectivité du pore et statut ouvert/fermé du canal (Channel gating)

Les aquaporines, PIPs, TIPs, NIPs et SIPs fonctionnent comme des canaux à eau. En effet, l'expression de ces aquaporines dans une levure ou d'un ovocyte de xénope augmente Pf^1 , le coefficient de perméabilité à l'eau (Ishikawa *et al.*, 2005 ; Kamaluddin *et al.*, 2002, Maurel *et al.*, 1993, Rivers *et al.*, 1997). Par ailleurs, la perméabilité à l'eau de protéo-liposomes est augmenté lorsqu'ils contiennent une aquaporine purifiée (Dean *et al.*, 1999 ; Karlsson *et al.*, 2003). Le transfert de l'eau à travers le pore de ces aquaporines est passif. Les

¹ La perméabilité (osmotique) à l'eau (Pf) est proportionnelle à la conductivité hydraulique membranaire (Lp) selon la formule : $Pf = Lp (R T / V_w)$ avec R , le nombre d'Avogadro, T , la température absolue et V_w , le volume molaire de l'eau (Maurel, 1997 ; Hertel et Steudle, 1997).

motifs NPA interagissent dans la zone la plus étroite du pore et empêchent la formation d'eau structurée, *i.e.* la formation de ponts hydrogène entre les molécules d'eau.

Des études d'expression hétérologue dans des ovocytes de xénope montrent que certaines isoformes d'aquaporines végétales transfèrent aussi de petits solutés tels que le glycérol (Biela *et al.*, 1999), l'urée (Liu *et al.*, 2003), le formamide, l'acétamide (Rivers *et al.*, 1997), l'ammoniaque, l'ammonium (Holm *et al.*, 2005), l'acide borique (Takano *et al.*, 2006), l'acide silicique (Ma *et al.*, 2006), l'acide lactique (Choi and Robert, 2007) et le peroxyde d'hydrogène (Bienert *et al.*, 2007). La spécificité du substrat peut être expliquée par l'exclusion de taille provoquée par deux motifs conservés, le motif aromatique/Arginine (Ar/R) et le motif NPA. L'imperméabilité remarquable des aquaporines aux protons peut être expliquée par une répulsion électrostatique au niveau de la constriction Ar/R, mécanisme le plus probable mais qui reste toujours débattu (de Groot et Grubmüller, 2005).

Le statut ouvert/fermé du canal des aquaporines (channel gating) est régulé par des effecteurs multiples incluant les protons, le calcium et la phosphorylation. Le transfert d'eau via AtPIP2;1 est réduit dans des protéoliposomes en variant le pH de 8 à 6 (Verdoucq *et al.*, 2008). Cette même étude met en évidence un lien entre le statut ouvert/fermé du canal et la présence de cations divalents. Le cadmium et le manganèse, en plus du calcium, ont été identifiés comme des inhibiteurs potentiels de l'ouverture d'AtPIP2;1. Des analyses de mutants suggèrent que l'inhibition de l'ouverture du canal par protonisation ou fixation d'ions divalents est liée par un mécanisme moléculaire commun. En particulier, l'histidine 199 est identifiée comme un site sensible aux protons (Tournaire-Roux *et al.*, 2003) et des résidus acides en position N-terminale seraient impliqués dans l'ouverture/fermeture du canal de manière proton-dépendante et calcium-dépendante (Tournaire-Roux *et al.*, 2003).

Des analyses de structure-fonction ont été menées dans des ovocytes de xénopes et plus récemment en considérant la structure atomique des SoPIP2;1 dans sa conformation ouverte et fermée (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Le rôle de la phosphorylation sur la régulation du statut ouvert/fermé du canal est visible lors de l'expression de protéines chimériques au sein d'ovocytes de xénope complétée par l'utilisation de kinases, de phosphatases, d'agonistes ou inhibiteurs. Ces approches ont montré le rôle de la phosphorylation dans l'ouverture/fermeture de PvTIP3;1, de GmNOD26 et de SoPIP2;1 (Daniels *et al.*, 2005 ; Guenther *et al.*, 2003 ; Johansson *et al.*, 1998, Maurel *et al.*, 1995). Les PIPs portent des sites de phosphorylation conservés et multiples (jusqu'à trois) dans la boucle B et des phosphorylations interdépendantes se produisent dans des sites adjacents des extrémités C-terminales. La substitution des sérines en position 7, 23 ou 99 en alanine au sein

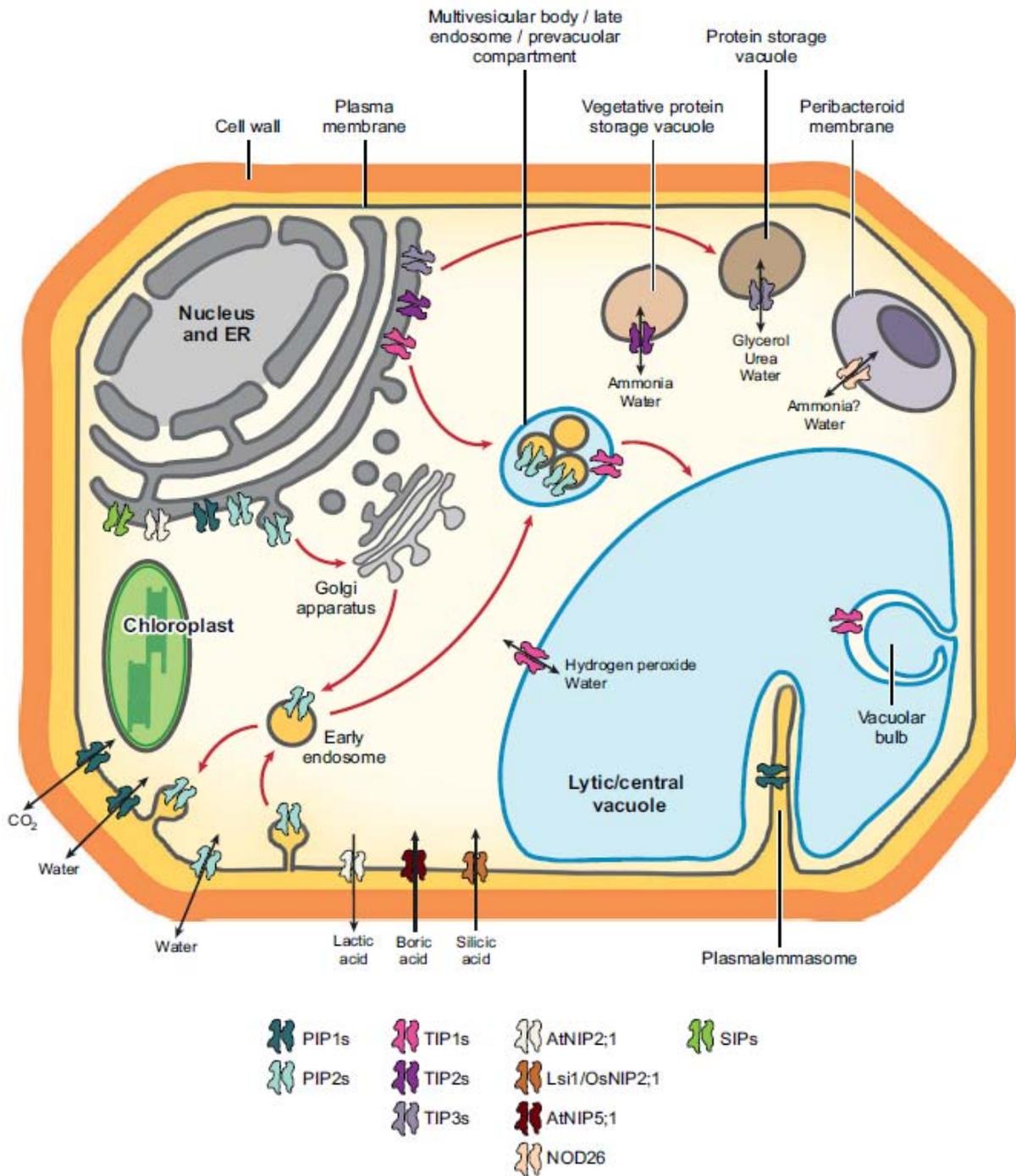


Figure 15 : Localisation subcellulaire des aquaporines. La figure illustre la variété des fonctions de transport réalisées par les aquaporines dans les différents compartiments subcellulaires. Les flèches rouges indiquent le trafic des aquaporines à l'intérieur de la cellule. (Maurel *et al.*, 2008).

de la séquence protéique de la TIP3;1 du haricot réduit la capacité de transfert d'eau (Maurel *et al.*, 1995). De plus, la phosphorylation de la sérine 115 ou 274 de la PIP2;1 de l'épinard active cette capacité (Johansson *et al.*, 1998).

La phosphorylation des aquaporines est dépendante des paramètres environnementaux. Le taux de phosphorylation de la PIP2;1 du soja diminue quand le potentiel osmotique diminue, suggérant une fermeture des canaux lors d'un stress osmotique (Johansson *et al.*, 1996). Le taux de phosphorylation de la sérine 262 de la NOD26 du soja est augmentée *in vivo* lors de stress osmotique et est dépendante du stade de développement du nodule (Guenther *et al.*, 2003). La température joue aussi un rôle important dans la régulation de la phosphorylation. Chez la tulipe, à 20°C, une phosphorylation calcium-dépendante de l'aquaporine facilite le transfert d'eau et l'ouverture des pétales. A 5°C, la déphosphorylation de l'aquaporine diminue les flux d'eau au sein des cellules et les pétales se ferment (Azad *et al.*, 2004).

1.3.3- Localisation des aquaporines et adressage

Les aquaporines sont présentes dans toutes les membranes des compartiments subcellulaires (Figure 15). Cette large localisation reflète le degré élevé de compartimentation cellulaire. Eau et solutés sont transférés non seulement à travers la membrane plasmique, mais aussi à travers les membranes intracellulaires. Le nom des différentes classes d'aquaporines suggère un adressage univoque à la membrane d'un compartiment. Toutefois, les différentes classes ne sont pas forcément adressées à un unique compartiment subcellulaire (Figure 15). Certaines NIPs sont localisées sur la membrane plasmique (Takano *et al.*, 2006). En revanche, les trois SIP d'*Arabidopsis thaliana* sont uniquement localisées dans le réticulum endoplasmique (Ishikawa *et al.*, 2005). Des études immuno-cytochimiques, utilisant des anticorps spécifiques anti-TIP, révèlent que différents types de vacuole peuvent coexister dans une même cellule et quelles sont équipées de combinaisons spécifiques d'isoformes de TIP (Jauh *et al.*, 1998). Les TIP1 et TIP2 sont préférentiellement associées aux vacuoles lytiques et aux grandes vacuoles accumulant des protéines de réserve, respectivement (Jauh *et al.*, 1998). AtTIP1;1 s'accumule dans des structures sphériques identifiées comme étant des invaginations intra-vacuolaires constituées d'une double membrane de tonoplaste (Saito *et al.*, 2002).

Comprendre les mécanismes d'adressage spécifique des aquaporines aux membranes et la spécialisation fonctionnelle associée est une question importante. Le trafic intracellulaire

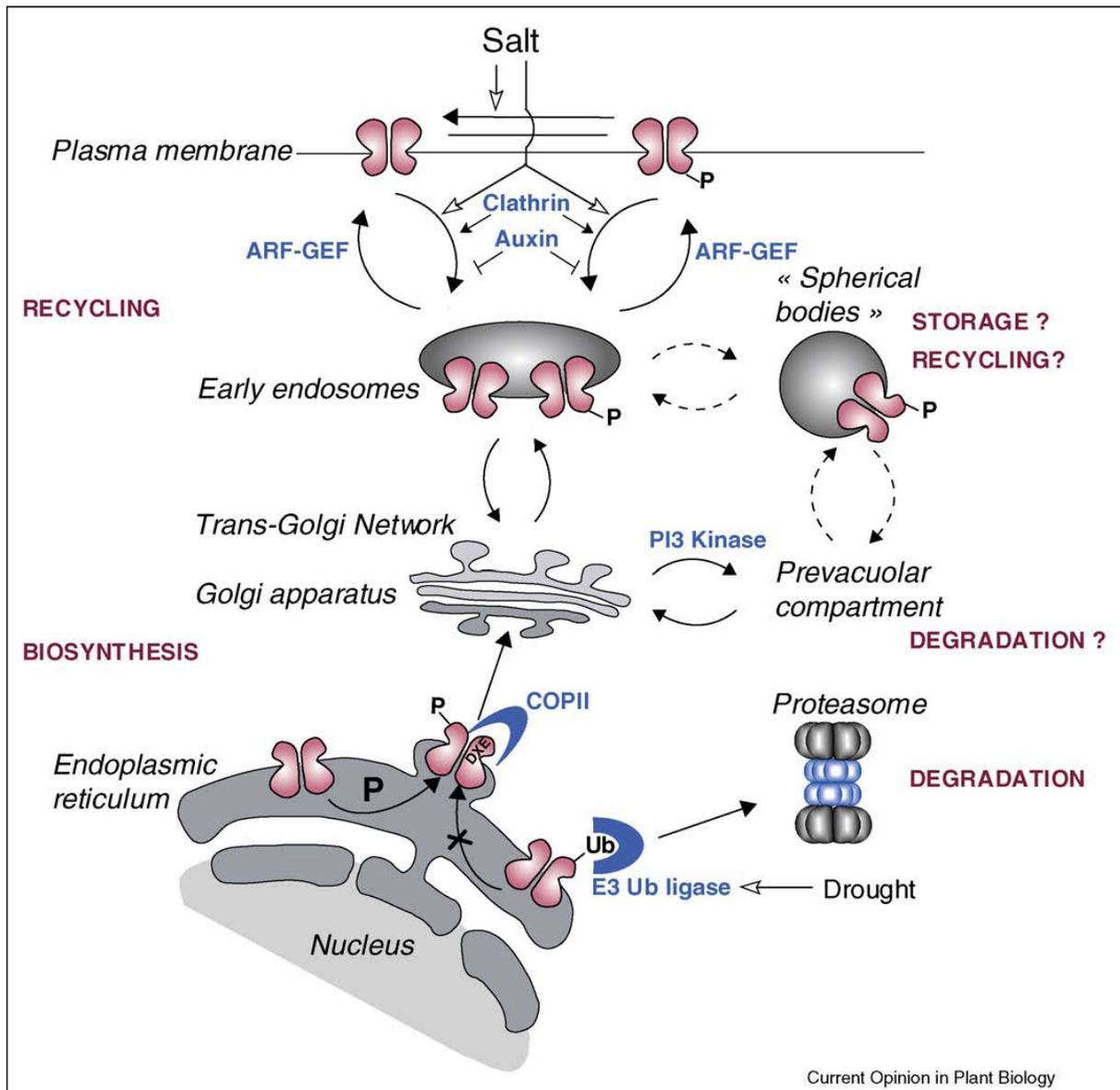


Figure 16 : Modèle hypothétique du rôle des modifications post-traductionnelles et des signaux de ciblage dans le trafic intracellulaire de AtPIP2;1. Suite à sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, AtPIP2;1 peut être i) dégradée par l'action du complexe d'ubiquitination (Ub), phénomène observé en condition de sécheresse (Lee *et al.*, 2009) ou ii) phosphorylée (P) sur la sérine 283 (Prak *et al.*, 2008). La reconnaissance d'un motif putatif diacide (DXE) par la protéine de capsid du complexe II (COPII) permet l'export de AtPIP2;1 puis son trafic à travers l'appareil de Golgi, jusqu'à la membrane plasmique. Un équilibre entre formes phosphorylées et déphosphorylées de AtPIP2;1 dans la membrane plasmique est atteint par l'action combinée des protéines kinases et phosphatases putatives. L'endocytose impliquant des vésicules recouvertes de clathrines est inhibée par l'auxine (Paciorek *et al.*, 2005 ; Dhonukshe *et al.*, 2007). L'exocytose implique des protéines de type ARF-GEF (Adenosine-Ribosylation-GTPases Exchange Factor), (Maurel *et al.*, 2009).

des PIPs a été étudié, depuis leur synthèse au niveau du réticulum endoplasmique jusqu'à leur membrane de destination, la membrane plasmique, via le réseau de sécrétion (Figure 16). Plusieurs mécanismes contrôleraient le trafic intracellulaire des aquaporines du réticulum endoplasmique jusqu'au Golgi. Des études sur la levure, les animaux et plus récemment les plantes, montrent que l'export des protéines membranaires au-delà du réticulum endoplasmique pourrait être dû en partie à un motif diacide (D/E-XD/E) présent sur la séquence protéique (Hanton *et al.*, 2005 ; Mikosch *et al.*, 2006 ; Sato et Nakano, 2007). Ces motifs diacides seraient reconnus par un complexe protéique (COPII pour COAT PROTEIN COMPLEX II) qui permettrait le transport des protéines par des vésicules d'export du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Sieben *et al.*, 2008). Certaines séquences PIPs arborent plusieurs motifs diacides dans leur région N-terminale et la fonction d'un de ces motifs a été montrée chez le maïs, pour ZmPIP2;4 et ZmPIP2;5 (Zelazny *et al.*, 2009). D'autre part, les aquaporines peuvent être phosphorylées en de multiples sites. Par exemple, AtPIP2;1 présente deux résidus adjacents phosphorylables (une sérine en position 280, Ser280, et en position 283, Ser283) dans la région C-terminale. Des mutations au niveau de ces résidus montrent que la phosphorylation de Ser283 est nécessaire pour éviter la rétention de AtPIP2;1 au niveau du réticulum endoplasmique (Prak *et al.*, 2008). Toujours au niveau du réticulum endoplasmique, des phénomènes de régulation par ubiquitination ont été rapportés: les aquaporines peuvent être reconnues par une ubiquitine ligase et dégradées par le protéasome. Cette dégradation peut être induite lors d'une sécheresse (Lee *et al.*, 2009). Au niveau de cellules rhizodermiques, un traitement à la brefeldine A, agent bloqueur du trafic des protéines depuis les endosomes vers la membrane plasmique, induit une accumulation de AtPIP2;1 dans des endosomes (Jaillais *et al.*, 2008) suggérant que le trafic des aquaporines de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane pourrait se faire via des endosomes.

Le trafic intracellulaire des aquaporines peut aussi être facilité par des interactions protéine-protéine entre aquaporines. Des analyses FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert, technique permettant d'observer des interactions protéine-protéine) chez le maïs montrent que les PIP1 et PIP2 interagissent pour faciliter leur trafic intracellulaire (Zelazny *et al.*, 2007).

1.3.4- Aquaporines et expansion cellulaire

L'implication des aquaporines dans la croissance des organes a été mise en évidence par l'utilisation de dérivés de mercure. Ces dérivés du mercure, qui agissent par oxydation en

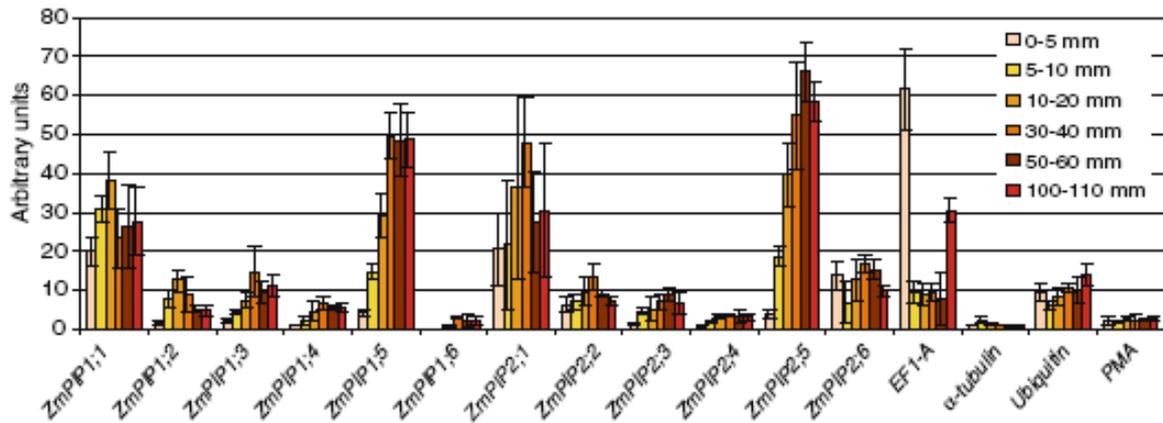


Figure 17 : Niveau d'accumulation des transcrits *ZmPIPs* le long de la racine du maïs.

La racine est coupée en segments : 0–5 mm (correspondant à la coiffe, au méristème et au début de la zone d'expansion), 5–10 mm (zone d'expansion), 10–20 mm (fin de la zone d'expansion, et début de la zone où se forment les poils racinaires), 30–40 mm (zone à poils racinaires), 50–60 mm (zone mature), and 100–110 mm (apparition de racines secondaires). Les niveaux d'accumulation de *ZmPIPs* et *EF1-A* (codant le facteur d'élongation alpha, utilisé comme marqueur d'activité méristématique) sont normalisés par les gènes de référence, α -tubulin, ubiquitin, et H^+ /ATPase (Hachez *et al.*, 2006a).

se fixant sur les résidus cystéine, sont utilisés pour occlure le pore des aquaporines et limiter ainsi le transfert d'eau. En 2002, Hukin et ses collaborateurs ont montré que l'application de chlorure de mercure ralentit la croissance des racines de maïs. Un traitement de 20 μM réduit l'expansion de la racine de 75%. Ce traitement affecte fortement l'expansion et la conductivité hydraulique membranaire des cellules en forte expansion [5-12 mm] mais n'affecte pas celles des cellules proches de l'apex [3 mm]. Ce résultat suggère l'implication des aquaporines dans le transfert d'eau au sein d'un tissu en croissance et la possible limitation de la croissance par la conductivité hydraulique membranaire. Par ailleurs, la perméabilité à l'eau des cellules en croissance du mésophylle ou de l'épiderme de feuilles d'orge est de 31 à 55% plus forte que celle des cellules matures (Volkov *et al.*, 2006).

La plupart des *PIPs* sont exprimées dans tous les tissus de la plante, et sont plus fortement exprimées dans les tissus en croissance (Maurel *et al.*, 2002). *AtPIP1;2* est exprimée préférentiellement dans la zone d'expansion et de différenciation de la racine d'*Arabidopsis thaliana* (Kaldenhoff *et al.*, 1995). Une forte expression des *PIPs* a été détectée dans les tissus en expansion de racines de tabac (Otto et Kaldenhoff, 2000), de l'hypocotyle d'haricot (Eisenbarth et Weig, 2005), des anthères et des pistils (Bots *et al.*, 2005, O'Brien *et al.*, 2002) et des feuilles d'orge (Fricke *et al.*, 2006, Wei *et al.*, 2007). Chez l'orge, alors qu'*HvPIP1;6* est préférentiellement exprimée dans la région basale de la feuille, i.e. dans la zone présentant la plus forte expansion, *HvPIP2;1* présente un patron d'expression inverse, suggérant un rôle prépondérant des *PIP1s* par rapport aux *PIP2s* dans l'expansion cellulaire (Wei *et al.*, 2007). Chez le riz, *OsPIP1A* et *OsPIP2A* sont plus fortement exprimées chez les jeunes plantules. De plus, leur expression est régulée par la lumière dans la racine primaire (Malz et Sauter, 1999). Durant l'expansion des pétales de rose, une forte accumulation des transcrits *RhPIP2;1* est observée dans les cellules épidermiques (Ma *et al.*, 2008). L'inhibition de l'expression de ce gène par des traitements éthylène ou dans des mutants « silencing », induit une réduction de la taille des cellules et réduit l'expansion des pétales. Chez le maïs, 12 des 13 *PIPs* sont exprimées dans la racine et leur expression dépend du stade de développement de la racine (Chaumont *et al.*, 2001, Hachez *et al.*, 2006a). Quelle que soit la position au sein de la racine, quatre *PIPs* (2 *PIP1* et 2 *PIP2*) sont fortement exprimées par rapport aux huit autres. L'expression des *PIPs* augmente avec la distance à l'apex jusqu'à 40 mm. Au delà leur expression se stabilise ou diminue (Figure 17).

Le flux d'eau nécessaire à l'expansion de la cellule traverse la membrane plasmique mais l'eau ne reste pas dans le cytosol, elle traverse une seconde membrane, le tonoplaste, entourant la vacuole. Le volume cytoplasmique est petit en regard de celui de la vacuole et du

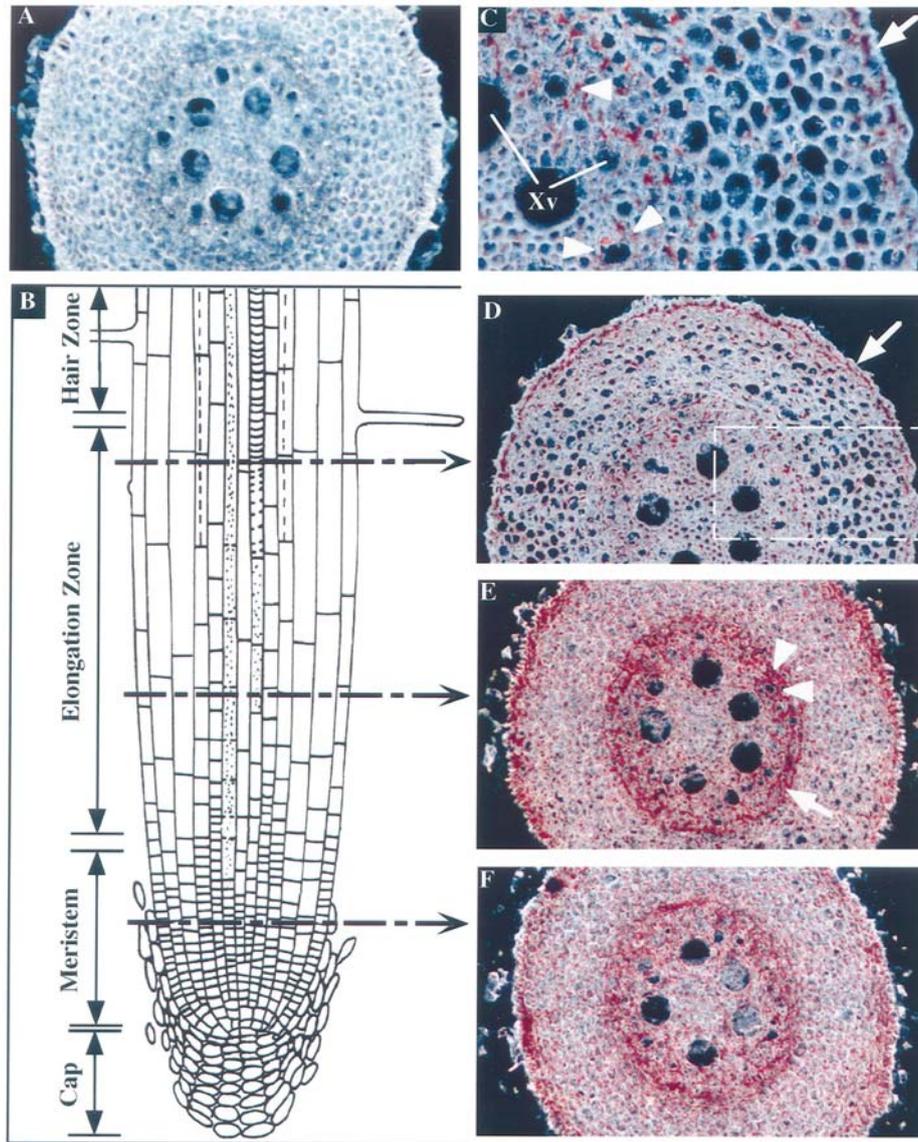


Figure 18 : Localisation des transcrits de *ZmTIP1* dans la racine du maïs. Les transcrits sont visualisés (en rouge) par hybridation *in situ* sur des sections transversales réalisées le long de la racine (A, C-F). **A.** Contrôle négatif. **B.** Représentation schématique de la section longitudinale d'une racine de maïs. Les flèches en pointillés indiquent la position des sections transversales D, E et F. **C.** Grossissement du cadre présent dans la figure D. **D.** Section transversale en fin de zone d'expansion. Les flèches blanches indiquent la position de l'épiderme. **E.** Section transversale au milieu de la zone d'expansion. Les flèches blanches indiquent la position de l'endoderme et du péricycle. Les triangles blancs indiquent l'accumulation des transcrits au niveau des cellules du parenchyme qui entourent les vaisseaux du métaxylème. **F.** Section transversale dans la zone de division. (Barrieu *et al.*, 1998)

volume cellulaire total. Au cours de l'expansion cellulaire, la taille de la vacuole augmente considérablement, jusqu'à occuper la quasi-totalité de l'espace cellulaire. Des mesures de transfert d'eau sur des vésicules de tonoplaste, isolées à partir de suspensions cellulaires de tabac ou de racines de blé révèlent la très forte conductivité hydraulique du tonoplaste (Maurel *et al.*, 1997 ; Niemietz et Tyerman, 1997). La conductivité hydraulique de la membrane plasmique est environ 6 fois plus faible que celle du tonoplaste, bien qu'une forte conductivité de la membrane plasmique ait été trouvée pour quelques types cellulaires et à certains stades de développement (Chaumont *et al.*, 2005 ; Maurel *et al.*, 2002). La différence de perméabilité entre la membrane plasmique et le tonoplaste est essentielle pour l'homéostasie cellulaire. En effet, le volume du cytoplasme ainsi que son potentiel osmotique sont rapidement ajustés en réponse à un changement externe de potentiel osmotique, et ceci est facilité par la forte conductivité hydraulique du tonoplaste, faisant de la vacuole une source pour ajuster les entrées et les sorties d'eau au niveau du cytoplasme (Cosgrove, 1993 ; Fricke et Chaumont, 2006 ; Maurel *et al.*, 2002 ; Tyerman *et al.*, 2002). Etant donné que le flux d'eau entrant dans la cellule traverse aussi la vacuole, il est permis de penser que les TIPs peuvent jouer, au même titre que les PIPs, un rôle important dans la régulation de l'expansion cellulaire.

Des approches d'hybridation *in situ* et de type 'gène rapporteur' (*pAtTIP1;1::GUS*), montrent une expression d'*AtTIP1;1* préférentiellement dans la zone d'expansion de la racine, aucune dans le méristème, ni dans la zone mature (Ludevid *et al.*, 1992). Par ailleurs, les transcrits *AtTIP1;1* s'accumulent en présence d'acide gibbérellique, hormone de croissance (Phillips et Huttly, 1994). Des approches utilisant l'ARN interférent (ARN qui interfère avec un ARN messenger spécifique conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine) ont été menées : les plantes subissant une régulation négative d'*AtTIP1;1* ont une croissance réduite (Ma *et al.*, 2004). *ZmTIP1;1*, orthologue chez le maïs d'*AtTIP1;1* est fortement exprimée dans les cellules en expansion de la racine, des feuilles et des organes reproducteurs (Chaumont *et al.*, 1998). La quantité de transcrits *ZmTIP1;1* est aussi abondante dans les cellules de l'épiderme et dans les tissus conducteurs (Figure 18, Barrieu *et al.*, 1998). Les TIPs sont fortement exprimées dans les tissus en expansion de l'hypocotyle de soja, de haricot, et de jeunes plants de radis (Eisenbarth et Weig, 2005 ; Higuchi *et al.*, 1998 ; Suga *et al.*, 2002), pendant l'expansion de la tige de tulipe (Balk et de Boer, 1999) et pendant la croissance du fruit chez le pois (Ozga *et al.*, 2002). Une augmentation de la quantité de transcrits d'*HvTIP1;1* est observée chez le mutant *slender* dont la croissance des feuilles est accélérée par rapport au témoin (Schünmann et Ougham, 1996). La surexpression d'une TIP

dans des protoplastes de tabac induit une augmentation de la taille des cellules (Reisen *et al.*, 2003). Dans des protoplastes de tabac, la surexpression de *TIP1;1* accélère à la fois la régénération de la vacuole et l'expansion cellulaire (Okubo-Kurihara *et al.*, 2009). Ces études soulignent la bonne corrélation entre l'expression des *TIPs* et l'expansion cellulaire.

1.3.5- Alimentation en eau de la zone en croissance

L'origine de l'eau nécessaire à l'expansion cellulaire dans la zone en croissance fait l'objet d'un débat depuis longtemps. L'expansion cellulaire requiert un apport massif d'eau qui doit être soutenu par un flux d'eau en direction des cellules en croissance. Dans le cas des racines, une première hypothèse envisageait que l'alimentation en eau de la zone de croissance résultait du transfert direct de l'eau du sol qui entoure la zone de croissance, radialement vers les cellules internes en croissance (Silk et Wagner, 1980). Cependant, cette hypothèse est partiellement remise en question. En effet, la croissance des racines adventives du maïs, du riz, et d'autres graminées, qui se développent en partie à l'air, suggère que le flux d'eau nécessaire à l'expansion des cellules des racines ne provient pas uniquement du milieu entourant la racine (Westgate et Boyer, 1985). D'autre part, la comparaison des patrons de potentiels hydriques mesurés avec des potentiels hydriques générés par des modèles - considérant une source d'eau soit strictement périphérique à la zone de croissance, soit périphérique et interne (via les tissus matures en amont)- soutient l'hypothèse d'une source d'eau multiple « externe et interne » pour l'apex en croissance (Boyer et Silk, 2004 ; Wieggers *et al.*, 2009). L'eau alimentant la zone de croissance proviendrait à la fois de la périphérie de l'apex et des tissus matures via le protophloème. Cette hypothèse est soutenue par des études empiriques et théoriques qui tendent à montrer que le flux phloémien fournissant les solutés et les macromolécules nécessaires à l'expansion cellulaire dans la zone en croissance de la racine, fournit aussi une quantité d'eau proche de celle nécessaire à l'expansion (Bret Harte et Silk, 1994 ; Frensch et Hsiao, 1995 ; Pritchard, 1996 ; Pritchard *et al.*, 1996 ; Hukin *et al.*, 2002 ; Gould *et al.*, 2004).

Si le flux d'eau arrive *via* le protophloème jusque dans la zone de croissance, le contrôle de la différenciation de ce dernier pourrait être un élément clé pour maintenir un flux d'eau en direction des cellules en croissance. Durant l'embryogenèse, les cellules procambiales subissent des divisions coordonnées et asymétriques, aboutissant à la formation de cellules initiales (les cellules initiales du protophloème et du protoxylème). Après la germination, ces cellules se différencient en cellules conductrices spécialisées, nommées

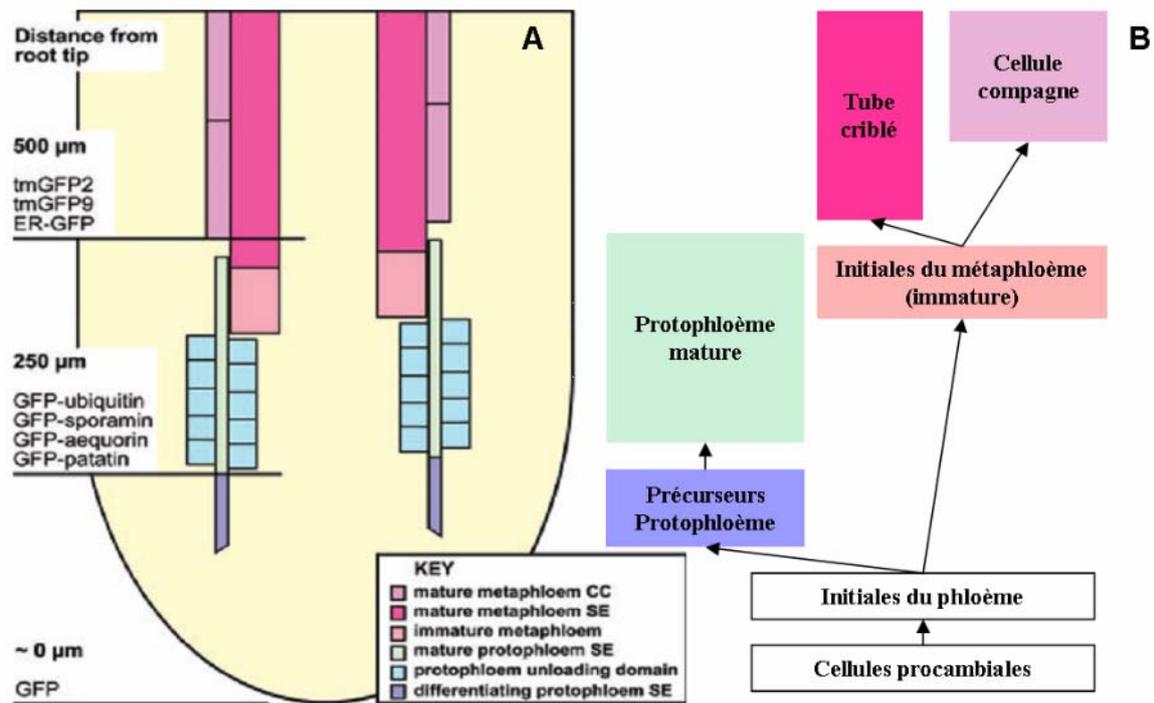


Figure 19 : Trafic symplasmique dans la zone de croissance d'*Arabidopsis thaliana*. **A.** A l'aide de protéines chimériques de tailles différentes, les auteurs ont mis en évidence la connectivité symplasmique des cellules le long de la zone de croissance. Des molécules sont déchargées au niveau des cellules compagnes hors de la zone de croissance puis diffusent au sein de la zone de croissance par les plasmodesmes du protoxylème. Il existe un gradient de taille des plasmodesmes le long de la zone en croissance : leur diamètre diminue avec la distance à l'apex, le long de la zone de croissance et les plasmodesmes de petits diamètres sont localisés près du méristème. Les cadres contigus indiquent une connexion symplasmique (Stadler *et al.*, 2005). **B.** Schéma récapitulatif de la différenciation du protoxylème et du métaxylème au sein de la racine d'*Arabidopsis thaliana*. (Adapté de Bauby *et al.*, 2007).

protophloème et protoxylème. Le facteur de transcription, APL (Altered Phloem Development) est un des rares marqueurs moléculaires de différenciation du protophloème. Il est essentiel pour le maintien de la différenciation des cellules du protophloème, la différenciation des cellules compagnes (qui apparaissent au-delà de la zone de croissance) et pour délimiter la zone de différenciation du xylème (Bonke *et al.*, 2003). La différenciation du protophloème est dépendante des conditions expérimentales. Quand les racines grandissent rapidement, la différenciation du protophloème a lieu à une position plus distale de l'apex que lorsque la croissance est plus lente (Esau, 1969 ; Beauchamp et Lathwell, 1966, Rost et Baum, 1988). Inversement la réduction de la croissance par la sécheresse est accompagnée d'une différenciation précoce du protophloème (Silk, 1992). Ces résultats suggèrent aussi l'importance du protophloème dans l'alimentation en eau de la zone de croissance.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *SUC2* codant une protéine membranaire responsable du transport de sucrose, est spécifiquement exprimé au niveau des cellules compagnes du métaphloème (Stadler et Sauer, 1996 ; Truernit et Sauer, 1995). En 2005, Stadler et ses collaborateurs ont couplé le promoteur du gène *SUC2* à des gènes codant des protéines cytosoliques de tailles différentes elles-mêmes couplées à une protéine fluorescente (de 36 à 67 kDa, Figure 19A). Bien que les protéines chimériques soient traduites exclusivement dans les cellules compagnes, de la fluorescence est détectée dans la zone de croissance, où les cellules compagnes ne sont pas différenciées. Ainsi les protéines chimériques traduites dans la zone mature sont transférées jusque dans la zone en croissance (Figure 19). Ce résultat prouve l'existence d'une connectivité symplasmique entre les cellules de la zone mature et celles de la zone en croissance. Les cellules du protophloème joueraient un rôle majeur dans la connexion entre la zone mature et la zone en croissance de la racine. En effet, les cellules initiales du métaphloème sont reliées par des plasmodesmes aux cellules du protophloème dans la zone mature (Benke , 1989 ; van Bel et Kempers, 1996 ; van Bel et al., 2002, Oparka et Turgeon, 1999). Dans la zone en croissance, seules les cellules du protophloème sont différenciées (Esau, 1969) et sont connectées par voie symplasmique aux cellules en croissance (Figure 19A). D'autres part, le long de la zone de croissance, la connectivité symplasmique des cellules du protophloème avec les cellules en croissance n'est pas homogène (Stadler *et al.*, 2005). En effet, en fin de zone d'expansion, la connectivité symplasmique est faible alors que la connectivité est forte au milieu de la zone de croissance, là où commence la différenciation du protophloème. En parallèle, les cellules au sein de la zone de croissance sont connectées les unes aux autres par des plasmodesmes, dont le nombre et le diamètre varient en fonction de la distance à l'apex. La partie proximale de la zone en

croissance est caractérisée par une forte quantité de plasmodesmes de petits diamètres (Bret-Hart et Silk, 1994). Dans la partie distale, la quantité de plasmodesmes est plus faible mais leur diamètre est plus grand (Bret-Hart et Silk, 1994). Si peu d'études se sont intéressées au transfert de l'eau vers la zone en croissance de la racine, l'utilisation d'un traceur fluorescent chez le maïs a permis de montrer qu'il existait une connectivité symplasmique entre le protophloème et les cellules en croissance à 3 mm de l'apex mais que cette connectivité n'était pas présente à 5 mm et 20 mm de l'apex (Hukin *et al.*, 2002). Du fait de cette connectivité hétérogène, un changement dans le transfert de l'eau s'opèrerait au sein de la zone en croissance. En effet, dans le segment [5-6 mm], *ZmPIP1;2* et *ZmPIP2;4* sont surexprimées par rapport au segment [1.5-2.5 mm]. La faible connectivité symplasmique des cellules les plus distantes de l'apex nécessiterait l'implication d'aquaporines pour faciliter le transfert de l'eau. En effet, l'application de chlorure de mercure (inhibiteur d'aquaporines) diminue la croissance de la racine du maïs (Hukin *et al.*, 2002). Les résultats disponibles semblent montrer que les voies symplasmique et transmembranaire sont toutes deux importantes et complémentaires le long de l'apex.

II- La cinématique, un outil pour décrire et analyser la croissance

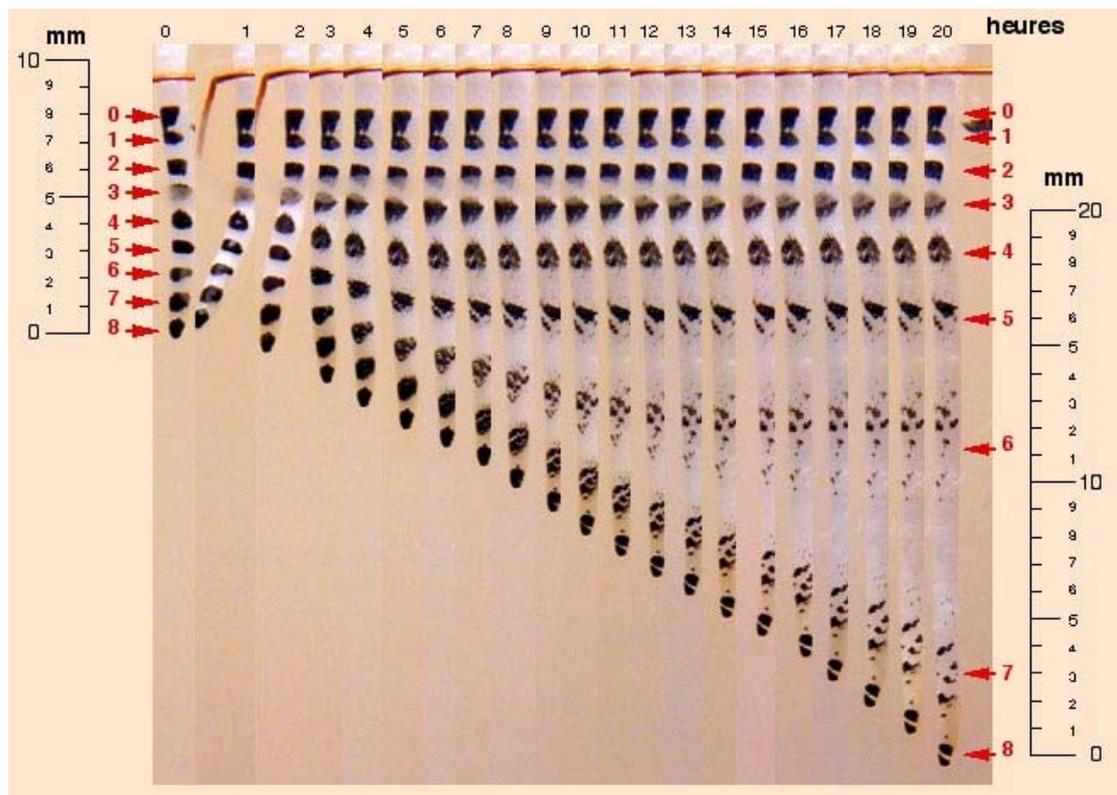


Figure 20: Reconstitution de l'expérience de Sachs (1882) sur une racine de potimarron.
 Issue de <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/racine/01-sachs.htm>.

En 1882, l'expérience menée par Sachs a montré que la zone de croissance de l'axe de la racine est localisée au niveau de l'apex. Cette expérience consiste à marquer la racine de points équidistants, puis à observer après un certain temps, les nouvelles positions de ces marques (Figure 20). Les points ont été déplacés et ne sont plus équidistants. Il s'agit de la première mise en évidence de la zone de croissance, localisée dans l'apex de la racine, mais surtout de l'existence au sein de la zone de croissance d'un gradient de vitesse de déplacement des cellules selon leur position initiale (les cellules ne sont pas déplacées à la même vitesse en fonction de leur distance à l'apex).

Dans un organe mature, la détermination de la vitesse de variation d'une propriété ne nécessite que la prise en compte de la variation quantitative de la propriété au cours du temps. Dans un organe en croissance, il n'est pas possible de déterminer la vitesse de variation au cours du temps d'une propriété à une position donnée puisque les cellules sont déplacées du cadre de référence pendant l'intervalle de temps nécessaire à la détermination de la variation. En une position x , la cellule présente à un instant t , ne sera plus la même à un instant $t + \delta t$, du fait du déplacement des cellules. D'autre part, en plus d'être déplacée si la cellule grandit, le biais induit par le changement de taille de la cellule doit aussi être corrigé. De manière plus générale, l'étude des variations d'une propriété au cours du temps dans un organe en croissance, nécessite une analyse qui prend en compte à la fois le déplacement et l'expansion des éléments cellulaires impliqués dans ce phénomène. Un formalisme de la mécanique des fluides permet d'analyser la variation d'une propriété au sein d'un organe en croissance, en le considérant comme un milieu continu.

II.1- La racine : un milieu continu

L'analyse mathématique des écoulements fluides repose sur l'hypothèse que le liquide peut être considéré comme un milieu continu, même si à l'échelle moléculaire, la masse de la matière est loin d'être uniforme dans sa distribution, étant concentrée dans les noyaux des atomes qui forment les molécules. Cette hypothèse de milieu continu (les propriétés de la matière sont réparties uniformément) est justifiée dans le cas d'un fluide, car un volume de liquide contient un grand nombre de molécules, de sorte que les propriétés du fluide sont des moyennes non affectées par les propriétés des molécules individuelles (Truesdell, 1977).

Comme souligné par Silk en 1984, il est plus difficile de visualiser un tissu végétal comme un milieu continu car les unités de base dont il est composé, les cellules, sont plus grandes que les molécules d'un fluide par rapport au volume considéré. En outre,

l'organisation spatiale des tissus végétaux est plus complexe. L'unité fondamentale du tissu, la cellule, est elle-même composée de sous-structures présentant de grandes différences dans leurs propriétés physiques et chimiques (par exemple, la viscosité). Par ailleurs, la racine présente une variabilité radiale des types cellulaires (Figure 1). Cependant, une particularité remarquable des cellules végétales est qu'elles ne migrent pas les unes par rapport aux autres. La lamelle moyenne et la paroi primaire fixent les cellules entre elles, empêchant des glissements entre couches cellulaires ou une expansion plus rapide ou plus lente de certaines couches de cellules. Dans une racine, l'ensemble des cellules sur un plan radial, subiront le même déplacement et la même expansion. Dès lors, la zone de croissance peut être considérée comme un milieu continu: toutes les assises cellulaires sont déplacées de façon similaire. En ce sens, la zone de croissance peut être analysée comme un milieu continu. Ce constat a conduit certains auteurs à utiliser un formalisme de la mécanique des fluides pour analyser la croissance (Silk et Erickson, 1979 ; Gandar, 1980 ; Gandar, 1983a ; Gandar, 1983b ; Beemster et Baskin, 1998). Il s'agit de caractériser le champ spatio-temporel des vitesses de déformation liées à la croissance, ce qui ressort de ce qu'on appelle en mécanique, la cinématique des milieux continus (Mouliat, 2005). La cinématique est l'étude quantitative des déplacements physiques et des déformations, sans référence aux forces qui les causent. La cinématique de la croissance est l'étude des déplacements et de l'expansion induits par la croissance le long d'axe sans faire référence aux causes physiologiques sous-jacentes (Silk et Erickson, 1979).

II.2- Analyse spatiale et temporelle d'une propriété au sein d'un organe en croissance

II.2.1- Caractérisation de la croissance

La croissance au sein d'un organe est caractérisée par la vitesse d'allongement relatif (ou Relative Elemental Growth Rate, REGR) des cellules. REGR est le changement en longueur par unité de longueur d'un petit élément tissulaire. Le concept de REGR, issu des travaux de von Sachs (1882) et de Richards et Kavanagh (1943), est formalisé par Ralph Erickson dans les années 1950 (Erickson et Sax, 1956 ; révisé par Erickson, 1976). Le REGR est mathématiquement équivalent à la vitesse de déformation d'un fluide dans un milieu continu (revue dans Silk et Erickson, 1979 ; Silk, 1984).

Au cours des dernières années, de nombreuses méthodes quantitatives basées sur l'analyse de séquences d'images ont été développées et appliquées principalement à l'étude de

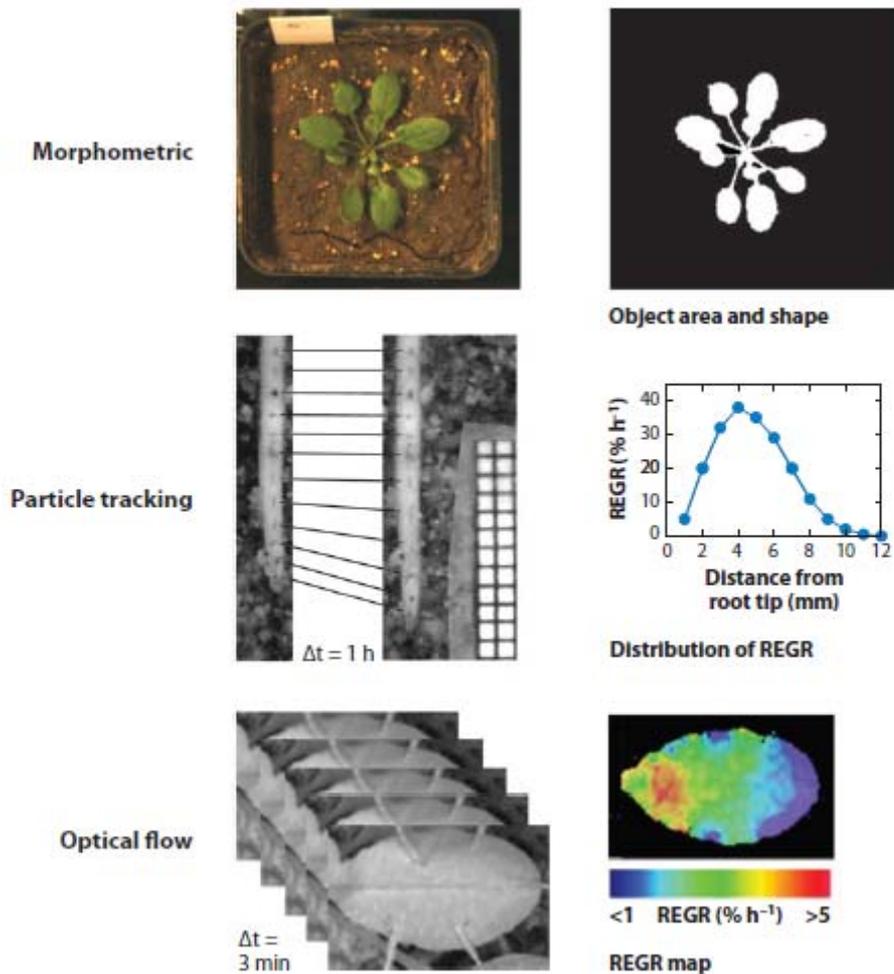


Figure 21 : Méthodes pour décrire la croissance. L'approche morphométrique consiste à mesurer par analyses d'images la croissance globale de l'organe considéré mais ne donne pas accès à la croissance locale. L'approche par suivi de particules est la méthode la plus simple pour déterminer un profil de REGR. Des méthodes plus sophistiquées, comme des analyses d'image par nuance de gris permettent d'augmenter la résolution et la précision de la détermination du REGR (Walter *et al.*, 2009).

la croissance des racines et des feuilles, ou de l'allongement de l'hypocotyle (Nozue *et al.*, 2007 ; van der Weele *et al.*, 2003 ; Walter *et al.*, 2003). Ces méthodes peuvent être classées en trois approches (Figure 21): (a) l'approche morphométrique, (b) le suivi de points, et (c) l'approche en flux optique. Les approches morphométriques sont utilisées pour déterminer la croissance d'un organe (Granier *et al.*, 2006 ; Barbagallo *et al.*, 2003 ; Leister *et al.*, 1999). Cette approche peut être développée à grande échelle et à haut débit, mais ne révèle pas la distribution de la croissance à l'intérieur d'un organe. Dans l'approche «suivi de points », un certain nombre de points (marques au marqueur, particules de carbone, marques « naturelles », etc...) est appliqué ou choisi sur l'organe (Basu *et al.*, 2007 ; Beemster et Baskin, 1998 ; Ishikawa et Evans, 1997). La position de ces points est déterminée par prise d'images à des temps successifs, et leur déplacement est mesuré pendant chaque δt . La mesure du déplacement des points à la surface de l'organe entre deux temps permet de calculer un champ spatial de vitesse, qui représente la vitesse de déplacement des cellules au sein de l'organe en fonction de la position. Par cette approche, la distribution spatiale de REGR peut être calculée. L'approche par flux optique repose sur l'évaluation de la structure optique de l'organe par analyse de nuances de gris (Barron et Liptay, 1997 ; Schmundt *et al.*, 1998 ; Supatto *et al.*, 2005 ; van der Weele *et al.*, 2003 ; Walter *et al.*, 2002). Cette approche offre une haute résolution spatiale et temporelle sans altération due au marquage. Pour l'analyse de la croissance des racines, des images sont acquises à des pas de temps de moins d'une minute et à des résolutions très fines, ce qui permet d'obtenir une distribution de REGR à une résolution quasi-cellulaire (Nagel *et al.*, 2006 ; Rahman *et al.*, 2007 ; Swarup *et al.*, 2005). De plus, le développement d'algorithmes a permis d'automatiser ces analyses (Schmundt *et al.*, 1998 ; Basu *et al.*, 2007 ; Walter *et al.*, 2002 ; van der Weele *et al.*, 2003). L'analyse de la croissance foliaire avec cette approche est réalisée sur de nombreuses espèces, y compris les espèces modèles comme *Arabidopsis thaliana* (Wiese *et al.*, 2007) et le peuplier (Walter *et al.*, 2005). Dans la plupart des approches automatisées, les logiciels donnent directement accès à un profil de vitesse ou de REGR. Mathématiquement, le REGR correspond à la dérivée de la vitesse en fonction de la position (Figure 22).

A partir des données de vitesse, le temps nécessaire à une particule positionnée en x pour atteindre la position $x+\Delta x$ peut être calculée. Ainsi le long d'un apex, depuis une position d'origine, le cumul du temps nécessaire pour effectuer la somme des déplacements Δx donne accès au temps nécessaire à une particule pour traverser la zone de croissance. Le suivi spatial et temporel de la particule est appelé trajectoire de croissance (Silk et Wagner, 1980). La trajectoire de croissance est obtenue par intégration des valeurs de vitesse sous

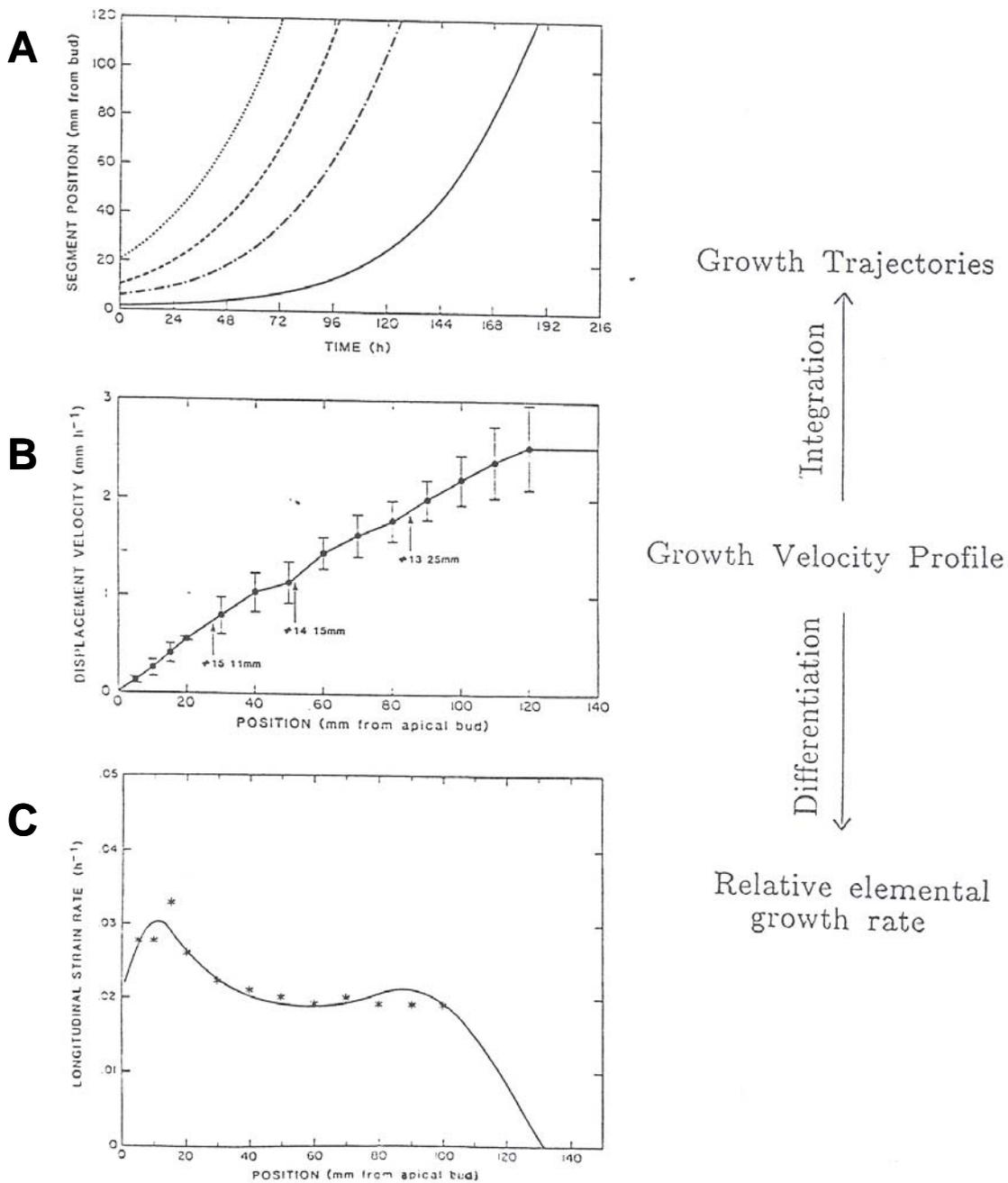


Figure 22 : Caractérisation de la croissance. **A.** La trajectoire de croissance illustre le temps nécessaire à une particule (cellule) positionnée en x pour atteindre la position $x+\delta x$. Cette trajectoire peut être interprétée comme le temps nécessaire à une cellule pour traverser la zone de croissance. Sous réserve d'un régime permanent, la trajectoire est calculée en intégrant les valeurs de vitesse. **B.** Le profil de vitesse représente la vitesse de déplacement des cellules le long d'un axe en croissance. La vitesse augmente avec la distance à l'apex et atteint un plateau correspondant à la vitesse de croissance globale de l'organe. **C.** En dérivant les valeurs de vitesse, le profil de REGR est obtenu. Il représente la vitesse d'allongement relatif des cellules le long de l'axe. (Silk, 1992).

réserve d'une stabilité temporelle de la croissance sur le temps nécessaire à la traversée de la zone considérée (Figure 22). En effet, le calcul de la trajectoire de croissance est issu de l'intégration des valeurs de vitesse, celles-ci sont souvent obtenues sur un pas de temps court alors que le temps nécessaire, par exemple, pour traverser toute la zone de croissance est souvent beaucoup plus long. Chez le maïs, le déplacement d'une particule de la position 2.5 mm à la position 12 mm dans la zone de croissance de la racine requiert 17 h à 16°C et 8 h à 29°C (Pahlavanian et Silk, 1988). En interprétant le déplacement d'une particule en termes de déplacement d'une cellule, on obtient le temps nécessaire à une cellule pour parcourir toute la zone de croissance, depuis son origine dans le méristème jusqu'à la fin de son expansion au-delà de la zone de croissance.

II.2.2- Détermination de la vitesse de variation d'une propriété au sein d'un organe en croissance

La zone de croissance de la racine présente de fortes hétérogénéités en termes de vitesse de déplacement, de vitesse d'allongement relatif et de densité cellulaire. Ces hétérogénéités doivent être prises en compte pour analyser la croissance et étudier la variation d'une propriété au sein de cette zone. En ce sens, l'équation de continuité et les analyses cinématiques, adaptées de la mécanique des fluides pour analyser la croissance des organes (Erickson et Sax, 1956 ; Goodwin et Avers, 1956 ; Hejnowicz, 1956), offre un cadre conceptuel pour analyser la vitesse de variation d'une propriété. Ce champ d'analyses a été fortement utilisé dans les années 1980 (Silk et Erickson, 1979 ; Silk, 1984). L'équation de continuité permet de s'affranchir de l'hétérogénéité spatiale des paramètres de croissance le long de l'apex, et donne accès à la vitesse de variation d'une propriété :

$$D_{(x)} = \frac{\partial \rho}{\partial t_{(x)}} + v \frac{\partial \rho}{\partial X_{(x)}} + \rho \frac{\partial v}{\partial X_{(x)}}$$

où D, représente la dérivée matérielle soit la vitesse de variation ou le taux de déposition d'une propriété (exprimée en quantité unité de temps⁻¹ unité de longueur⁻¹), ρ , la propriété d'intérêt, et t, le temps. Cette équation est composée de trois termes. Le premier terme $\frac{\partial \rho}{\partial t}$, la dérivée locale, correspond à la variation de la propriété à une position fixe en fonction du

temps. Le second terme $v \frac{\partial \rho}{\partial x}$, le terme convectif, représente la variation de la propriété induite par le déplacement des cellules. Il résulte du produit entre la vitesse en une position x et la variation spatiale de la propriété à cette position. Le troisième terme $\rho \frac{\partial v}{\partial x}$, le terme dilutif prend en compte la dilution de la propriété due à la croissance. En effet, au fur et à mesure de la croissance, le volume cellulaire augmente. La propriété est donc diluée dans un volume plus grand. Cette équation de continuité permet donc de prendre en compte à la fois le déplacement et l'allongement des cellules dans un organe en croissance, et par conséquent d'accéder à la vitesse de variation d'une propriété dans un organe en croissance (Silk, 1984). En mécanique des fluides, cette vitesse de variation D est aussi appelée dérivée matérielle, qui se distingue de la dérivée locale en intégrant le mouvement du fluide dans le calcul de la variation.

II.2.3- Précédentes utilisations de l'équation de continuité pour analyser la croissance

L'équation de continuité a été appliquée pour comprendre la physiologie de la croissance des racines. Silk et ses collaborateurs (1984) ont étudié la distribution de l'uronide, composant de la paroi primaire, le long de la zone de croissance de la racine du maïs. En couplant des mesures biochimiques de la concentration en uronide et des mesures de croissance relative le long de l'apex, ils ont décrit le taux de déposition de l'uronide le long de la racine en croissance. L'uronide est fortement accumulé dans les premiers millimètres de la zone de croissance du maïs (pic à 3.5 mm) et son accumulation décroît au-delà. Le rôle des osmolites dans la croissance de la racine a aussi été analysé (Silk *et al.*, 1986), montrant les régions au sein de l'apex qui sont des puits ou des sources d'osmolites

Cette équation est appliquée à des états de croissance contrastés, obtenus suite à des stress biotiques ou abiotiques. Sharp et ses collaborateurs (1990) ont étudié le rôle des osmolites dans la croissance de la racine du maïs sous déficit hydrique. Deux états de croissance- où les profils de déplacement et de REGR sont différents - sont comparés. En effet, le déficit hydrique induit une diminution de la vitesse et du REGR au-delà des 3 premiers millimètres apicaux. Les taux de déposition de l'hexose et du potassium présentent des profils contrastés suggérant une régulation osmotique complexe dans l'apex de la racine sous déficit hydrique. L'effet de la température sur la croissance de la racine du maïs a aussi

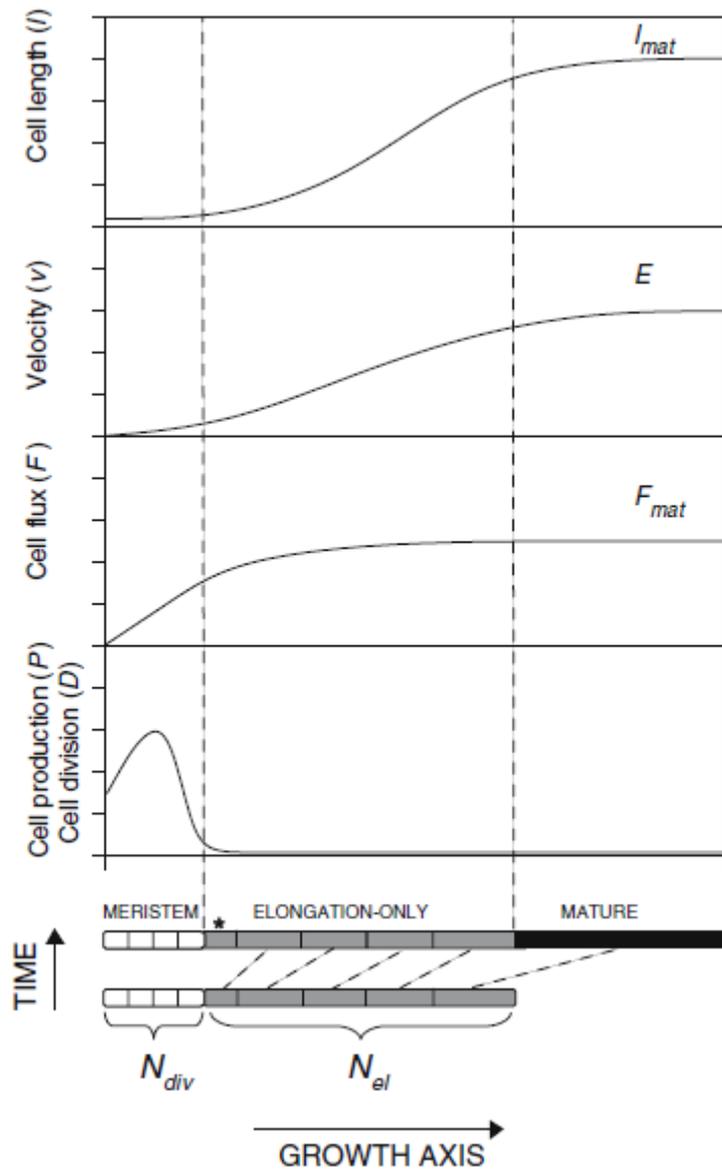


Figure 23 : Analyse cinématique permettant l'accès à la vitesse de production cellulaire. L'analyse conjointe de la longueur des cellules (l) et de la vitesse (v) le long de l'apex donne accès à un flux de cellules, F ($F = vl$). L'intégration des données de densité cellulaire (l'inverse de la longueur des cellules) dans l'équation de continuité donne accès à la vitesse de production des cellules, P . N_{div} est le nombre de cellules en division dans le méristème. Le taux de division cellulaire, D , est le rapport de P/N_{div} (Fiorani et Beemster 2006).

été analysé à l'aide de l'équation de continuité (Pahlavanian et Silk, 1988). L'augmentation de la température, dans des gammes de variations allant de 16 à 29°C, induit un déplacement et un allongement des cellules plus fort quelle que soit la position au sein de l'apex. Le taux de variation de la biomasse le long de l'apex est aussi température-dépendante. Girousse et ses collaborateurs (2005) ont étudié l'effet de l'attaque du puceron sur l'expansion radiale et longitudinale de la tige de luzerne, et ont appliqué l'équation de continuité pour étudier l'effet du stress sur le taux d'accumulation de l'eau, du carbone et de l'azote. Ils montrent ainsi qu'une attaque de pucerons sur une courte période induit chez la luzerne une forte réduction synchronisée des taux d'expansion et de déposition de l'eau et du carbone.

Ce formalisme a aussi été appliqué pour analyser l'activité de division au sein des zones en croissance (Figure 23 ; Fiorani et Beemster, 2006). Dans ce cas, la propriété d'intérêt, ρ , est la densité cellulaire, soit l'inverse de la longueur cellulaire. La vitesse de variation de la densité cellulaire correspond à la vitesse de production de cellules. Cette approche a été utilisée pour analyser les processus responsables de la variabilité de la croissance de la racine primaire de 18 accessions d'*Arabidopsis thaliana* (Beemster *et al.*, 2002). Les variations de croissance observées entre accessions peuvent être, entre autres, expliquées par des différences de vitesses de production cellulaire. West et ses collaborateurs (2004) ont utilisé la même approche pour étudier l'effet d'un stress salin sur le cycle cellulaire. Ils montrent que la vitesse de production cellulaire au sein du méristème de la racine d'*A. thaliana* diminue sous l'effet du stress, entraînant une réduction de la taille du méristème. Cette vitesse est mise en regard de l'activité de cyclin-dépendant kinase (CDK). Comme la quantité de protéines de CDKA;1 et CDKB1;1 reste inchangée face au stress, les auteurs concluent que l'inhibition temporaire de l'activité mitotique qui permet l'adaptation au stress salin est issue d'un contrôle post-traductionnelle de l'activité CDK. La vitesse de production cellulaire a aussi été utilisée chez des mutants d'*A. thaliana* pour étudier l'effet d'une mutation particulière sur la croissance de la racine (pour exemple, Beemster et Baskin, 2000 ; Fleury *et al.*, 2007 ; Kutschmar *et al.*, 2009 ; Achard *et al.*, 2009). Ce formalisme est un outil puissant et est très utilisé pour comprendre les mécanismes qui régissent la croissance d'un organe et sa réponse aux stimuli environnementaux.

II.2.4- Spécifications eulérienne et lagrangienne d'une propriété

Dans une zone de croissance, les propriétés (par exemple la densité de transcrits) sont souvent décrites de façon spatiale de même que les profils de vitesse, de REGR et les

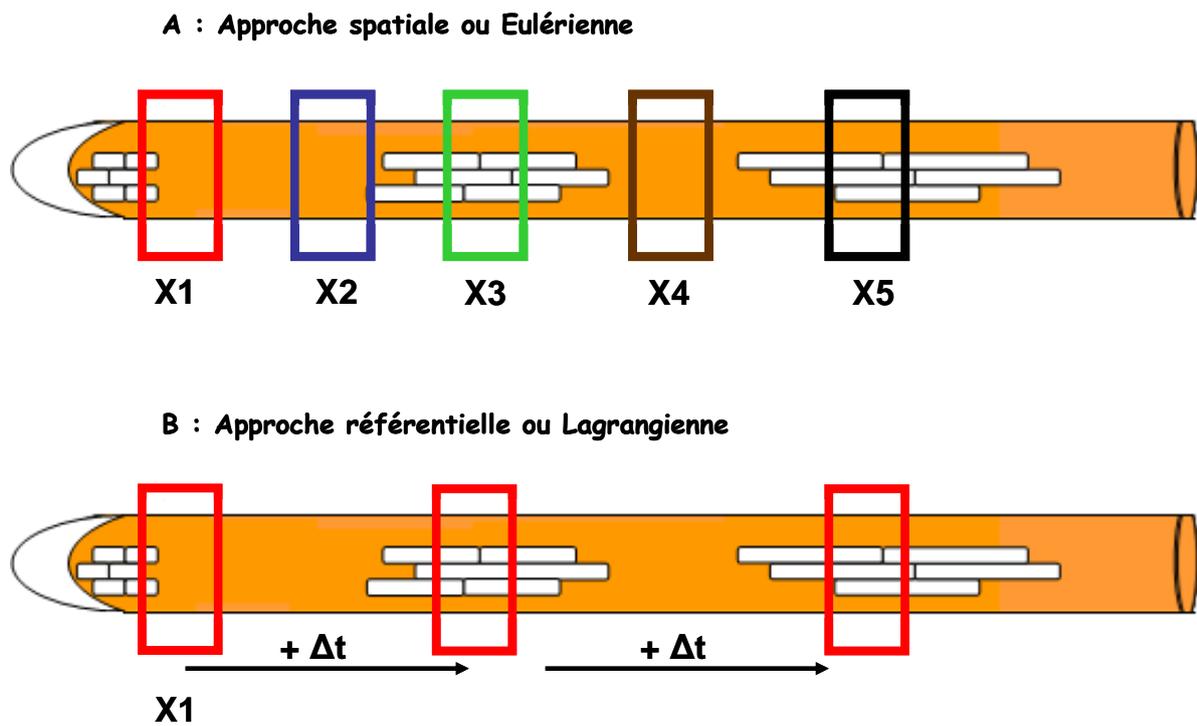


Figure 24 : Description eulérienne ou lagrangienne d'une propriété dans la zone en croissance. En tant qu'observateur, la croissance le long d'un axe peut être décrite de deux manières. **A.** Dans l'approche spatiale ou eulérienne, l'expérimentateur observe une propriété à différents positions fixées le long de l'axe. **B.** Dans l'approche référentielle ou lagrangienne, l'expérimentateur porte son attention sur une propriété d'un élément situé à une position X1. Cet élément est suivi au cours du temps à toutes les positions. La propriété peut alors être décrite à la fois en fonction de l'espace et du temps.

dérivées matérielles, c'est-à-dire décrites en fonction de la position dans l'organe en croissance, à un instant donné (Birnbaum *et al.*, 2003, Brady *et al.*, 2007). On parle alors d'une description spatiale ou eulérienne (Figure 24A). Cependant, nous avons montré que bien que la zone de croissance soit stable, les éléments cellulaires qui la composent sont constamment renouvelés et « fluent à travers » cette zone. Dans ce type de configuration, il est possible de s'intéresser à un élément (une cellule) qui à partir du méristème « traverse » la zone de croissance. Ainsi, le point de repère pour l'observateur est la position 0, fixée à la pointe de la racine (vers le méristème). La propriété est donc considérée à l'intérieur d'une cellule, et son évolution est suivie au cours du temps, donc au cours du déplacement de la cellule le long de la zone de croissance. La propriété n'est plus uniquement décrite de façon spatiale mais aussi de façon temporelle. Il s'agit alors d'une description matérielle ou lagrangienne de la propriété (Figure 24B ; Gandar, 1983a, 1983b). En d'autres mots, une description lagrangienne est une description spatio-temporelle de la propriété. La trajectoire de croissance (qui permet de déterminer le temps nécessaire à une particule pour se déplacer le long de la zone en croissance) permet de passer d'une description eulérienne à une description lagrangienne (Gandar, 1983a, 1983b). Les coordonnées spatiales sont converties en coordonnées temporelles, à chaque position x correspond un temps t .

Dans un tissu en croissance, le temps et l'espace sont intimement mais non linéairement liés. Les cellules sont déplacées plus rapidement en fin qu'en début de zone de croissance. Dès lors, la représentation lagrangienne d'une propriété est différente de sa représentation eulérienne. La trajectoire de croissance peut être utilisée pour déterminer le temps entre l'apparition d'un signal et les changements morphologiques ou chimiques initiés dans la cellule. La trajectoire de croissance est un puissant outil pour étudier les bases physiologiques des processus de croissance (Silk, 2006).

Objectifs

En situation de déficit hydrique, la croissance est le premier processus physiologique affecté, avant même une modification détectable du statut hydrique (potentiel hydrique de base, teneur en eau), de la conductance stomatique ou de la photosynthèse (Hsiao, 1973 ; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007). Le maintien du statut hydrique sous sécheresse édaphique suppose de limiter la transpiration et/ou maximiser l'absorption de l'eau. Ainsi la capacité d'une plante à maintenir la croissance de ses racines lors d'un déficit hydrique léger est une composante de l'acclimatation à la sécheresse. Il apparaît alors essentiel d'étudier les mécanismes qui contrôlent la croissance de la racine sous déficit hydrique. A l'échelle de la zone en croissance, le déficit hydrique induit des variations des vitesses d'allongement et de déplacement des cellules le long de l'apex de la racine et une réduction de la taille de la zone de croissance (Sharp *et al.*, 1988). Il existe donc une hétérogénéité de réponse dans la zone en croissance. De façon simplifiée, deux régions se distinguent : une région apicale où les paramètres d'allongement et de déplacement ne sont pas affectés par le déficit hydrique et une région distale où ces paramètres sont réduits sous déficit hydrique. Le processus d'expansion cellulaire est différentiellement impacté par le déficit hydrique selon la position le long de l'apex. Il apparaît alors nécessaire d'analyser les mécanismes de régulation de l'expansion cellulaire dans la zone de croissance, avec une résolution suffisamment fine.

Les contrôles d'un processus physiologique peuvent être étudiés à plusieurs niveaux. Le choix s'est porté dans cette thèse sur l'étude du contrôle de l'expansion cellulaire au niveau moléculaire (niveau de transcrits). Comme illustré dans l'introduction, les acteurs moléculaires intervenant dans l'expansion cellulaire sont nombreux. Sur la base du modèle de Lockhart, plusieurs paramètres sont importants pour l'expansion cellulaire, notamment l'extensibilité des parois et la conductivité hydraulique membranaire. J'ai fait le choix d'analyser le contrôle de l'expansion cellulaire et, en particulier, de me focaliser sur des acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la modulation de la conductivité hydraulique membranaire : les aquaporines TIP1 (aquaporines du tonoplaste modulant les flux entre le cytoplasme et la vacuole et connues pour transférer l'eau). En effet lors de l'expansion cellulaire, de grandes quantités d'eau et de solutés sont stockées dans la vacuole générant la pression de turgescence indispensable à l'expansion cellulaire. Malgré une disponibilité moindre sous déficit hydrique, l'eau doit parvenir jusqu'aux cellules en croissance pour permettre le maintien d'une expansion cellulaire et une croissance de la racine. Ainsi il paraît pertinent d'étudier la régulation de ces aquaporines sous déficit hydrique. Afin d'apporter des éléments de compréhension à la régulation de la croissance sous déficit hydrique, deux autres gènes ont été étudiés : une aquaporine de type PIP2 (fixée à

la membrane plasmique et dont la classe est connue pour avoir une forte capacité de transfert d'eau) et un facteur de transcription impliqué dans la différenciation du protophloème qui est une source probable de flux d'eau vers la zone de croissance.

Jusqu'à présent, les connaissances sur les mécanismes de régulation de la croissance sous déficit hydrique restent encore fragmentaires, en partie car les analyses détaillées de la croissance et des mécanismes moléculaires sous-jacents sont relativement rares (Skirycz *et al.*, 2010 ; Rymen *et al.*, 2007 ; Spollen *et al.*, 2008). Comme récemment souligné par Skirycz et Inzé (2010), les données disponibles sur la réponse au déficit hydrique sont majoritairement obtenues sur des tissus matures ou des plantes entières. Cependant, le stade de développement et l'identité cellulaire influencent les réponses physiologiques et moléculaires au déficit (Skirycz *et al.*, 2010 ; Dinneny *et al.*, 2008). Les analyses moléculaires à l'échelle d'un organe en croissance ne sont pas simples et souvent mal abordées. Dans un organe en croissance, les cellules grandissent et sont déplacées au cours du temps et de l'espace, alors que cette dynamique est absente dans un organe mature. L'équation de continuité peut prendre en compte cette dynamique et nous permet d'analyser les mécanismes moléculaires de régulation de la croissance (cf. Introduction).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'expression des aquaporines *TIP1s* et leur régulation au sein de la zone de croissance de la racine et l'impact du déficit hydrique sur ce patron de régulation. Cette étude a été menée sur du peuplier, arbre modèle en biologie moléculaire. En effet, c'est le genre pour lequel les outils moléculaires sont les plus développés (transformation, publication du génome de *Populus trichocarpa*, Tuskan *et al.*, 2006). En plus de son importance économique, le peuplier présente un certain nombre d'avantages pour l'expérimentation : croissance rapide, capacité de bouturage et propagation clonale. Pour cette étude, le modèle biologique choisi est un hybride commercial *Populus deltoides x nigra* cv 'Soligo', qui se cultive aisément en hydroponie et présente l'avantage de développer de grosses racines adventives à la base de la bouture, facilitant ainsi l'analyse de la croissance.

Dans un premier temps nous formalisons un cadre d'analyse pour étudier la régulation des gènes dans un organe en croissance. Une démarche intégrative combinant biologie moléculaire et concepts issus de la mécanique des fluides est menée. Cette démarche nécessite un système d'étude simple : système où des états de croissance sont contrastés mais stables dans le temps. Cependant, la réponse de la croissance des organes sous déficit hydrique modéré est souvent caractérisée par une phase d'inhibition, suivie d'une phase de récupération et d'ajustement à la nouvelle condition (Skirycz et Inzé, 2010). Ainsi, chez plusieurs espèces

dont le peuplier (Hummel, 2006), la vitesse de croissance de la racine diminue fortement juste après l'application d'un déficit hydrique de faible intensité. Après une (courte) phase d'acclimatation, la vitesse de croissance retrouve un niveau proche de celles des témoins, et peut même être stimulée. Cette réponse est souvent interprétée comme adaptative car elle favoriserait l'exploration du milieu édaphique et l'exploitation des ressources hydriques. En réponse à un déficit plus sévère, la récupération de la vitesse de croissance est plus lente et souvent partielle. Ainsi dans un deuxième temps, nous avons recherché si, et le cas échéant, à partir de quand la croissance revenait à un état stable et caractériser ces d'états de croissance contrastés sous déficit hydrique. Différents niveaux de déficit ont été appliqués sur plusieurs jours afin de générer ces états de croissance.

Le système d'étude mis en place, les densités de transcrits des aquaporines *TIP1s* ainsi que de deux autres gènes sont étudiées le long de l'apex de la racine dans les différents états de croissance. Cette densité permet d'étudier les réorganisations d'expression dans la zone de croissance sous déficit hydrique. Enfin, le cadre d'analyse développé pour étudier la régulation de l'expression des gènes a été appliqué à ces états de croissance contrastés. Ce cadre permet de démêler s'il existe un déterminisme spatial et/ou temporel de la régulation des gènes sous déficit hydrique et lors d'un remaniement de la croissance.

Mes travaux de recherche s'articulent ainsi autour de 4 questions principales :

Question 1 : *Comment s'affranchir de l'hétérogénéité des paramètres de croissance le long de l'apex de la racine pour analyser la régulation de l'expression d'un gène ?*

Pour répondre à cette question, j'ai mis en œuvre une démarche intégrative et multi-échelle. Les transcrits sont quantifiés avec une haute résolution spatiale (millimétrique) le long de l'apex de la racine du peuplier, et le profil de vitesse d'allongement relatif (REGR) est déterminé à partir d'une analyse cinématique. L'équation de continuité est appliquée à la densité de transcrits de deux gènes dit de référence, *ACTIN11* et *EF1B*. Le cadre expérimental développé donne accès à la régulation spatiale et temporelle de l'expression des gènes dans un organe en croissance.

Question 2 : *Quel est l'impact de différents niveaux de déficit hydrique sur la vitesse d'allongement relatif au sein de la zone de croissance de la racine du peuplier ?*

Deux niveaux de déficit hydrique sont appliqués et induisent des états de croissance stables et contrastés. Le déficit hydrique est simulé en hydroponie par ajout de polyéthylène

glycol (PEG, poids moléculaire 3500 g mol⁻¹), qui réduit le potentiel hydrique de la solution nutritive. Les effets des déficits hydriques sur l'allongement des cellules au sein de la zone en croissance sont caractérisés par une analyse cinématique.

Question 3 : *Des états de croissance contrastés sont-ils associés à une **expression** différentielle des aquaporines TIP1 le long de l'apex de la racine ? Ces profils d'expression sont-ils liés à l'état de croissance ?*

Les densités de transcrits des *TIP1s*, d'une *PIP2* et d'*APL* sont analysées dans chaque état de croissance. Les résultats sont discutés au regard de l'origine du flux d'eau au sein de la zone en croissance et l'état de croissance considéré. La classe des *TIP1s* ayant été fortement dupliquée au sein du génome, les différences d'expression entre gènes paralogues sont discutées.

Question 4 : *Des états de croissance contrastés impliquent-ils une **régulation** différentielle de l'expression des gènes le long de l'apex de la racine ? La régulation de l'expression des aquaporines est-elle régie par un contrôle positionnel ou temporel ?*

La dérivée matérielle de la densité de transcrits donne accès à la régulation de l'expression des gènes le long de l'apex. Ce cadre permet de déterminer les patrons de régulation dans les états de croissance contrastés et de les comparer. Sous l'hypothèse d'une stabilité temporelle des états de croissance, la trajectoire des cellules le long de la zone en croissance est caractérisée pour chacun des états de croissance et la spécification lagrangienne de la dérivée matérielle est calculée. Cette spécification donne accès à une description temporelle de la régulation de l'expression des gènes.

Matériel et Méthodes

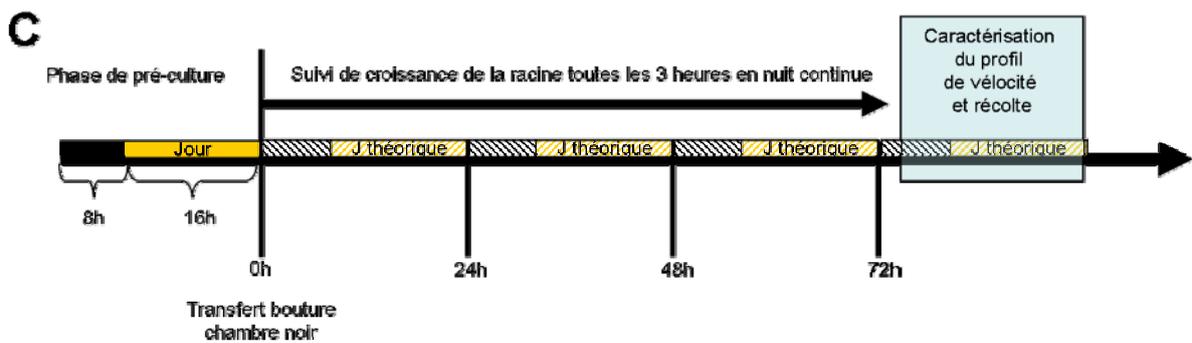
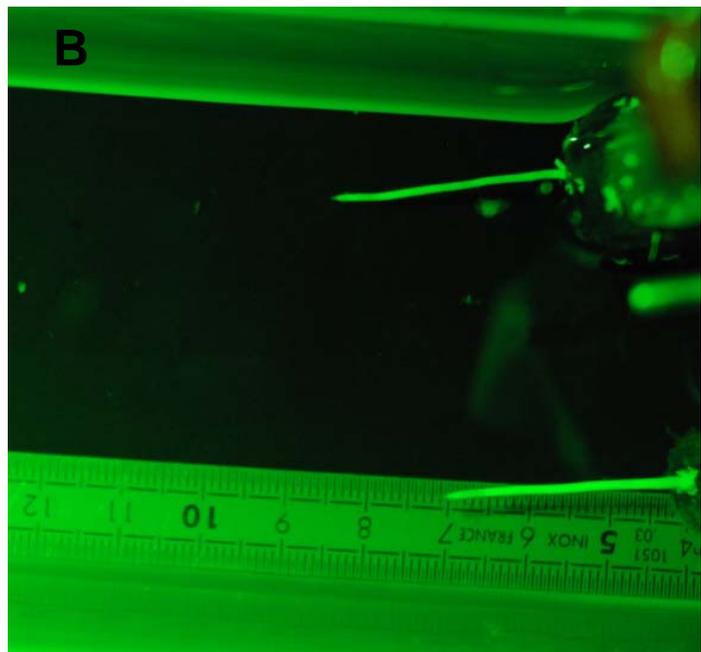


Figure 25 : Pré-culture et suivi de la croissance de la racine. **A.** Pré-culture des boutures en phytotron dans des bacs opaques, **B.** Bouture placée dans un bac horizontal pour mesurer la croissance de la racine. **C.** Schéma récapitulant la chronologie des mesures depuis la phase de pré-culture jusqu'à la récolte des racines.

I- Matériel végétal, conditions de pré-culture et de culture

L'étude a été menée sur des racines adventives d'un clone de peuplier (*Populus deltoïdes x nigra* cultivar 'Soligo'). Cet hybride se cultive aisément en hydroponie et présente l'avantage de développer de grosses racines à la base de la bouture, facilitant ainsi l'analyse de la croissance de ces dernières.

Au cours de la thèse, trois lots de boutures (30 cm de long) ont été utilisés. Les boutures sont produites en janvier (les pépinières de la Dive, Curcay sur Dive, France), puis conservées en chambre froide (4°C, le premier centimètre de la bouture dormante placée dans l'eau) et les lots sont renouvelés annuellement pour éviter des phénomènes de vieillissement. Au moment de la mise en culture, un lot de boutures homogènes (environ 2 cm de diamètre) est sélectionné. Les deux extrémités de la bouture sont coupées (pour éviter les effets induits par le trempage et/ou la déshydratation) et la bouture est coupée en deux. Chaque bouture (15 cm) est placée dans un bac pour une phase de pré-culture en hydroponie (Figure 25A). Une extrémité de la bouture (environ 10 cm) plonge dans une solution nutritive : Hoagland ½ enrichie en phosphate (0.5 mM KNO₃, 0.8 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 2.3 mM Ca(NO₃)₂, 23 µM de H₃BO₃, 4.6 µM MnCl₂, 0.4 µM ZnSO₄, 0.09 µM H₈M₀₂N₂H₇, 0.18 µM CuSO₄, 20 µM FeNaEDTA). Le pH de la solution est ajusté à 5.8 avec du NaOH 1N. La solution est aérée à l'aide d'un diffuseur d'air à aquarium et renouvelée deux fois par semaine. Les bacs (8 L) sont placés dans un phytotron sous une atmosphère contrôlée (température de l'air : 21°C, humidité relative : 70%, photopériode 16 h jour / 8 h nuit, densité de flux de photons photosynthétiques : 200 µmol s⁻¹ m⁻²). La pré-culture est réalisée dans des bacs opaques pour éviter l'exposition des racines à la lumière. Cette pré-culture permet de sélectionner des racines adventives de diamètre homogène pour l'analyse de croissance. L'apparition des racines d'intérêt est plus ou moins précoce selon la bouture et le temps de pré-culture varie de 1 à 2 semaines. Les boutures peuvent aussi développer des feuilles.

Dès qu'une racine présentant les critères de sélection apparaît, la bouture est transférée dans le système de mesure dans une chambre noire. Le transfert s'effectue toujours en début de la phase nuit du phytotron pour conserver par la suite, une « nuit continue ». Pour éviter les effets de la température sur la croissance de la racine, la température de la chambre noire est ajustée à celle du phytotron (21°C). Enfin, la bouture est transférée avec la solution de pré-culture, conservée tout le long de l'expérimentation. La racine du peuplier étant plagiotrope, la croissance est mesurée dans un bac horizontal de 700 mL. La bouture est tenue verticalement à l'aide d'une pince sur un trépied, la base plongeant dans la solution nutritive,

	Condition de culture	Temps de culture en nuit continue	Nombre de racines	Chapitre de la thèse	Lot de boutures
Expérience 1	Témoïn	1 à 6h	6	<i>Chapitre I</i>	2008/2009
Expérience 2	Témoïn	75 à 87h	6	<i>Chapitre II Chapitre III Chapitre IV</i>	2009/2010
	PEG 100 g L ⁻¹	75 à 87h	6		
	PEG 200 g L ⁻²	75 à 87h	6		

Tableau 1 : Plan des expérimentations. Au cours de la thèse deux expériences ont été menées. Chaque expérience est issue d'un lot de boutures différent.

qui est aérée à l'aide d'un bulleur à aquarium dans un circuit parallèle. C'est pendant cette phase de culture qu'ont été réalisés les traitements. Le déficit hydrique est simulé par ajout de polyéthylène glycol (PEG : $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$, poids moléculaire : 3500 g mol^{-1}) à la solution nutritive. Deux niveaux de stress osmotiques sont appliqués : un stress modéré par ajout de 100 g L^{-1} de PEG ($80 \text{ mosmol kg}^{-1}$) et un stress fort de 200 g L^{-1} de PEG ($250 \text{ mosmol kg}^{-1}$). Le potentiel osmotique de la solution de culture est vérifié (Vapor Pressure Osmometer, Wescor 5500). La solution nutritive est oxygénée par bullage à l'aide d'une pompe à air pour aquarium). Plus la solution est épaissie par la PEG, plus le flux d'air est important. La croissance de 6 racines par traitement a été suivie. Le tableau 1 résume les expériences réalisées.

II- Mesure de la croissance des racines

II.1- Suivi de la croissance

Un réglelet est placé dans le plan de la racine pour calibrer les analyses d'image (Figure 25B). La prise de photo est réalisée à l'aide d'un appareil photo Canon Powershot 80 placé sur une loupe binoculaire Leica MZ6 située au dessus de la bouture. Après un temps de « relaxation », une série de photos zénithales est réalisée, à raison d'une photo toutes les 3 heures pendant au moins 3 jours. Une lumière verte s'allume une minute avant la prise de photo et s'éteint une minute après. La variation de longueur de la racine est mesurée entre chaque photo. La vitesse de croissance de la racine est calculée toutes les trois heures. La Figure 25C récapitule la chronologie des mesures depuis la phase de pré-culture.

II.2- Détermination du profil de vitesse

Après le suivi de croissance, la bouture est délicatement retirée du bac. La zone de croissance de la racine est tamponnée puis marquée avec des particules de carbone qui sont déposées à l'aide d'un pinceau. La bouture est alors replacée dans le bac de mesure. Après une période de « relaxation » de quelques minutes, une photo zénithale est prise toutes les 2 minutes pendant au moins une heure avec le même système d'acquisition mais avec une plus forte résolution centrée sur la zone de croissance.

Le logiciel Kineroot (Basu *et al.*, 2007 ; <http://roots.psu.edu/node/782>) est utilisé pour analyser, à partir des images séquentielles, le déplacement des particules de carbone dans le temps et l'espace. Ce logiciel développé sous Matlab permet de recalculer un profil de vitesse à une résolution choisie. Une série de 3 à 10 photos consécutives est analysée. Parmi

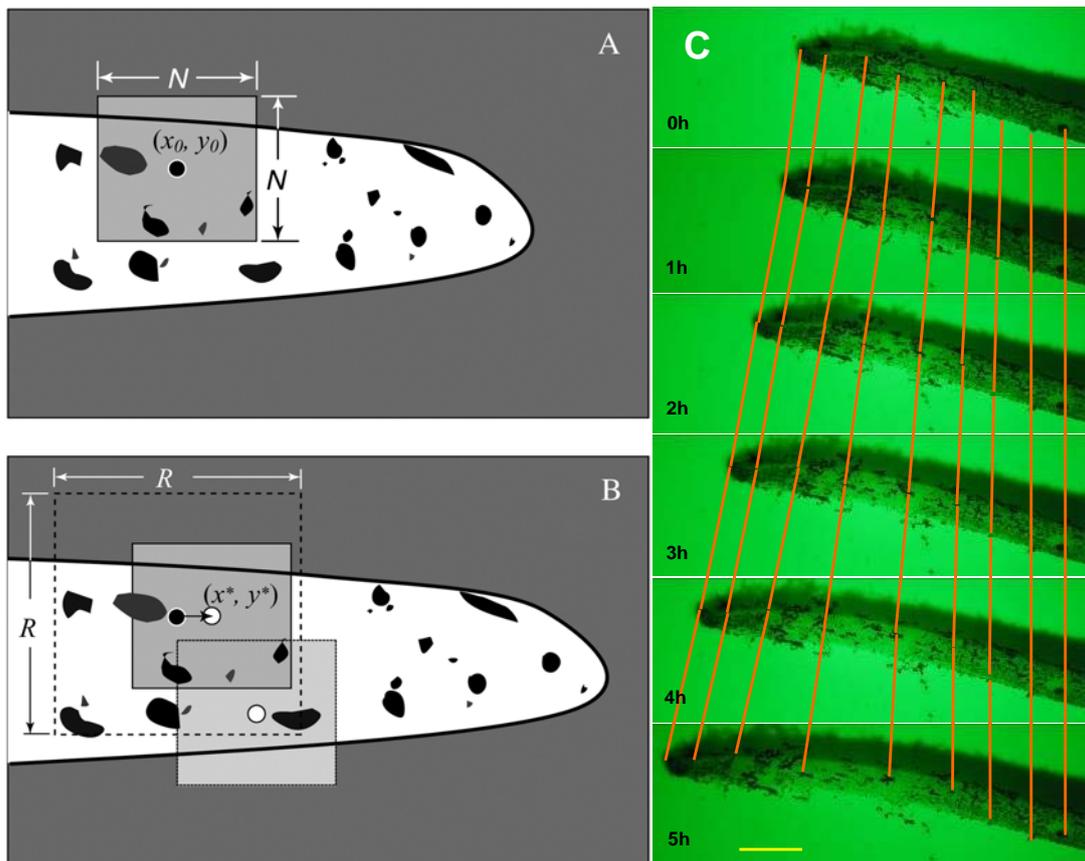


Figure 26 : Principe du logiciel Kineroot. **A.** Des points de repères (cercles noirs) sont appliqués de façon arbitraire le long de l'axe de la racine sur une image de référence. Un champ N est alors défini autour des points de repères. **B.** Ce champ N est recherché par analyse de nuance de gris sur l'image suivante dans un champ R d'une surface plus grande (Basu *et al.*, 2007). **C.** Mise en évidence du déplacement des particules entre différentes photos successives sur une racine de peuplier.

toutes les images chargées dans le logiciel, la première photo d'une série temporelle est définie comme image de référence. Dans cette dernière, des points de repère artificiels sont positionnés le long de l'axe médian de la racine. Le choix des points est arbitraire et sans rapport avec l'emplacement des particules de graphite. Le point situé à l'extrémité de l'apex est défini comme le référentiel d'analyse. Afin d'obtenir un profil dans lequel les valeurs de vitesse sont déterminées à des coordonnées équidistantes, il est nécessaire que les points de repère soient équidistants, ce qui est généré par interpolation. Les points de repère sont alors suivis dans toute la séquence d'images. Ce suivi s'effectue image par image par analyse de nuance de gris. Autour des points de référence, le champ de pixels est défini sur une surface N dans l'image de référence (Figure 26). Ce nuage de pixels N est suivi dans l'image suivante dans un nouveau champ de surface R, plus grand que N. Par exemple, si les points de référence sont placés sur l'image i, le logiciel identifie leurs positions dans l'image i-1 et/ou i+1. Pour identifier leurs positions dans l'image i+2, l'image i+1 deviendra l'image de référence. Le logiciel détermine le déplacement du champ N dans le champ R entre deux images par analyse de nuance de gris à l'aide d'un coefficient de corrélation. Il est important de définir au préalable un champ R de grande taille pour être certain que le champ de recherche N soit toujours présent dans le champ R entre deux photos. Le logiciel calcule un déplacement et une vitesse entre chaque image. Dans mes expériences, le champ N et le champ R font 20x20 et 80x80 pixels respectivement.

A la fin de l'analyse, une moyenne de vitesse est obtenue pour chaque point de référence. Bien entendu, la résolution de l'image détermine la qualité de l'analyse. Notre qualité d'image (3264x2448 pixels) nous permet d'obtenir de façon précise et répétable des valeurs de vitesse, déterminées tous les 0.25 mm par interpolation et lissage.

III- Quantification de la densité de transcrits

III.1- Quantification des transcrits à haute résolution dans la zone de croissance de la racine

Pour chaque racine dont le profil de vitesse a été caractérisé, les 11 premiers millimètres de l'apex, incluant la coiffe, sont immédiatement découpés sous une loupe binoculaire en segments d'un millimètre de long. Pour inhiber la dégradation potentielle des ARNs, l'apex est coupé dans un tampon (RNA later, Ambion). Chaque segment est placé dans un tube de 1,5 mL, incubé 24 h dans 100 µL de RNA later à 4°C. Le RNA later est retiré et les segments stockés à -80°C (Figure 27).

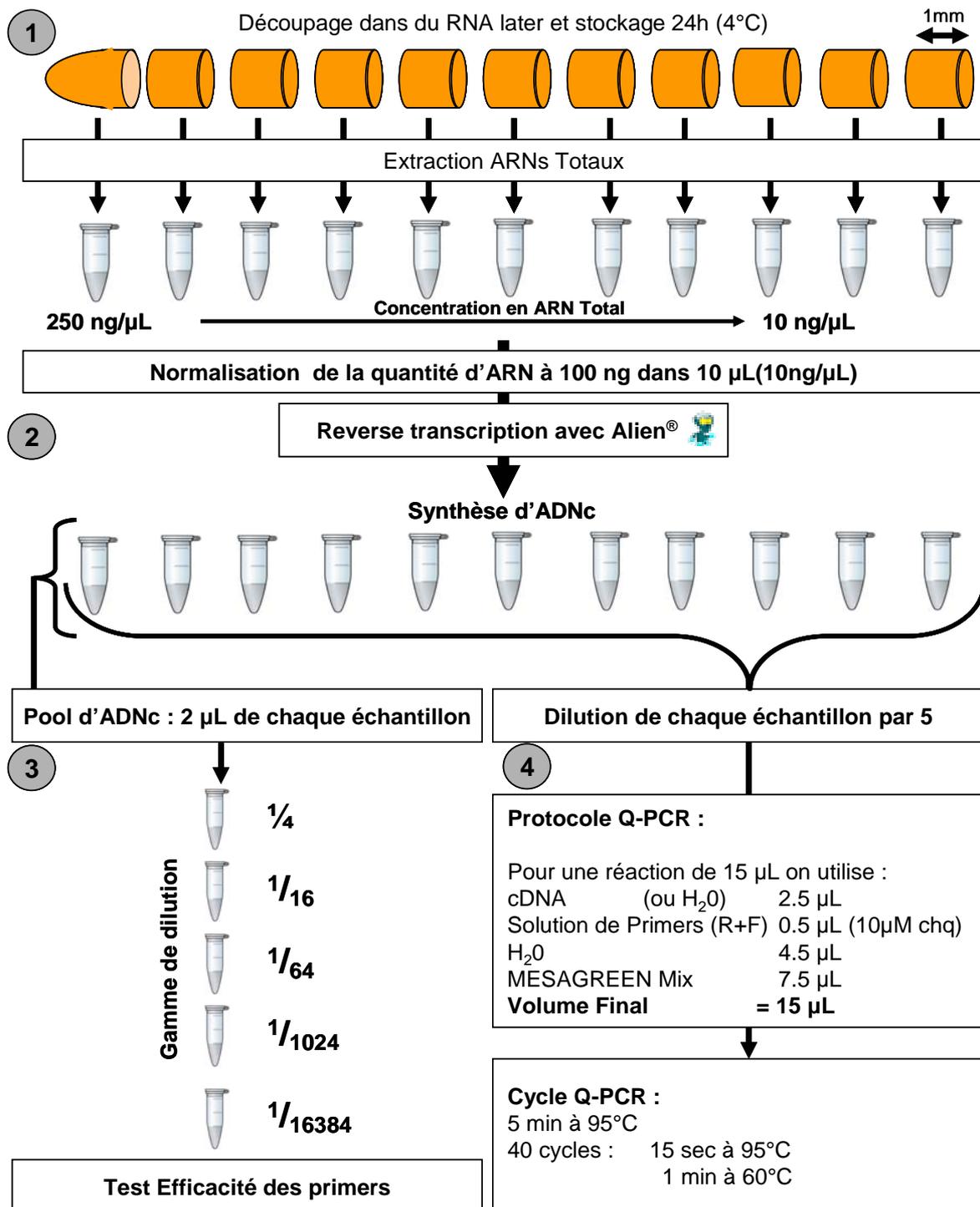


Figure 27 : Etapes successives de la quantification des transcrits par PCR quantitative.

Etape 1 : La racine est découpée en segments d'un millimètre de long dans du RNA later. Les ARN totaux sont extraits dans chacun des segments. *Etape 2 :* Les ARN totaux sont reverse transcrits en ADNc en présence d'une référence externe (Alien®). *Etape 3 :* Un pool d'ADNc est réalisé à partir de tous les échantillons pour constituer une gamme de dilution afin de tester l'efficacité des primers. *Etape 4 :* Les échantillons individuels sont analysés par PCR quantitative selon le protocole joint.

Les ARNs totaux sont extraits de chaque segment à l'aide du kit RNeasy Micro Kit (Qiagen), complété d'un traitement à la DNaseI (Figure 27). La concentration en ARN total de tous les extraits est déterminée par une quantification au Ribogreen (Quant-iT Ribogreen, Molecular Probes) et au spectrophotomètre (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). La qualité des ARNs est aussi vérifiée (kit Experion RNA HighSens, Bio-Rad).

La transcription réverse est réalisée à partir de 100 ng d'ARN total (kit iScript cDNA Synthesis, Bio-Rad). Afin de vérifier que la transcription réverse est efficace et homogène pour tous les échantillons, une quantité connue de référence externe est ajoutée avant la transcription réverse à toutes les matrices (kit Alien QRT-PCR Inhibitor Alert, Stratagene). Cette référence externe est une séquence chimérique d'ARN.

Des amorces spécifiques sont dessinées à partir de la séquence du génome de référence (*Populus trichocarpa*), dont la v1.1 est disponible sur <http://genome.jgi-psf.org>, <http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/> et la v2.0 est sur <http://www.phytozome.net/>. Les séquences des amorces sont dessinées avec les critères : Primer size : 19-21pb, Primer TM : 59-61°C, Product size <200nt- à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Les séquences des amorces spécifiques sont données dans le Tableau 2.

Les matrices d'ADNc obtenues sont diluées 5 fois. La gamme de dilution des ADNc est réalisée à partir d'un mélange de tous les échantillons (i.e. une représentation égale de tous les segments de toutes les racines, tous traitements confondus). La quantité de transcrits dans chaque matrice est déterminée par PCR quantitative. Le mélange réactionnel est composé de 2.5 µL de cDNA dilué, 7,5 µL de mix MESA GREEN qPCR Mastermix, 0.5 µL du couple d'amorces spécifiques (500 nM), et 4.5 µL d'H₂O. Les cycles de température (5 min à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C suivis d'une minute à 60°C) sont réalisés par un thermocycleur (MJ research PTC 2000) qui est couplé à un système de détection (Chromo 4, Bio-Rad). En fin de programme, une courbe de dissociation est réalisée (incrément de température de 65°C à 95°C, avec une lecture tous les 0.5°C) pour déterminer la spécificité des amorces (i.e. si le produit d'amplification est unique, il est dissocié à une seule température, déterminée par sa séquence nucléotidique). Le plan d'expérimentation comporte des témoins négatifs (absence de matrice ADNc, remplacée par de l'eau ou la matrice ARN) et un témoin positif (matrice séquence chimérique Alien).

La PCR quantitative repose sur la détermination de la quantité d'ADN amplifiée à chaque cycle, c'est-à-dire en temps réel et non en point final comme dans la PCR classique. Le principe de la technologie SybrGreen est un suivi d'intensité de fluorescence à la fin d'un cycle de PCR (dénaturation, hybridation, élongation) qui traduit la quantité d'ADN double

Nom des gènes	Description	N° d'accession	séquence des amorces 5' → 3'	Taille de la séquence amplifiée (bp)	Efficacité PCR-Q (%)
<i>PtTIP1;1</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	549212	F-AAACATCGGCCTTTGCTCTA R-TCACCCTTCTTTGGGTCAAC	124	99
<i>PtTIP1;2</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	833283	F-GGGTGACATCGGGATAATTG R-TGCAGAACCAACGAATGGAC	181	97,2
<i>PtTIP1;3</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	822504	F-CATGCATTGCACTCTTTGT R-CCAATAAGTGCACCGAAGGT	92	99,3
<i>PtTIP1;4</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	656044	F-AATCCTGCTGTGACCTTTGG R-GAAGCAAGCAAGCAACAACA	109	99,6
<i>PtTIP1;5</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	667870	F-TCTTCCGTGGCATCCTTTAC R-AACGAAGGCGTCCATACAC	140	97,4
<i>PtTIP1;6</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	589502	F-CTGCTTTCGCTCTGCCTCT R-TTGGAGCTATGATCCCCAAG	138	94,4
<i>PtTIP1;7</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	558321	F-CTTTCCTTGGTGGCAACATT R-CCCAGGGGACAGAGTGAATA	140	105,5
<i>PtTIP1;8</i>	Tonoplast Intrinsic Protein Class1	828458	F-CATTGGTGGCAACATCTCAC R-CCCAGGGGACAAAGTGAATA	136	96,9
<i>Actin11</i> ^a	Actin	CA8240001	F-CACACTGGAGTGATGGTTGG R-ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG	228	99,4
<i>EF1β</i> ^a	elongation factor 1-β	BI125345	F-AAGAGGACAAGAAGGCAGCA R-CTAACCGCCTTCTCCAACAC	145	99,6
<i>PtApl</i>	Altered Phloem Development transcription factor	765696	F-CTTTGATTTGGTCGGACGAT R-TAATGGTGGTGAATCTGGA	113	105
<i>PtPIP2;6</i>	Plasma Intrinsic Protein Class2	CV227359	F-GCTTTGTCTCTCGCCAAACT R-TTCAACGTCCTTGCCATA	60	98,5
<i>PtADH</i>	Alcohol deshydrogenase	816232	F-CGCATATTCGGTCATGAAGC R-GGTAATTGGCTTTCCGTTG	60	96,2

Tableau 2 : Liste des gènes et amorces utilisés. ^a amorces publiées par Brunner *et al.*, (2004).

brin présent dans le volume réactionnel (Figure 28). En effet, le SybrGreen est un intercalant nucléaire qui ne fluoresce que sous sa forme fixée à l'ADN double brin. Cycle après cycle, l'intensité de fluorescence augmente en suivant une sigmoïde, reflétant l'évolution la quantité d'ADN produit à chaque cycle. Un seuil de fluorescence est établi au point d'inflexion de la courbe de fluorescence (précédent la phase exponentielle du signal). Ce point d'inflexion est obtenu après x cycles d'amplification et son ordonnée est appelée "Ct" pour "Cycle Threshold". Plus la quantité initiale d'ADNc correspondant au gène d'intérêt est forte dans le milieu réactionnel, plus le Ct est atteint rapidement et correspond à un faible nombre de cycles. A l'inverse, plus la quantité initiale d'ADNc est faible, plus le Ct est atteint lentement. La gamme de dilution est utilisée pour convertir le Ct en quantité d'ADNc initial.

Dans notre étude, douze gènes ont été analysés en PCR quantitative dans chaque segment d'un millimètre pour chaque traitement. L'analyse a été réalisée sur trois répliquas biologiques et deux répliquas techniques. L'ensemble des étapes est résumé sur la Figure 27. Afin de s'assurer que le PEG ne provoque pas une hypoxie au niveau des racines, le niveau d'expression d'un gène codant un membre de la famille des alcools déshydrogénases est analysé (*PtADH*, Annexe 1). La séquence protéique de PtADH présente 85% d'identité avec la séquence protéique d'At1g77120 d'*Arabidopsis thaliana*. Ce gène a été montré comme induit lors du stress hypoxique (Liu *et al.*, 2005).

III.2- Expression normalisée et densité de transcrits

Le niveau d'accumulation de transcrits, mesuré par PCR quantitative, peut être exprimé soit en unité arbitraire (en se basant uniquement sur une échelle de valeurs arbitraires pour la gamme de dilution) soit en nombre de copies (si la gamme de dilution est réalisée à partir d'une quantité connue de copies du gène d'intérêt). Afin de s'assurer que les différences de niveau d'un transcrit d'intérêt entre deux échantillons sont effectivement dues à une répression ou une induction spécifique, il est nécessaire de prendre en compte un niveau basal d'expression dans les deux échantillons. Il s'agit de normaliser l'expression du gène d'intérêt en regard de celle d'un gène, dit « de référence », dont l'expression est relativement stable et reflète les processus moléculaires fondamentaux (« housekeeping gene »). La détermination du ou des « meilleurs » gènes de référence, parmi les gènes dont l'expression est mesurée dans plusieurs échantillons, a été réalisée en utilisant geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002, <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Ce programme utilise des comparaisons deux à

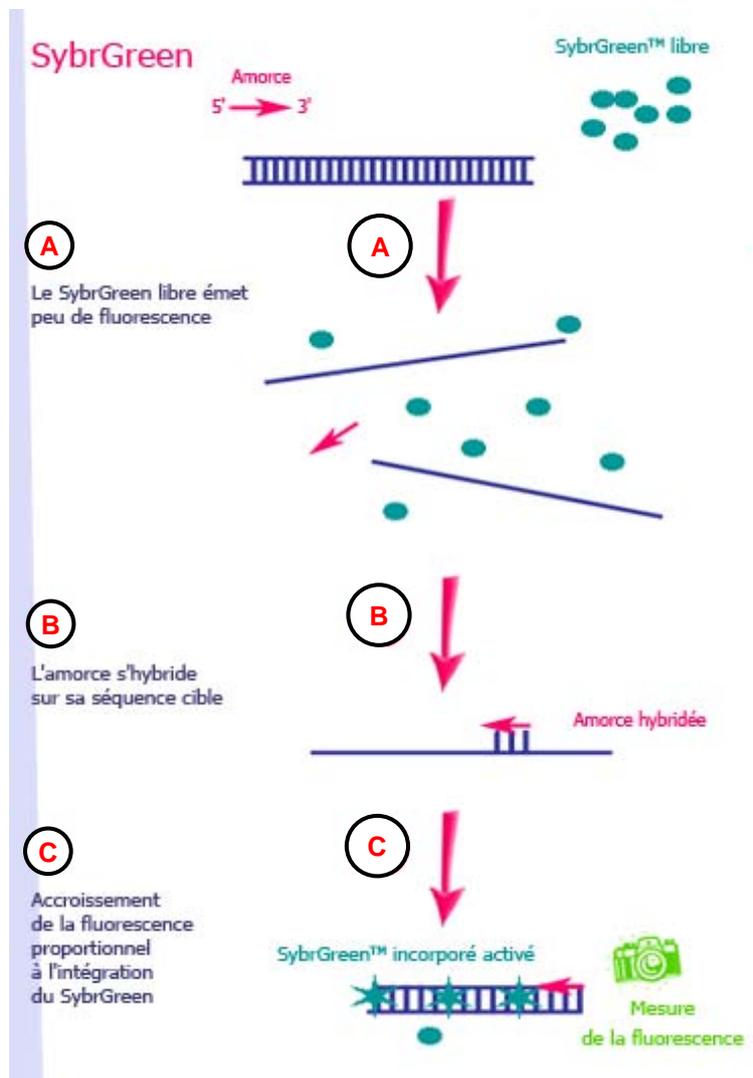


Figure 28 : Principe de la technologie SybrGreen pour quantifier les transcrits. Adapté de <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>.

deux ainsi que des moyennes géométriques à travers une matrice d'expression de gènes et d'échantillons biologiques.

Pour chaque gène, un ΔCt est calculé : le Ct le plus faible (Ct_{min}) au sein de la matrice d'échantillon est soustrait aux Ct de tous les autres échantillons.

$$\Delta Ct = Ct - Ct_{min}$$

L'expression relative du gène considéré dans un échantillon est calculée en considérant une efficacité d'amplification optimale.

$$\text{Expression relative} = 2^{(-\Delta Ct)}$$

La matrice d'expression relative de tous les gènes dans tous les échantillons est soumise au logiciel geNorm. Le logiciel détermine alors le/les gène(s) présentant l'expression relative la plus stable parmi toutes les conditions. Il(s) est (sont) alors utilisé comme gène(s) de référence dans la détermination de l'expression normalisée des gènes d'intérêt.

$$\text{Expression normalisée} = 2^{-(Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence})}$$

Les expressions normalisées de chaque gène (nombre relatif de transcrits exprimé en unité arbitraire) dans chaque échantillon peuvent alors être comparées.

En considérant que l'échantillonnage de la matrice ARN est représentatif, la quantité de transcrits par millimètre, c'est-à-dire la densité de transcrits, correspond au produit de la quantité d'ARN total dans un segment par la quantité de transcrits mesurée par PCR quantitative. La densité de transcrits du gène d'intérêt (unités arbitraires par mm) est calculée dans chaque segment en prenant compte de la quantité d'ARN total présente initialement dans le segment :

$$\text{Densité de transcrits} = \text{quantité ARN total} \times \text{Expression normalisée}$$

IV- Méthodes numériques

IV.1- Détermination du profil de REGR

Le profil de REGR (Relative Elemental Growth Rate) est issu du profil de vélocité par une dérivée spatiale. Pour réduire le bruit de fond, une dérivée point à point a été privilégiée. Les formules d'Erickson (1976) sont des formules permettant de dériver localement des points équidistants. REGR a été calculé selon la formule suivante :

$$REGR_x = \frac{(-2(V_{x-2}) - 1(V_{x-1}) + 1(V_{x+1}) + 2(V_{x+2}))}{10\Delta x}$$

Où V_x est la vitesse en une position x , et Δx la distance entre deux positions x . Avec cette formule, 5 points de mesure sont nécessaires pour dériver V en une position x . Avec des valeurs de V tous les 0.25 mm sur une plage [0.5-10.5 mm], REGR est obtenu pour la plage [1-10 mm].

IV.2- Détermination de la trajectoire de croissance

La trajectoire de croissance résulte de l'intégration des valeurs de vitesse. Des valeurs de vitesse sont disponibles tous les 0.25 mm entre 0 et 11 mm. Le temps nécessaire pour rejoindre la position $x + 0.25$ mm à partir de la position x est calculé en divisant la distance (0.25 mm) par la moyenne des vitesses en x et $x + 0.25$ mm. A chaque coordonnée spatiale correspond une coordonnée temporelle.

IV.3- Equation de continuité

Le système d'équations différentielles utilisé ici est issu de la mécanique des fluides et appelé équation de continuité (Erickson et Sax, 1956 ; Goodwin et Avers, 1956 ; Hejnowicz 1956). Comme présenté en introduction (II.2.2), la dérivée matérielle, D , représente la vitesse de variation d'une variable (ρ) dans un élément d'un organe en croissance. L'équation de continuité donne accès à la dérivée matérielle:

$$D_{(x)} = \frac{\partial \rho}{\partial t_{(x)}} + v \frac{\partial \rho}{\partial x_{(x)}} + \rho \frac{\partial v}{\partial x_{(x)}} \quad (1)$$

Dans nos cas, ρ est la densité de transcrits (u.a.. mm^{-1}) ou la densité d'ARN total (ng mm^{-1}), v la vitesse exprimée en mm h^{-1} , x la distance à l'apex (mm) et t le temps. $\delta\rho/\delta t$ correspond à la variation locale de ρ , c'est à dire sa variation temporelle à une position x . $\delta\rho/\delta x$ est la variation spatiale du paramètre ρ , et $\delta v/\delta x$ la variation spatiale de v a été définie précédemment comme étant REGR.

Lorsque le paramètre mesuré est stable dans le temps, c'est à dire lorsque $\delta\rho/\delta t$ est nul, l'équation (1) est simplifiée :

$$D_{(x)} = v \frac{\partial \rho}{\partial x_{(x)}} + \rho \frac{\partial v}{\partial x_{(x)}} \quad (2)$$

La dérivée matérielle de la densité de transcrits des gènes d'intérêt est calculée. Comme la densité de transcrits et la densité d'ARN, sont mesurées tous les millimètres, les données sont interpolées en utilisant une spline cubique interpolante et en fixant les dérivées secondes à zéro. Cette interpolation est réalisée à l'aide de la fonction '*csape*' sous le logiciel Matlab (MATLAB, The MathWorks, MA, USA). Les valeurs sont extraites tous les 0.25 mm sur une plage [0.5-10.5 mm]. La dérivée spatiale de ρ a été déterminée de la même façon que pour le calcul du REGR, c'est-à-dire en utilisant la formule d'Erickson à 5 points sur une plage [1-10 mm].

Pour tester la stabilité temporelle de la densité de transcrits (Equation 1), deux lots de trois racines ont été étudiés par traitement. Après 72 h de culture, les racines sont récoltées 1) entre 75 h et 78 h, correspondant à une phase théorique de nuit et 2) entre 84 et 87 h de culture, correspondant à une phase théorique de jour.

IV.4- Traitements statistiques

Les graphiques représentent soit les données individuelles soit les valeurs moyennes par traitement. Dans ce cas, les valeurs moyennes sont représentées \pm erreur standard (i.e. $\text{écartype}/\sqrt{n}$).

L'impact de chacun des traitements par rapport au témoin a été testé sur les paramètres de croissance avec un test paramétrique. En effet le test de Shapiro-Wilk a montré que la distribution de tous échantillons était normale. Comme la condition d'homoscédasticité n'était pas respectée dans toutes les comparaisons, le test de Welsh a été utilisé pour les comparaisons 2 à 2 (test t sans nécessité d'égalité des variances, $\alpha = 0.05$, Annexe 2, 3 et 4). La recherche des faux positifs (multiples comparaisons) a été effectuée avec le test de Bonferonni.

Un test de régression linéaire (sous Excel) a été utilisé pour tester la stabilité de la vitesse de croissance de la racine pendant les 20 dernières heures de l'expérience (Annexe 5).

Résultats et Discussion

I- Comment s'affranchir de l'hétérogénéité des paramètres de croissance le long de l'apex de la racine pour analyser la régulation de l'expression d'un gène ?

Présentation de l'étude

L'induction ou la répression d'un gène correspond à la variation temporelle de son expression, i.e. la variation de densité de transcrits entre deux temps. Dans un organe mature, un échantillonnage local (à une position x) considère la même cellule ou le même groupe cellulaire, quel que soit le temps t de prélèvement. En revanche, dans un organe en croissance, en une position x , entre deux temps de mesure, les cellules ont été déplacées. Si on souhaite étudier la régulation d'un gène au sein d'une cellule dans un organe en croissance, il est nécessaire de prendre en compte le déplacement des cellules et leur expansion. Un formalisme de la mécanique des fluides, l'équation de continuité permet de calculer une dérivée matérielle, c'est-à-dire la vitesse de variation d'une propriété dans un organe en croissance (cf. Introduction II) en prenant en compte la vitesse de déplacement et la vitesse d'allongement relatif des cellules le long de l'apex en croissance. Alors que cette équation a été couramment utilisée pour étudier différents paramètres liés à la croissance, elle n'a jamais été appliquée à l'analyse de l'expression des gènes.

Nous avons appliqué ce formalisme à la densité de transcrits de deux gènes, *Actin11* et *EF1B*, qui sont fréquemment utilisés comme gènes de référence. Les transcrits ont été quantifiés par PCR quantitative le long de l'apex de la racine du peuplier avec une forte résolution spatiale (millimétrique). Une analyse cinématique a permis de caractériser les profils de déplacement et d'allongement des cellules le long de l'apex de la racine.

L'objectif de cette étude est de développer un cadre expérimental permettant de s'affranchir de l'hétérogénéité des paramètres de croissance le long de l'apex pour analyser la régulation de l'expression d'un gène. En outre, le cadre, développé en condition témoin, donne accès à la régulation spatiale et temporelle de l'expression des gènes dans un organe en croissance. Cette étude a fait l'objet d'un article paru dans *BMC Biology*.

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism

Rémy Merret^{1†}, Bruno Mouliat^{2†}, Irène Hummel^{1†}, David Cohen¹, Erwin Dreyer¹, Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot^{1*}

Abstract

Background: Technological advances have enabled the accurate quantification of gene expression, even within single cell types. While transcriptome analyses are routinely performed, most experimental designs only provide snapshots of gene expression. Molecular mechanisms underlying cell fate or positional signalling have been revealed through these discontinuous datasets. However, in developing multicellular structures, temporal and spatial cues, known to directly influence transcriptional networks, get entangled as the cells are displaced and expand. Access to an unbiased view of the spatiotemporal regulation of gene expression occurring during development requires a specific framework that properly quantifies the rate of change of a property in a moving and expanding element, such as a cell or an organ segment.

Results: We show how the rate of change in gene expression can be quantified by combining kinematics and real-time polymerase chain reaction data in a mechanistic model which considers any organ as a continuum. This framework was applied in order to assess the developmental regulation of the two reference genes *Actin11* and *Elongation Factor 1-β* in the apex of poplar root. The growth field was determined by time-lapse photography and transcript density was obtained at high spatial resolution. The net accumulation rates of the transcripts of the two genes were found to display highly contrasted developmental profiles. *Actin11* showed pulses of up and down regulation in the accelerating and decelerating parts of the growth zone while the dynamic of *EF1β* were much slower. This framework provides key information about gene regulation in a developing organ, such as the location, the duration and the intensity of gene induction/repression.

Conclusions: We demonstrated that gene expression patterns can be monitored using the continuity equation without using mutants or reporter constructions. Given the rise of imaging technologies, this framework in our view opens a new way to dissect the molecular basis of growth regulation, even in non-model species or complex structures.

Background

Understanding time-course changes in gene expression and their complex interplay is a major challenge in gene regulation networks [1,2]. Attention has been shifted from mRNA steady-state levels towards rates of changes in transcript abundance and their regulation [3-5]. These dynamic of gene expression become even more complex when dealing with the developmental biology of multicellular bodies. Indeed, the fact that both temporal and positional cues are known to directly influence transcriptional networks [6] creates the need for a

spatiotemporal specification of the changes in gene expression. Coordinated gene expression in tissue (or cells) at different stages of development has been revealed using technologies such as microarray analyses [7,8], mutant screening [9,10] and novel imaging techniques [11,12]. However, these approaches only provide snapshots of gene expression at given times or developmental stages. In these widespread cases, gene expression is mapped in an Eulerian specification, using spatial coordinates at a given time. In developing multicellular structures, changes in gene expression occur alongside changes in organ size, shape and anatomy. Cell positions thus vary continuously due to cell movements, cell growth and cell death [13,14]. It is thus relevant to follow a cell during its movement over time in the growing

* Correspondence: triboulot@nancy.inra.fr

† Contributed equally

¹INRA, Nancy Université, UMR1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR 110 EFABA, F-54280 Champenoux, France

tissue to assess gene expression along the developmental trajectory through a material or Lagrangian specification. Despite evidence of important gene regulations following cell movements [15], there has so far been little research into quantitatively monitoring the rates of changes in expression levels over time and position during the developmental movements.

The question of how cell expansion and cell displacement both influence organ growth and gene expression can be addressed using mechanistic models that consider an organ as a continuum [13,15]. Quantifying rates of change in moving elements has been a longstanding issue in continuum mechanics. This approach requires a detailed characterization of the motion velocity field $v(x, t)$ which can be monitored using video or time-lapse photography [15,16]. Based on the conservation of mass in a deforming continuum, the continuity equation properly quantifies the rate of change of a property in a moving element [17]. For instance, if the concentration of compound A varies across a growing tissue but not with time (that is, $A(t)$ is steady but $A(x)$ is not constant), then the local rate of change $\partial A/\partial t$ at any position x is zero. However, there has necessarily been a change in the concentration of compound A in the moving element to match the change between $A(x)$ and $A(x+v \cdot dt)$ (convective changes). By the same token, if the element volume has increased between t and $t+dt$, then a constant A over time means that net synthesis has occurred and compensated the dilution due to volumetric growth. The continuity equation is able to take into account not only the local rate of change but also the consequences of movement and of possible changes in volume on the rate of change of the property [18].

The use of the continuity equation and the underlying kinematic analyses for growth studies was developed in the 1950's [19-21]. It was then introduced to a wider audience [22,23] and reviewed in [18,24]. Plant tissues can easily be considered as a continuum: since plant cells are stuck together by their middle lamella, shear between cells is usually infinitesimal. Consequently, cell motion in a growing organ is due to the elongation of other cells pushing it [24]. To date, the continuity equation has mainly been applied to gain insights into the physiology of both growth and development of elongating organs. For example, the continuity equation framework has revealed overwhelming convective components of the rate of change of uronide deposition in growing roots [25]. It has also been used to assess the effects of stresses on growth [26,27].

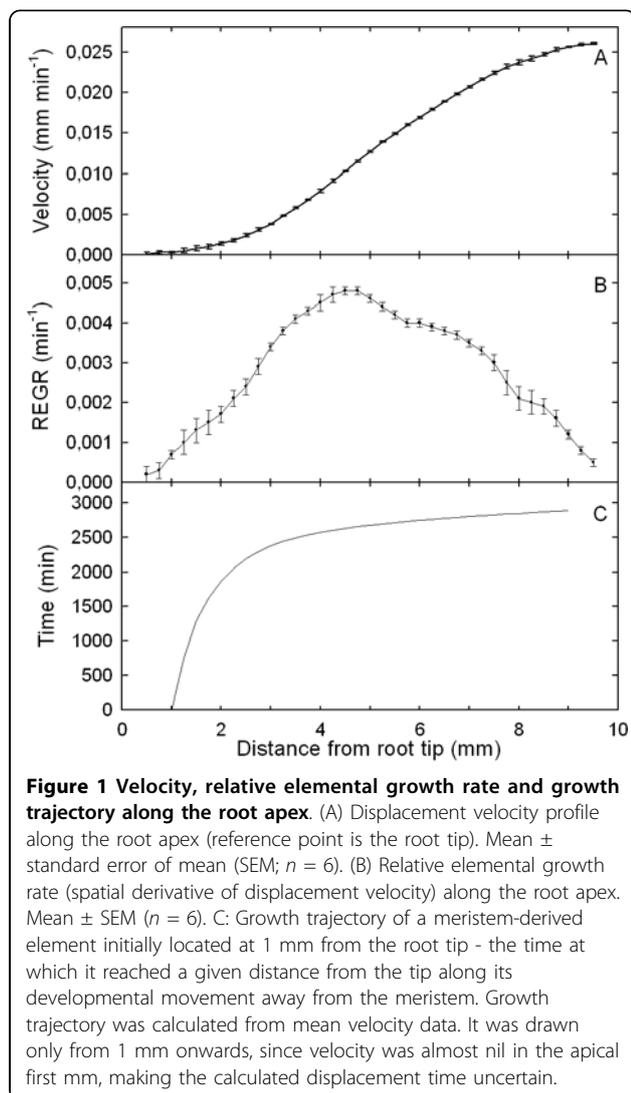
Surprisingly, this framework has not yet been applied to gain a spatiotemporal description of the rates of change in gene expression and provide molecular developmental information in growing tissue. In the present work, changes in the rate of gene expression in the apex

of poplar roots growing under optimal conditions were quantified at high spatial resolution with real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). We assessed the developmental regulation of two genes: *Actin11* and *Elongation Factor 1- β* . These two genes are widely used as internal controls in real-time PCR [28]; yet both may be under transcriptional regulation in time and/or space in an actively growing organ. We show that the rate of change in gene expression can be quantified in time and space by combining kinematics and the continuity equation with real-time PCR. The resulting fields of expression rate revealed highly contrasted profiles for the control of *Actin11* and *Elongation Factor 1- β* during the developmental movement. We highlighted the importance of the convective component for monitoring changes in gene expression. These results underline that careful attention must be paid to growth and its possible alteration induced by changes in the environment before drawing any conclusions from raw transcript profiling in growing organs [29]. We demonstrate that the regulation of gene expression can be evidenced in growing tissues without using mutants or reporter constructions. Consequently, the proposed framework also constitutes in our view a useful bypass for in-depth analysis of the molecular basis of growth regulation in a wide range of non-model species.

Results

Trajectory, velocity and relative elemental growth rate along the growth zone

The growth-velocity profile (velocity of cell movement away from the root tip) was determined in 6 roots aged from 5 to 11 days (Figure 1A). As shown by the very low variability around the average profile, neither root age nor the time of the observation along the night (from 1 h to 6 h after light shutting, see Additional File 1: Figure S1A) induced significant changes in the growth profiles. A side experiment comparing root growth during the light phase and the night phase did not reveal any change due to direct light signaling or possible nycthemeral rhythm (see Additional File 1: Figure S1B). Growth was thus assumed to be steady for a few days in the following. The spatial derivative of velocity - that is, the relative elemental growth rate measuring relative elongation per unit time of elements along the axis, had a skewed bell-shaped distribution peaking at 4.5 mm from the root tip (Figure 1B). The first 2 mm, which include the root cap and the meristematic zone, displayed low velocity. Velocity increased with distance from the root tip, reaching a plateau of $0.026 \text{ mm min}^{-1}$ at approximately 9 mm, corresponding to the elongation rate of the whole root. Given the assumption of steady state, the growth trajectory - that is, the mapped position on the root of a meristem-derived tissue element as



a function of time was calculated from velocity data. It was found highly non-linear (Figure 1C). A tissue element crossed the growth zone in about 2800 min (about 2 days), but spent more than 2300 min (over 38 h) in the 1-3 mm section - over 80% of total growth duration.

Transcript density along the growth zone

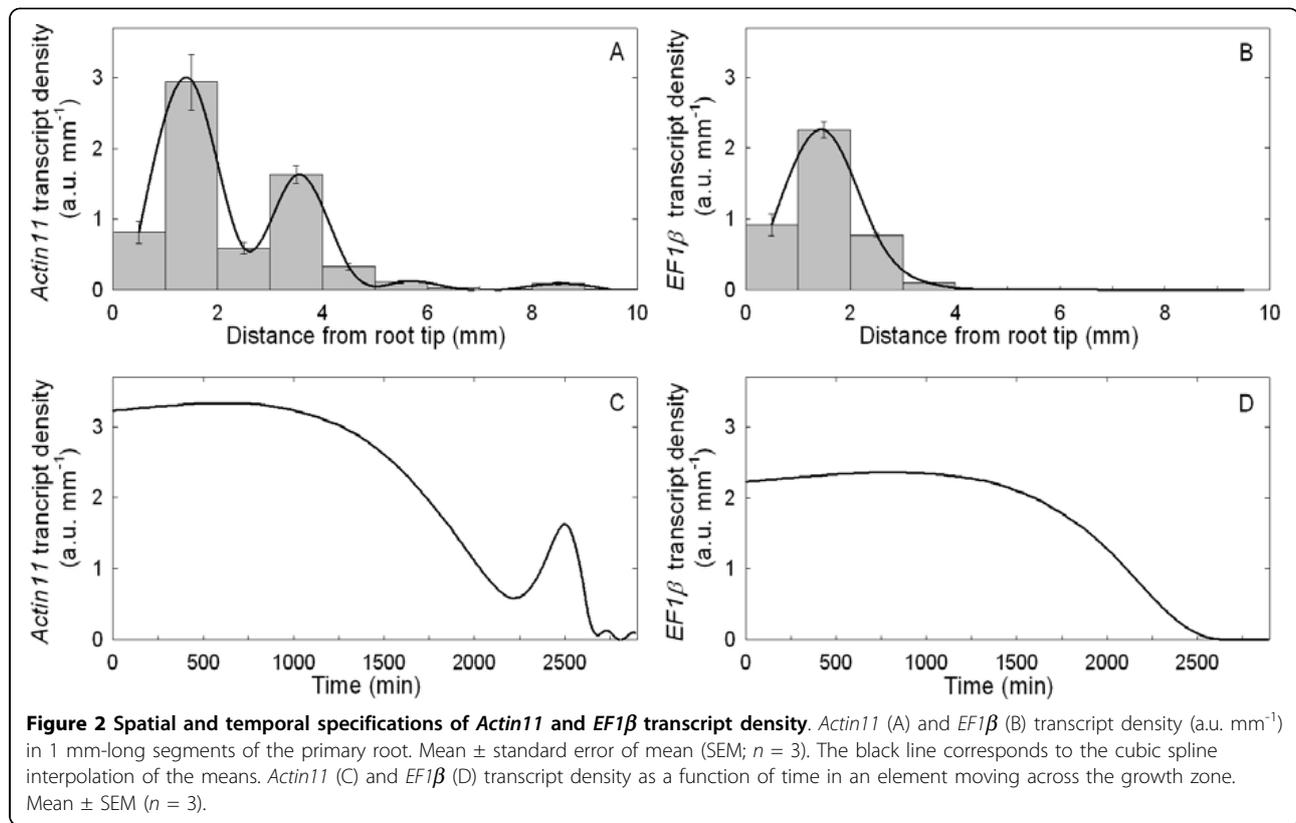
As the growth zone shows highly heterogeneous local velocity and relative elemental growth rate (Figure 1A and 1B), the spatial distribution of molecular entities was analysed at high spatial resolution. The transcript densities of *Actin11* and a putative *Elongation Factor 1- β* (*EF1 β*) were plotted against the current segment position on the root axis (Eulerian specification, Figure 2A and 2B). The *Actin11* density profile displayed two peaks at 1.5 and 3.5 mm from the root tip with similar spans, but decreasing intensity, and low values in more distal segments. The *EF1 β* density profile differed

from that of *Actin11*, displaying a single peak at 1.5 mm and very low levels in all the more distal segments.

No time trend of the RNA profiles can be suspected (see Additional File 2: Figure S2A), suggesting a temporal stability of the RNA profiles whatever the age of the root, or the time of the observation during the night phase. Consistently with the steadiness of growth, the profiles of transcript density were thus assumed to be steady for a few days in the following (see also Additional File 2: Figure S2B for additional indirect arguments). Assuming steady growth and steady transcript density, the developmental time-course of the transcript density in a tissue element initially positioned at 1 mm from the root tip (Lagrangian specification, Figure 2C and 2D for *Actin11* and *EF1 β* , respectively) was calculated by combining transcript density (Figure 2A and 2B) with growth trajectory (Figure 1C). Due to non-linear changes in local velocity, the actual time-course of transcript density in a given tissue element was quite different from what could be expected intuitively from Figures 2A and 2B. For *Actin11* (Figure 2C), the first peak lasted almost five times longer than the second peak, indicating that the first changes in *Actin11* were smooth and long-lasting, whereas the second peak was a transient shift (8 h). However, even these transcript density profiles (Figure 2) cannot be analysed for regulation of gene expression simply by considering position-to-position variations, since as time goes on, each element not only moves but also expands (Figure 1B). While the Lagrangian specification of transcript density considers the movement of the tissue element, only the continuity equation gives an unbiased view of gene expression during growth, taking into account both cell movement and cell volume expansion.

Regulation of gene expression

The material derivative of transcript density D (expressed in arbitrary unit $\text{mm}^{-1} \text{min}^{-1}$) was calculated from the continuity equation. D corresponds to the net accumulation rate of transcripts in each element along the root. In other words, D reveals the regulation of gene expression resulting from the balance of transcription and decay along the root, corrected for the positional and dilutive effects of growth (if $D = 0$, then transcript level remains constant). From equation (3), it is possible to plot the two components of D , namely the convective and the dilutive components. Under the assumption of steady transcript density, the local rate of change in gene expression $\delta\rho/\delta t$ is null. The convective rate of change, $v \cdot \delta\rho/\delta x$, corresponds to the variation in transcript density in an element moving to a region further away from the root tip (Figure 3A and 3B). The dilutive component, $\rho \cdot \delta v/\delta x$ (Figure 3C and 3D) assesses potential compensation of the dilution of transcript abundance during expansive growth through net

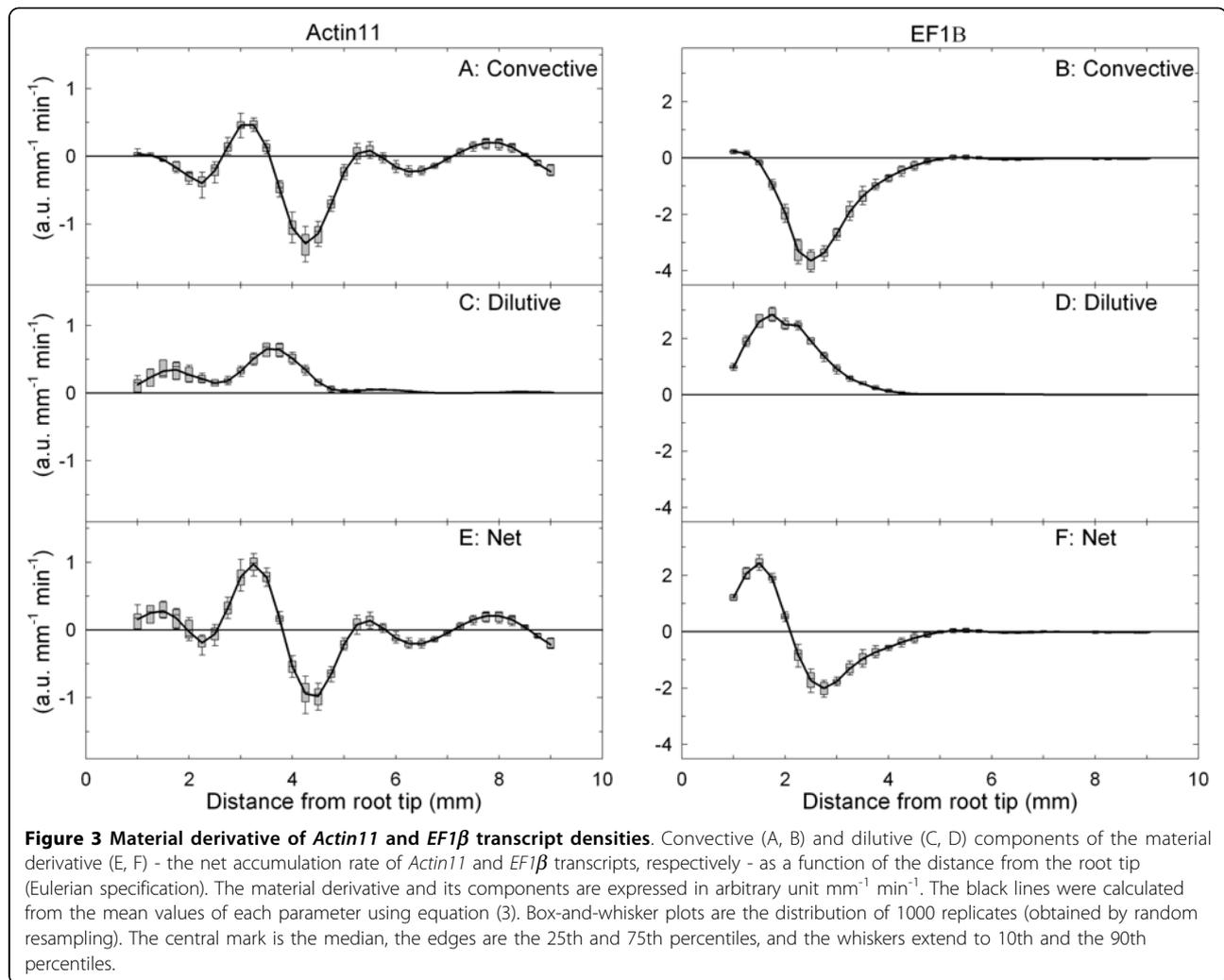


transcript synthesis (that is, if $\rho \cdot \delta v / \delta x = 0$, then net transcript synthesis just compensates for the expansion-driven dilution).

Figures 3E and 3F illustrate these net accumulation rates along the root growth zone (Eulerian specification) for the *Actin11* and *EF1β* transcripts, respectively. For both genes, the profile of the net accumulation rate of transcripts in tissue elements D was highly dynamic in the zone of increasing relative elemental growth rate (Figure 1B). In the distal part of the growth zone (5–9 mm), D was generally not significantly different from zero, indicating that the transcript level remained almost constant for both genes. There was an active accumulation of *Actin11* transcripts peaking at 3.25 mm in cells undergoing growth acceleration, followed by a negative peak of almost the same amplitude at 4.25 mm (Figure 3E) in cells just starting to decelerate their growth (Figure 1B). Significant peaks of smaller amplitude were observed, showing that *Actin11* transcripts accumulate in cells at 1.5 mm from the root tip (probably sitting in the division zone) and in cells that were poised to enter post-growth cell differentiation at 8.5 mm. In comparison, the *EF1β* expression is up-regulated closer to the root tip, at 1.5 mm (Figure 3F). As for *Actin11*, this accumulation phase was followed by a phase during which the decay rate overcame the transcription rate.

For *Actin11*, the absolute value of D was clearly mainly attributable to the convective component whereas for *EF1β* the relative contribution of the convective and dilutive components was balanced (Figure 3), meaning that synthesis rates were unequal for both transcripts. Note also that net transcript synthesis overreached dilution in the first 5 mm - the zone of increasing relative elemental growth rate (Figure 3C and 3D). Beyond 5 mm, the dilutive effect was just compensated.

Since the density of nuclei and presumably the cellular activity are heterogeneous along the root growth zone [29,30], the net accumulation rate of total RNA was used as a control. The total RNA content varied significantly along the growth zone, with a lognormal distribution and a peak at 1.5 mm from the tip (Figure 4A). The net accumulation rate of total RNA, calculated using the same formalism as above, was positive in the 1–3 mm range and showed a flat and near null profile thereafter (Figure 4B). The simulated distribution of D , shown by box-and-whiskers plots, included zero, meaning that the mean value of D can be null by chance. In other words, the net accumulation rate of total RNA can not be considered as strictly different from zero beyond the 3 mm mark (Figure 4B). This location of total RNA accumulation adds to the evidence for a high cellular activity of a meristematic zone.



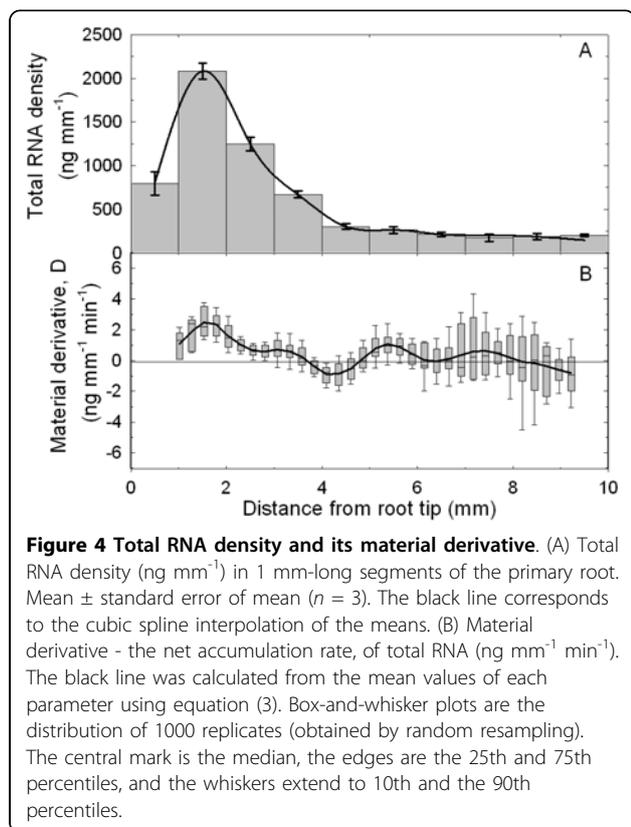
Given the calculation of temporal variations using the growth trajectory (as in Figure 2C and 2D), net accumulation rates were plotted in space and time (Figure 5, Additional Files 3, 4, 5: Movie1, Movie2 and Movie3). In other words, variations of net accumulation rate were tracked in a tissue element which was originally located at 1 mm from the root tip and moved through the growth zone away from the meristem. This spatiotemporal mapping enables to equally perceive kinetic and positional cues. The Lagrangian specification is shown here for a single element, but as long as growth and development are steady, all the elements display the same developmental fate [18]. Figure 5 highlights that the variations in net accumulation rate of *Actin11* and *EF1β* transcripts differed markedly from the dynamics of total RNA, thus strengthening the conclusion of a tight regulation of gene expression in any cell crossing the growth zone. Given that total RNA accumulation rate did not significantly differ from zero beyond the 3 mm

mark (or 3400 min, Figure 4B), its dynamics appear more stable than the sharper dynamics of *Actin11*. Both transcripts appeared to be under distinct control. The dynamics of *EF1β* were much slower than the dynamics of *Actin11*, which varied very rapidly in the ageing cell. However, both were maintained at an almost constant rate of net accumulation for approximately 1500 minutes (25 hours) at the very tip of the root. These results offer novel insights into the developmental analysis of gene regulation in growing plant organs.

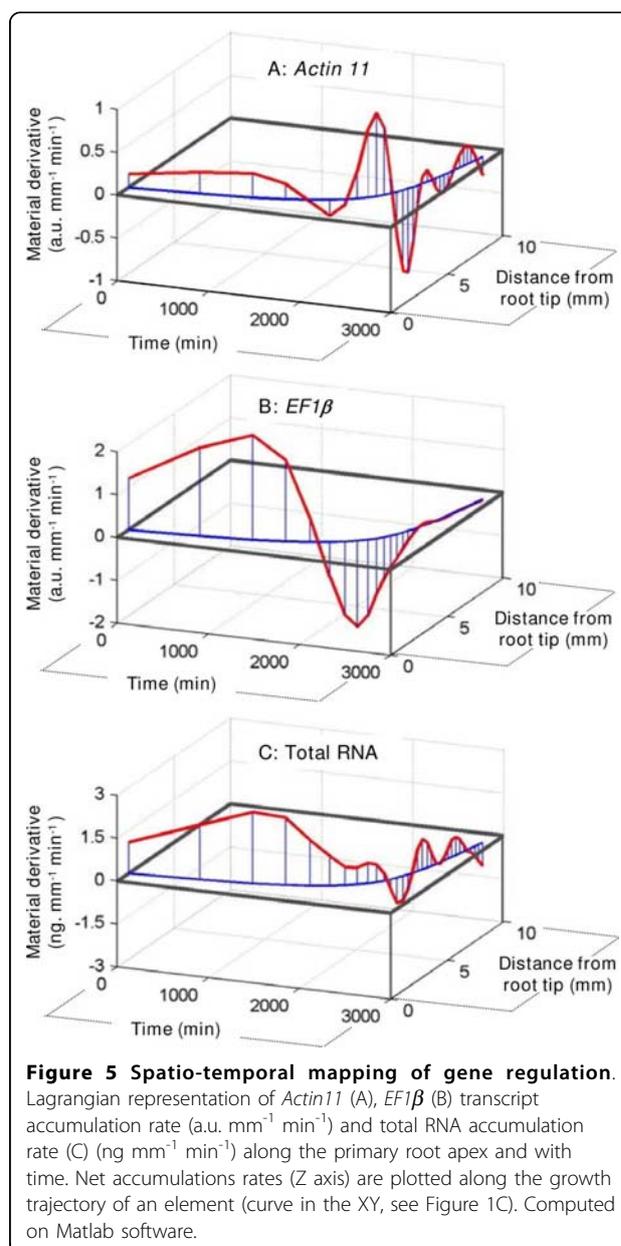
Discussion

Specification of space, time and age in the study of dynamic processes

The present work focuses on the combination of two dynamic processes: expansive growth and gene expression. The analysis of both processes is influenced by the way space, time and age are considered. This stands as a pivotal point, since it shapes every experimental design



and, therefore, drives conclusions. Dynamic analyses necessarily involve considering the rates of change in a biological structure (a cell, a piece of tissue or a segment of an organ). Whereas growth studies usually consider the rates of change (relative elemental growth rate), many investigations into the control of gene expression are based on the quantification of mRNA transcript levels, which are shaped by a dynamic interplay between the rates of synthesis and decay [3,5]. In mature tissues, where cells no longer move nor enlarge irreversibly, the transcriptional regulation of gene expression (for example environmental induction) is revealed by the temporal derivative of local transcript density. However, a further step is needed in order to capture gene regulation in growing structures by considering movement and expansion, which are taken into account by the input of the partial derivatives and the growth velocity field into the continuity equation [18]. The present work is, to our knowledge, the first study to apply this framework to transcript density, providing an unbiased view of the spatiotemporal regulation of gene expression (Figure 4E and 4F). In a steady growing structure, constant patterns of activity are displayed while material flows through it [31,32]. The developmental changes in net rates of gene expression were revealed by the convective and dilutive partial derivatives, two terms that are usually not considered in typical molecular studies of development.



We studied growth kinematics and gene expression under steady conditions of growth (window of stable growth rate, dark phase and constant temperature). In these conditions both the growth velocity and transcript density of housekeeping genes were assumed to be time invariant. When transcript density and/or velocity vary (ies) over time and are properly quantified at each time step, equation (1) has to be used [instead of simplified equation (3)]. Quantification of material derivative through equation (1) requires a larger experimental effort but is still straightforward (see for example [33]). Vital imaging of growth and gene expression, as well as high throughput quantitative analyses of gene transcript

abundance, will greatly support such measurements in the near future, enlarging the potential uses of the method presented here.

In the present work, mean trends were established from the mean value of three independent measurements of ρ (transcript density or total RNA density) at every position. RNA extraction from very small samples is destructive and missing values prevented analysis at the individual root level. However, the advent of imaging techniques which provide accurate positioning and quantitative measurement of transcript level [11,12] will enable more detailed analyses of individual organs using the continuity equation. This could be a major breakthrough, as the analysis of single roots have revealed a steep relative elemental growth rate gradient between the meristem and the elongation zone, which is usually smoothed when pooling data from several roots [34]. Taking such gradients into account should reveal even more dynamic patterns of gene expression rates due to convective and dilutive terms. By the same token, our framework could be used to conduct a more detailed analysis at the level of small cell territories in order to characterize the contributions of different cell types along the root growth zone [8], but would require more advanced three dimensional kinematic and a more complex formalism. For simplification, the growth field of the root apex was considered here as a one dimensional vector field (the main axis) due to the slenderness of the root and the anisotropy of its growth and to the lack of shear growth (this is similar to the rod approximation in the beam theory of solid mechanics [24]). However, two or even three dimensions can be taken into account by using equations developed for appropriate coordinate systems (cylindrical, rectangular, spherical), as given by Silk [18]. More complex structures with a lower level of symmetry (for example, branching roots or apical meristem of shoots) can also be considered, using natural curvilinear coordinate system and proper tensorial formalism [35]. The transcript density would have to be characterized with the necessarily accuracy in the three dimensions. While feasible, it would require a large experimental effort.

Once the rates of change have been properly computed, the next significant challenge to reveal regulation processes is the spatial and temporal specifications of these rates. In most studies of growing organs [7,36], the property of interest is described at a given developmental stage (time) as a function of the position in the growth zone (Eulerian specification, as in Figure 2A and 2B for transcript density). This can reveal spatial mechanisms such as those related to highly diffusible or transported chemicals (for example, auxin in roots [37]). An even more insightful way to describe this dynamic process is to choose an element and track its properties as it is displaced in space and time and undergoes

developmental changes (Lagrangian specification, Figure 5). These three dimensional plots are necessary in order to handle the fact that, in a growing organ, time and space are intimately but non-linearly linked. In the present study, Eulerian and Lagrangian specifications of dynamic processes highlight different aspects of developmental regulation. The Lagrangian time*space specification revealed a long-term steady accumulation of transcripts of the studied genes (*EF1 β* and *Actin11*), as well as total RNA in the first 2 mm of the root tip (presumably the meristem) followed by highly dynamic regulation as the cells move away and undergo the accelerating and decelerating phases of expansion growth.

Towards a dynamic analysis of transcriptional regulation during development

A deeper understanding of the mechanisms underlying organ growth and development requires quantitative data on three dimensional morphology and gene expression at a variety of stages and scales [13]. Recent technological advances have made it possible to analyse gene expression in individual cell types, tissues or organs through the use of specific mutants [7,8,38]. Fluorescent proteins can thus be coupled with high-resolution imaging in order to display the expression patterns of a gene at whole-organ level. For example, the expression of the vein marker gene *ATHB8* can be used to track the earliest stage of vein development in leaves of *Arabidopsis* seedlings [39]. This approach has also been used to study tissue organization and gene expression during phloem development [40]. However, even if the analysis of consecutive snapshots reveals changes in gene expression, their spatiotemporal dynamics need to be clarified in order to avoid misinterpretation of the observed variations.

Understanding how signals through gene expression generate patterns and govern ontogenic timing is a crucial challenge in developmental biology. Coupling quantitative data with mathematical models provides some answers [41]. In the present study, real-time PCR associated with kinematic analysis of growth at high spatial resolution gave access to the dynamics of gene regulation (Figure 5A and 5B). The demonstration was conducted on two widely-studied genes considered to be housekeepers. We chose the gene coding for ACTIN11 as this protein is one of the main components of cell architecture. Actin microfilaments are involved in many processes such as cell polarity, division and elongation [42]. The use of an inhibitor of actin polymerization (latrunculin B), at a concentration sufficient to remove a considerable amount of actin, reduced the root growth rate by about 50% [43]. Using *Arabidopsis* mutants, Ringli et al. [44] demonstrated that the *Actin2* gene is involved in root hair growth and Bannigan and Baskin

[45] pointed out that Actin microfilaments are crucial for the tuning of cell expansion throughout the organ. In line with these findings, the expression of poplar *Actin11* appears to be tightly controlled along the root growth zone (Figure 5A). Three pulses of up-regulation were observed, corresponding to: (i) the division zone; (ii) the accelerating part of the elongation zone; and (iii) to just before the entry into the maturation zone. The putative *Elongation factor 1-β(EF1β)* encodes a subunit of the EF-1 complex, an essential enzyme for protein synthesis in eukaryotes [46]. *EF1α*, another part of the same functional EF-1 complex, is accumulated in regions of high protein synthesis [47]. *EF1α* is used as a marker for meristematic activity in maize [48]. Poplar *EF1β* was found to be up-regulated in the first two mm of the growth zone (Figure 5B). The high regulation of *Actin11* and *EF1β* expression and their patterning along root growth zone pointed out that these genes did not display the expression stability required for their use as endogenous controls in real-time PCR.

Conclusions

In contrast with the transcript density profiles widely used in the literature [7,8,36], the material derivative of transcript density provides key information about gene expression patterns, such as the location and the intensity of gene induction/repression. This framework appears to be very useful, offering rapid tracking of gene regulation, even in non-model species and species that are not-easily transformable. Moreover, contrary to green fluorescent protein/ β -glucuronidase tracking, the framework makes it possible to analyze many genes in the same biological sample (the number is only limited by the available amount of RNA). In addition, this approach can be used: (i) to test hypotheses on when and where a transduction signal is perceived, which is a key step in rebuilding the between-gene interplays underlying growth; (ii) to unravel the temporal and spatial aspects of gene regulation between treatments affecting the time-course of cells across the growth zone, even under non-steady state situations; and, ultimately, (iii) to assess putative reference genes in the very dynamic context of growing and developing tissues. Although illustrated here for plant roots, the method is fairly generic and can be applied to most developing plant or animal organs or tissues, as long as they can be considered as a continuum [13,14].

Methods

Cultivation condition

Poplar cuttings (*Populus deltoides* × *nigra* cv 'Soligo') were grown in hydroponics in a controlled-environment growth cabinet (air temperature: 21°C, relative humidity: 70%, 16 h light regime, photosynthetic photon flux density:

200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). The Hoagland 1/2 nutrient solution was supplemented with 0.8 mM KH_2PO_4 and pH was adjusted to 5.8. It was aerated by air bubbling and renewed once a week. This production of plant material was done in opaque plastic pots to avoid root exposure to light.

Root growth

The growth rate of a root depends on its total length or its age (the time in days between its emergence and its sampling). Root growth is slow when emerging, constant for several days and then decreases (due to the competition of the lateral roots). Roots were sampled in the plateau phase and were 5-11 days old. Six roots were used to assess the velocity profile. Cuttings were sampled during the dark period and transferred for measuring velocity to a dark room where temperature was kept constant. Root growth measurements were conducted in continuous dark in order to avoid possible actinic light artefact. As poplar roots are plagiotropic, growth was assessed in a horizontal 700 mL tray filled with the same aerated nutrient solution. First, the root apex was carefully marked with graphite powder under 'safe' green light. The cutting was then fixed vertically, the base plunging in the tray so that the marked root was submerged. Time lapse photography was performed using a Canon Powershot S80 camera placed on a Leica MZ6 modular stereomicroscope, which was set vertically above the tray. A ruler was set close to the root for calibration. After a 1 h rest, a series of pictures was taken at 10 min intervals under a 'safe' green light (switched on for 1 min every 10 min). The MATLAB-based software Kineroot [49] was used to track the displacement of graphite particles over space and time and determine the velocity (the local rate of longitudinal displacement due to growth of cells along the growth zone) at a resolution of 0.25 mm.

Transcript density

The root apices were harvested after velocity measurement. The apical centimetre, including the root cap, was cut into 1 mm-long segments under a stereomicroscope in RNA later (Ambion, Texas, USA) following the manufacturer's protocol. Total RNA was extracted using an RNeasy Micro Kit (Qiagen, CA, USA) with an additional DNase I treatment, following the manufacturer's protocol. Total RNA concentration was determined in duplicate using a Quant-iT Ribogreen RNA Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) and NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Colorado, USA) following the manufacturer's protocols. RNA quality was assessed using an Experion RNA HighSens Analysis kit (Bio-Rad, CA, USA). Since total RNA content varied up to 14-fold between root segments, reverse transcription was performed on a standardized 100 ng RNA using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). An Alien QRT-PCR Inhibitor Alert kit (Stratagene, CA, USA) was used

to assess reverse transcription efficiency, following the manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed in a 96-well thermocycler (MJ research PTC 2000) with a chromo4 detection system (Bio-Rad) according to the recommended cycling program (5 min 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C) followed by the generation of a dissociation curve to check for specificity of amplification. The mix contained MESA GREEN qPCR MasterMix (Eurogentec, Liège, Belgium), 500 nM gene-specific primers and 2.5 µL cDNA (diluted 1/5) in each 15 µL reaction. *Actin11* (CA824001 similar to At3g12110) and a putative *Elongation Factor 1-β* (BI125345 similar to At2g18110) were amplified using previously published primers [28]. Primer efficiencies were close to 100% and calculated using Opticon Monitor v3.1 software (Bio-Rad) on standard curves generated using a fourfold dilution series of all cDNA, over at least five dilution points measured in duplicate. By setting the most diluted point of the standard curve to one copy, threshold cycle values were linearly transformed into arbitrary units. Transcript abundances (a.u.) were assessed on two technical replicates. Given that all real-time procedures were conducted on standardized 100 ng RNA, transcript linear density (a.u. mm⁻¹) was calculated as the transcript abundance with respect to total RNA content in each segment. For simplification, the root was considered as a homogeneous cylinder.

Numerical methods

The system of differential equations applied here is reviewed in Silk and Erickson [22] and Silk [18]. The material derivative D (the rate of change of any property ρ in a tissue element of a growing organ) can be computed from the continuity equation:

$$D_{(x,t)} = \frac{\partial \rho}{\partial t}_{(x,t)} + v \frac{\partial \rho}{\partial x}_{(x,t)} + \rho \frac{\partial v}{\partial x}_{(x,t)} \quad (1)$$

Here ρ is the transcript density (a.u. mm⁻¹) or total RNA density (ng mm⁻¹), v the velocity of the tissue element (mm min⁻¹), x the distance from a reference point (here the root tip), and t the time (min), $\delta\rho/\delta t$ is the local partial time-derivative at position x , $\delta\rho/\delta x$ is the spatial gradient in ρ , and $\delta v/\delta x$ is the growth velocity gradient, which measures local growth activity and has previously been termed 'relative elemental growth rate' [18] or 'growth induced strain rate' ($\dot{\epsilon}$, [24]). D is the material derivative (taking into account the movement and expansion in length of each tissue element) with $(v \delta\rho/\delta x)$ the convective component and $(\rho \delta v/\delta x)$ the dilutive component. Contrary to most studies on the dynamics of fluids with low compressibility, this dilutive component cannot be neglected in growing tissues [32].

At any given time (t):

$$D_{(x)} = \frac{\partial \rho}{\partial t}_{(x)} + v \frac{\partial \rho}{\partial x}_{(x)} + \rho \frac{\partial v}{\partial x}_{(x)} \quad (2)$$

As a reasonable first approximation (see Additional File 2: Figure S2), ρ is assumed to be steady (time invariant) and the equation is simplified:

$$D_{(x)} = v \frac{\partial \rho}{\partial x}_{(x)} + \rho \frac{\partial v}{\partial x}_{(x)} \quad (3)$$

Using equation (3), we computed the material derivative D of (i) the transcript density of *Actin11* and *EF1β* and (ii) total RNA density. Note that if the investigated property exhibits temporal variations (waves, circadian,...), the sampling method should be adequately adapted to accurately assess $\delta\rho/\delta t$, the local partial time-derivative over time and space [equation (2)].

As the transcript density ρ was determined every mm, data were interpolated using cubic spline interpolation and setting the end second derivatives to zero (MATLAB, The MathWorks, MA, USA). The spatial derivatives of velocity ($\delta v/\delta x$) and transcript density ($\delta\rho/\delta x$) were calculated using the five-point quadratic differentiation formula [50] to filter high frequency noise. Applying this formula with a 0.25 mm resolution restricted the calculation of D to the 1-9 mm range but avoided potential boundary effects.

RNA extraction from very small samples and real-time PCR are subject to experimental hazards, leading to missing values. While growth was measured on six independent roots, transcript densities ρ for every position on the root axis were measured in three out of the six roots. In addition to the calculation of mean D profiles (from the mean profiles of ρ and v), dispersion around mean D values was estimated on 1000 bootstrap replicates. The 1000 computed profiles were randomly generated by sampling with replacement of the original dataset, which consisted of three (ρ , v) pairs for every position on the root axis. Unless specified, graphs were computed using Sigmaplot software.

Under the assumption of steady state of growth (see Additional File 1: Figure S1), the growth trajectory (element position as function of time) was computed by temporally integrating the (steady) velocity. The successive positions of a particle were iteratively tracked according to $x_{(t+dt)} = x_{(t)} + v_{(x)} dt$. The initial position of the particle was set at 1 mm of the root tip in order to avoid discrepancies due to the very low velocity in the first millimetre. Under the assumption that both growth trajectory and ρ profile were constant, they were compiled to draw a Lagrangian specification of gene

expression and gene regulation. Note that Lagrangian specifications can be drawn for unsteady parameters provided that the temporal variations are taken into account.

Additional material

Additional file 1: Figure S1. Data supporting the time stability of growth. (A) Velocity profiles determined by time lapse photography and Kineroot [49]. Time corresponds to the time between beginning of the dark and the sampling time. The mean velocity shown in Figure 1A is the mean \pm standard error of mean of these six profiles. (B) Biplot between velocity measured during the light phase and velocity measured after 72 h continuous dark ($n = 3$, mean \pm standard deviation). The relation is not statistically different from the identity function - that is, intercept = 0, slope = 1.

Additional file 2: Figure S2. Data supporting the time stability of RNA profiles. (A) Profiles of *Actin11* transcript density. Blue and red symbols correspond to the data shown in Figure 2A. Data were split into two groups according to their sampling time. The black lines correspond to complementary data - three independent roots collected after more than 72 hours of continuous dark. (B) Additional arguments for the steadiness of expression profile. The assumption of a steady profile for *Actin11* is supported by the mining and viewing of diurnal and circadian microarray data from *Arabidopsis* and poplar <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu>. Figure S2B shows the diurnal patterns of *Actin* expression in leaves, which are the most exposed to light and presumably the most light-sensitive organ. The *Arabidopsis* ortholog (At3g12110) (dashed lines) exhibited a diurnal regulation of its expression with no circadian persistency. On the contrary, poplar *Actin11* (continuous lines) showed a very constant expression over the diurnal cycle and no circadian rhythm. The absence of circadian control in poplar leaf supports the hypothesis of constancy of *Actin11* expression in roots. Blue and red = 12 h light/12 h dark; black = continuous light; dashed black = continuous dark. Temperature was constant (22°C).

Additional file 3: Movie1. Rotating spatio-temporal mapping - *Actin11*. Visualization of the three dimensional Figure 5A rotating from the temporal axis to the spatial axis.

Additional file 4: Movie2. rotating spatio-temporal mapping - *EF1 β* . Visualization of the three dimensional Figure 5B rotating from the temporal axis to the spatial axis.

Additional file 5: Movie3. Rotating spatio-temporal mapping - total RNA. Visualization of the three dimensional Figure 5C rotating from the temporal axis to the spatial axis.

Abbreviations

EF: elongation factor; real-time PCR: real-time polymerase chain reaction.

Acknowledgements

RM was financially supported by an INRA and Région Lorraine PhD grant (No. 12000086). This research was supported in part by a Région Lorraine grant (No. 12000158) and by the Agence Nationale de la Recherche under the grant reference ANR-09-BLAN-0245-01 (project Senzo). The authors thank Dr F Halkett and Dr P Montpied for their help with the statistical analyses; UMR1136 (INRA-UHP, Nancy) for hosting the molecular experiments; and Dr N Leblanc-Fournier and four anonymous reviewers for their useful comments on the manuscript.

Author details

¹INRA, Nancy Université, UMR1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR 110 EFABA, F-54280 Champenoux, France. ²INRA, Université Blaise Pascal, UMR_A547 Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier, Domaine de Crouelle, F-63039 Clermont Ferrand, France.

Authors' contributions

RM participated in the design of the study, carried out the kinematics and molecular studies and drafted the manuscript. BM had the original idea of applying the continuity equation to the analysis of gene expression dynamics, conceived the study, participated in its design and drafted the manuscript. IH participated in the design and coordination of the study, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. DC helped in the molecular studies and to draft the manuscript. ED helped to draft the manuscript. MBBT conceived the study, participated in its design and coordination and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 10 September 2009 Accepted: 4 March 2010

Published: 4 March 2010

References

1. Sun N, Carroll RJ, Zhao HY: **Bayesian error analysis model for reconstructing transcriptional regulatory networks.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:7988-7993.
2. Zhou Q, Chipperfield H, Melton DA, Wong WH: **A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:16438-16443.
3. von Dassow G, Meir E, Munro EM, Odell GM: **The segment polarity network is a robust development module.** *Nature* 2000, **406**:188-192.
4. Bolouri H, Davidson EH: **Transcriptional regulatory cascades in development: Initial rates, not steady state, determine network kinetics.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:9371-9376.
5. Narsari R, Howell KA, Millar AH, O'Toole N, Small I, Whelan J: **Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell* 2007, **19**:3418-3436.
6. Levine M, Davidson EH: **Gene regulatory networks for development.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:4936-4942.
7. Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN: **A gene expression map of the *Arabidopsis* root.** *Science* 2003, **302**:1956-1960.
8. Brady SM, Orlando DA, Lee J-Y, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN: **A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns.** *Science* 2007, **318**:801-806.
9. Alonso JM, Ecker JR: **Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**:524-536.
10. Song YJ, He F, Xie GQ, Guo XY, Xu YJ, Chen Y, Liang XH, Stagljar I, Egli D, Ma J, Jiao R: **CAF-1 is essential for *Drosophila* development and involved in the maintenance of epigenetic memory.** *Dev Biol* 2007, **311**:213-222.
11. Galbraith DW, Birnbaum K: **Global studies of cell type-specific gene expression in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2006, **57**:451-475.
12. Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, Hill B, Ross A, Hecksher-Sorensen J, Baldock R, Davidson D: **Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies.** *Science* 2002, **296**:541-545.
13. Coen E, Rolland-Lagan AG, Matthews M, Bangham JA, Prusinkiewicz P: **The genetics of geometry.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:4728-4735.
14. Green PB: **Expression of pattern in plants: combining molecular and calculus-based biophysical paradigms.** *Am J Bot* 1999, **86**:1059-1076.
15. Supatto W, Debarre D, Moulia B, Brouzes E, Martin JL, Farge E, Beaupaire E: **In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:1047-1052.
16. Biskup B, Scharr H, Fischbach A, Wiese-Klinkenberg A, Schurr U, Walter A: **Diel growth cycle of isolated leaf discs analyzed with a novel, high-throughput three-dimensional imaging method is identical to that of intact leaves.** *Plant Physiol* 2009, **149**:1452-1461.
17. Lautrup B: **Physics of Continuous Matter: Exotic and Everyday Phenomena in the Macroscopic World.** Copenhagen: The Niels Bohr Institute 2004.
18. Silk WK: **Quantitative descriptions of development.** *Ann Rev Plant Physiol* 1984, **35**:479-518.
19. Erickson RO, Sax KB: **Rates of cell division and cell elongation in the growth of the primary root of *Zea mays*.** *Proc Am Phil Soc* 1956, **100**:499-514.

20. Goodwin RH, Avers CJ: Studies on roots. III. An analysis of root growth in *Phleum pratense* using photomicrographic records. *Am J Bot* 1956, **43**:479-487.
21. Hejnowicz Z: Growth and differentiation in the root of *Phleum pratense*. II. Distribution of cell division in the root. *Acta Soc Bot Pol* 1956, **25**:615-628.
22. Silk WK, Erickson RO: Kinematics of plant growth. *J Theor Biol* 1979, **76**:481-501.
23. Erickson RO, Silk WK: The kinematics of plant growth. *Sci Am* 1980, **242**:134-151.
24. Moullia B, Fournier M: The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view. *J Exp Bot* 2009, **60**:461-486.
25. Silk WK, Walker RC, Labavitch J: Uronide deposition rates in the primary root of *Zea mays*. *Plant Physiol* 1984, **74**:721-726.
26. Sharp RE, Hsiao TC, Silk WK: Growth of the maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiol* 1990, **93**:1337-1346.
27. Girousse C, Moullia B, Silk W, Bonnemain JL: Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different inhibitions of longitudinal and radial expansion. *Plant Physiol* 2005, **137**:1474-1484.
28. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH: Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* 2004, **4**:14.
29. Walter A, Silk WK, Schurr U: Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Annu Rev Plant Biol* 2009, **60**:279-304.
30. West G, Inze D, Beemster GTS: Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol* 2004, **135**:1050-1058.
31. Green PB: Growth and cell pattern formation on an axis - critique of concepts, terminology, and modes of study. *Bot Gaz* 1976, **137**:187-202.
32. Silk WK: Steady form from changing cells. *Int J Plant Sci* 1992, **153**:S49-S58.
33. Maurice I, Gastal F, Durand JL: Generation of form and associated mass deposition during leaf development in grasses: a kinematic approach for non-steady growth. *Ann Bot* 1997, **80**:673-683.
34. Weele van der CM, Jiang HS, Palaniappan KK, Ivanov VB, Palaniappan K, Baskin TI: A new algorithm for computational image analysis of deformable motion at high spatial and temporal resolution applied to root growth. Roughly uniform elongation in the meristem and also, after an abrupt acceleration, in the elongation zone. *Plant Physiol* 2003, **132**:1138-1148.
35. Hejnowicz Z, Karczewski J: Modeling of meristematic growth of root apices in a natural coordinate system. *Am J Bot* 1993, **80**:309-315.
36. Sharp RE, Silk WK, Hsiao TC: Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiol* 1988, **87**:50-57.
37. Petersson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K: An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* 2009, **21**:1659-1668.
38. Naway T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN: Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell* 2005, **17**:1908-1925.
39. Lee K, Avondo J, Morrison H, Blot L, Stark M, Sharpe J, Bangham A, Coen E: Visualizing plant development and gene expression in three dimensions using optical projection tomography. *Plant Cell* 2006, **18**:2145-2156.
40. Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthelemy J, Palauqui JC: High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008, **20**:1494-1503.
41. Lewis J: From signals to patterns: space, time, and mathematics in developmental biology. *Science* 2008, **322**:399-403.
42. Staiger CJ: Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Phys* 2000, **51**:257-288.
43. Rahman A, Bannigan A, Sulaman W, Pechter P, Blancaflor EB, Baskin TI: Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J* 2007, **50**:514-528.
44. Ringli C, Baumberger N, Diet A, Frey B, Keller B: ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002, **129**:1464-1472.
45. Bannigan A, Baskin TI: Directional cell expansion - turning toward actin. *Curr Opin Plant Biol* 2005, **8**:619-624.
46. Rose AB, Elfersi T, Parra G, Korf I: Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *Plant Cell* 2008, **20**:543-551.
47. Ursin VM, Irvine JM, Hiatt WR, Shewmaker CK: Developmental analysis of elongation factor-1-alpha expression in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1991, **3**:583-591.
48. Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F: Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol* 2006, **62**:305-323.
49. Basu P, Pal A, Lynch JP, Brown KM: A novel image-analysis technique for kinematic study of growth and curvature. *Plant Physiol* 2007, **145**:305-316.
50. Erickson RO: Modeling of plant growth. *Ann Rev Plant Physiol* 1976, **27**:407-434.

doi:10.1186/1741-7007-8-18

Cite this article as: Merret et al.: Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism. *BMC Biology* 2010 **8**:18.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



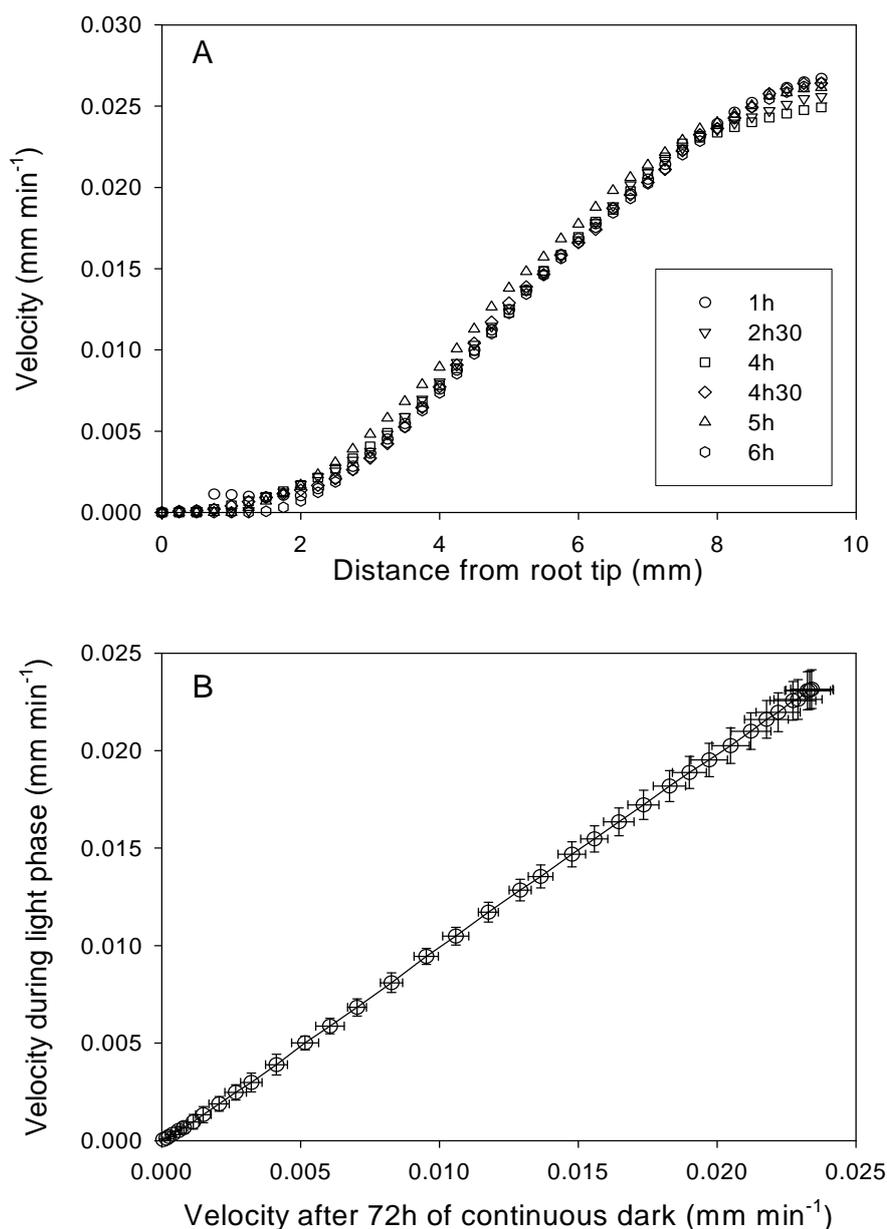


Figure S1. Data supporting the time stability of growth. **A.** Velocity profiles determined by time lapse photography and Kineroot [49]. Time corresponds to the time between beginning of the dark and the sampling time. The mean velocity shown in Figure 1A is the mean \pm standard error of mean of these six profiles. **B.** Biplot between velocity measured during the light phase and velocity measured after 72 h continuous dark ($n = 3$, mean \pm standard deviation). The relation is not statistically different from the identity function - that is, intercept = 0, slope = 1.

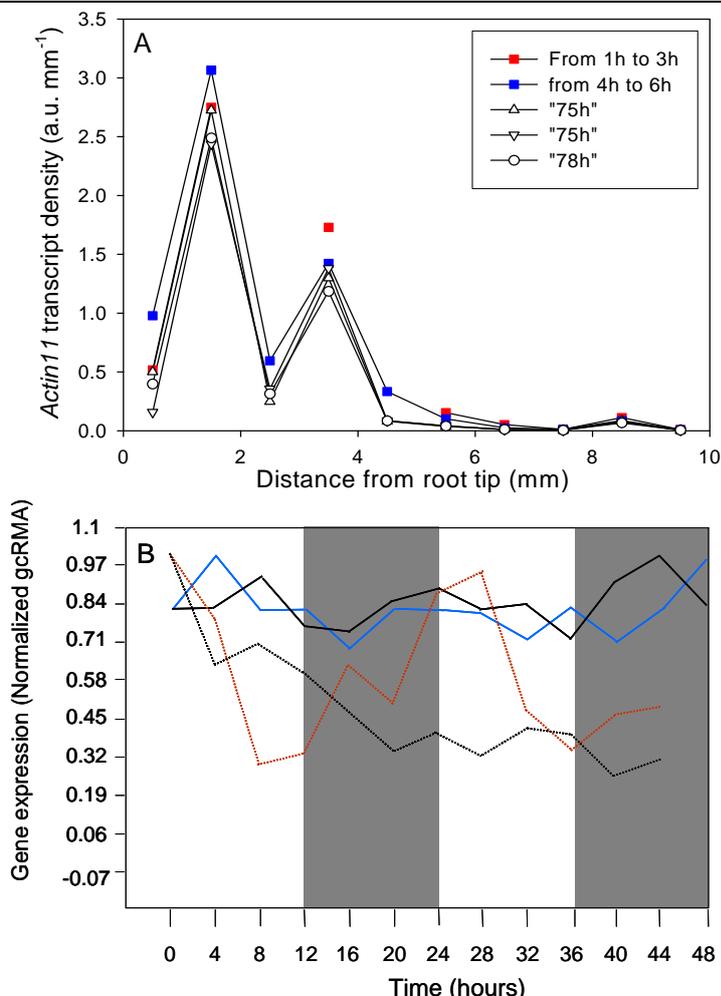


Figure S2. Data supporting the time stability of RNA profiles. **A.** Profiles of *Actin11* transcript density. Blue and red symbols correspond to the data shown in Figure 2A. Data were split into two groups according to their sampling time. The black lines correspond to complementary data - three independent roots collected after more than 72 hours of continuous dark. **B.** Additional arguments for the steadiness of expression profile. The assumption of a steady profile for *Actin11* is supported by the mining and viewing of diurnal and circadian microarray data from *Arabidopsis* and poplar <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu> [webcite](#). Figure S2B shows the diurnal patterns of *Actin* expression in leaves, which are the most exposed to light and presumably the most light-sensitive organ. The *Arabidopsis* ortholog (At3g12110) (dashed lines) exhibited a diurnal regulation of its expression with no circadian persistency. On the contrary, poplar *Actin11* (continuous lines) showed a very constant expression over the diurnal cycle and no circadian rhythm. The absence of circadian control in poplar leaf supports the hypothesis of constancy of *Actin11* expression in roots. Blue and red = 12 h light/12 h dark; black = continuous light; dashed black = continuous dark.

Additional files 3 to 5: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/18/additional/>

Conclusions

Notre étude montre que coupler des données de densité de transcrits acquises à une forte résolution spatiale à des analyses de cinématique permet d'accéder à la vitesse de variation de la quantité de transcrits, autrement dit à la régulation de l'expression des gènes, résultat de l'équilibre entre leur transcription et de leur dégradation le long de la racine, corrigées des effets dilutifs et positionnels de la croissance. L'équation de continuité permet à partir des données de PCR quantitative d'obtenir la description spatiale de la régulation de l'expression d'un gène le long de l'apex. Il est ainsi possible de déterminer les positions auxquelles débutent et se terminent l'induction/répression de l'expression des gènes.

Couplée à une trajectoire de croissance, c'est-à-dire au déplacement d'un territoire cellulaire en fonction du temps, la dérivée matérielle donne accès à la régulation temporelle de l'expression d'un gène, c'est à dire à la durée de l'induction/ de la répression le long de l'apex. Ce cadre d'analyse permet aussi d'obtenir une description temporelle de la régulation de l'expression d'un gène.

Les deux gènes étudiés *Actin11* et *EF1B* sont classiquement utilisés en biologie moléculaire en tant que gène de référence (Brunner *et al.*, 2004). Nous montrons par cette étude, qu'au sein d'un apex de racine, ces gènes peuvent être soumis à une forte régulation à la fois spatiale et temporelle, remettant en cause leur statut de gène de référence pour un apex en croissance.

Contrairement aux profils de densités de transcrits largement utilisés dans la littérature, la vitesse d'accumulation de transcrits fournit des informations clés sur les patrons d'expression des gènes, telles que la localisation, l'intensité et la durée des inductions/répressions. Notre approche permet aussi de démêler les aspects temporels et spatiaux de la régulation de l'expression des gènes le long de l'apex de la racine. Prenant en compte l'hétérogénéité des paramètres de croissance (REGR, vitesse), le cadre d'analyse est approprié pour comparer la régulation de l'expression des gènes le long de l'apex de la racine entre des traitements affectant la croissance.

II- Croissance de la racine du peuplier sous déficit hydrique

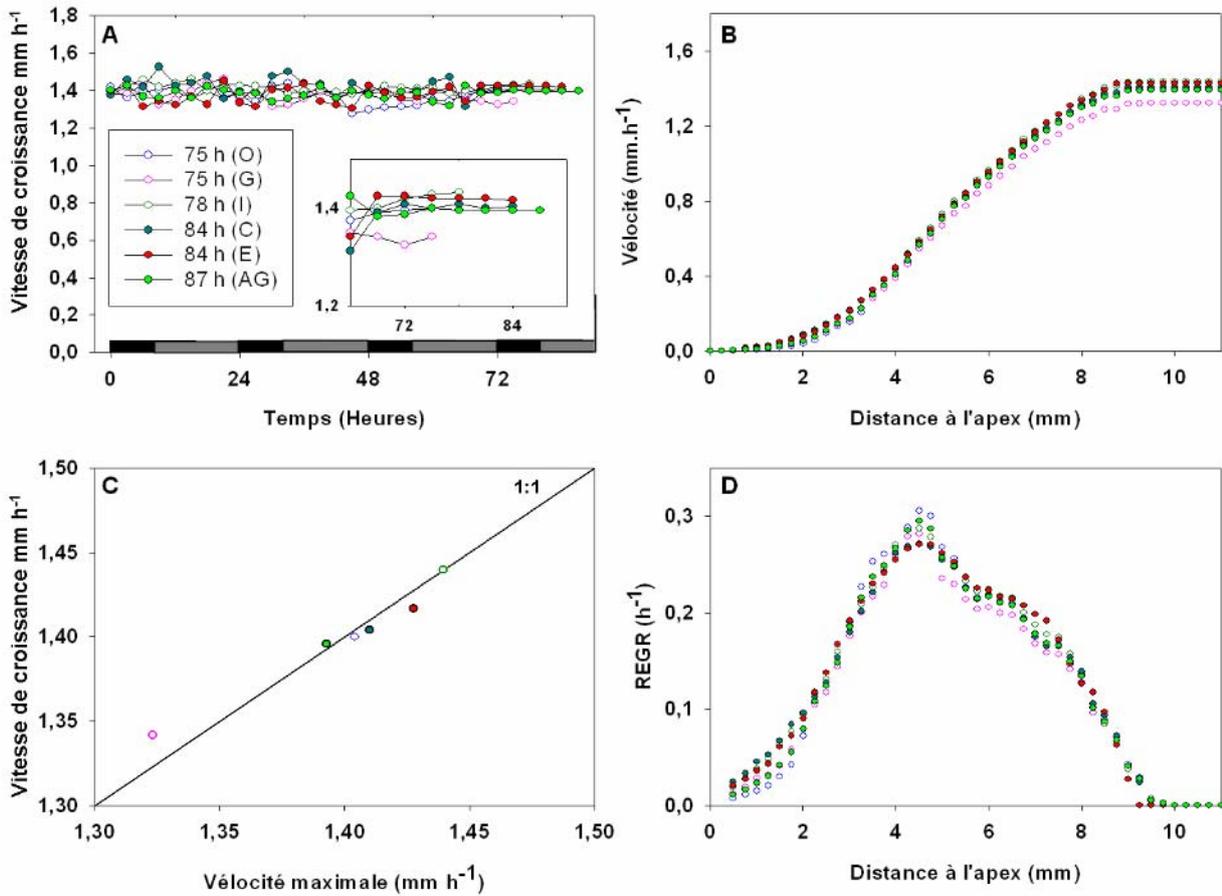


Figure 29 : Analyse de la croissance en condition témoin. **A.** Vitesse de croissance de 6 racines de peuplier pendant 72 heures de nuit continue. Les racines ont été récoltées à 75 h, 78 h, 84 h ou 87 h. Les boutures étant initialement cultivées sous une photopériode définie, les phases ‘nuit théorique’ et ‘jour théorique’ sont représentées par les barres noires et grises respectivement. L’encart montre les dernières mesures pour chaque racine. **B.** Profil de vélocité le long de l’apex des 6 racines, déterminé juste avant leur récolte (marquage au carbone et analyse d’images avec Kineroot, Basu *et al.*, 2007). **C.** Relation entre la vitesse et la vélocité maximale. **D.** Profil de REGR issu de la dérivée spatiale du profil de vélocité. Pour les graphiques A, B et D, les cercles vides correspondent aux racines récoltées en phase ‘nuit théorique’ (75 h et 78 h) et les cercles pleins correspondent aux racines récoltées en phase ‘jour théorique’ (84 h et 87 h). Les lettres entre parenthèses correspondent au nom de la racine.

II.1- Croissance en condition témoin

Après une phase de pré-culture en phytotron dans des conditions mimant une alternance jour/nuit, la bouture est transférée dans une chambre noire pour mesurer la vitesse de croissance d'une racine. Les mesures sont réalisées en lumière verte pour limiter les effets de la lumière sur la croissance. Les racines sont sélectionnées rigoureusement : le diamètre de la racine est égal à 1 millimètre. La vitesse de croissance de six racines, cultivées en condition témoin est mesurée pendant plus de 3 jours (Figure 29A). Au bout de 3 jours, la vitesse de croissance est en moyenne de $1.39 \pm 0.01 \text{ mm h}^{-1}$, les vitesses individuelles variant entre 1.34 et 1.43 mm h^{-1} . Au pas de temps de mesure (3 h), aucune variation rythmique de la croissance et aucun éventuel effet rémanent de l'alternance jour/nuit pendant la phase de pré-culture ne sont détectés.

Le profil de vélocité est déterminé juste avant la récolte, à la suite des 3 jours de suivi de la vitesse de croissance, et après un marquage avec des particules de graphite (Figure 29B). Le point de repère étant fixé à la pointe de la racine, la vélocité représente la vitesse de déplacement des cellules dans la zone de croissance depuis la coiffe jusqu'à la zone de maturation et au-delà. Dans les deux premiers millimètres apicaux, correspondant à la coiffe et une partie de la zone division où les cellules s'allongent peu, la vitesse de déplacement est faible. Au-delà, la vélocité augmente avec la distance, s'infléchit et atteint à la position 9.5 mm de l'apex un plateau moyen de $1.40 \pm 0.01 \text{ mm h}^{-1}$. Comme pour la vitesse de croissance, la variabilité entre individus est faible. Le biplot entre la vitesse de croissance mesurée au dernier point (Figure 29A) et la vélocité maximale mesurée par kineroot (Figure 29B), montre que vitesse de croissance et vélocité maximale, mesurées indépendamment, sont bien corrélées ($R^2=0.99$, $N = 6$, Figure 29C). Dans nos conditions, le marquage aux particules de graphite (nécessaire à la détermination du profil de vélocité) n'affecte pas la croissance de la racine. Le temps d'attente de quelques minutes après le marquage permet à la racine de se rétablir de la manipulation.

La vitesse de croissance relative ou vitesse d'allongement relatif d'un segment (Relative Elemental Growth Rate) est obtenue en dérivant le profil de vélocité et est exprimée en h^{-1} . Les profils individuels sont présentés en Figure 29D. Les profils présentent une allure classique, en cloche dissymétrique. Dans la zone [0-2.5 mm], la vélocité est très faible, à la limite de résolution de l'analyse d'image. Entre deux photos ($\Delta t = 2 \text{ min}$), les particules de graphite sont peu déplacées, ce qui peut augmenter l'imprécision de la mesure, amplifiée par la dérivée du calcul de REGR. Dès lors, les variations individuelles peuvent être fortement

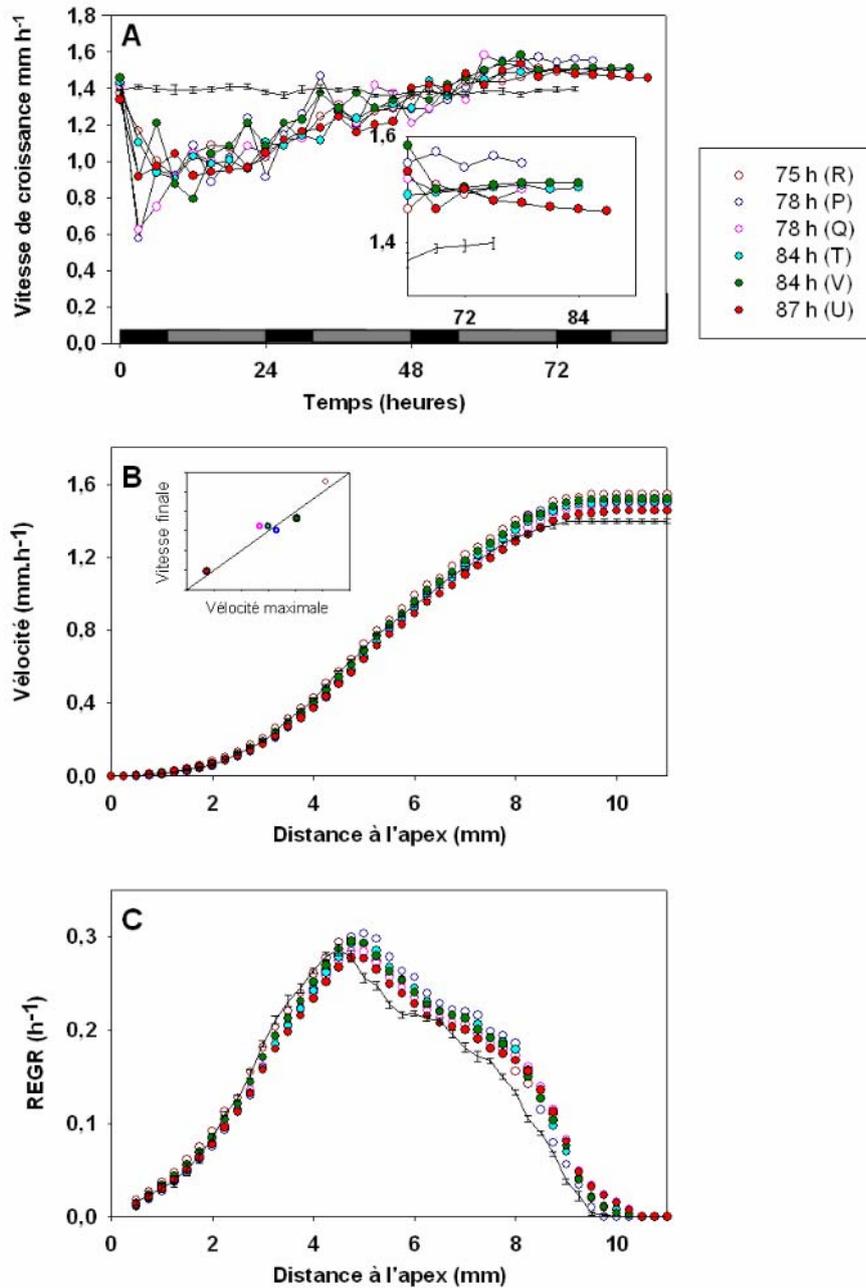


Figure 30 : Analyse de la croissance sous stress osmotique modéré. **A.** Vitesse de croissance de 6 racines de peuplier pendant 72 heures de nuit continue sous stress osmotique modéré (PEG : 100 g L⁻¹, 80 mosmol kg⁻¹). L'application du stress débute à 0h. **B.** Profil de vitesse le long de l'apex des 6 racines, déterminé juste avant leur récolte. L'encart représente la relation entre la vitesse et la vitesse maximale. **C.** Profil de REGR issu de la dérivée spatiale du profil de vitesse. Les cercles vides et pleins correspondent aux racines récoltées en phase 'nuit théorique' (75 h et 78 h) et en phase 'jour théorique' (84 h et 87 h) respectivement. La moyenne des témoins (\pm e.s.) est rappelée (ligne noire). Les lettres entre parenthèses correspondent au nom de la racine.

amplifiées dans cette zone. Après passage par un maximum à la position 4.5 mm, REGR diminue jusqu'à s'annuler à la position 9.5 mm, indiquant la fin de la zone de croissance (les cellules ont atteint leur longueur maximale). Dans la zone [5.5-7 mm], on note un « épaulement », systématique pour les six racines, la diminution de REGR est ralentie dans cette petite zone.

II.2- Croissance sous stress osmotique

La culture et la conduite des mesures de croissance sont identiques à celles mises en œuvre pour la condition témoin. Après transfert dans la chambre de mesure, la vitesse de croissance est suivie pendant environ 3 h. Le stress osmotique est appliqué (changement de la solution nutritive par une solution nutritive enrichie en PEG, 3500 g mol⁻¹). La mesure de croissance est suivie sur plus de 3 jours. Deux niveaux de stress osmotique sont appliqués : un stress osmotique modéré de 100 g L⁻¹ de PEG (80 mosmol kg⁻¹) et un stress osmotique fort de 200 g L⁻¹ de PEG (250 mosmol kg⁻¹).

II.2.1- Stress osmotique modéré

Avant l'application du stress, la vitesse de croissance des racines est de 1.39 ± 0.01 mm h⁻¹, c'est-à-dire identique à celle des témoins. La vitesse de croissance chute à 0.88 ± 0.14 mm h⁻¹ en moyenne après 3 h de stress osmotique modéré (Figure 30A). La variabilité interindividuelle est forte pendant les six premières heures de stress. Le pas de mesure (3 h) ne permet pas de caractériser avec précision la baisse initiale de croissance, ni d'extrapoler les fluctuations potentielles sur des périodes plus courtes. Trois racines présentent une vitesse de croissance minimale entre 0-3 h puis récupèrent au-delà. La vitesse de croissance des trois autres racines diminue encore pendant les trois heures suivantes. Au-delà de six heures, la vitesse de croissance de toutes les racines augmente progressivement. A 63 h, la vitesse de croissance se stabilise à 1.50 ± 0.01 mm h⁻¹, et devient significativement supérieure à celle des témoins (1.39 mm h⁻¹ ± 0.01 , Annexe 2, $P < 0.05$).

Le profil de vélocité des racines soumises à un stress osmotique modéré présente une allure similaire à celles des témoins (Figure 30B). Cependant la vélocité maximale est significativement plus élevée sous stress osmotique modéré (Annexe 3, $P < 0.05$), atteignant une valeur maximale de 1.50 mm h⁻¹ ± 0.01 mm h⁻¹. L'analyse des profils moyens de REGR met en évidence que les valeurs obtenues sous stress modéré sont identiques ou légèrement plus faibles que celles des témoins dans la partie proximale de la zone de croissance [0-

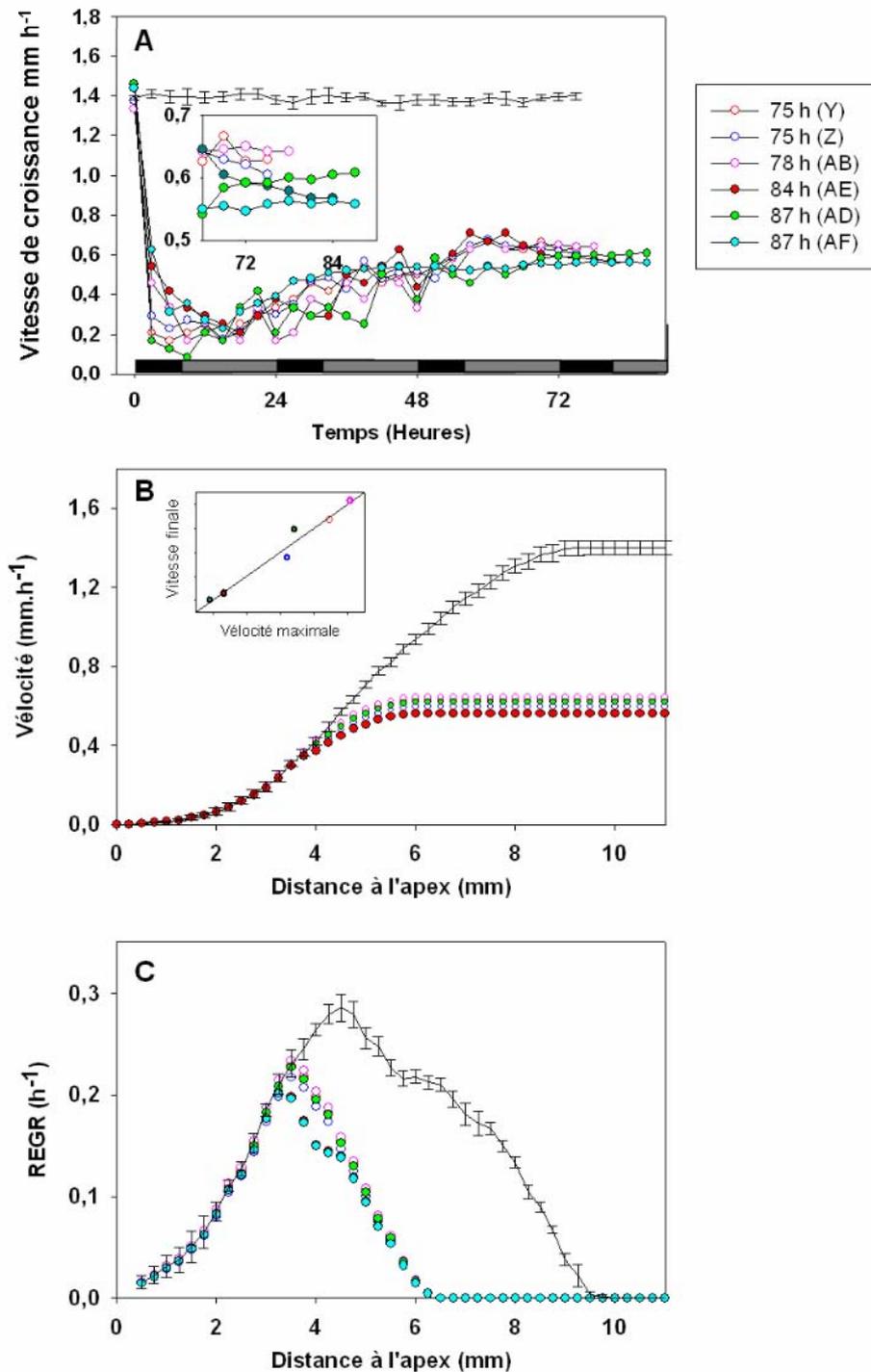


Figure 31 : Analyse de la croissance sous stress osmotique fort. **A.** Vitesse de croissance de 6 racines de peuplier pendant 72 heures de nuit continue sous stress osmotique fort (PEG : 200 g L⁻¹, 250 mosmol kg⁻¹). L'application du stress débute à 0h. **B.** Profil de vélocité le long de l'apex des 6 racines, déterminé juste avant leur récolte. L'encart représente la relation entre la vitesse et la vélocité maximale **C.** Profil de REGR issu de la dérivée spatiale du profil de vélocité. Les cercles vides et pleins correspondent aux racines récoltées en phase 'nuit théorique' (75 h et 78 h) et en phase 'jour théorique' (84 h et 87 h) respectivement. La moyenne des témoins (\pm e.s.) est rappelée (ligne noire) pour les trois graphiques. Les lettres entre parenthèses correspondent au nom de la racine.

4.75 mm] et significativement plus élevée dans les parties distales à [5-6 mm] et à [7-9 mm] (Annexe 4, $P < 0.05$). Le profil de REGR présente la même allure que pour les témoins avec un épaulement similaire. Le maximum de REGR est décalé de 0.5 mm et la zone de croissance est plus longue de 0.75 mm.

II.2.2- Stress osmotique fort

La vitesse de croissance est de $1.38 \pm 0.02 \text{ mm h}^{-1}$ avant application du stress. Après 3 h d'application du stress, elle chute à $0.38 \pm 0.08 \text{ mm h}^{-1}$. Après 6 h à 15 h de stress selon la racine considérée, elle diminue encore, mais plus faiblement. Ensuite, elle récupère progressivement pour atteindre $0.58 \text{ mm h}^{-1} \pm 0.01 \text{ mm h}^{-1}$ après de 66 h de stress et se stabilise à cette valeur (Figure 31A, Annexe 2).

L'effet du stress osmotique fort n'est visible sur le profil de vélocité qu'au delà du 4^{ème} millimètre (Figure 31B), où la vélocité devient significativement différente de celle du témoin (Annexe 3, $P < 0.05$). La vélocité est réduite par rapport à la moyenne des témoins, atteignant une valeur maximale de $0.60 \pm 0.01 \text{ mm h}^{-1}$ au millimètre 6. En condition de stress fort, le profil de REGR présente une allure en cloche comme celui des témoins mais montre un important raccourcissement de la zone de croissance. L'allongement relatif des cellules s'arrête dès la position 6.5 mm (Figure 31C). Dans la partie apicale du profil [0 et 3.5 mm], REGR n'est pas différent de celui du témoin. Le maximum de REGR est atteint à la position 3.5 mm (soit un décalage d'1 mm par rapport au témoin). Un épaulement n'est visible que pour deux des six racines.

II.3- Discussion

La vitesse de croissance des racines, en particulier en condition témoin, présente peu de variations entre individus. La stricte sélection des racines pour leur diamètre (1 mm), contribue à cette faible variabilité. Chez le chêne, la vitesse de croissance des racines est corrélée à leur diamètre (Pagès, 1995). Dans nos conditions de mesure, i.e. en nuit continue, la vitesse de croissance ne présente pas de rythmicité. Il n'y a pas d'effet rémanent de la photopériode appliquée lors de la pré-culture. L'absence de variation journalière de la croissance a aussi été observée pour les racines de cerisier, de pommier, de riz, de sorgho ou encore de maïs, cultivés sous alternance jour/nuit tant que tous les autres paramètres environnementaux sont constants (Head, 1965 ; Iijima *et al.*, 1998 ; Walter *et al.*, 2002 ; Walter et Schurr, 2005). Cette constatation s'applique non seulement à la vitesse

d'allongement des organes mais aussi à l'activité de division cellulaire (Campilho *et al.*, 2006). Cette insensibilité de la croissance de la racine à la photopériode est remarquable car l'absorption des nutriments et le transfert des sucres vers la racine sont sujets à des rythmes journaliers (Hansen, 1980 ; Schurr et Schulze, 1995). Cependant, dans notre dispositif de mesure, la bouture ne présente pas ou peu de feuilles développées et l'impact de la transpiration, et par conséquent de la compétition entre organes, est limité. Par ailleurs, les racines adventives de peuplier disposent d'une source d'énergie importante, les réserves de la bouture, permettant une croissance stable et vraisemblablement indépendante de la photosynthèse. La croissance des racines de peuplier a été analysée sous conditions contrôlées (température 21°C) et homogènes entre les phases de pré-culture et de mesure (conservation de la solution nutritive) car la croissance des racines est très sensible aux fluctuations de ces paramètres de l'environnement. La croissance des racines de maïs réagit fortement aux changements de température (Pahlavanian et Silk, 1988). La croissance de racines de tabac suivrait de façon quasi linéaire les variations journalières de température (Hummel *et al.*, 2007). Ces ajustements de croissance peuvent être très rapides. En quelques minutes, la croissance des racines du maïs est modifiée lors de changements de la température (Walter *et al.*, 2002) ou de la disponibilité des éléments nutritifs (Walter *et al.*, 2003). Bien que peu d'études quantitatives examinent cet aspect, la vitesse de croissance des racines peut aussi osciller indépendamment de l'environnement. La période d'oscillation de la croissance de la racine de maïs varie de douze minutes à une heure selon la disponibilité en nutriments (Walter *et al.*, 2003), suggérant une corrélation entre l'oscillation de la croissance et l'absorption des nutriments. Nos analyses de vitesse de croissance ont été effectuées à un pas de temps de 3 h, il n'est pas exclu que ce pas de temps masque des oscillations de croissance de courte période.

Le profil de distribution spatiale de REGR le long de la zone de croissance de la racine du peuplier est similaire à celui retrouvé chez toutes les espèces étudiées à ce jour et comparable à celui des feuilles de monocotylédones : un profil en forme de cloche (Figure 29D). L'existence de pics secondaires notamment au niveau de la zone de transition division/expansion ou l'apparition de deux pics de REGR dans la zone d'expansion a précédemment été reportée (Walter *et al.*, 2002, Walter *et al.*, 2003). Nous n'observons pas de second pic de REGR significatif mais un léger « épaulement » dans la zone [5.5-7 mm] en conditions témoin et de stress osmotique modéré qui disparaît pour quatre des six racines sous stress osmotique fort.

L'application du stress osmotique a généré, après 3 jours de stress, deux états de croissance stable mais contrastés: une stimulation de la vitesse de croissance (100 g L^{-1} de

PEG) et une restauration partielle de la croissance (200 g L^{-1} de PEG) par rapport à la condition témoin. Le déficit hydrique est connu pour induire, en fonction de son intensité, des effets différentiels sur la croissance de la racine. Chez le pin maritime, une augmentation de la croissance racinaire en réponse à un stress osmotique (réalisé en hydroponie) a également été reportée (N'Guyen et Lamant, 1989 ; Triboulot, 1996). Meyer et Boyer (1981) ont observé le même phénomène sur des hypocotyles de plantules de soja cultivées sur vermiculite. Au cours de la première phase d'application d'un déficit hydrique progressif, la croissance des racines de plantules de maïs a dépassé celle des témoins (Sharp et Davies, 1979). Dans cette étude, le déficit hydrique est appliqué par dessèchement du sol. La stimulation de la croissance de la racine de peuplier par un déficit hydrique modéré n'est donc pas due à l'utilisation de PEG.

Sous les deux conditions de stress osmotique, la vitesse de croissance de la racine du peuplier présente deux phases distinctes : une phase d'inhibition, suivie d'une reprise de la croissance, et d'une phase de stabilisation (Figure 30A et 31A). La croissance des plantes sous un stress d'intensité moyenne est souvent caractérisée par une phase aigüe de rapide inhibition, suivie d'une phase de récupération et d'acclimatation à la nouvelle condition (Skirycz et Inzé, 2010). Chez les feuilles d'orge, un stress salin au niveau des racines induit une diminution du taux d'expansion des feuilles jusqu'à un niveau proche de zéro en quelques secondes, suivie d'une reprise du taux d'expansion des feuilles à environ 46% puis 70% par rapport aux témoins en quelques minutes et quelques jours, respectivement (Fricke *et al.*, 2006). De même chez *Arabidopsis thaliana*, l'activité du cycle cellulaire est diminuée sous 12 h et 36 h de stress salin mais est restaurée au bout de quatre jours de stress (Bursens *et al.*, 2000). Selon Skirycz et Inzé (2010), la réponse aiguë, i.e. une inhibition rapide de la croissance, peut être interprétée comme une anticipation d'éventuelles conditions plus sévères et la phase de reprise de croissance correspondrait à l'établissement d'un nouvel état d'équilibre sous un stress prolongé et stable.

Nos résultats montrent que, quelle que soit l'intensité du stress osmotique, son effet sur la vitesse et le REGR dépend de la position le long de la zone de croissance. Dans les quatre millimètres apicaux de la zone de croissance, le REGR des cellules est identique dans toutes les conditions, stress osmotiques et témoin (Annexe 4, $P < 0.05$). L'effet différentiel de l'intensité du stress osmotique sur la croissance n'est visible qu'au-delà. Alors que la stimulation de la croissance par un stress osmotique modéré génère des profils de REGR supérieurs à ceux des témoins dans la région distale de la zone d'expansion [5-10 mm], un stress osmotique fort réduit la taille de la zone de croissance, l'arrêt de l'expansion cellulaire ayant lieu plus près de l'apex. En termes d'allongement relatif, la région apicale de la zone de

croissance de la racine du peuplier apparaît donc insensible au déficit hydrique. Par des analyses fines de vélocité et de REGR, Sharp *et al.* (1988) ont aussi montré que les trois premiers millimètres de la zone de croissance de la racine du maïs étaient insensibles à différents niveaux de stress hydrique. Il a été proposé que le maintien de la vitesse d'allongement relatif dans les premiers millimètres apicaux impliquerait un fort ajustement osmotique et que cette capacité d'ajustement disparaîtrait au-delà de ces positions (Sharp *et al.*, 1990). D'autres ajustements peuvent aussi contribuer au maintien de la vitesse d'allongement relatif dans les premiers millimètres apicaux. Un relâchement des parois permettrait le maintien de l'expansion sous une faible pression de turgescence (Cosgrove, 2005 ; Spollen et Sharp, 1991). Le déficit hydrique pourrait avoir un effet différentiel sur les capacités d'extension des parois selon la position des cellules le long de la zone de croissance (e.g. Pritchard *et al.* 1993 ; Wu *et al.*, 1996). Sous déficit hydrique, l'accumulation de phénols et de lignines dans la région distale de la zone de croissance, liée à l'activité de peroxydases et d'oxydases, rigidifierait les parois par des liaisons covalentes aux polysaccharides pariétaux (Fan *et al.*, 2006). Au contraire, dans la partie apicale, l'extensibilité des parois serait associée à un changement de pH et d'activité des xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases (XTH) qui contribueraient à l'acidification et à la perte de connectivité entre les microfibrilles de celluloses (Fan et Neumann 2004 ; Wu *et al.*, 2001). Des analyses de protéomique ont montré que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) était fortement augmentée dans la zone où REGR est maintenu sous déficit hydrique (Zhu *et al.*, 2007). L'augmentation de ROS en condition de déficit hydrique pourrait être impliquée dans l'extensibilité accrue de la paroi primaire dans cette région (Wu *et al.*, 1996). Des études récentes suggèrent que la production de radicaux hydroxyles peut jouer un rôle direct dans le relâchement de la paroi primaire par clivage des polysaccharides pariétaux (Fry, 1998 ; Fry *et al.*, 2001 ; Liskay *et al.*, 2003). Cette activité a été mise en évidence dans la zone d'élongation des feuilles (Rodriguez *et al.*, 2002) et des racines primaires de maïs (Liskay *et al.*, 2004). Une hypothèse complémentaire serait que, dans les premiers millimètres apicaux, les mécanismes de tolérance au déficit hydrique seraient plus fortement régulés que dans les régions distales. Des études de transcriptomique ont montré que le maintien de REGR dans les premiers millimètres nécessite une forte régulation des mécanismes impliqués dans le relâchement des parois, dans la régulation osmotique, la régulation de l'ABA, et la régulation des transports membranaires (Spollen *et al.*, 2008). Au-delà de ces positions, pour les régions dont la vélocité et le REGR sont affectés par le déficit hydrique, ce sont principalement des gènes impliqués dans la différenciation des cellules qui sont exprimés, aboutissant à une maturation précoce de ces

dernières (Spollen *et al.*, 2008). L'expansion cellulaire devant être soutenue par des flux entrants d'eau et de macromolécules (Boyer et Silk, 2004), il est envisageable que la sensibilité différentielle de REGR au stress osmotique, selon la position le long de la zone de croissance, implique une réorganisation des flux d'eau au sein de la zone de croissance.

III- Densités de transcrits le long de l'apex sous déficit hydrique

A

Echantillon	Segment	N° Echantillon	Gènes pris en compte											
			PtTIP1;1	PtTIP1;2	PtTIP1;3	PtTIP1;4	PtTIP1;5	PtTIP1;6	PtTIP1;7	PtTIP1;8	PtPIP2;6	PtAPL	PtAct11	PtADH
Témoin 1	[0-1mm]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Témoin 1	[1-2mm]	2	0,963	0,973	0,983	0,917	0,886	0,892	0,979	0,856	0,948	0,871	0,950	0,98409
Témoin 1	[2-3mm]	3	0,917	0,877	0,963	0,898	0,785	0,841	0,760	0,856	0,736	0,820	0,930	0,963838
Témoin 1	[3-4mm]	4	0,901	0,829	0,911	0,895	0,745	0,818	0,732	0,856	0,708	0,800	0,903	0,911846
Témoin 1	[4-5mm]	5	0,898	0,707	0,880	0,886	0,740	0,809	0,697	0,844	0,675	0,792	0,883	0,880786
Témoin 1	[5-6mm]	6	0,898	0,648	0,877	0,883	0,735	0,801	0,697	0,844	0,675	0,789	0,880	0,877738
Témoin 1	[6-7mm]	7	0,892	0,633	0,815	0,722	0,697	0,678	0,683	0,844	0,661	0,771	0,769	0,816125
Témoin 1	[7-8mm]	8	0,877	0,620	0,790	0,695	0,681	0,646	0,676	0,832	0,654	0,756	0,743	0,791062
Témoin 1	[8-9mm]	9	0,874	0,597	0,774	0,693	0,671	0,626	0,660	0,815	0,638	0,743	0,733	0,774782
Témoin 1	[9-10mm]	10	0,871	0,582	0,766	0,678	0,660	0,599	0,657	0,815	0,636	0,737	0,722	0,766768
Témoin 1	[10-11mm]	11	0,841	0,572	0,735	0,667	0,639	0,590	0,655	0,815	0,634	0,727	0,701	0,735533
Témoin 2	[0-1mm]	12	0,841	0,540	0,735	0,653	0,590	0,588	0,653	0,760	0,632	0,675	0,694	0,735533
Témoin 2	[1-2mm]	13	0,829	0,452	0,727	0,651	0,420	0,570	0,646	0,760	0,625	0,590	0,689	0,727926
Témoin 2	[2-3mm]	14	0,826	0,429	0,722	0,642	0,418	0,553	0,635	0,745	0,615	0,581	0,682	0,722897
PEG200 3	[6-7mm]	95	0,010	0,000	0,410	0,000	0,019	0,003	0,010	0,434	0,322	0,489	0,351	0,410901
PEG200 3	[7-8mm]	96	0,009	0,000	0,382	0,000	0,019	0,003	0,009	0,425	0,315	0,452	0,316	0,382058
PEG200 3	[8-9mm]	97	0,008	0,000	0,372	0,000	0,018	0,003	0,000	0,415	0,229	0,415	0,285	0,372901
PEG200 3	[9-10mm]	98	0,007	0,000	0,344	0,000	0,018	0,002	0,000	0,401	0,216	0,362	0,156	0,34433
PEG200 3	[10-11mm]	99	0,003	0,000	0,321	0,000	0,015	0,002	0,000	0,398	0,000	0,206	0,002	0,321271
M < 1,5			1,150	3,622	1,658	2,436	1,784	1,643	1,921	2,341	2,275	1,959	1,931	1,705

B

PtTIP1;1	PtTIP1;3
1	1
0,963	0,983
0,917	0,963
0,901	0,911
0,898	0,880
0,898	0,877
0,892	0,815
0,877	0,790
0,874	0,774
0,871	0,766
0,841	0,735
0,841	0,735
0,829	0,727
0,826	0,722
0,010	0,410
0,009	0,382
0,008	0,372
0,007	0,344
0,003	0,321
1,150	1,658

Figure 32 : Expression relative des gènes au sein des échantillons. A. Extrait de la matrice des expressions relatives des 11 gènes étudiés. Chaque racine est découpée en 11 segments. Il y a trois répétitions biologiques par traitement (témoin, modéré, fort) et par segment soit un total de 99 échantillons. Une expression relative est calculée indépendamment pour chaque gène dans les 99 échantillons, en normalisant par la valeur de Ct minimum observée pour le gène considéré dans l'ensemble des échantillons. **B.** GeNorm génère les moyennes géométriques (M) pour chaque gène au sein de la matrice A. La moyenne géométrique la plus forte désigne le gène le moins stable dans la matrice. Ce gène est alors retiré de l'analyse. L'analyse est itérative et reprend jusqu'à ne conserver que le (ou les) gène(s) dont l'expression relative est la plus stable (M<1.5). *PtTIP1;1* présente la moyenne géométrique la plus faible (M = 1.150) et est utilisé comme gène de référence pour cette matrice.

L'application du stress osmotique a généré, après 3 jours de stress, deux états de croissance stable mais contrastés: une stimulation de la vitesse de croissance (100 g L⁻¹ de PEG) et une restauration partielle de la croissance (200 g L⁻¹ de PEG) par rapport à la condition témoin. Nous avons testé si ces états de croissance sont associés à un patron différentiel d'expression des aquaporines le long de l'apex. Nous avons considéré dans ce chapitre que la variation de la quantité normalisée des transcrits entre des états de croissance contrastés aurait une signification fonctionnelle. Selon cette hypothèse, l'augmentation du nombre de transcrits ne conduit pas forcément à l'augmentation proportionnelle du nombre de protéines, l'activité de traduction n'étant pas considérée proportionnelle à celle de transcription. La durée de vie des transcrits et des protéines peut varier et l'efficacité de traduction peut aussi être dépendante des conditions environnementales. Cependant, en tenant compte du coût de transcription, il semble parcimonieux de considérer que la variation normalisée du nombre de transcrits ne reflète pas un processus aléatoire. Ainsi, nous avons posé l'hypothèse qu'une variation de densités de transcrits reflète des ajustements fonctionnels quel que son impact sur la variation de la quantité de protéines. Nous avons donc recherché les membres les plus régulés en réponse au déficit hydrique et un lien potentiel avec les états de croissance.

III.1- Densité de transcrits le long de l'apex

III.1.1- Expression normalisée des gènes

La quantification des transcrits est réalisée sur une quantité de matrice ARN identique pour chaque segment (100 ng) afin d'éviter des biais techniques lors de la transcription inverse et de la PCR quantitative. Pour comparer l'expression d'un gène entre les différents segments, la quantité de transcrits du gène d'intérêt est normalisée en regard de celle d'un gène de référence. Par définition, les gènes de référence ne sont pas induits/réprimés par le traitement étudié et sont souvent utilisés pour représenter l'activité métabolique de base de la cellule. De nombreux gènes de références sont classiquement utilisés en PCR quantitative, notamment les gènes codant des éléments du cytosquelette comme l'actine ou la tubuline (Brunner *et al.*, 2004 ; Czechowski *et al.*, 2005). Bien que normaliser par un gène de référence constitutivement exprimé soit la méthode la plus courante, il n'existe pas de gène de référence universel, stable dans toutes les conditions expérimentales (Czechowski *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs gènes sont considérés plus performants que les

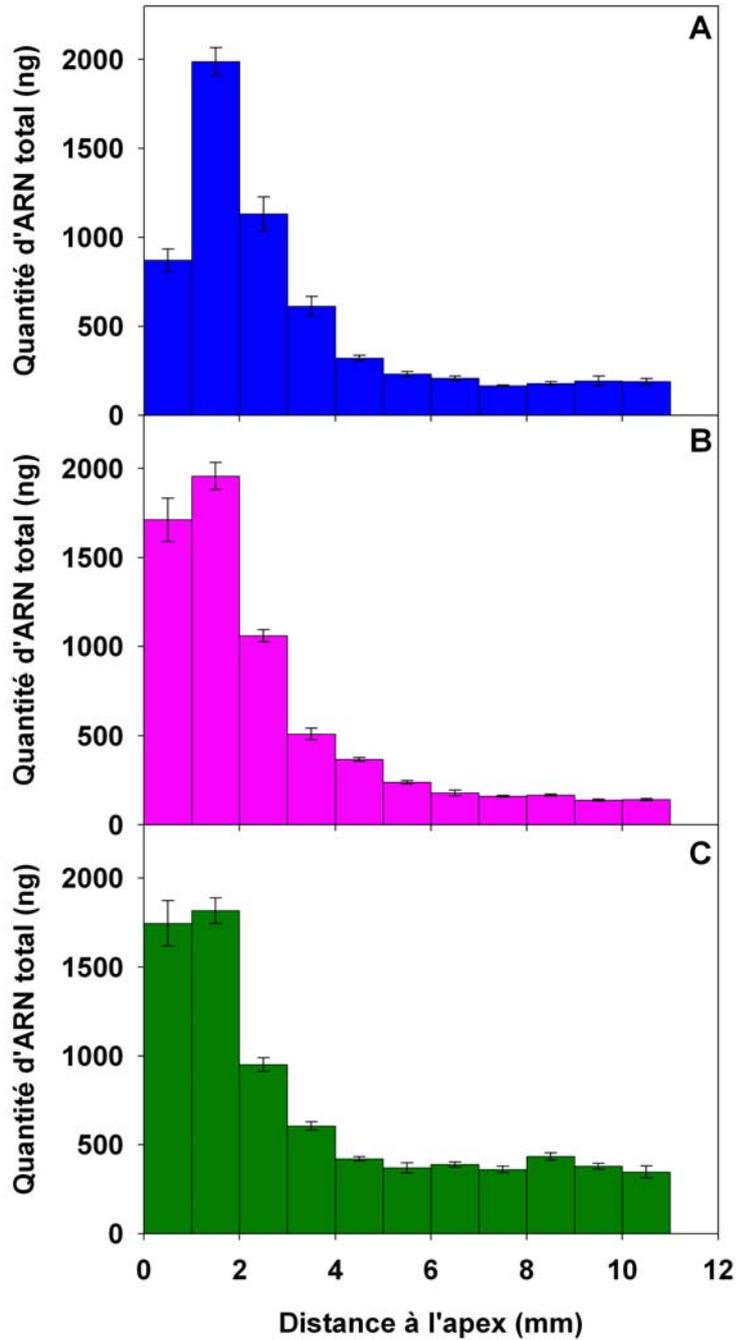


Figure 33 : Densité d'ARN total par millimètre (quantité mesurée dans chaque segment d'un millimètre) le long de l'apex de la racine du peuplier (ng mm^{-1}) après 75 h à 87 h de culture. A. en condition témoin. B. sous stress osmotique modéré. C. sous stress osmotique fort. Moyenne \pm e.s., N = 6.

gènes de référence traditionnels en terme de stabilité d'expression au cours du développement et dans une vaste gamme de conditions environnementales (Czechowski *et al.*, 2005). Il est nécessaire d'identifier des gènes de référence propres à chaque protocole. Pour déterminer quels gènes de référence sont les plus appropriés, des algorithmes statistiques ont été développés, tels que geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Ce programme utilise des comparaisons deux à deux ainsi que des moyennes géométriques à travers une matrice de gènes et d'échantillons biologiques pour identifier le meilleur gène de référence parmi le jeu de données utilisé (cf Matériel et Méthodes). Dans notre étude, nous avons utilisé geNorm pour déterminer quel était, parmi nos gènes testés, le gène le plus stable quel que soit le segment au sein de l'apex et le traitement considéré (11 segments x 3 répétitions x 3 traitements = 99 échantillons). Les trois répétitions biologiques sont les racines récoltées à 75 h à 78 h. Le logiciel geNorm a déterminé que, dans nos 99 échantillons, parmi tous les gènes étudiés, le gène *PtTIP1;1* présentait la plus grande stabilité quelle que soit la position et quel que soit le traitement considéré (Figure 32). L'expression relative des autres gènes est calculée par rapport à *PtTIP1;1* (cf. Matériel et Méthodes). Cette expression relative permet de comparer l'expression des différents gènes dans toutes les combinaisons position/traitement.

III.1.2- Densité d'ARN total le long de l'apex

La quantité d'ARN total est mesurée avant l'étape de PCR quantitative dans chaque segment d'un millimètre. La densité d'ARN total (exprimée en ng mm^{-1}) est déterminée sur six racines par traitement (Figure 33). Quelle que soit la condition, la densité d'ARN total varie fortement selon la position. Les quatre premiers millimètres sont très riches en ARN, avec une densité supérieure à 500 ng mm^{-1} et un maximum de 2000 ng mm^{-1} dans le segment [1-2 mm]. Au-delà du 4^{ème} millimètre, la densité est d'environ 200 ng mm^{-1} . Après 75 h de stress osmotique fort ou modéré, l'allure du profil de densité est relativement similaire à celle du témoin, avec un pic de densité dans le même segment. Néanmoins, pour les deux niveaux de stress, la densité d'ARN total est plus forte dans le premier millimètre (environ deux fois plus forte qu'en condition témoin). De plus, sous stress fort, la densité dans la zone [4-11 mm] est deux fois plus élevée que dans les autres conditions.

	0-1 mm	1-2 mm	2-3 mm	3-4 mm	4-5 mm	5-6 mm	6-7 mm	7-8 mm	8-9 mm	9-10 mm	10-11 mm
<i>PtTIP1;2</i>	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2	2,2 ± 0,3	5,9 ± 0,3	9,3 ± 1,3	18,4 ± 1,9	28,7 ± 0,6	46,8 ± 1,1	45,0 ± 7,1	0,0 ± 0,0
<i>PtTIP1;3</i>	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,4 ± 0,2	6,5 ± 2,2
<i>PtTIP1;4</i>	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,4	13,6 ± 1,1	21,7 ± 1,0	55,8 ± 0,8	57,1 ± 0,9	48,3 ± 0,4	40,0 ± 0,8	21,0 ± 0,7	18,3 ± 2,8	41,3 ± 14,1
<i>PtTIP1;5</i>	28,5 ± 5,8	43,3 ± 8,2	41,5 ± 4,3	47,9 ± 1,0	8,3 ± 0,5	2,0 ± 0,1	6,2 ± 0,2	4,6 ± 0,3	0,7 ± 0,0	2,1 ± 0,3	23,7 ± 8,1
<i>PtTIP1;6</i>	22,0 ± 5,3	24,1 ± 3,4	25,0 ± 3,2	18,4 ± 1,3	9,6 ± 0,3	4,4 ± 0,3	2,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,1
<i>PtTIP1;7</i>	46,2 ± 11,4	25,3 ± 12,1	17,7 ± 8,3	9,0 ± 2,5	19,6 ± 0,8	26,3 ± 2,3	23,9 ± 2,0	25,3 ± 1,1	30,3 ± 0,3	32,1 ± 10,3	26,1 ± 25,0
<i>PtTIP1;8</i>	2,9 ± 0,4	3,8 ± 0,4	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,9 ± 0,7
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 3 : Contribution de chaque *PtTIPs* par rapport à la population globale des *TIPs* dans chaque segment de l'apex (%) en condition témoin. A chaque position, le gène le plus représenté est signalé en rouge. Moyenne ± e.s., N=3.

	0-1 mm	1-2 mm	2-3 mm	3-4 mm	4-5 mm	5-6 mm	6-7 mm	7-8 mm	8-9 mm	9-10 mm	10-11 mm
<i>PtTIP1;2</i>	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	4,2 ± 0,6	6,9 ± 1,1	6,4 ± 1,3	10,5 ± 3,0	5,0 ± 0,5	10,8 ± 1,5	15,3 ± 1,6	16,4 ± 0,2	81,9 ± 2,2
<i>PtTIP1;3</i>	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,3 ± 0,3
<i>PtTIP1;4</i>	0,1 ± 0,1	3,0 ± 0,2	11,9 ± 0,3	18,5 ± 1,3	41,1 ± 0,8	53,7 ± 1,9	52,3 ± 0,5	44,7 ± 3,2	29,3 ± 0,8	18,5 ± 0,4	8,9 ± 1,2
<i>PtTIP1;5</i>	43,7 ± 0,4	59,2 ± 0,5	55,7 ± 2,5	41,8 ± 0,7	25,6 ± 0,6	4,2 ± 0,1	7,5 ± 0,5	5,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0	2,3 ± 0,1	5,4 ± 0,7
<i>PtTIP1;6</i>	27,4 ± 0,7	23,2 ± 0,4	20,2 ± 2,1	18,5 ± 1,1	7,8 ± 0,2	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,5	0,1 ± 0,0
<i>PtTIP1;7</i>	25,1 ± 0,3	11,6 ± 0,2	7,0 ± 0,5	13,5 ± 0,2	18,6 ± 0,2	28,2 ± 1,0	31,5 ± 0,5	38,2 ± 5,0	52,8 ± 0,8	59,6 ± 0,3	0,4 ± 0,0
<i>PtTIP1;8</i>	3,6 ± 0,3	2,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,32 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,1
Total	100										

Tableau 4 : Contribution de chaque *PtTIPs* par rapport à la population globale des *TIPs* dans chaque segment de l'apex (%) après 75 ou 78h de stress modéré. A chaque position, le gène le plus représenté est signalé en rouge. Moyenne ± e.s., N=3.

	0-1 mm	1-2 mm	2-3 mm	3-4 mm	4-5 mm	5-6 mm	6-7 mm	7-8 mm	8-9 mm	9-10 mm	10-11 mm
<i>PtTIP1;2</i>	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,1	10,5 ± 0,5	23,3 ± 0,8	39,8 ± 1,0	23,3 ± 1,8	24,7 ± 6,0	30,0 ± 6,1	36,9 ± 4,9	46,3 ± 0,8	41,0 ± 5,8
<i>PtTIP1;3</i>	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5
<i>PtTIP1;4</i>	1,2 ± 1,1	2,9 ± 0,3	12,2 ± 1,4	42,0 ± 0,9	34,2 ± 1,7	56,2 ± 0,9	47,3 ± 2,2	32,7 ± 3,9	43,9 ± 2,6	41,6 ± 0,6	30,2 ± 2,9
<i>PtTIP1;5</i>	40,1 ± 2,8	45,2 ± 1,7	36,1 ± 3,0	17,0 ± 0,4	12,1 ± 2,8	7,6 ± 2,4	12,6 ± 0,8	18,8 ± 2,4	2,2 ± 0,0	3,4 ± 0,3	7,9 ± 2,3
<i>PtTIP1;6</i>	23,5 ± 2,5	9,3 ± 0,9	8,8 ± 0,4	6,0 ± 0,5	4,6 ± 0,1	4,3 ± 0,3	3,1 ± 0,8	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,2 ± 0,0
<i>PtTIP1;7</i>	31,2 ± 1,9	41,0 ± 1,7	32,2 ± 1,6	11,2 ± 0,8	8,4 ± 2,3	7,3 ± 0,4	10,9 ± 3,1	15,1 ± 8,7	13,6 ± 6,0	5,0 ± 0,7	16,1 ± 3,7
<i>PtTIP1;8</i>	3,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	2,0 ± 0,3
Total	100										

Tableau 5 : Contribution de chaque *PtTIPs* par rapport à la population globale des *TIPs* dans chaque segment de l'apex (%) après 75 ou 78h de stress fort. A chaque position, le gène le plus représenté est signalé en rouge. Moyenne ± e.s., N=3.

III.1.3- Contribution relative des *PtTIP1s* le long de l'apex

Dans le génome du peuplier, huit gènes appartiennent à la sous-classe des aquaporines TIP1 (Gupta et Sankararamakrishnan, 2009). *PtTIP1;1* a été utilisé comme gène de référence pour normaliser l'expression des gènes codant les sept autres TIP1 (*PtTIP1;2* à *PtTIP1;8*). La contribution relative de chaque membre à la population totale des transcrits *PtTIP1s* est déterminée pour chaque segment en condition témoin (Tableau 3). Au sein de chaque segment un gène représente toujours au moins 40% des transcrits TIP1 et ce gène dépend du segment. Alors que *PtTIP1;5* est fortement représentée dans la partie proximale de l'apex, *PtTIP1;4* est prépondérante dans les segments [4 à 8 mm] et [10-11 mm], et *PtTIP1;2* en fin de zone d'expansion. La proportion de *PtTIP1;7*, qui est forte (46%) dans le premier segment correspondant à la coiffe et au méristème, est supérieure à 9% dans tous les segments. Ces résultats suggèrent un rôle spécifique des aquaporines TIP1;2, 1;4, 1;5 et 1;7 dans les différentes zones de l'apex (Tableau 3). La contribution relative de chaque membre à la population totale des transcrits *PtTIP1s* dans chaque segment est peu affectée par le stress osmotique modéré (Tableau 4). Comme en condition témoin, les segments apicaux [0-4 mm] contiennent en majorité des transcrits de *PtTIP1;5* et les segments [4 à 8 mm] des *PtTIP1;4*. La contribution relative de *PtTIP1;7* est plus forte dans les segments [8 à 10 mm] et plus faible dans le premier millimètre par rapport à la condition témoin. *PtTIP1;2* n'est majoritaire que dans le dernier segment (82%) en fin de zone de croissance. Par contre, sous stress osmotique fort (Tableau 5), la contribution relative de *PtTIP1;2* est toujours supérieure à 20% dans les segments [3-11 mm]. Les contributions de *PtTIP1;5* et *PtTIP1;4* demeurent prépondérantes sous stress osmotique fort dans la zone apicale et dans la zone médiane de l'apex, respectivement.

III.1.4- Densité de transcrits *PtTIP1* le long de l'apex

Le polyéthylène glycol rend la solution nutritive visqueuse et pourrait induire une hypoxie. Afin de tester cette hypothèse, l'expression relative du gène codant une alcool déshydrogénase, *PtADH* est analysée dans chaque segment pour tous les traitements (Annexe 1). A chaque position, l'expression relative de *PtADH* ne diffère pas entre traitements, ce qui suggère que, dans nos conditions où la solution nutritive était fortement aérée, les traitements osmotique au PEG n'ont pas induit d'hypoxie. Néanmoins, l'allure du profil d'expression laisse supposer une régulation de *PtADH* le long de l'apex.

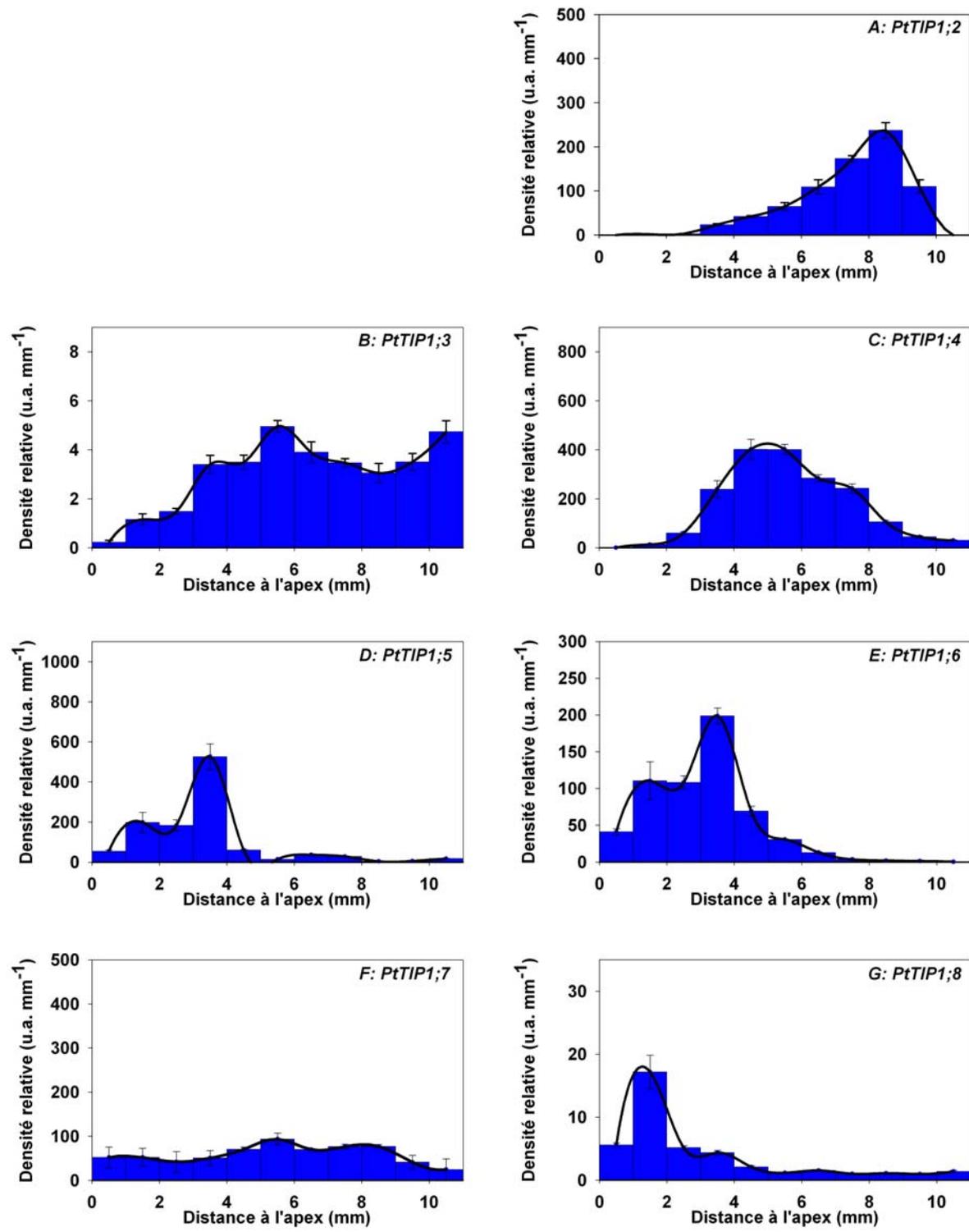


Figure 34 : Densités des transcrits *PtTIP1* du peuplier au sein de l'apex de la racine en condition témoin. Les trois racines sont récoltées en phase 'nuit théorique'. Les densités exprimées en unités arbitraires par millimètre sont normalisées par rapport à *PtTIP1*;1. Moyenne \pm e.s., N = 3.

La densité de transcrits *PtTIP1;2* à *PtTIP1;8* est analysée le long de l'apex de trois racines cultivées en condition témoin et récoltées en phase de nuit théorique (Figure 34). Les valeurs de densité sont interpolées à l'aide d'une spline interpolante (tracé noir). Les densités de transcrits de *PtTIP1;3* et *PtTIP1;8* sont faibles par rapport aux autres gènes. Les profils de densité de transcrits *PtTIP1;2* et *PtTIP1;4* suivent une cloche dissymétrique avec un maximum de densité, respectivement mesuré à la position [8-9 mm] et [4-6 mm]. Un pic de densité de transcrits *PtTIP1;5* est localisé au segment [3-4 mm], la densité est réduite d'un facteur 10 au segment suivant et est quasi nulle dans toute la zone distale. La densité de *PtTIP1;6* est forte dans la partie apicale de la zone d'expansion. Le profil de densité de transcrits *PtTIP1;7* est relativement stable le long de la zone de croissance.

Les densités de transcrits *PtTIP1s* sont mesurées le long de l'apex de trois racines après 3 jours de stress osmotique modéré (Figure 35). Dans chaque sous-graphe, le tracé bleu rappelle la spline ajustée au profil de densité des témoins. A l'exception de *PtTIP1;2*, les profils de densité de transcrits des *PtTIP1s* au sein de l'apex de la racine présentent une allure et un ordre de grandeur proches de ceux déterminés en condition témoin. Comme en condition témoin, les densités de *PtTIP1;8* et *PtTIP1;3* restent faibles en condition de stress osmotique modéré. Concernant *PtTIP1;2*, le maximum de densité situé à [8-9 mm] en condition témoin, est décalé en toute fin de zone de croissance à la position [10-11 mm] sous stress modéré. *PtTIP1;4* présente un maximum de densité à la position [5-6 mm] contre [4-6 mm] chez les témoins, la valeur maximale de la densité de transcrits est 1.3 fois plus forte. Alors qu'en condition témoin, un maximum de densité de transcrits de *PtTIP1;5* est visible à la position [3-4 mm], en condition de stress modéré, le pic est moins marqué, la densité de transcrits étant forte entre [1-4 mm]. La densité de transcrits *PtTIP1;6* présente un patron spatial proche de celui trouvé chez les témoins. Au-delà, comme pour les témoins, la densité est très faible et proche de zéro après le millimètre 8. *PtTIP1;7* présente une densité de transcrits plus faible que les témoins pour les 3 premiers millimètres apicaux et plus fortes au-delà de cette position mais le profil demeure relativement plat.

Les profils de densité de transcrits sont plus fortement modifiés après 3 jours de stress fort qu'après 3 jours de stress modéré (Figure 36). La densité de transcrits *PtTIP1;2* dans les trois premiers millimètres est plus forte qu'en condition témoin, le maximum de densité est fortement décalé (de 5 mm) vers la base de l'apex. *PtTIP1;3* et *PtTIP1;8* présentent des valeurs de densité plus élevées qu'en condition témoin mais qui restent faibles en regard des autres transcrits. Concernant *PtTIP1;8*, le stress osmotique fort génère un décalage du maximum de densité vers le millimètre apical et le pic est élargi sur deux millimètres. Le

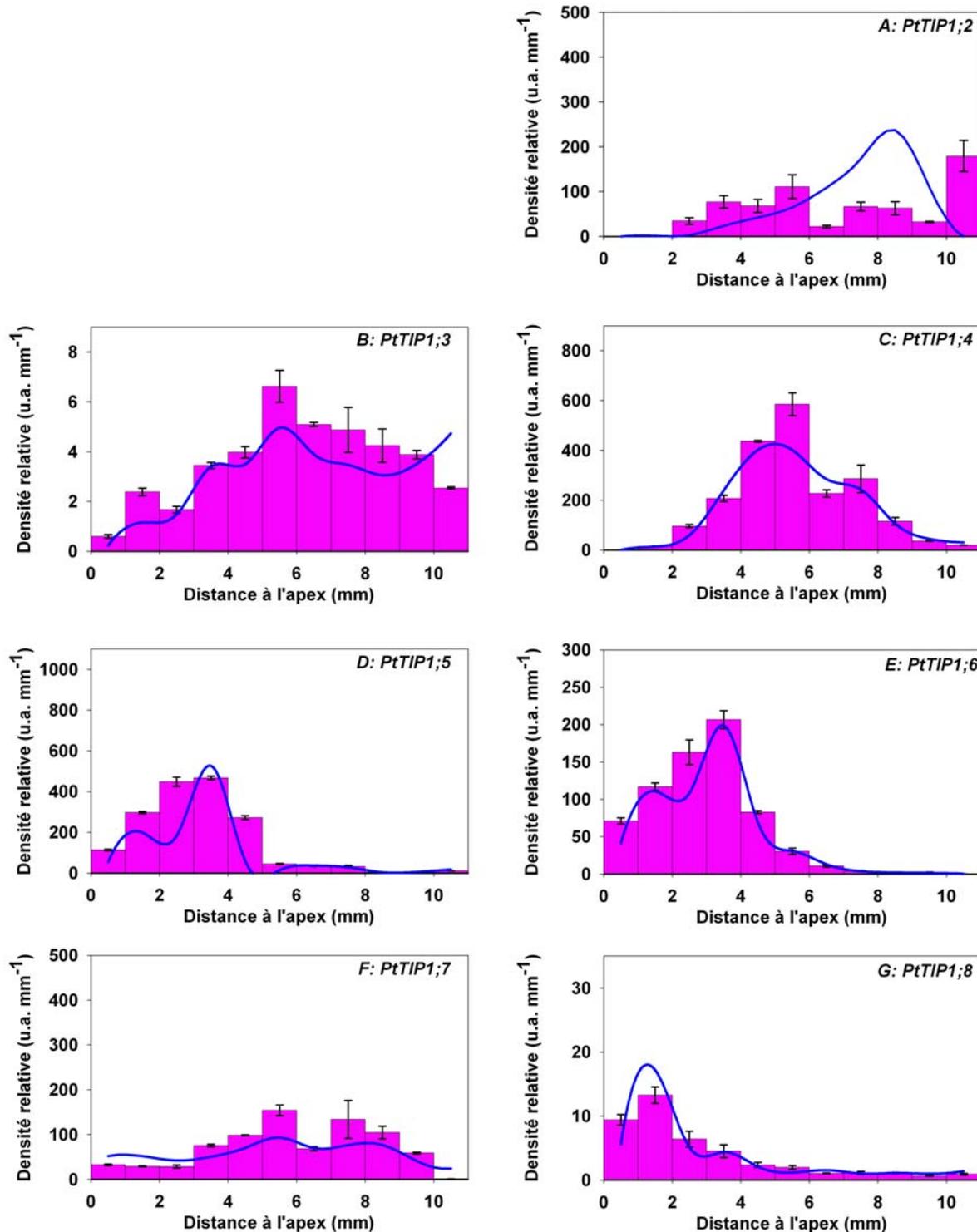


Figure 35 : Densités des transcrits *PtTIP1* du peuplier au sein de l'apex de la racine sous stress modéré (PEG 100 g L⁻¹). Les trois racines sont récoltées en phase 'nuit théorique'. Les densités exprimées en unités arbitraires par millimètre sont normalisées par rapport à *PtTIP1;1*. Moyenne ± e.s., N = 3. La ligne bleue correspond à une spline cubique interpolante de la moyenne des témoins.

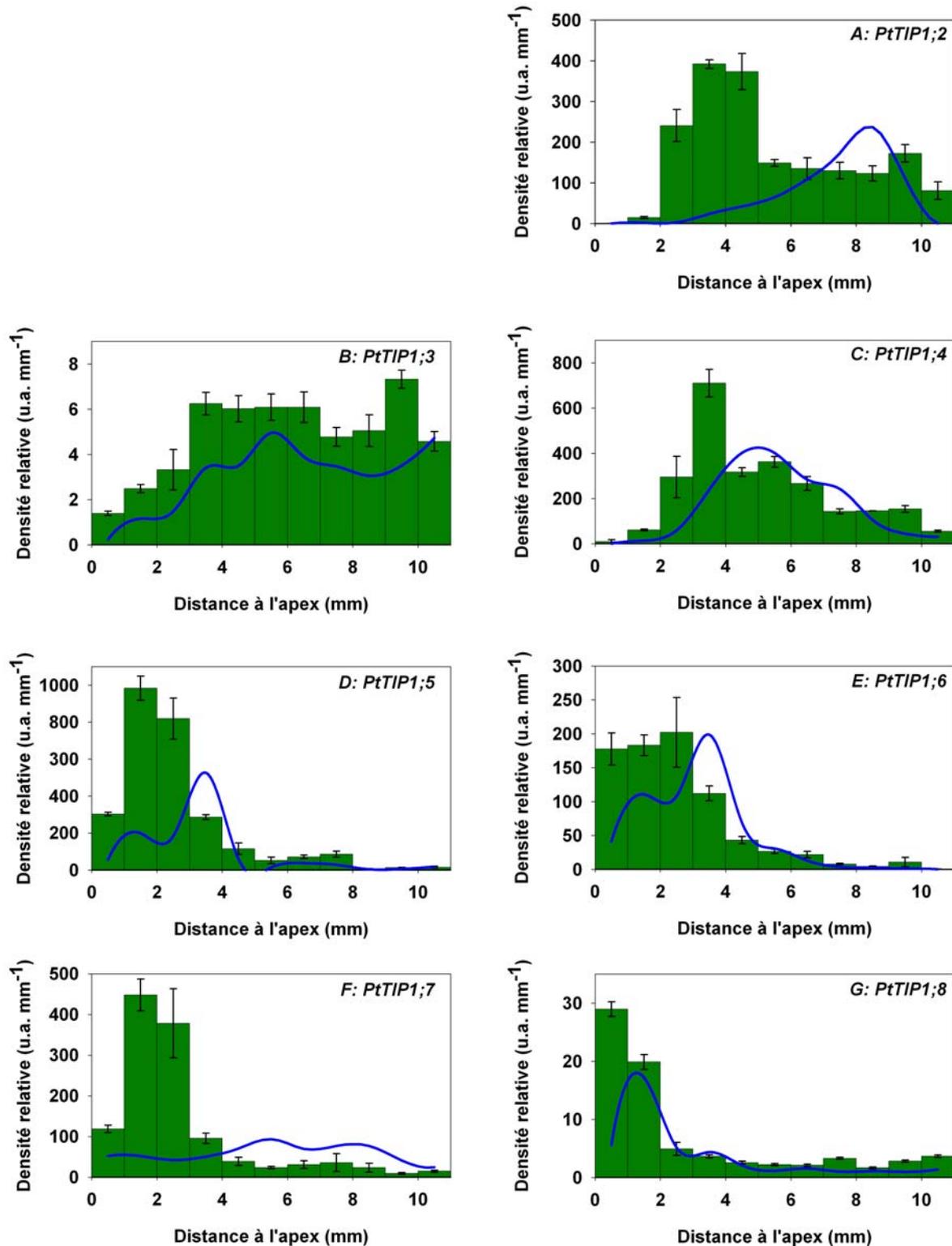


Figure 36 : Densités des transcrits *PtTIP1* du peuplier au sein de l'apex de la racine sous stress fort (PEG 200 g L⁻¹). Les trois racines sont récoltées en phase 'nuit théorique'. Les densités exprimées en unités arbitraires par millimètre sont normalisées par rapport à *PtTIP1*;1. Moyenne \pm e.s., N = 3. La ligne bleue correspond à une spline cubique interpolante de la moyenne des témoins.

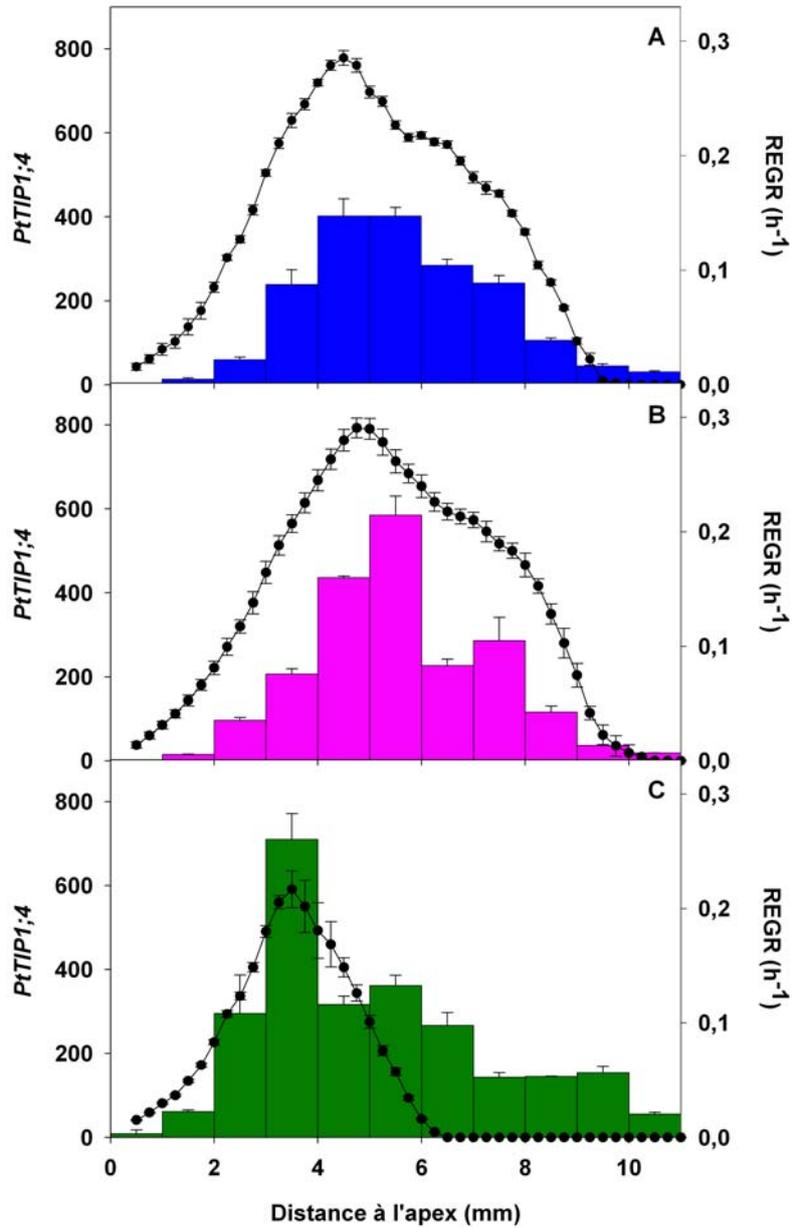


Figure 37 : Profils de densité de transcrits de *PtTIP1;4* et Profils de REGR le long de l'apex. A. en condition témoin. B. sous stress osmotique modéré. C. sous stress osmotique fort. Moyenne \pm e.s., N = 3.

profil de densité de transcrits *PtTIP1;4* présente un pic de densité décalé de 2 mm vers l'apex et dont la valeur maximale est plus élevée qu'en condition témoin. Le maximum de densité est aussi décalé vers la partie apicale de la zone de croissance pour *PtTIP1;5*, avec une densité plus forte que les témoins. Un décalage et un élargissement de pic sont observés pour *PtTIP1;6* mais les niveaux de densité de transcrits sont comparables à ceux mesurés en condition témoin. *PtTIP1;7* présente la plus forte augmentation de la densité de transcrits par rapport à la condition témoin (avec des valeurs 5 fois plus fortes). Un pic de densité, non visible chez les témoins, est présent entre les positions [1-3 mm]. Globalement, le stress osmotique fort affecte davantage l'allure des densités relatives des *TIP1s* que le stress osmotique faible. Le pic de densité de transcrits est, dans la plupart des cas, décalé vers la base de l'apex avec des densités plus élevées.

Les profils de densité de *PtTIP1;4* ayant une allure proches de celles des profils de REGR, ils ont été superposés pour chaque traitement respectivement (Figure 37). Plutôt bien superposés pour chaque traitement, les profils de densité de *PtTIP1;4* et de REGR, ont de surcroît un maximum colocalisé et ce dans les trois états de croissance. En considérant que la variation de densité de transcrits est fonctionnelle, la forte correspondance détectée suggère que *PtTIP1;4* pourrait être impliquée dans l'expansion cellulaire.

III.1.5- Densité des transcrits *PtPIP2;6* et *PtAPL* le long de l'apex

Les densités de *PtPIP2;6*, codant une aquaporine de la sous-classe PIP2, et de *PtAPL*, codant un facteur de transcription impliqué dans la différenciation du protophloème) sont mesurées, en phase de nuit théorique, le long de l'apex dans les trois états de croissance (Figure 38 A-F). Quelle que soit la condition, le profil de densité présente une allure en cloche. La densité maximale de transcrits *PtPIP2;6* semble colocaliser avec le maximum de REGR. Ainsi, le pic de densité qui est détecté à la position 5.5 mm en condition témoin et de stress modéré, est légèrement décalé vers l'apex (à la position 3.5 mm) sous un stress osmotique fort. Le niveau de transcrits est beaucoup plus élevé sous stress osmotique fort par rapport aux autres conditions.

En condition témoin, la densité de *PtAPL* est faible dans les premiers millimètres [0-3 mm], et de plus en plus forte dans les segments de plus en plus distants de l'apex. Le maximum de densité est retrouvé dans le dernier segment [9,5-10,5 mm]. En condition de stress osmotiques modéré et fort, les profils de densité de *PtAPL* le long de l'apex sont proches de celui déterminé en condition témoin. Alors que la densité de transcrits est plus

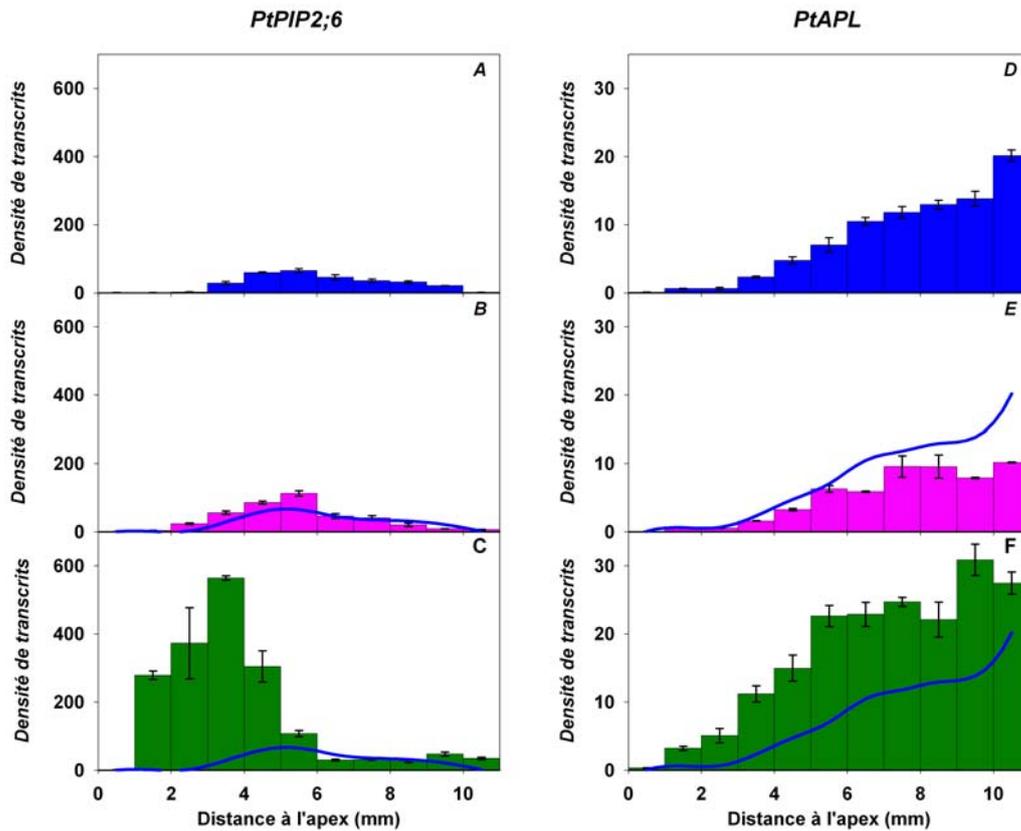


Figure 38 : Profils de densité de transcrits de *PtPIP2;6* et *PtAPL* le long de l'apex. A et D. en condition témoin. B et E sous stress osmotique modéré. C et F. sous stress osmotique fort. La ligne bleue correspond à une spline cubique interpolante de la moyenne des témoins. Moyenne \pm e.s., N = 3.

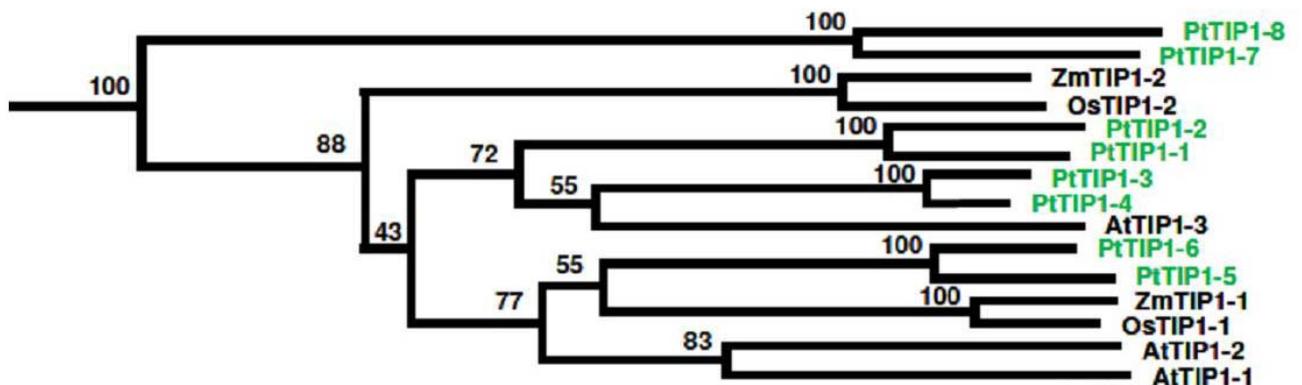


Figure 39 : Arbre phylogénétique des TIP1s de *Populus trichocarpa*, d'*Arabidopsis thaliana*, d'*Oryza sativa* et de *Zea mays*. Le numéro en dessous de chaque branche indique la valeur du bootstrap. (D'après Gupta et Sankararamakrishnan, 2009).

faible sous stress osmotique modéré qu'en condition témoin, le stress osmotique fort induit une augmentation nette de la densité de transcrits. Dès lors sous stress osmotique fort, la densité de *PtAPL* est nettement plus élevée qu'en condition témoin aux positions proximales [0-3 mm].

III.2- Discussion

A notre connaissance, nous avons mené la première analyse de l'expression de l'ensemble des *TIP1s* chez le peuplier, ce dans l'apex de la racine. A ce jour, peu de travaux portent sur l'expression des aquaporines *TIP1s* au regard des *PIPs*. Chez le peuplier, quelques études ont été menées (Almeida-Rodriguez *et al.*, 2010; Secchi *et al.*, 2009, 2010) qui s'intéressent principalement à l'expression des *PIPs* à l'échelle de l'organe.

Les séquences protéiques du sous-groupe TIP1, sont très conservées, notamment au niveau des acides aminés formant le motif aromatique/Arginine (Ar/R). Dans cette région, qui constitue un filtre de sélectivité, l'arginine hautement conservée est remplacée par une valine chez *Arabidopsis thaliana* et *Populus trichocarpa*. Cette substitution ne figure pas chez les TIP1s de la mousse de *Physcomitrella patens* (Danielson et Johanson, 2008) suggérant que les TIP1s jouent un rôle spécifique chez les plantes supérieures. Toutefois, la démonstration du rôle physiologique des TIP1s fait défaut et les résultats disponibles sont contradictoires. La régulation négative d'*AtTIP1;1* par ARN interférent (RNAi) chez *A. thaliana* provoque une sénescence précoce et une mort de la plante (Ma *et al.*, 2004). Le degré de répression de ce gène entraîne une gamme de phénotypes allant d'un phénotype comparable au sauvage à un phénotype létal. Les plantes transformées présentant une réduction d'expression d'*AtTIP1;1* sont affectées dans leur métabolisme du carbone, dans le transport vésiculaire, et dans le réseau de signalisation. Les auteurs suggèrent que TIP1;1 joue une fonction essentielle dans le transfert à travers les cellules par un mécanisme impliquant le trafic vésiculaire (Ma *et al.*, 2004). Cependant, un mutant *tip1;1* chez *A. thaliana*, généré par mutation insertionnelle, est tout à fait viable et ne présente aucune variation dans son métabolisme par rapport au sauvage (Schüssler *et al.*, 2008). L'analyse du double mutant d'*A. thaliana* déficient en *tip1;1* et *tip1;2* montre que ces mutations n'induisent aucune variation dans la capacité de rétention de l'eau de la plante (Schüssler *et al.*, 2008). Par contre, la surexpression de *TIP1;1* de *Panax ginseng* chez *A. thaliana*, entraîne une croissance rapide des organes, une floraison précoce, et une biomasse plus importante comparée au sauvage (Peng *et al.*, 2007). De plus, les lignées

d'*A. thaliana* surexprimant *PgTIP1;1* semblent résistantes à des stress salins et hydriques (Lin *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2007). Ainsi *TIP1;1* serait aussi impliquée dans la croissance des organes et dans la tolérance aux stress abiotiques. De plus, au sein de protoplastes de cellules de tabac BY-2, la surexpression de la *NtTIP1;1* entraîne à la fois la régénération de la vacuole et une augmentation de l'expansion cellulaire (Okubo-Kurihara *et al.*, 2009). Dans notre étude, la densité de transcrits des *PtTIP1s* au sein de l'apex du peuplier est modifiée lors d'un stress osmotique fort. Les pics de densités sont décalés vers l'apex, suggérant un rôle physiologique des *TIP1* dans la croissance de la racine dans les premiers millimètres.

L'analyse phylogénétique des *TIP1s* du peuplier révèle que les séquences protéiques sont proches deux à deux, révélant 4 groupes de gènes paralogues (Figure 39, issue de Gupta et Sankararamakrishnan, 2009). Hormis le couple [*PtTIP1;7* et *1;8*], les autres *TIP1* du peuplier ont des orthologues chez d'autres espèces. Ainsi le couple [*PtTIP1;5* et *1;6*] dérive d'un ancêtre commun à *ZmTIP1;1* et d'*OsTIP1;1*. Les couples [*PtTIP1;1*, et *1;2*] et [*1;3* et *1;4*] sont apparentés à *AtTIP1;3*. Au regard des autres génomes disponibles, le peuplier apparaît avoir un plus grand nombre de *TIP1s* : 8 *PtTIP1s* contre 3 *AtTIP1s*, 2 *ZmTIP1s* et 2 *OsTIP1s*. L'amplification du nombre des *PtTIP1s* est cohérente avec les événements de duplication massif détectés au cours de l'analyse de la séquence génomique du peuplier (Tuskan *et al.*, 2006). Les événements de duplication ont un impact fort sur l'évolution des patrons d'expression des gènes de familles multigéniques. Il a été avancé que l'évolution des patrons d'expression des gènes dupliqués aurait contribué à l'adaptation du peuplier à son environnement (Tuskan *et al.*, 2006). Le génome du peuplier ne présente pas d'orthologue direct d'*AtTIP1;1* et *AtTIP1;2*. Selon la Figure 39, ces deux séquences protéiques résultent de la duplication d'un gène ancestral et de l'évolution de leur séquence au sein du génome d'*A. thaliana*. Il s'agit donc de gènes paralogues. Cependant, les transcrits d'*AtTIP1;1* sont localisés dans la zone d'expansion de la racine (Ludevid *et al.*, 1992), la protéine *AtTIP1;2* est exclusivement localisée dans la coiffe (Gattolin *et al.*, 2009). Les patrons d'expression des deux paralogues ont donc vraisemblablement divergé depuis la duplication du gène ancestral. Selon Force et ses collaborateurs (1999), un relâchement de la pression de sélection permet l'évolution des séquences paralogues. Au sein d'un génome, des événements de mutation peuvent : 1- entraîner une divergence des séquences paralogues, et l'apparition d'une nouvelle fonction (« neofunctionalization »), 2- aboutir à une répartition de l'expression et de la fonction de l'ancêtre commun entre les deux paralogues (« subfunctionalization »), 3- entraîner une perte d'expression et de fonction d'un des deux paralogues (le rôle de l'ancêtre commun est conservé pour un seul paralogue, « nonfunctionalization », Force *et al.*, 1999).

Dès lors, l'évolution de ces séquences paralogues au sein du génome du peuplier complique fortement la comparaison avec les patrons d'expression des orthologues du maïs, de l'arabette ou encore du riz.

En condition témoin, le long de l'apex, nous avons montré que *PtTIP1;3* et *PtTIP1;8* sont faiblement exprimées, ainsi que *PtTIP1;1* qui a été utilisé comme gène de référence. De plus, un paralogue de chaque couple n'est quasiment pas exprimé, sauf *PtTIP1;6* qui est plus faiblement exprimé que son paralogue *PtTIP1;5*. *PtTIP1;5* et *PtTIP1;6*, présentent des profils de densités similaires avec des valeurs importantes dans les premiers millimètres de l'apex, c'est-à-dire dans la coiffe, la zone de division, et dans la partie proximale de la zone d'expansion. Des résultats similaires ont été trouvés chez le maïs pour *ZmTIP1;1*, proche en séquence protéique de *PtTIP1;5* et *PtTIP1;6*, qui est exprimée à la fois dans les cellules en division et les cellules en expansion de l'apex de la racine (Chaumont *et al.*, 1998). De plus, l'expression de *ZmTIP1;1* serait forte principalement dans les tissus conducteurs comme l'épiderme ou l'endoderme (Barrieu *et al.*, 1998). Nos résultats, cohérents avec la littérature, suggèrent une implication de *PtTIP1;5* et *PtTIP1;6* dans la croissance dans les premiers millimètres de la zone de croissance de la racine. Le profil de densité de *PtTIP1;4* coïncide avec le profil de REGR, ceci pour les trois états de croissance, suggérant une possible implication dans l'expansion cellulaire.

Il n'y a pas de démonstration de la fonction des TIP1s chez le peuplier. Toutefois, chez d'autres espèces, les TIP1s présentent une forte capacité de transfert d'eau notamment *AtTIP1;1* (Maurel *et al.*, 1994), *AtTIP1;3* (Soto *et al.*, 2008), *ZmTIP1;1* (Chaumont *et al.*, 1998) ou encore l'isoforme *RsTIP1;1* du radis (Suga et Maeshima, 2004). Cependant, les aquaporines ont la capacité de transférer d'autres solutés dont H_2O_2 , qui présente une analogie chimique avec l'eau. Les aquaporines *AtTIP1;1*, *AtTIP1;2* et *AtTIP2;3* sont perméables à H_2O_2 (Bienert *et al.*, 2007; Dynowski *et al.*, 2008b). Par translocation de H_2O_2 dans la vacuole, les TIPs pourrait contribuer à sa détoxification. D'autre part, il a été montré que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont accumulées dans la zone où le REGR est maintenu sous déficit hydrique chez la racine de maïs et pourraient contribuer au maintien de croissance (Zhu *et al.*, 2007). Ces ROS ont été suggérées comme impliquées dans l'expansion de la paroi primaire (Fry, 1998 ; Fry *et al.*, 2001 ; Liskay *et al.*, 2003). *PtTIP1;4*, *PtTIP1;5*, *PtTIP1;6* et *PtTIP1;7* sont exprimés fortement dans cette zone sous stress osmotique fort. Ce qui laisse suggérer une implication de ces aquaporines dans la réponse au déficit au sein de cette zone. Toutefois, la traduction et la fonctionnalité de ces aquaporines chez le peuplier restent à

démontrer, ce qui nécessiterait de localiser les protéines et de déterminer si ces aquaporines transfèrent l'eau, voire H₂O₂ par des mesures de perméabilité sur ovocytes ou levures.

Les PIP2 sont connues pour présenter une forte capacité de transfert d'eau chez *A. thaliana* ou encore le maïs (Chrispeels *et al.*, 2001). Notre analyse conjointe de l'expression de *PIP2;6* et de *PtAPL*, sous l'hypothèse que la variation de la quantité de transcrits soient des indicateurs de la variation de la quantité de protéines, apporte des éléments au schéma hypothétique de la circulation de l'eau dans la zone de croissance de la racine. Selon un modèle actuel, l'eau nécessaire à l'expansion des cellules provient en grande partie du protophloème par connectivité symplasmique (Boyer et Silk, 2004 ; Wieggers *et al.*, 2009). Le protophloème est fonctionnel jusqu'au milieu de la zone de croissance de la racine (Esau, 1969). L'eau est alors distribuée aux cellules distantes de l'apex soit par le symplasme, soit à travers la membrane plasmique (cf. Introduction). Quel que soit le traitement, le profil de densité de transcrits de la *PIP2;6* est très similaire au profil de REGR. Bien que ne concernant qu'une PIP2 et sous l'hypothèse d'une « traduction proportionnelle » et d'une fonctionnalité du canal, nos résultats supportent l'hypothèse d'un transfert de l'eau important par voie transmembranaire sans exclure pour autant un transfert symplasmique. Parallèlement, les profils de transcrits de *PtAPL* suggèrent une différenciation du protophloème plus apicale en réponse au stress fort, comme déjà proposé Silk (1992). Notre résultat est cohérent avec cette réponse anatomique qui permettrait un flux d'eau vers les jeunes cellules en expansion pour maintenir une croissance. Cette réorganisation des profils de densité de transcrits *PtAPL* et *PtPIP2;6* sous les deux niveaux de stress osmotique apporte des éléments pour appuyer l'hypothèse d'un flux d'eau issu du protophloème et véhiculé par les PIP2.

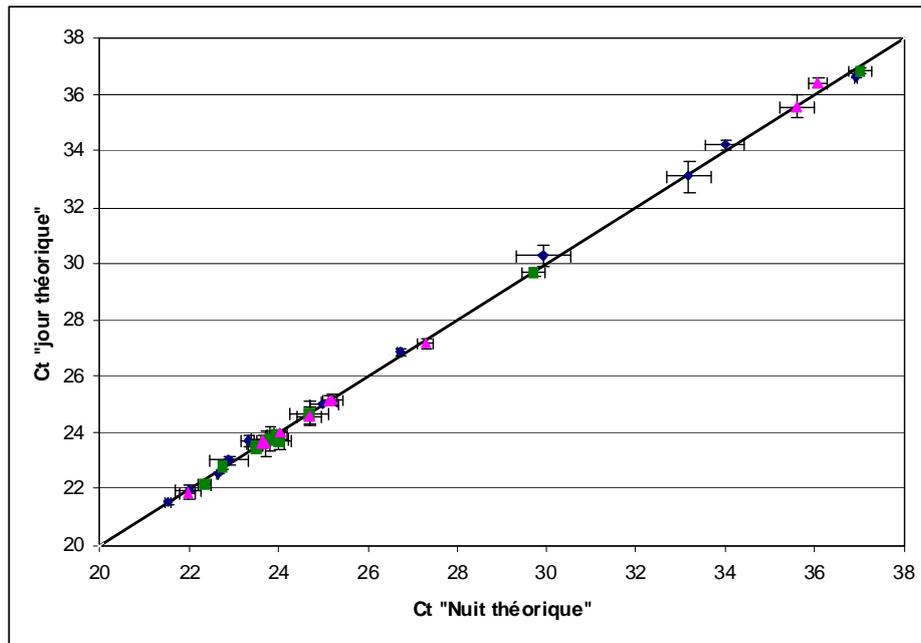


Figure 40 : Graphique représentant les valeurs moyennes de Ct du gène *PtTIP1;2* mesurées à 75 et 78 h en fonction des valeurs moyennes de Ct mesurées à 84 et 87 h. Chaque point correspond à la moyenne des répétitions pour une combinaison traitement/segment. Les points bleus correspondent aux témoins, les points roses au stress osmotique modéré, et les points verts au stress fort. La ligne noire est la bissectrice. Moyenne \pm e.s., N = 6.

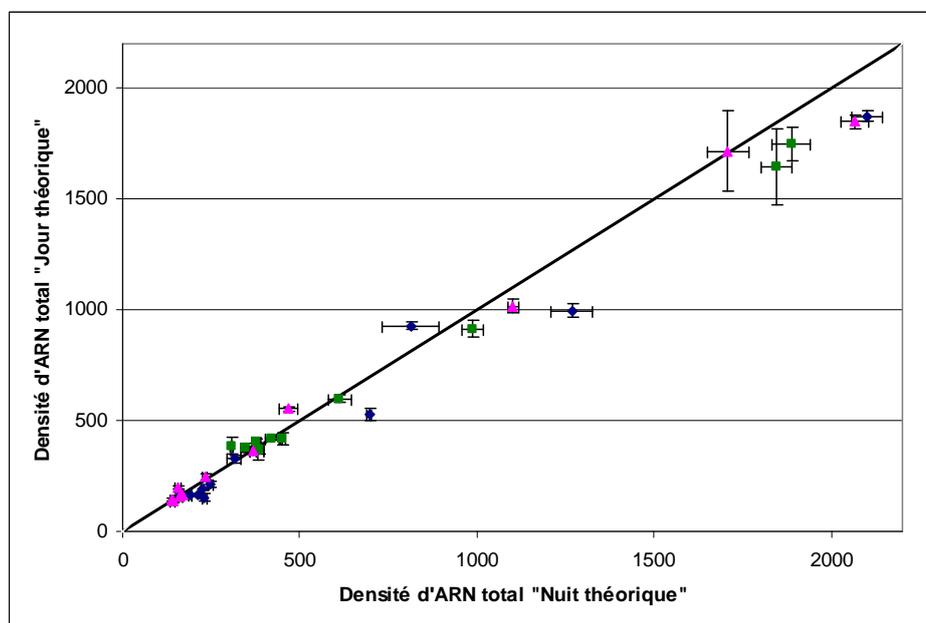


Figure 41: Graphique représentant les densités moyennes d'ARN total (ng mm^{-1}) mesurées à 75 et 78 h en fonction des densités moyennes mesurées à 84 et 87 h. Chaque point correspond à la moyenne des répétitions pour une combinaison traitement/segment. Les points bleus correspondent aux témoins, les points roses au stress osmotique modéré, et les points verts au stress fort. La ligne noire est la bissectrice. Moyenne \pm e.s., N = 6.

*IV- Description spatiale et temporelle de la régulation de
l'expression des gènes dans la zone de croissance sous déficit
hydrique*

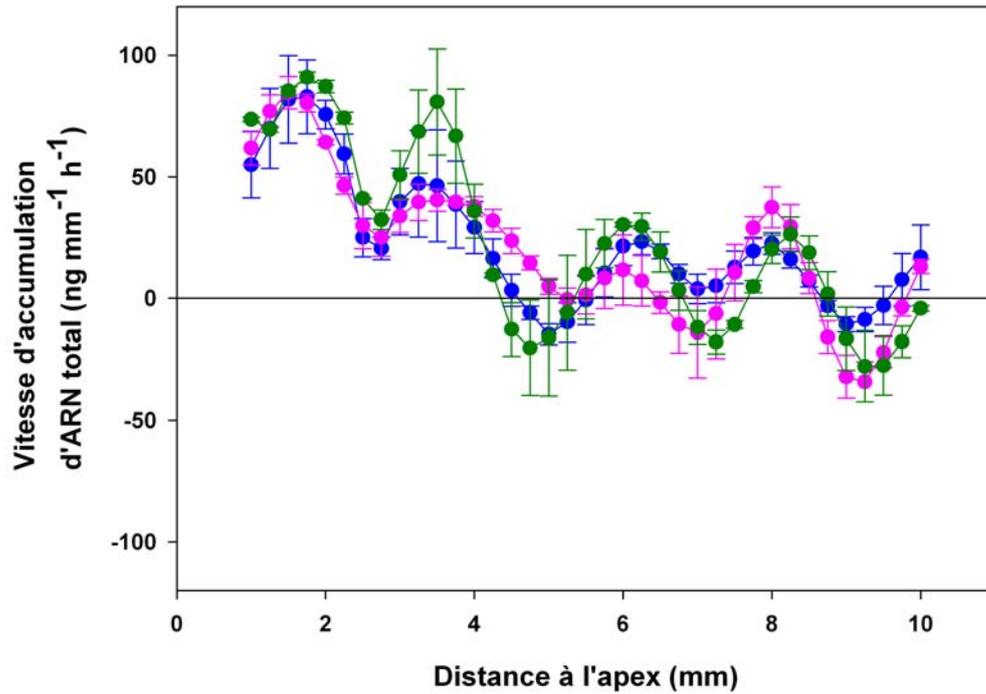


Figure 42: Vitesse d'accumulation d'ARN total le long de l'apex (ng mm⁻¹ h⁻¹). La vitesse est calculée à partir de l'équation de continuité pour les témoins (bleu), suite à un stress osmotique modéré (rose) et suite à un stress osmotique fort (vert). Moyenne ± e.s., N = 3.

Le déficit hydrique induisant des variations de vitesse d'allongement et de déplacement des cellules dans nos trois états de croissance, le cadre expérimental développé dans le Chapitre I a été appliqué à l'analyse des transcrits. Ce cadre permet d'accéder à la vitesse de variation de la densité de transcrits, c'est-à-dire la vitesse d'accumulation de transcrits. La vitesse d'accumulation calculée correspond à la résultante de la transcription et de la dégradation, corrigée des effets dilutifs et positionnels de la croissance. Une vitesse d'accumulation positive correspond à une prépondérance de la transcription du gène par rapport à la dégradation des transcrits, c'est-à-dire une induction. Inversement, une vitesse d'accumulation négative correspond à une prépondérance de la dégradation des transcrits par rapport à la transcription du gène, c'est-à-dire à une répression. La vitesse d'accumulation de transcrits correspond donc à la régulation de l'expression d'un gène dans une zone en croissance. Ce cadre a été appliqué à l'analyse de la régulation de l'expression des *PtTIP1s*, de *PtPIP2;6* et de *PtAPL* le long de l'apex sous déficit hydrique.

IV.1- Description spatiale de la régulation de l'expression des gènes

IV.1.1- Stabilité temporelle de la densité de transcrits

L'équation de continuité comporte trois termes dont $\frac{\partial \rho}{\partial t}$, la variation temporelle (locale) de la densité de transcrits. Afin d'estimer cette variation temporelle locale, la densité d'ARN total et la densité des transcrits de *PtTIP1;2* sont mesurées dans un lot de racines récoltées à 75 et 78 h et un lot de racines récoltés à 84h et 87 h. Quels que soient la position et le traitement, les variations de Ct (représentatif de la quantité de transcrits *PtTIP1;2*) et de densité d'ARN total entre deux périodes sont faibles (Figure 40 et 41 respectivement). Nous pouvons donc accepter l'hypothèse d'une stabilité temporelle de la densité d'ARN total et de transcrits de ce gène sur ce pas de temps (9 h) et l'absence d'effet rémanent de la photopériode sur ces paramètres. Dans notre étude, le terme $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ est considéré nul par extension pour tous les gènes. Pour tous les gènes considérés, le calcul de la vitesse d'accumulation de transcrits est réalisé à partir de l'équation 2 présentée dans « Matériel et Méthodes ».

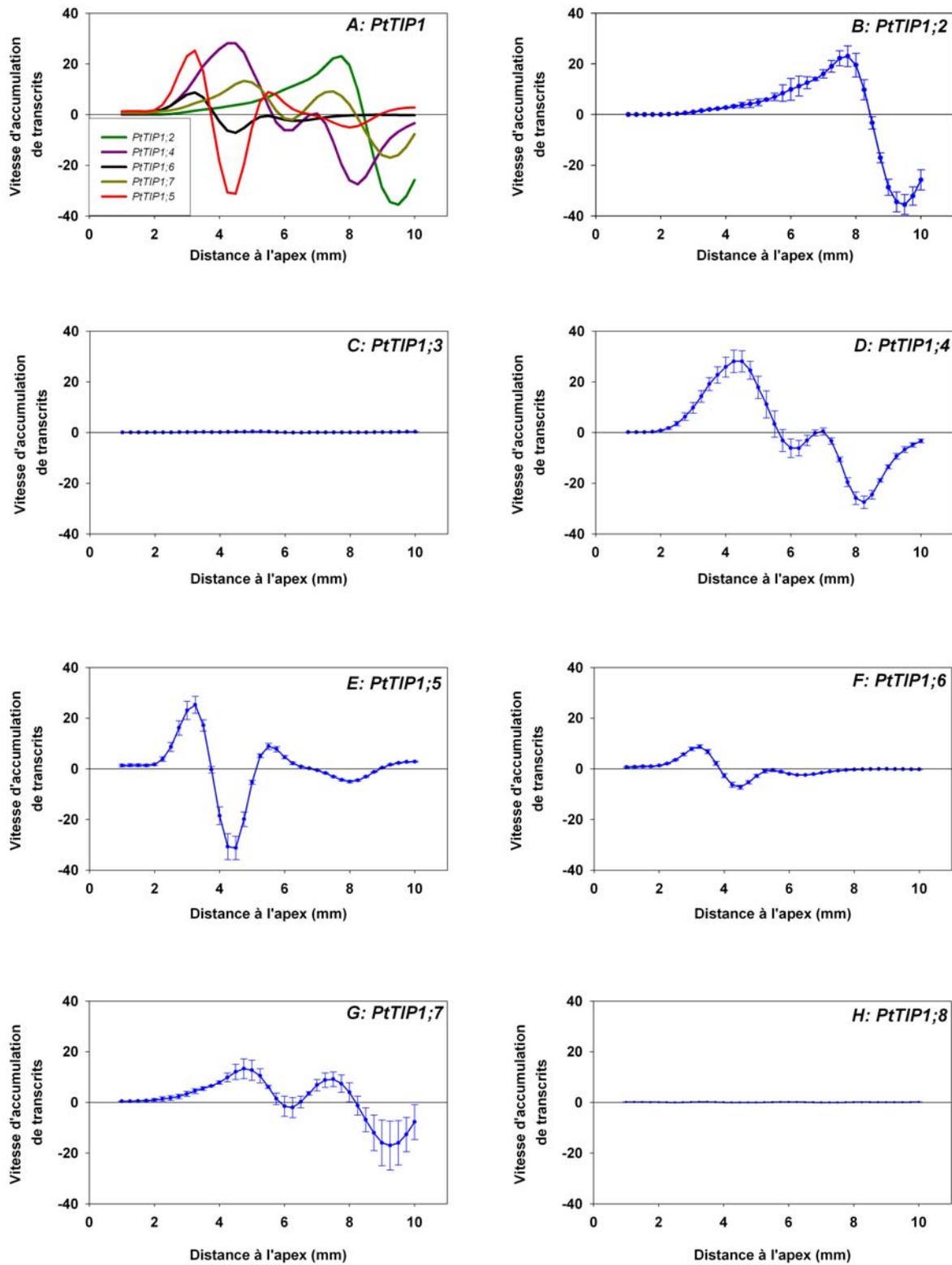


Figure 43 : Vitesse d'accumulation de transcrits *PtTIP1s* le long de l'apex en condition témoin ($\text{u.a. mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). Moyenne \pm e.s., N = 3. Le sous graphe A représente la superposition des moyennes de 5 *PtTIP1s* les plus fortement régulées.

IV.1.2- Description spatiale de la vitesse d'accumulation d'ARN total

La vitesse d'accumulation de l'ARN total ($\text{ng mm}^{-1} \text{h}^{-1}$) est calculée dans les trois états de croissance, i.e. en condition témoin, sous stress osmotique modéré, et sous stress osmotique fort (Figure 42). Quelle que soit la condition, la vitesse d'accumulation d'ARN total varie selon un profil similaire le long de l'apex (gamme de variation entre -50 et $+100 \text{ ng mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). Alors que la densité d'ARN total montre un très fort gradient le long de la zone de croissance, la prise en compte des variations de vélocité et d'allongement relatif, montre que la vitesse d'accumulation d'ARN total est très faible au regard de la densité (-50 à $+100 \text{ ng mm}^{-1} \text{h}^{-1}$ versus 200 à 2000 ng mm^{-1}).

IV.1.3- Description spatiale de la régulation de l'expression des *PtTIP1s*

La vitesse d'accumulation des transcrits *PtTIP1s* le long de l'apex en condition témoin, exprimée en unités arbitraires $\text{mm}^{-1} \text{h}^{-1}$, est présentée en Figure 43. Parmi les sept gènes étudiés, *PtTIP1;3* et *PtTIP1;8* montrent une très faible vitesse d'accumulation le long de l'apex (entre -0.5 et $0.5 \text{ u.a. mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). Autrement dit, l'équilibre entre la transcription et la dégradation de ces gènes tend à être maintenu le long de l'apex. En revanche, les cinq autres *PtTIP1s* présentent des vitesses d'accumulation fortes (entre -40 et $+40 \text{ u.a. min}^{-1} \text{h}^{-1}$) notamment dans la zone d'expansion [2-10 mm]. Une augmentation de la vitesse d'accumulation de transcrits *PtTIP1;2* est détectée le long de l'apex dès 2 mm jusqu'à la position 8.5 mm. Au-delà, la vitesse d'accumulation devient très négative, ce qui traduit à une plus forte dégradation des transcrits *PtTIP1;2* par rapport au niveau de transcription. La vitesse d'accumulation de *PtTIP1;4* est positive entre les positions [2-5.75 mm] avec un pic à 4.25 mm, elle est négative entre les positions [7-10 mm]. *PtTIP1;5* montre une accumulation rapide de transcrits dans la zone [2-4 mm] puis une dégradation tout aussi rapide dans les segments suivants [4-5 mm]. Au-delà, une légère accumulation est détectée en position [5-6 mm]. *PtTIP1;4* et *PtTIP1;5* sont les deux gènes dont la régulation de l'expression est la plus fortement régulée. La vitesse d'accumulation des transcrits *PtTIP1;6* présente un patron similaire à celui de *PtTIP1;5* avec une amplitude plus faible. Le long de l'apex, *PtTIP1;7* présente deux petits pics d'accumulation positive, le premier à 5 mm et le deuxième à 7.5 mm. Lorsque l'on superpose les vitesses d'accumulation des cinq *PtTIP1s* fortement régulés, des pics communs se démarquent le long de la zone de croissance. La partie apicale de la zone d'expansion [2-4 mm] présente une induction de *PtTIP1;5* et *PtTIP1;6*. La position

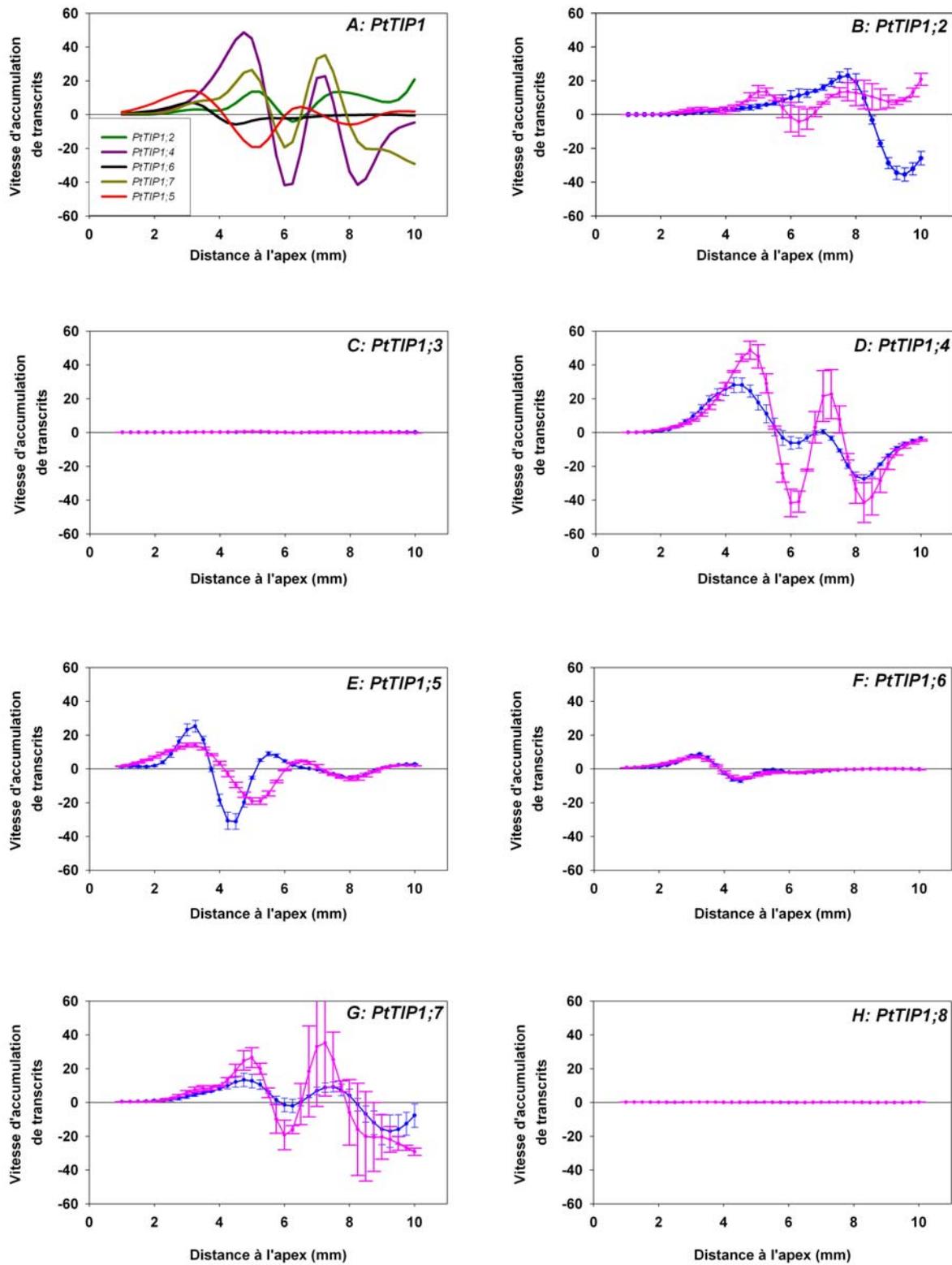


Figure 44 : Vitesse d'accumulation de transcrits *PtTIP1s* le long de l'apex en condition stress modéré ($\text{u.a. mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). Moyenne \pm e.s., N = 3. Les valeurs du témoin sont rappelées en bleu. Le sous graphe A représente la superposition des moyennes de 5 *PtTIP1s* les plus fortement régulées.

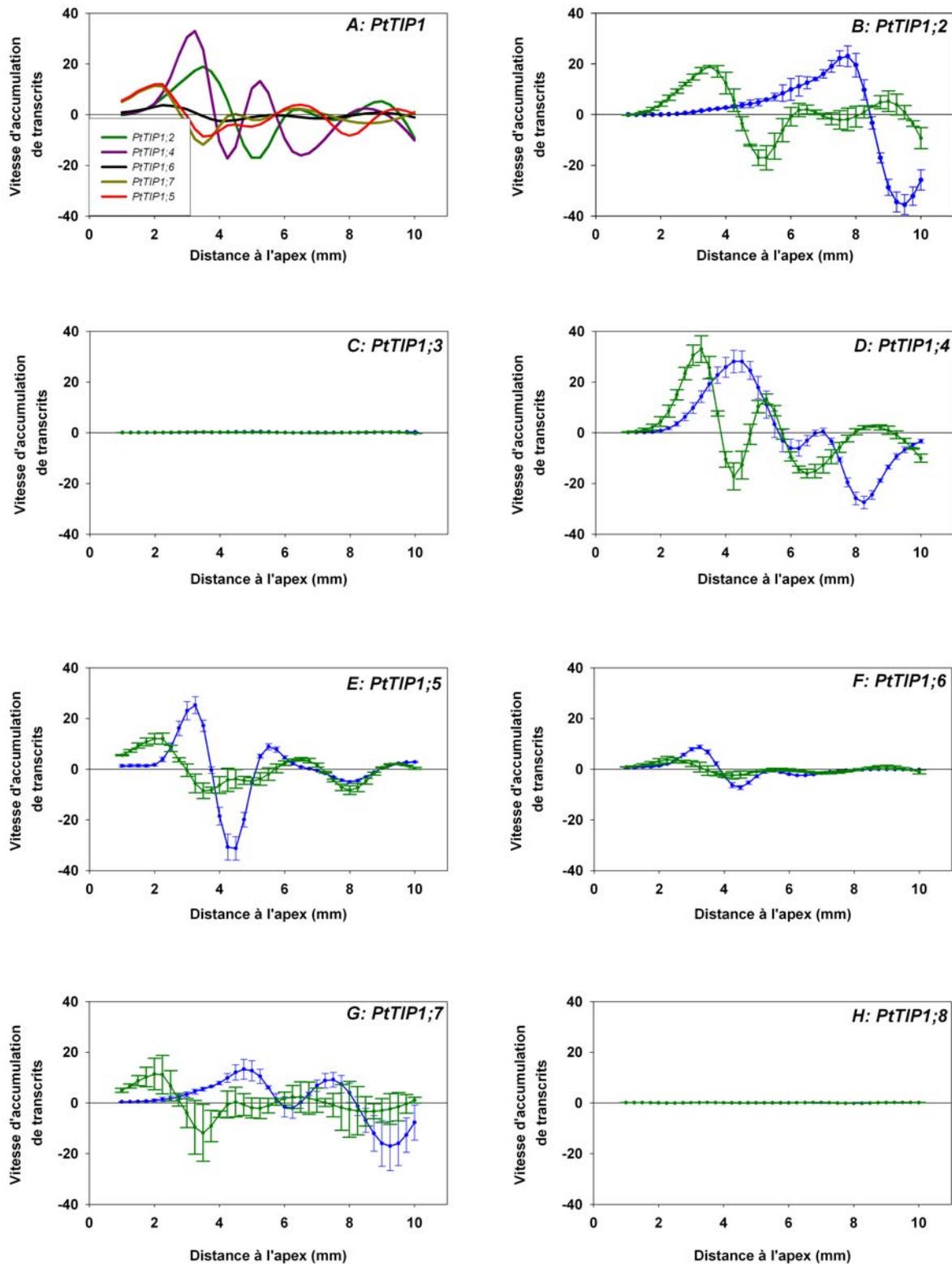


Figure 45: Vitesse d'accumulation de transcrits *PtTIP1s* le long de l'apex en condition stress fort (u.a. $\text{mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). Moyenne \pm e.s., N = 3. Les valeurs du témoin sont rappelées en bleu. Le sous graphe A représente la superposition des moyennes de 5 *PtTIP1s* les plus fortement régulées.

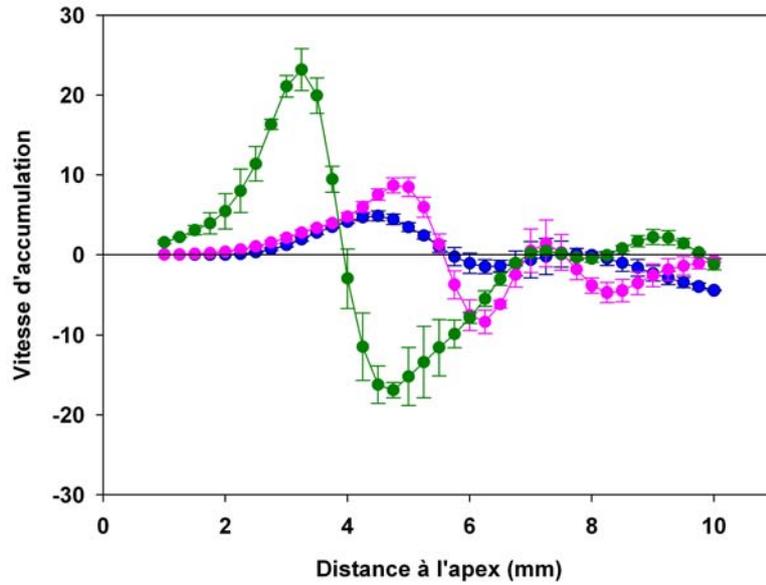


Figure 46 : Vitesse d'accumulation des transcrits *PtPIP2;6* le long de l'apex dans les trois états de croissance (u.a. $\text{mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). La vitesse est calculée à partir de l'équation de continuité pour les témoins (bleu), suite à un stress osmotique modéré (rose) et suite à un stress osmotique fort (vert). Moyenne \pm e.s., N = 3.

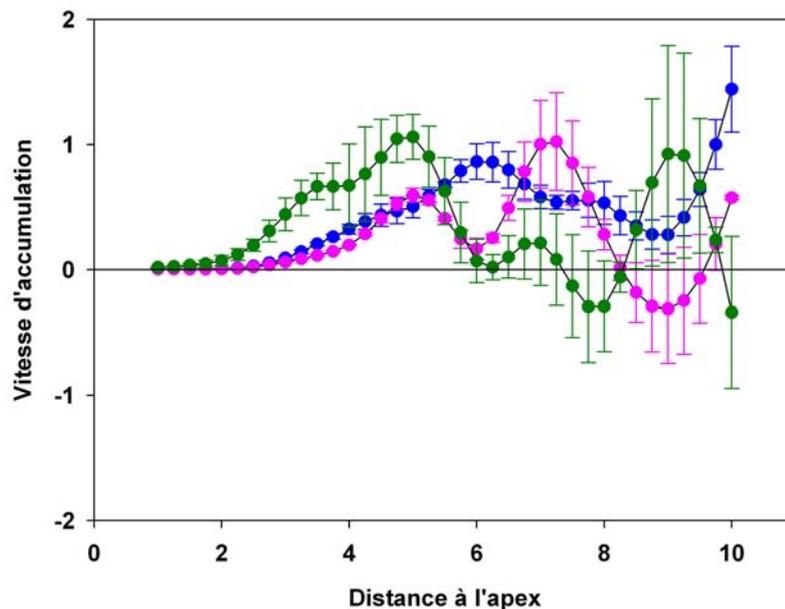


Figure 47 : Vitesse d'accumulation des transcrits *PtAPL* le long de l'apex dans les trois états de croissance (u.a. $\text{mm}^{-1} \text{h}^{-1}$). La vitesse est calculée à partir de l'équation de continuité pour les témoins (bleu), suite à un stress osmotique modéré (rose) et suite à un stress osmotique fort (vert). Moyenne \pm e.s., N = 3.

[4-7 mm] est caractérisée par une induction de *PtTIP1;4* et *PtTIP1;7*. La fin de la zone d'expansion [7-10 mm] présente une accumulation des transcrits *PtTIP1;2* et *PtTIP1;7*.

Sous un stress osmotique modéré, les niveaux d'induction et répression sont du même ordre de grandeur que chez les témoins. De plus, les profils de vitesse d'accumulation sont peu affectés par rapport à ceux observés pour les témoins (Figure 44). Cependant, deux différences sont à noter. *PtTIP1;2* présente un profil différent qu'en condition témoin. Deux pics d'induction d'intensité moyenne sont détectés à 5 et 8 mm de l'apex. Un pic d'intensité plus forte est aussi détecté à la position 10. Les pics d'induction/répression sont légèrement décalés de 0.25 mm vers la partie distante de l'apex pour *PtTIP1;4*.

Sous un stress osmotique fort, les pics d'inductions des *PtTIP1* sont soit plus faibles soit de même amplitude qu'en condition témoin mais souvent décalés vers l'apex (Figure 45). Alors que certains profils de densité présentent des valeurs plus fortes qu'en condition témoin (Figure 36), aucune vitesse d'accumulation n'est supérieure à celles des témoins. Ainsi, alors que la vitesse d'accumulation de *PtTIP1;2* présente une amplitude similaire en condition de stress osmotique fort et en condition témoin (Figure 45), le pic de densité de transcrits est décalé mais plus élevé sous stress osmotique fort (Figure 36A). La dérivée matérielle de la densité de transcrits montre que des régulations de même amplitude peuvent pourtant générer des densités de transcrits différentes.

La superposition des profils de vitesses d'accumulation des cinq *PtTIP1s* fortement régulées met en évidence une nouvelle configuration spatiale de la régulation de l'expression des *PtTIP1s* sous stress osmotique fort. Au-delà du 7^{ème} millimètre, la régulation de l'expression des *PtTIP1s* est proche de 0. Au-delà de cette position, la croissance des cellules est achevée, ces dernières ont atteint leur taille mature. En revanche, au sein des six premiers millimètres, les *PtTIP1s* présentent une régulation d'expression dynamique. *PtTIP1;5* et *PtTIP1;7* présentent des vitesses d'accumulation positives entre les positions [1-3 mm]. Les positions [2-4.5 mm] sont caractérisées par une forte vitesse d'accumulation des transcrits *PtTIP1;2* et *PtTIP1;4*. Une accumulation des transcrits *PtTIP1;6* se produit en fin de zone d'expansion.

IV.1.4- Description spatiale de la régulation de l'expression de *PtPIP2;6* et *PtAPL*

En condition témoin, *PtPIP2;6* présente une vitesse d'accumulation positive et forte aux positions [3-5 mm]. La vitesse reste proche de zéro au delà. Sous stress osmotique

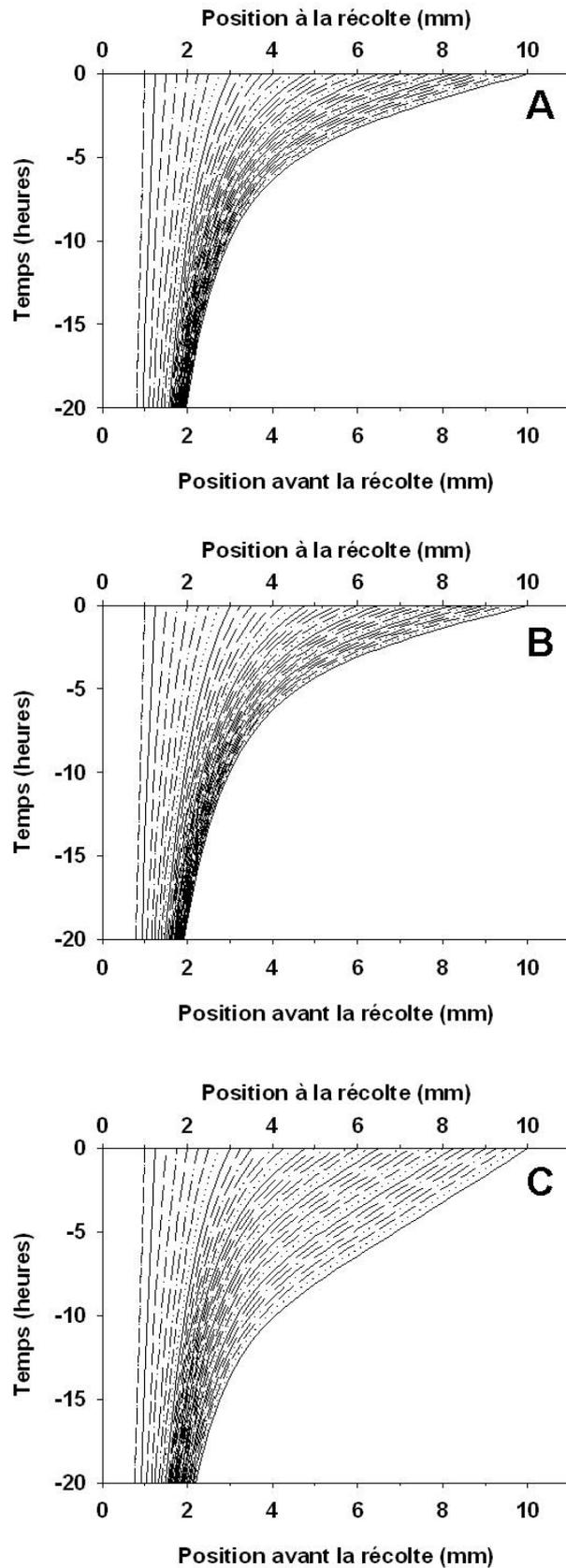


Figure 48 : Trajectoires de croissance. Sous réserve d'une stabilité de croissance de 20h, la trajectoire de particules (situées entre 1 et 10mm) est retracée depuis leur position finale (occupée au moment de la récolte) vers leur position initiale (occupée 20 h avant la récolte). **A.** Condition témoin. **B.** Stress osmotique modéré. **C.** Stress osmotique modéré. Pour chaque condition, les trajectoires sont calculées à partir de la moyenne des vitesses des trois racines.

modéré, le profil de vitesse d'accumulation est similaire avec un pic d'accumulation plus fort et décalé à 5 mm contre 4.5 en condition témoin. Sous stress osmotique fort, comme pour les *PtTIP1*, le pic de régulation d'expression de *PtPIP2;6* est décalé vers la base de l'apex (Figure 46). En revanche, la valeur absolue de la vitesse d'accumulation est trois fois plus forte que celle des témoins. Contrairement aux *PtTIP1s*, l'intensité de l'induction de *PtTIP2;6* est nettement plus forte sous stress fort qu'en condition témoin.

Le long de l'apex, la variation d'accumulation des transcrits *PtAPL* est positive (Figure 47). Quel que soit le traitement, la transcription du gène *PtAPL* augmente avec la distance à l'apex. En condition témoin, la vitesse d'accumulation augmente dès le 2^{ème} millimètre progressivement jusqu'au 6^{ème} millimètre, puis la vitesse régresse au delà jusqu'à 9^{ème} millimètre. Un nouveau pic d'induction semble se dessiner en fin de zone de croissance. Sous stress osmotique modéré, l'induction du gène débute à la même position qu'en condition témoin. En fin de zone de croissance, un pic d'accumulation de transcrits semble se dessiner de la même manière que pour les témoins. Sous stress osmotique fort, l'induction commence à la base de l'apex avec une intensité plus forte qu'en condition témoin.

IV.2- Description temporelle de la régulation de l'expression des gènes

Jusqu'à présent l'ensemble des résultats a été présenté en fonction de la position spatiale, le long de l'apex. Mais il est aussi intéressant d'avoir une description temporelle d'une variable attachée à une unique particule qui traverse la zone de croissance. Cette représentation temporelle de la variable est appelée représentation matérielle ou lagrangienne. Dans le cas d'une racine, il s'agit de pouvoir préciser ce qui se passe pour une particule apparue au niveau du méristème (à $t = 0$) et qui « traverse » la zone de croissance. La trajectoire de croissance, issue des données de vitesse, permet de convertir la référence spatiale en référence temporelle. Le calcul simple de la trajectoire de croissance à partir du profil de vitesse repose sur l'hypothèse d'une stabilité de croissance pendant la durée nécessaire à la traversée complète de la zone de croissance par la particule. Il est possible de prendre en compte une instabilité de croissance mais cela complique nettement les calculs.

IV.2.1- Trajectoire de croissance

Une analyse statistique basée sur un test de pente montre que la croissance est restée stable pendant les 20 h précédant la récolte quelle que soit la condition (Annexe 5). Il est alors possible de tracer des trajectoires de croissance sur une plage horaire de 20 h.

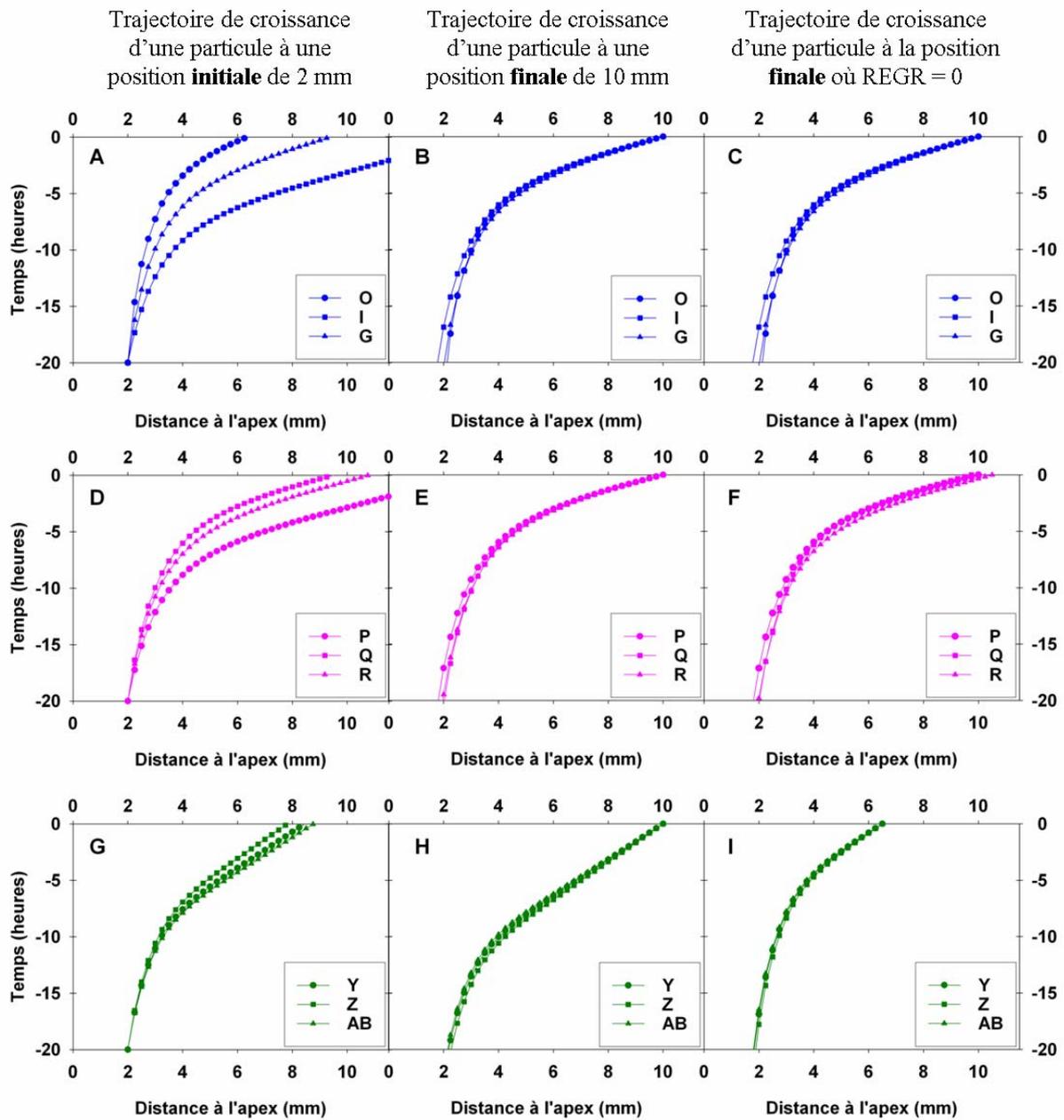


Figure 49 : Trajectoires de croissance d'une particule. A. D. G. Trajectoire de croissance d'une particule à une position **initiale** de 2 mm 20 h avant la récolte. B. E. H. Trajectoire de croissance d'une particule à une position **finale** de 10 mm au moment de la récolte. C. F. I. Trajectoire de croissance d'une particule positionnée à la fin de la zone de croissance, i.e. à la position **finale** où le REGR = 0, au moment de la récolte.

Classiquement, la trajectoire de croissance est calculée pour une particule positionnée proche de l'apex à $t = 0$. Cependant, il est aussi possible de « remonter le temps » et tracer la trajectoire inverse d'une particule qui finira sa course en une position finale déterminée. Assumant la stabilité de la croissance pendant les 20 h précédant la récolte, quel que soit le traitement, la trajectoire inverse de particules réparties le long de l'apex entre les positions 1 et 10 mm a été calculée (Figure 48). L'hétérogénéité de la vitesse de déplacement le long de l'apex induit des distances de déplacement variables selon la position. En condition témoin, une particule présente en position finale à 10 mm se trouvait à 2 mm 20 h avant la récolte, alors qu'une particule présente en position finale à 2 mm était en position 1.25 mm 20 h avant la récolte (Figure 48A). Quelles que soient la condition considérée et les particules dont la position finale était entre 1 et 10 mm, celles-ci se situent entre les positions [0.75-2.25 mm] 20 h avant la récolte (Figure 48).

Alors que ces trajectoires sont issues de la moyenne des vitesses par traitement, il est aussi intéressant de considérer la variabilité intra-racine entre chaque traitement et de considérer des particules à différentes positions clés. La Figure 49 considère les trois répétitions individuelles par traitement et illustre les trajectoires de trois particules d'intérêt : une particule dont la position initiale est 2 mm à $t = -20$ h, une particule dont la position finale est 10 mm à $t = 0$ h et une particule dont la position finale correspond à la fin de la zone de croissance (position où le REGR = 0) à $t = 0$ h. Lorsqu'à $t = -20$ h, la particule est positionnée à 2 mm, la variabilité des trajectoires est forte, notamment pour la condition témoin (Figure 49A, D et G). Ceci s'explique par le fait que dans les premiers millimètres de l'apex, une faible différence de vitesse de déplacement entre répétitions engendre, au fur et à mesure, des écarts cumulés de déplacement importants. Après 20 h de déplacement, la position finale de la particule varie fortement d'une racine à l'autre. Pour la racine I, qui grandit plus rapidement que les deux autres, la particule est déjà hors de la zone de croissance. Pour la racine G, la position finale correspond à la fin de la zone de croissance. Pour la racine I, la position finale est de 6.5 mm. Cette grande variabilité est toutefois moins marquée dans les deux conditions de stress.

Si la trajectoire de croissance est tracée pour une particule dont la position finale après 20 h de déplacement sera 10 mm, la variabilité entre les différentes racines est réduite (Figure 49B, E, H). En fin de zone de croissance, peu de variabilité au niveau de la vitesse est observée. Les écarts dus aux différences de vitesse dans la partie apicale de la zone de croissance ont moins d'impact sur l'allure de la trajectoire.

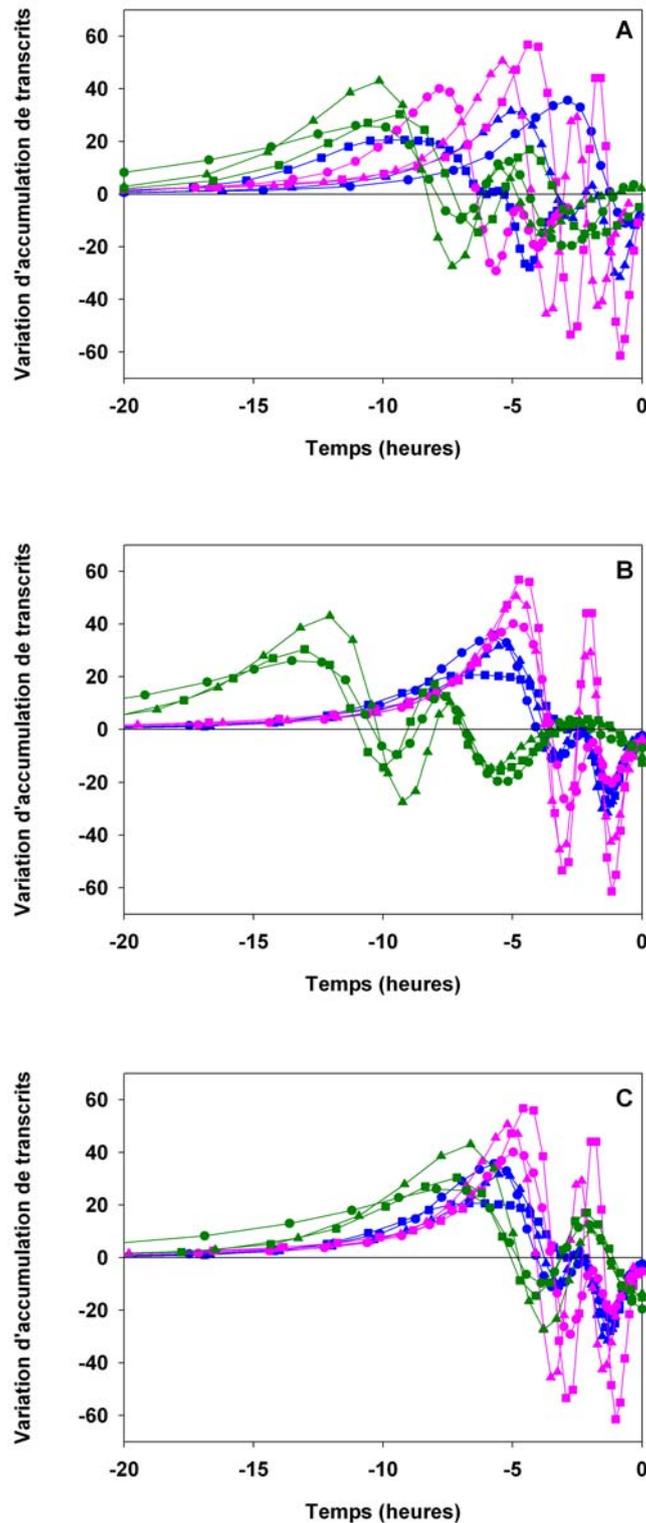


Figure 50 : Représentations lagrangiennes de la vitesse d'accumulation des transcrits *PtTIP1;4* dans les trois états de croissance. A. Représentation lagrangienne calculée à partir de la trajectoire d'une particule à la position initiale de 2 mm (20 h avant la récolte). **B.** Représentation lagrangienne calculée à partir de la trajectoire d'une particule à la position finale de 10 mm (au moment de la récolte). **C.** Représentation lagrangienne calculée à partir de la trajectoire d'une particule positionnée à la fin de la zone de croissance, i.e. où le REGR = 0, au moment de la récolte.

Il est aussi intéressant de tracer une trajectoire de croissance qui reflète 20 h de déplacement dans la zone de croissance considérée. La taille de la zone de croissance variant selon les traitements (Figure 29D, 30C, 31C), la position finale de la particule juste en sortie de cette zone (REGR = 0) sera 9.5 mm, 10.25 mm et 6.5 mm pour les conditions témoin, stress osmotique modéré et stress osmotique fort, respectivement. 20 h avant la récolte, ces particules se situent toutes près de la position 2 mm. Dans les trois traitements, la vitesse de déplacement étant forte au delà de la position 6.5 mm, la position initiale des particules est peu affectée par leur position finale.

IV.2.2- Représentation lagrangienne de la régulation de l'expression des gènes

Les représentations lagrangiennes de la régulation de l'expression des gènes sont calculées à l'aide des différentes trajectoires de croissance. La similarité des profils de densités de *PtTIP1;4* et de REGR suggère un lien entre cette TIP1 et l'expansion cellulaire. Nous avons donc choisi d'analyser la représentation lagrangienne de la dérivée matérielle de la densité de transcrits de *PtTIP1;4* afin de décrire sa régulation dans le temps. La représentation lagrangienne est calculée pour les trois particules considérées précédemment. Ces représentations illustrent la régulation de l'expression du gène dans une unique particule au cours du temps. Autrement dit, ces représentations donnent accès à l'évolution temporelle de la régulation du gène dans une cellule au cours de son déplacement.

Lorsque la cellule (ou la particule) d'intérêt a pour position initiale 2 mm, la représentation lagrangienne de la régulation d'expression de *PtTIP1;4* aboutit à des profils temporels très variables en fonction de la racine considérée (Figure 50A). Les variations entre les différentes trajectoires individuelles se répercutent sur les profils de régulation.

En revanche, lorsque la position finale de la cellule est à 10 mm, la variabilité interindividuelle est réduite et un « patron temporel » de régulation se démarque pour chaque traitement (Figure 50B), malgré une position initiale variable entre les conditions. En condition témoin, 10 à 20 h avant la récolte, la régulation d'expression de *PtTIP1;4* est quasi nulle. Pendant les 10 dernières heures, l'expression du gène est induite atteignant un pic 6h avant son « arrivée » à 10 mm. Sous stress osmotique modéré, un pic d'intensité plus forte est visible 5 h avant la fin du déplacement. Sous stress osmotique fort, le pic de régulation apparaît 12 h avant. Quelle que soit la position initiale de la particule, le stress osmotique fort induit une régulation précoce de l'expression de *PtTIP1;4*. Ainsi, dans un état de croissance

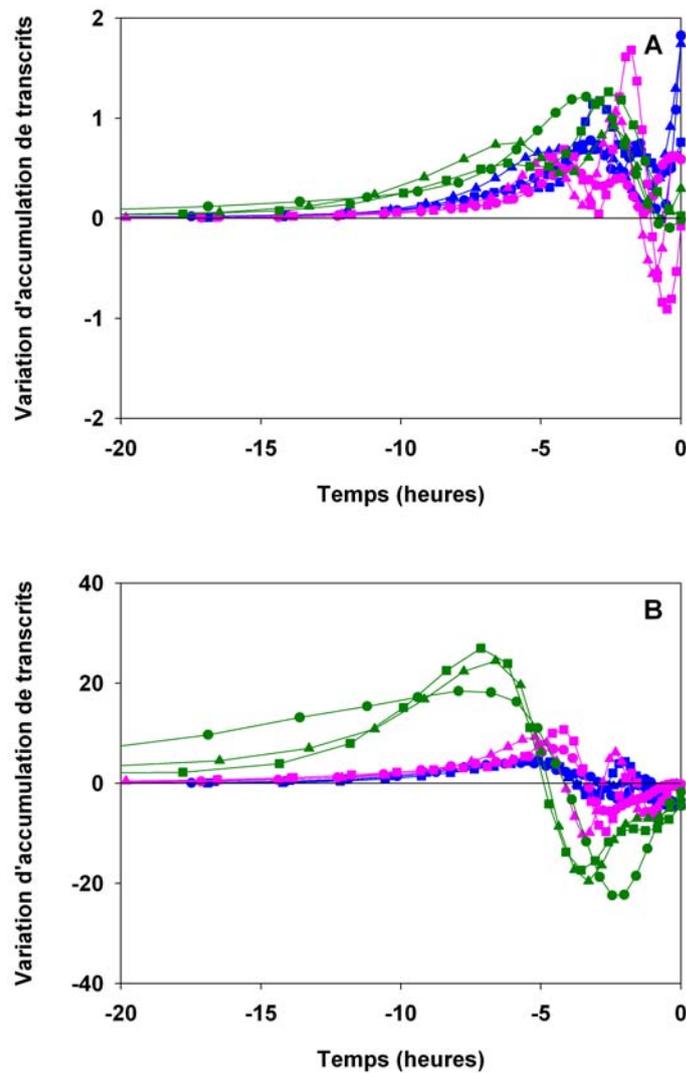


Figure 51 : Représentations lagrangiennes des vitesses d'accumulation des transcrits *PtAPL* et *PtPIP2;6* dans les trois états de croissance. A. Représentation lagrangienne de la variation d'accumulation des transcrits *PtAPL* calculée à partir de la trajectoire d'une particule à la position finale où le REGR = 0. **B.** Représentation lagrangienne de la variation d'accumulation des transcrits *PtPIP2;6* calculée à partir de la trajectoire d'une particule à la position finale où le REGR = 0.

considéré, l'expression de *PtTIP1;4* suit un patron temporel de régulation bien défini tout au long de son déplacement.

Si la cellule considérée est celle qui finit juste sa croissance à $t = 0$ h (position variable selon les racines), les représentations lagrangiennes associées reflètent une description temporelle de la variable lié à l'activité de croissance. Ainsi, les pics temporels de régulation de *PtTIP1;4* dans les trois conditions sont beaucoup plus similaires. Bien que la distance de déplacement pendant 20 h de croissance soit plus courte sous stress osmotique fort (Figure 49C, F, I), le patron temporel de régulation de *PtTIP1;4* est peu différent de celui de la condition témoin. Ainsi, pendant 20 h de croissance, toutes conditions confondues, la régulation de l'expression de *PtTIP1;4* suit un patron temporel de régulation. En d'autres mots, le durée de régulation de *PtTIP1;4* sera quasi-similaire pour toute cellule au cours de ses dernières heures de croissance quelle que soit la condition.

La Figure 51 présente la régulation de l'expression de *PtAPL* et *PtPIP2;6* dans une cellule qui a pour position finale la fin de la zone de croissance. Pendant 20 h de croissance, la régulation de *PtAPL* suit comme celle de *PtTIP1;4* un patron similaire pour tous les traitements. En condition témoin et stress osmotique modéré, le gène *PtAPL* est induit progressivement 10 h avant la fin de la croissance avec un maximum quelques heures avant la fin de la croissance. Cependant, sous stress osmotique fort, l'induction du gène débute progressivement dès -20 h et atteint son maximum légèrement plus tôt entre 3 et 5 h avant la récolte. En revanche, la régulation de *PtPIP2;6* est très différente selon les traitements au cours des 20 h précédant la fin de la croissance. En condition témoin et stress osmotique modéré, *PtPIP2;6* est induit progressivement jusqu'à 5 h avant la fin de la croissance. Sous stress osmotique fort, l'induction est beaucoup plus forte et plus précoce atteignant un maximum 7 h avant la fin de la croissance

IV.3- Discussion

Après trois jours, les deux niveaux de déficit hydrique ont généré deux états de croissance différents. L'équation de continuité a donné accès à la régulation de l'expression des gènes dans ces différents états de croissance. Cette régulation a été décrite à la fois dans l'espace et le temps permettant ainsi de déceler le long de l'apex les lieux et temps d'induction et/ou répression.

Malgré les avancées technologiques qui permettent une description de l'expression de l'ensemble des gènes à l'échelle d'un type cellulaire (Brady *et al.*, 2007, Birnbaum *et al.*, 2003), la prise en compte du déplacement et de l'expansion des cellules fait défaut dans les analyses de l'expression des gènes dans un organe en croissance. Les variations spatiales des densités de transcrits le long d'un apex sont souvent interprétées comme des variations d'expression le long de l'apex. Récemment, une étude de l'expression de l'ensemble des gènes à l'échelle du type cellulaire a été menée le long de l'apex de la racine d'*Arabidopsis thaliana* (Birnbaum *et al.*, 2003). Des données d'expression sont obtenues pour tous les types cellulaires à différentes positions de l'apex. Une description spatiale de la régulation de l'expression des gènes est alors dressée pour chaque type cellulaire en comparant uniquement les positions entre elles. L'utilisation de la dérivée matérielle en condition de régime permanent est la seule façon d'accéder à la régulation d'un gène au sein d'une particule (cellule) qui traverse la zone de croissance. Ainsi, nous montrons que sous stress osmotique fort, les pics d'induction des *PtTIP1s* ont lieu plus près de l'apex qu'en condition témoin avec des niveaux généralement plus faibles. Cette induction faible et précoce dans l'espace aboutit pourtant à de fortes densités de transcrits. Nous mettons alors en évidence qu'à une position donnée, une induction forte n'est pas forcément nécessaire pour accumuler fortement des transcrits. Les analyses qui comparent uniquement les densités de transcrits position à position aboutissent à des conclusions erronées. Notre description spatiale de la dérivée matérielle de la densité de transcrits donne ainsi accès au lieu d'induction et de répression des gènes ainsi qu'à leur intensité.

Le tracé de la trajectoire de croissance montre que le temps de déplacement le long de l'apex varie fortement. Les cellules sont déplacées plus rapidement en fin qu'en début de zone de croissance. Ainsi, la présence d'un pic de densité de transcrits en début de zone de croissance sera la conséquence d'une faible accumulation de transcrits, mais prolongée dans le temps, alors qu'un pic de densité de même intensité en fin de zone de croissance nécessite une induction forte car brève. Le temps passé en début de zone de croissance est long. Par conséquent, une induction forte n'est pas forcément nécessaire pour accumuler des transcrits dans cette zone. Autrement dit, la description spatiale de la régulation permet d'appréhender ces pics de densité mais n'est pas suffisante pour comprendre la durée de l'accumulation. Nous avons utilisé la spécification lagrangienne pour mettre en évidence les temps d'induction/de répression des différents gènes. Cette description temporelle de la dérivée matérielle de la densité de transcrits donne accès au temps d'induction et de répression des

gènes. Il est ainsi mis en évidence que pendant 20 h de croissance, la régulation de l'expression de *PtTIP1;4* suit une évolution quasi similaire quel que soit l'état de croissance. Dans le temps, *PtTIP1;4* est induit progressivement pendant les 4 à 7 h précédant la fin de croissance. La corrélation entre le profil de densité de transcrits de *PtTIP1;4* et du profil de REGR dans les trois états de croissance, suggérait un rôle de *PtTIP1;4* dans l'expansion cellulaire (Figure 37). La régulation similaire de l'expression de *PtTIP1;4* lors de 20 h de croissance quelle que soit la condition est un argument supplémentaire pour envisager un lien entre *PtTIP1;4* et l'activité de croissance. Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de dire si l'expression de *PtTIP1;4* module l'activité de croissance, ou si c'est l'activité de croissance qui module l'expression de *PtTIP1;4*.

Synthèse et Perspectives

Le but de cette thèse était d'étudier le contrôle moléculaire de la croissance de la racine du peuplier sous déficit hydrique en ciblant le processus d'expansion cellulaire, et en particulier l'étude de la régulation de l'expression des aquaporines *TIP1s*. Le caractère « en croissance » de l'apex de la racine a nécessité la mise en place d'un cadre conceptuel permettant d'analyser la régulation de l'expression des gènes dans un organe en croissance prenant en compte les variations de vitesse d'allongement et de déplacement des cellules le long de l'apex. Ce cadre nous a permis de déterminer comment est modulée la régulation des aquaporines *PtTIP1s* sous deux niveaux de déficit hydrique, l'un qui réduit la croissance et l'autre qui ne l'affecte quasiment plus. Nous mettons ainsi en évidence que lorsque la croissance est réduite, la plupart des *TIP1s* sont induites plus précocement dans le temps et l'espace, générant une forte densité de transcrits dans les premiers millimètres de l'apex, zone où la croissance des cellules est maintenue. Les fortes densités de transcrits sont le résultat d'une induction de même ampleur qu'en condition témoin mais prolongée dans le temps. Lorsque la croissance est maintenue, les profils d'induction des *PtTIP1s* sont similaires à ceux des témoins. Le patron d'expression de *PtTIP1;4* très similaire au profil de REGR fait soupçonner un lien entre cette aquaporine et l'expansion cellulaire. La régulation de l'expression de *PtTIP1;4* apparaît suivre un patron temporel similaire pour tous les traitements bien que la taille de la zone de croissance varie, renforçant l'hypothèse d'un lien avec l'activité de croissance sans en donner l'origine de la cause et de la conséquence. Par ailleurs, l'analyse de la régulation d'une *PIP2* permet de montrer que contrairement aux *TIP1s*, l'expression de *PtPIP2* est induite plus fortement sous stress osmotique fort qu'en condition témoin.

Amélioration du cadre expérimental

Le cadre expérimental repose sur une analyse d'expression de gènes à une résolution du millimètre. Cette résolution peut apparaître faible au vue de l'impact du stress osmotique fort sur la taille de la zone de croissance. Il est envisageable d'améliorer la résolution spatiale utilisée pour analyser la densité de transcrits. Des analyses de PCR quantitative à des résolutions plus fines que le millimètre présentent des désavantages (faible rendement en ARN, précision de la découpe). Cependant un décalage dans les découpes des segments d'un millimètre permettrait d'augmenter le nombre de points. Deux jeux de données pourraient être générés : un premier avec notre découpage actuel : 11 segments d'un millimètre, et un deuxième avec toujours des segments d'un millimètre, mais dont le premier commencerait à 0.5 mm de l'apex. Ainsi le cumul des deux jeux de données génèrerait une nouvelle résolution

de 0.5 mm (Silk *et al.*, 1984). Sous stress osmotique fort, la zone de croissance étant raccourcie, cette nouvelle résolution permettrait d'obtenir des données d'expression ainsi que des splines interpolantes plus précises.

Par ailleurs, pour utiliser l'équation de continuité dans sa version monodimensionnelle, nous avons posé l'hypothèse que l'apex de la racine se présentait sous la forme d'un cylindre de diamètre constant à l'intérieur duquel les cellules sont déplacées de manière monodirectionnelle. Nous ne prenons donc pas en compte la variation de volume qu'il peut exister dans les tous premiers millimètres de la zone de croissance (forme conique). Les premiers segments présentent un volume plus faible que les segments suivants, la densité des transcrits calculée est approximative. Une densité de transcrits rapportée par unité de volume permettrait de prendre en compte ce gradient de diamètre.

Révéler des réseaux de co-régulation

L'analyse de la régulation de l'expression montre que les membres de la sous classe des aquaporines *TIP1s* sont différenciellement régulés le long de l'apex sous déficit hydrique. Le stress fort induit une réorganisation de l'induction de certains membres vers la base de l'apex (positions auxquelles le maintien de croissance est observé). Cette réorganisation s'accompagne d'une densité de transcrits plus forte à ces positions. Il serait intéressant d'une part, d'analyser les régions promotrices des séquences codantes de ces aquaporines afin de déterminer si leur expression est régie par un facteur de transcription commun induit par le déficit hydrique et d'autre part d'étudier la régulation spatiale et temporelle du facteur de transcription éventuellement associé. L'analyse de la régulation de l'expression du facteur de transcription et de son régulon pourrait mettre en évidence des patrons de co-régulation séparés dans le temps et/ou l'espace. Ceci permettrait de dessiner un réseau de régulation de ces aquaporines et d'autres gènes en réponse au déficit hydrique le long de l'apex. En effet, la division, l'expansion ainsi que la différenciation cellulaire sont des processus qui impliquent de nombreux acteurs moléculaires qui interagissent au sein d'un réseau. Ces acteurs peuvent être sous le contrôle d'un facteur de transcription. Ces réseaux de régulation peuvent être mis en évidence par des techniques plus élaborées combinant des analyses de mutant et des analyses de microscopie. Il a ainsi été révélé un réseau de régulation spatiale et temporelle des gènes impliqués dans le cycle cellulaire au niveau du méristème de la racine d'*Arabidopsis thaliana* (Sozzani *et al.*, 2010). Ce réseau serait contrôlé dans le temps et l'espace par les facteurs de transcription SHR et SCR (pour *shortroot* et *scarecrow* respectivement). Toutefois, ces techniques restent accessibles uniquement pour l'espèce modèle *Arabidopsis*

thaliana. Ici nous proposons à la fois un cadre conceptuel qui permet l'étude de la régulation de l'expression d'un gène dans un organe en croissance, mais qui de plus peut permettre de révéler des réseaux de régulation sur des espèces non-modèles.

Prise en compte de l'hétérogénéité radiale

Par ailleurs ces réseaux de régulation peuvent être spécifiques d'un type cellulaire. L'étude de la réponse moléculaire de différents types cellulaires de la racine d'*Arabidopsis thaliana* sous un stress salin a été menée à très haute résolution (Dinnyen *et al.*, 2008). Il est mis évidence que la réponse au stress salin dépend du type cellulaire et de son stade de développement. Dans notre étude, nous ne prenons pas en compte l'hétérogénéité radiale des différents types cellulaires trouvés au sein de la racine (Figure 1). Travailler sur la densité de transcrits au niveau du type cellulaire en utilisant la microdissection par exemple, pourrait révéler des régulations spécifiques d'un type cellulaire le long de l'apex face à un stimulus. Les cellules étant intimement liées les unes aux autres par la paroi primaire, celles-ci sont toutes déplacées dans la même direction, sur un plan radial, les types cellulaires présentent ainsi la même vitesse de déplacement. Les analyses moléculaires fines pourront être alors couplées à une analyse globale de la croissance de la racine comme dans cette étude. Suite à notre analyse, les patrons d'induction des PtTIP1s sont connus. Une analyse de localisation des transcrits par hybridation *in situ* permettrait de détecter la localisation des transcrits au niveau du type cellulaire. Cette analyse permettrait de cibler le ou les types cellulaires d'intérêt.

Mieux caractériser le lien entre PtTIP1;4 et l'expansion cellulaire

Nos résultats laissent supposer un lien entre *PtTIP1;4* et l'expansion cellulaire. Néanmoins, nos données ne permettent pas de déterminer si *PtTIP1;4* contrôle l'expansion cellulaire, ou si c'est l'expansion cellulaire qui conditionne l'expression et la régulation de *PtTIP1;4*. Une approche pour confirmer ce lien, serait d'analyser l'expression et la régulation de *PtTIP1;4* sous d'autres types de stress affectant la croissance. Cela permettrait de confirmer si le lien entre *PtTIP1;4* et l'expansion cellulaire. Toutefois, une caractérisation de la croissance de la racine sur un mutant peuplier *PtTIP1;4* permettrait d'affirmer ou non si *PtTIP1;4* joue un rôle dans l'expansion cellulaire.

Caractériser l'anatomie de la racine sous déficit hydrique

L'analyse de la régulation d'un facteur de différenciation du protophloème a suggéré que sous déficit hydrique le protophloème se différencie plus près de l'apex. Selon Silk (1992), cette différenciation est l'une des deux adaptations observées au niveau des racines sous un stress environnemental affectant la croissance. Le second ajustement est l'augmentation de la taille des cellules à la base de l'apex, qui faciliterait le transfert intercellulaire de l'eau et des macromolécules. Des analyses histologiques permettraient de caractériser l'anatomie des cellules le long de l'apex. Des coupes longitudinales le long de l'apex permettraient de déterminer un profil de longueur de cellules. Ce profil pourra être alors comparé dans chaque état de croissance et de révéler un éventuel ajustement anatomique dans un état de croissance affecté par le déficit hydrique. Durant la thèse, des expériences de coupes longitudinales d'apex de racine ont été initiées après inclusion des échantillons en paraffine. Les résultats n'ont pas été concluants et une amélioration du protocole est encore nécessaire. Un changement dans le type d'inclusion est envisagé par une étape d'inclusion en résine plutôt qu'en paraffine.

Caractériser le taux de division cellulaire

Alors que la croissance résulte de deux processus, l'expansion cellulaire et la division, cette étude a été principalement focalisée sur l'expansion cellulaire. Nous montrons que quel que soit le niveau de stress appliqué, les quatre premiers millimètres de la zone de croissance ne présentent aucune variation en termes de vitesse d'allongement et de déplacement. Dans les premiers millimètres, les processus de division et d'expansion sont actifs. Une étude complémentaire pourrait être menée pour étudier l'impact du déficit hydrique sur les contrôles de la division cellulaire. Le taux de division peut être calculé en intégrant des données de densités cellulaires à l'équation de continuité. Ce taux de division cellulaire pourra être mis au regard de la régulation de l'expression de *cyclin-dependant kinases*. Les deux informations pourraient alors nous renseigner sur les contrôles spatiaux et temporels de la division sous stress.

Références

- Achard P., Gusti A., Cheminant S., Alioua M., Dhondt S., Coppens F., Beemster GT. and Genschik P. (2009)** Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 19, 1188-11893.
- Aeschbacher AR., Schiefelbein JW. and Benfey PN. (1994)** The Genetic and Molecular Basis of Root Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 25-45.
- Almeida-Rodriguez AM., Cooke JE., Yeh F. and Zwiazek JJ. (2010)** Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simoniixbalsamifera* clones with different drought resistance strategies. *Physiologia Plantarum*, in press.
- Arioli T., Peng L., Betzner AS., Burn J., Wittke W., Herth W., Camilleri C., Höfte H., Plazinski J., Birch R., Cork A., Glover J., Redmond J. and Williamson RE. (1998)** Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, 279, 717-720.
- Azad AK., Sawa Y., Ishikawa T. and Shibata H. (2004)** Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant and Cell Physiology*, 45, 608–617.
- Balk PA. and de Boer AD. (1999)** Rapid stalk elongation in tulip (*Tulipa gesneriana* L. cv. Apeldoorn) and the combined action of cold-induced invertase and the water-channel protein gammaTIP. *Planta*, 209, 346-354.
- Barbagallo RP., Oxborough K., Pallett KE. and Baker NR. (2003)** Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology*, 132, 485–493.
- Barrieu F., Thomas D., Marty-Mazars D., Charbonnier M. and Marty F. (1998)** Tonoplast intrinsic proteins from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*): immunological analysis, cDNA cloning and evidence for expression in meristematic tissues. *Planta*, 204, 335–344.
- Barron JL. and Liptay A. (1997)** Measuring 3-D plant growth using optical flow. *Bioimaging*, 5, 82–86.
- Baskin TI. (2005)** Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 203-222.
- Basu P., Pal A., Lynch JP. and Brown KM. (2007)** A novel image analysis technique for kinematic study of growth and curvature. *Plant Physiology*, 145, 305–316.
- Bauby H., Divol F., Truernit E., Grandjean O. and Palauqui JC. (2007)** Protophloem differentiation in early *Arabidopsis thaliana* development. *Plant and Cell Physiology*, 48, 97-109.
- Beauchamp E. and Lathwell DJ. (1966)** Root-zone temperature effects on the vascular development of adventitious roots in *Zea mays*. *Botanical Gazette*, 127, 153–158.

- Beeckman T., Burssens S. and Inzé D. (2001)** The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 52, 403-411.
- Beemster GT. and Baskin TI. (1998)** Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116, 1515-1526.
- Beemster GT. and Baskin TI. (2000)** Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124, 1718-1727.
- Beemster GT., De Vusser K., De Tavernier E., De Bock K. and Inzé D. (2002)** Variation in growth rate between Arabidopsis ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiology*, 129, 854-864.
- Benjamins R. and Scheres B. (2008)** Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 443-465.
- Behnke HD. (1989)** Structure of the phloem. In *Transport of Photoassimilates* (Baker, D.A. and Milburn, J.A., eds). Harlow, UK: Longman Scientific & Technical, pp. 79-137.
- van Bel AJE. and Kempers R. (1996)** The pore/plasmodesm unit: key element in the interplay between sieve element and companion cell. *Progress in Botany*, 58, 278-291.
- van Bel AJE., Ehlers K. and Knoblauch M. (2002)** Sieve elements caught in the act. *Trends in Plant Science*, 7, 126-132.
- van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. and Scheres B. (1997)** Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, 390, 287-289.
- Biela A., Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R. and Kaldenhoff R. (1999)** The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant Journal*, 18, 565-570.
- Bienert GP., Moler AL., Kristiansen KA., Schulz A., Moler IM., Schjoerring JK. and Jahn TP. (2007)** Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 1183-1192.
- Birnbaum K., Shasha DE., Wang JY., Jung JW., Lambert GM., Galbraith DW. and Benfey PN. (2003)** A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*, 302, 1956-1960.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. and Scheres B. (2005)** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433, 39-44.
- Bogeat-Triboulot MB., Brosché M., Renaut J., Jouve L., Le Thiec D., Fayyaz P., Vinocur B., Witters E., Laukens K., Teichmann T., Altman A., Hausman JF., Polle A., Kangasjärvi J. and Dreyer E. (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.

Bonke M., Thitamadee S., Mähönen AP., Hauser MT. and Helariutta Y (2003) APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature*, 426, 181-186.

Bots M., Vergeldt F., Wolters-ArtsM., Weterings K., van As H. and Mariani C. (2005) Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiology*, 137, 1049–1056.

Boyer JS. (1985) Water transport. *Annual Review of Plant Physiology*, 36, 473-516.

Boyer JS. (1988) Cell enlargement and growth-induced water potentials. *Physiologia Plantarum*, 73, 311-316.

Boyer JS. and Silk WK. (2004) Hydraulics of plant growth. *Functional Plant Biology*, 31, 761-773.

Brady SM., Orlando DA., Lee JY., Wang JY., Koch J., Dinneny JR., Mace D., Ohler U. and Benfey PN. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*, 318, 801-806.

Bret-Harte MS. and Silk WK. (1994) Nonvascular, symplasmic diffusion of sucrose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of *Zea mays*. *Plant Physiology*, 105, 19–33.

Brunner AM., Yakovlev IA. and Strauss SH. (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, 4, 14.

Buchanan BB., Gruissem W. and Jones RL. (2002) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*.

BursSENS S., Himanen K., van de Cotte B., Beeckman T., Van Montagu M., Inzé D. and Verbruggen N. (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 211, 632-640.

Campilho A., Garcia B., v.d. Toorn H., v. Wijk H., Campilho A. and Scheres B. (2006) Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Plant Journal*, 48, 619–627.

Chaumont F., Barrieu F., Herman EM. and Chrispeels MJ. (1998) Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiology*, 117, 1143-1152.

Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels MJ. and Jung R. (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*, 125, 1206-1215.

Chaumont F., Moshelion M. and Daniels MJ. (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*, 97, 749-764.

- Cho HT. and Cosgrove DJ. (2000)** Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 9783-9788.
- Choi D., Lee Y., Cho HT. and Kende H. (2003)** Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. *Plant Cell*, 15, 1386-1398.
- Choi WG. and Roberts DM. (2007)** *Arabidopsis* NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 24209-24218.
- Chrispeels MJ., Morillon M., Maurel C., Gerbeau P., Kjellbom P. and Johansson I. (2001)** Aquaporins of plants: structure, function, regulation, and role in plant water relations. *Current Topics in Membranes*, 51, 277-334.
- Chu Z., Chen H., Zhang Z., Zhang Z., Zheng N., Yin B., Yan H., Zhu L., Zhao X., Yuan M., Zhang X. and Xie Q. (2007)** Knockout of the AtCESA2 Gene Affects Microtubule Orientation and Causes Abnormal Cell Expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143, 213-224.
- Cosgrove DJ. (1993)** Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *International Journal of Plant Science*, 154, 10-21.
- Cosgrove DJ. (1997)** Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 171-201.
- Cosgrove DJ. (1999)** Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 391-417.
- Cosgrove DJ. (2000)** Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 109-124.
- Cosgrove DJ. (2005)** Growth of the plant cell wall. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 6, 850-861.
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi MK. and Scheible WR. (2005)** Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 5-17.
- Daniels MJ., Chrispeels MJ. and Yeager M. (1999)** Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *Journal of Molecular Biology*, 294, 1337-1349.
- Daniels MJ. and Yeager M. (2005)** Phosphorylation of aquaporin PvTIP3;1 defined by mass spectrometry and molecular modeling. *Biochemistry*, 44, 14443-14454.
- Danielson J. and Johanson U. (2008)** Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, 8, 45.

- Dean RM., Rivers RL., Zeidel ML. and Roberts DM. (1999)** Purification and functional reconstitution of soybean Nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry*, 38, 347–353.
- Dello Ioio R., Linhares FS., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P. and Sabatini S. (2007)** Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, 17, 678–682.
- Dello Ioio R., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S., Taniguchi M., Morita MT., Aoyama T., Costantino P. and Sabatini S. (2008)** A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322, 1380-1384.
- Derbyshire P., McCann MC. and Roberts K. (2007)** Restricted cell elongation in arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology*, 7, 31.
- Dewitte W. and Murray JA. (2003)** The Plant Cell Cycle. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 235-264.
- Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson DG., Mravec J., Stierhof YD. and Friml J. (2007)** Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Current Biology*, 17, 520-527.
- Dinneny JR., Long TA., Wang JY., Jung JW., Mace D., Pointer S., Barron C., Brady SM., Schiefelbein J. and Benfey PN. (2008)** Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science*, 320, 942-945.
- Doerner P. (2000)** Plant stem cells: the only constant thing is change. *Current Biology*, 10, R826-R829.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. and Scheres B. (1993)** Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*, 119, 71-84.
- Dynowski M., Schaaf G., Loque D., Moran O. and Ludewig U. (2008b)** Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochemical Journal*, 15, 53-61.
- Eisenbarth DA. and Weig AR. (2005)** Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1831–1842.
- Erickson RO. and Sax KB. (1956)** Rates of cell division and cell elongation in the growth of the primary root of *Zea mays*. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 100, 499-514.
- Erickson RO. (1976)** Modeling of plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 27, 407-434.
- Esau K. (1969)** The Phloem. *Encyclopedia of Plant Anatomy*.

- Fagard M., Desnos T., Desprez T., Goubet F., Refregier G., Mouille G., McCann M., Rayon C., Vernhettes S. and Höfte H. (2000)** *PROCUSTE1* Encodes a Cellulose Synthase Required for Normal Cell Elongation Specifically in Roots and Dark-Grown Hypocotyls of Arabidopsis. *Plant Cell*, 12, 2409-2424.
- Fan L. and Neumann PM. (2004)** The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. *Plant Physiology*, 135, 2291-2300.
- Fan L., Linker R., Gepstein S., Tanimoto E., Yamamoto R. and Neumann PM. (2006)** Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology*, 140, 603–612.
- Fiorani F. and Beemster GTS. (2006)** Quantitative analyses of cell division in plants. *Plant Molecular Biology*, 60, 963-979.
- Fisher D. and Cyr RJ. (1998)** Extending the microtubule/microfibril paradigm. *Plant Physiology*, 116, 1043-1051.
- Fleming AJ., McQueen-Mason S., Mandel T. and Kuhlemeier C. (1997)** Induction of Leaf Primordia by the Cell Wall Protein Expansin. *Science*, 276, 1415-1418.
- Fleury D., Himanen K., Cnops G., Nelissen H., Boccardi TM., Maere S., Beemster GT., Neyt P., Anami S., Robles P., Micol JL., Inzé D. and Van Lijsebettens M. (2007)** The Arabidopsis thaliana homolog of yeast BRE1 has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. *Plant Cell*, 19, 417-432.
- Force A., Lynch M., Pickett FB., Amores A., Yan YL. and Postlethwait J. (1999)** Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151, 1531-1545.
- Fotiadis D., Jenő P., Mini T., Wirtz S., Müller SA., Frayse L., Kjellbom P. and Engel A. (2001)** Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1707-1714.
- Frensch J. and Hsiao TC. (1995)** Rapid response of the yield threshold and turgor regulation during adjustment of root growth to water stress in *Zea mays*. *Plant Physiology*, 108, 303-312.
- Fricke W. (2002)** Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Annals of Botany*, 90, 157-167.
- Fricke W., Akhiyarova G., Wei W., Alexandersson E., Miller A., Kjellbom PO., Richardson A., Wojciechowski T., Schreiber L., Veselov D., Kudoyarova G. and Volkov V. (2006)** The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1079-1095.
- Fricke W. and Chaumont F. (2006)** Solute and Water Relations of Growing Plant Cells. *Plant Cell Monographs*, 5, 7-31.

- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. and Jürgens G. (2003)** Efflux dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of Arabidopsis. *Nature*, 426, 147-153.
- Fry SC., Smith RC., Renwick KF., Martin DJ., Hodge SK. and Matthews KJ. (1992)** Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal*, 282, 821-828.
- Fry SC. (1998)** Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 332, 507-515.
- Fry SC., Dumville JC. and Miller JG. (2001)** Fingerprinting of polysaccharides attacked by hydroxyl radicals in vitro and in the cell walls of ripening pear fruit. *Biochemical Journal*, 357, 729-737.
- Fujiyoshi Y., Mitsuoka K., de Groot BL., Philippsen A., Grubmüller H., Agre P. and Engel A. (2002)** Structure and function of water channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 509-515.
- Galinha C., Bilsborough G. and Tsiantis M. (2009)** Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 1149–1156.
- Gandar PW. (1980)** The analysis of growth and cell production in root apices. *Botanical Gazette*, 141, 131-138.
- Gandar PW. (1983a)** Growth in root apices. I. The kinematic description of growth. *Botanical Gazette*, 144, 1-10.
- Gandar PW. (1983b)** Growth in root apices. II. Deformation and Rate of Deformation, *Botanical Gazette*, 144, 11-19.
- Gattolin S., Sorieul M., Hunter PR., Khonsari RH. and Frigerio L. (2009)** In vivo imaging of the tonoplast intrinsic protein family in Arabidopsis roots. *BMC Plant Biology*, 9, 133.
- Girousse C., Moulia B., Silk W. and Bonnemain JL. (2005)** Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different inhibitions of longitudinal and radial expansion. *Plant Physiology*, 137, 1474-1484.
- Goodwin RH. and Avers CJ. (1956)** Studies on roots. III. An analysis of root growth in *Phleum pratense* using photomicrographic records. *American Journal of Botany*, 43, 479-487.
- Gottschling DE. and Berg BL. (1998)** Chromosome dynamics: yeast pulls it apart. *Current Biology*, 29, R76-R79.
- Gould N., Thorpe MR., Minchin PE., Pritchard J. and White PJ. (2004)** Solute is imported to elongation root cells of barley as a pressure driven flow of solution. *Functional Plant Biology*, 31, 391–397.

- Granier C., Aguirrezabal L., Chenu K., Cookson SJ., Dauzat M., Hamard P., Thioux JJ., Rolland G., Bouchier-Combaud S., Lebaudy A., Muller B., Simonneau T. and Tardieu F. (2006)** PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist*, 169, 623–625.
- Green PB. (1962)** Mechanism for plant cellular morphogenesis. *Science*, 138, 1404–1405.
- Grieneisen VA., Xu J., Maree AF., Hogeweg P. and Scheres B. (2007)** Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449, 1008–1013.
- de Groot BL. and Grubmüller H. (2005)** The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 176–183.
- Guenther JF., Chanmanivone N., Galetovic MP., Wallace IS., Cobb JA. and Roberts DM. (2003)** Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*, 15, 981–991.
- Gupta AB. and Sankararamakrishnan R. (2009)** Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology*, 9, 134.
- Hachez C., Moshelion M., Zelazny E., Cavez D. and Chaumont F. (2006a)** Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Molecular Biology*, 62, 305–323.
- Hamann T., Benkova E., Baurle I., Kientz M. and Jurgens G. (2002)** The *Arabidopsis* BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting M ONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes and Development*, 16, 1610–1615.
- Hamant O. and Trass J. (2010)** The mechanics behind plant development. *New Phytologist*, 185, 369–385.
- Hansen GK. (1980)** Diurnal variation of root respiration rates and nitrate uptake as influenced by nitrogen supply. *Physiologia Plantarum*, 48, 421–427.
- Hanton SL., Renna L., Bortolotti LE., Chatre L., Stefano G. and Brandizzi F. (2005)** Diacidic motifs influence the export of transmembrane proteins from the endoplasmic reticulum in plant cells. *Plant Cell*, 17, 3081–3093.
- Harashima H., Kato K., Shinmyo A. and Sekine M. (2007)** Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1103–1112.
- Head GC. (1965)** Studies of diurnal changes in cherry root growth and nutational movements of apple root tips by time-lapse cinematography. *Annals of Botany*, 29, 219–224.
- Hejnowicz Z. (1956)** Growth and differentiation in the root of *Phleum pratense*. II. Distribution of cell division in the root. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 25, 615–628.

- Hemerly AS., Ferreira P., de Almeida Engler J., van Montagu M., Engler G. and Inze D. (1993)** cdc2a Expression in Arabidopsis Is Linked with Competence for Cell Division. *Plant Cell*, 5, 1711-1723.
- Hertel A. and Steudle E. (1997)** The function of water channels in Chara: The temperature dependence of water and solute flows provides evidence for composite membrane transport and for a slippage of small organic solutes across water channels. *Planta*, 202, 324-335.
- Higuchi T., Suga S., Tsuchiya T., Hisada H., Morishima S., Okada Y. and Maeshima M. (1998)** Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant and Cell Physiology*, 39, 905-913.
- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inzé D. and Beeckman T. (2002)** Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. *Plant Cell*, 14, 2339-2351.
- Holm LM., Jahn TP., Moler AL., Schjoerring JK., Ferri D., Klaerke DA. and Zeuthen T. (2005)** NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archives*, 450, 415-428.
- Hsiao TC. (1973)** Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 519-570.
- Hukin D., Doering-Saad C., Thomas CR. and Pritchard J. (2002)** Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. *Planta*, 215, 47-56.
- Hummel A. (2006)**. Etude de la croissance racinaire du peuplier en réponse à un stress osmotique : approche moléculaire à l'échelle de la zone de croissance. *Rapport de Master II. Université Henri Poincaré, Nancy.*
- Hummel GM., Naumann M., Schurr U. and Walter A. (2007)** Root growth dynamics of *Nicotiana attenuata* seedlings are affected by simulated herbivore attack. *Plant Cell and Environment*, 30, 1326-1336.
- Iijima M., Oribe Y., Horibe Y. and Kono Y. (1998)** Time lapse analysis of root elongation rates of rice and Sorghum during the day and night. *Annals of Botany*, 81, 603-607.
- Ishikawa F., Suga S., Uemura T., Sato MH. and Maeshima M. (2005)** Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 579, 5814-5820.
- Ishikawa H. and Evans M. (1997)** Novel software for analysis of root gravitropism: comparative response patterns of Arabidopsis wild type and axr1 seedlings. *Plant Cell and Environment*, 20, 919-928.
- Jacobs TW. (1995)** Cell Cycle Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 317-339.

- Jaillais Y., Fobis-Loisy I., Miège C. and Gaude T. (2008)** Evidence for a sorting endosome in *Arabidopsis* root cells. *Plant Journal*, 53, 237-247.
- Jauh GY., Fischer AM., Grimes HD., Ryan CA Jr. and Rogers JC. (1998)** δ -Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 12995–12999.
- Jiang L., Yang SL., Xie LF., Pua CS., Zhang XQ., Yang WC., Sundaresan V., and Ye D. (2005)** Vanguard1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell*, 17, 584–596.
- Johansson I., Larsson C., Ek B. and Kjellbom P. (1996)** The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell*, 8, 1181–1191.
- Johansson I., Karlsson M., Shukla VK., Chrispeels MJ., Larsson C. and Kjellbom P. (1998)** Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 10, 451–460.
- Kaldenhoff R., Kölling A., Meyers J., Karmann U., Ruppel G. and Richter G. (1995)** The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant Journal*, 7, 87-95.
- Kamaluddin M. and Zwiazek JJ. (2002)** Ethylene enhances water transport in hypoxic aspen. *Plant Physiology*, 128, 962–969.
- Karlsson M., Fotiadis D., Sjövall S., Johansson I., Hedfalk K., Engel A. and Kjellbom P. (2003)** Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 537, 68–72.
- Kutschera U. and Niklas KJ. (2007)** The epidermal-growth-control theory of stem elongation: an old and a new perspective. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1395–1409.
- Kutschmar A., Rzewuski G., Stührwohldt N., Beemster GT., Inzé D. and Sauter M. (2009)** PSK-alpha promotes root growth in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 181, 820-831.
- Ledbetter MC. and Porter KR. (1963)** A “microtubule” in plant cell fine structure. *Journal of Cell Biology*, 19, 239–250.
- Lee HK., Cho SK., Son O., Xu Z., Hwang I. and Kim WT (2009)** Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 21, 622-641.
- Leister D., Varotto C., Pesaresi P., Niwergall A. and Salamini F. (1999)** Large-scale evaluation of plant growth in *Arabidopsis thaliana* in noninvasive image analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 671–678.

- Lin W., Peng Y., Li G., Arora R., Tang Z., Su W. and Cai W. (2007)** Isolation and functional characterization of PgTIP1, a hormone-autotrophic cells-specific tonoplast aquaporin in ginseng. *Journal of Experimental Botany*, 58, 947-956.
- Liszkay A., Kenk B. and Schopfer P. (2003)** Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217, 658-667.
- Liszkay A., van der Zalm E. and Schopfer P. (2004)** Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and $\cdot OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 136, 3114-3123.
- Liu LH., Ludewig U., Gassert B., Frommer WB. and von Wirén N. (2003)** Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133, 1220-1228.
- Liu F., Vantoai T., Moy LP., Bock G., Linford LD. and Quackenbush J. (2005)** Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137, 1115-1129.
- Lloyd C. and Chan J. (2004)** Microtubules and the shape of plants to come. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 5, 13-22.
- Lockhart JA. (1965)** An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology*, 8, 264-275.
- Loyer P., Trembley J., Katona R., Kidd V. and Lahti J. (2005)** Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signalling*, 17, 1033-1051.
- Ludevid D., Höfte H., Himmelblau E. and Chrispeels MJ. (1992)** The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiology*, 100, 1633-39.
- Ma N., Xue J., Li Y., Liu X., Dai F., Jia W., Luo Y. and Gao J. (2008)** Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology*, 148, 894-907.
- Ma JF., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M., Murata Y. and Yano M. (2006)** A silicon transporter in rice. *Nature*, 30, 440, 688-91.
- Ma S., Quist TM., Ulanov A., Joly R. and Bohnert HJ. (2004)** Loss of TIP1;1 aquaporin in *Arabidopsis* leads to cell and plant death. *Plant Journal*, 40, 845-859.
- MacAdam JW. and Grabber JH. (2002)** Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades. *Planta*, 215, 785-793.
- Malz S. and Sauter M. (1999)** Expression of two PIP genes in rapidly growing internodes of rice is not primarily controlled by meristem activity or cell expansion: *Plant Molecular Biology*, 40, 985-995.

- Maraschin Fdos S., Memelink J. and Offringa R. (2009)** Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant Journal*, 59, 100–109.
- Marga F., Grandbois M., Cosgrove DJ. and Baskin TI. (2005)** Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant Journal*, 43, 181–190.
- Mason MG., Mathews DE., Argyros DA., Maxwell BB., Kieber JJ., Alonso JM., Ecker JR. and Schaller GE. (2005)** Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17, 3007–3018.
- Maurel C., Reizer J., Schroeder JI. and Chrispeels MJ. (1993)** The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal*, 12, 2241–2247.
- Maurel C., Reizer J., Schroeder JI., Chrispeels MJ. and Saier MH Jr. (1994)** Functional characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 11869–11872.
- Maurel C., Kado RT., Guern J. and Chrispeels MJ. (1995)** Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin α -TIP. *EMBO Journal*, 14, 3028–3035.
- Maurel C., Tacnet F., Güclü J., Guern J. and Ripoche P. (1997)** Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 7103–7108.
- Maurel C. (1997)** Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 399–429.
- Maurel C., Javot H., Lauvergeat V., Gerbeau P., Tournaire C., Santoni V. and Heyes J. (2002)** Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*, 215, 105–148.
- Maurel C. (2007)** Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581, 2227–2236.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu DT. and Santoni V. (2008)** Plant Aquaporins : Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 595–624.
- Maurel C., Santoni V., Luu DT., Wudick MM. and Verdoucq L. (2009)** The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 690–698.
- Mayer U. and Jürgens G. (2004)** Cytokinesis: lines of division taking shape. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 599–604.

- McQueen-Mason SJ. and Cosgrove DJ. (1994)** Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 6574–6578.
- McQueen-Mason SJ. and Cosgrove DJ. (1995)** Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology*, 107, 87–100.
- Medford JI., Horgan R., El-Sawi Z. and Klee HJ. (1989)** Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell*, 1, 403–413.
- Merret R., Moulia B., Hummel I., Cohen D., Dreyer E. and Bogeat-Triboulot MB. (2010)** Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism. *BMC Biology*, 8, 18.
- Meyer RF. and Boyer JS. (1981)** Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials. *Planta*, 151, 482-489.
- Micheli F. (2001)** Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6, 414-419.
- Mikosch M., Hurst AC., Hertel B. and Homann U. (2006)** Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiology*, 142, 923-930.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M. and Kakimoto T. (2004)** Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37, 128–138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G. and Kakimoto T. (2006)** Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 16598–165603.
- Moulia B. (2005)** Biomécanique adaptative de la croissance et du déploiement spatial des végétaux. *Habilitation à Diriger des Recherches, Université Blaise Pascal*, 1-96.
- Nagel KA., Schurr U. and Walter A. (2006)** Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. *Plant Cell and Environment*, 29, 1936–1945.
- Niemietz CM. and Tyerman SD. (1997)** Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiology*, 115, 561–567.
- Nozue K., Covington MF., Duek PD., Lorrain S., Fankhauser C., Harmer SL. and Maloof JN. (2007)** Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature*, 448, 358–361.
- N’Guyen A. and Lamant A. (1989)** Variation in growth and osmotic regulation of roots water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree physiology*, 5, 123-133.

- O'Brien M., Bertrand C. and Matton DP. (2002)** Characterization of a fertilization-induced and developmentally regulated plasma-membrane aquaporin expressed in reproductive tissues, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Planta*, 215, 485-493.
- Olbrich A., Hillmer S., Hinz G., Oliviusson P. and Robinson DG. (2007)** Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiology*, 145, 1383-1394.
- Okubo-Kurihara E., Sano T., Higaki T., Kutsuna N. and Hasezawa S. (2009)** Acceleration of vacuolar regeneration and cell growth by overexpression of an aquaporin NtTIP1;1 in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*, 50, 151-160.
- Oparka KJ. and Turgeon R. (1999)** Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*, 11, 739-750.
- Otegui MS., Verbrugghe KJ. and Skop AR. (2005)** Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. *Trends in Cell Biology*, 15, 404-413.
- Otto B. and Kaldenhoff R. (2000)** Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 211, 167-172.
- Ozga JA., van Huizen R. and Reinecke DM. (2002)** Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiology*, 128, 1379-1389.
- Pagès L. (1995)** Growth patterns of the lateral roots of young oak (*Quercus robur*) tree seedlings Relationship with apical diameter. *New Phytologist*, 130, 503-509.
- Pahlavanian AM. and Silk WK. (1988)** Effect of temperature on spatial and temporal aspects of growth in the primary maize root. *Plant Physiology*, 87, 529-532.
- Paredez AR., Somerville CR. and Ehrhardt DW. (2006)** Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312, 1491-1495.
- Paciorek T., Zazimalová E., Ruthardt N., Petrásek J., Stierhof YD., Kleine-Vehn J., Morris DA., Emans N., Jürgens G., Geldner N. and Friml J. (2005)** Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435, 1251-1256.
- Peng Y., Lin W., Cai W. and 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.
- Perrot-Rechenmann C. (2010)** Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1-15.
- Phillips AL. and Huttly AK. (1994)** Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel, γ -TIP, is increased by GA3. *Plant Molecular Biology*, 24, 603-615.

- Pien S., Wyrzykowska J., McQueen-Mason S., Smart C. and Fleming A. (2001)** Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11812-11817.
- Prak S., Hem S., Boudet J., Viennois G., Sommerer N., Rossignol M., Maurel C. and Santoni V. (2008)** Multiple phosphorylations in the Cterminal tail of plant plasma membrane aquaporins. Role in sub-cellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7, 1019-1030.
- Preston GM., Carroll TP., Guggino WB. and Agre P. (1992)** Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256, 385-387.
- Pritchard J., Hetherington PR., Fry SC. and Tomos AD. (1993)** Xyloglucan Endotransglycosylase Activity, Microfibril Orientation and the Profiles of Cell Wall Properties Along Growing Regions of Maize Roots. *Journal of Experimental Botany*, 44, 1281-1289.
- Pritchard J. (1996)** Aphid stylectomy reveals an osmotic step between sieve tube and cortical cells in barley roots. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1519–1524.
- Pritchard J., Fricke W. and Yomos D. (1996)** Turgor-regulation during extension growth and osmotic stress of maize roots: an example of single-cell mapping. *Plant and Soil*, 187, 11–21.
- Pritchard J., Winch S. and Gould N. (2000)** Phloem water relations and root growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 539-548.
- Rahman A., Bannigan A., Sulaman W., Pechter P., Blancaflor EB. and Baskin TI. (2007)** Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant Journal*, 50, 514-528.
- Reisen D., Leborgne-Castel N., Ozalp C., Chaumont F. and Marty F. (2003)** Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with GFP in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Molecular Biology*, 52, 387-400.
- Richards OW. and Kavanagh AJ. (1943)** The analysis of the relative growth gradients and changing form of growing organisms: illustrated by the tobacco leaf. *American Naturalist*, 77, 385-399.
- Richard C., Granier C., Inzé D. and De Veylder L. (2001)** Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1625-1633.
- Ridley BL., O'Neill MA. and Mohnen D. (2001)** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
- Rivers RL., Dean RM., Chandy G., Hall JE., Roberts DM. and Zeidel ML. (1997)** Functional analysis of Nodulin 26, an aquaporin in soybean root symbiosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16256-16261.

- Röckel N., Wolf S., Kost B., Rausch T. and Greiner S. (2008)** Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant Journal*, 53, 133–143.
- Rodríguez AA., Grunberg KA. and Taleisnik EL. (2002)** Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology*, 129, 1627-1632.
- Rose JK., Braam J., Fry SC. and Nishitani K. (2002)** The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology*, 43, 1421-1435.
- Rost T. and Baum S. (1988)** On the correlation of primary root length, meristem size and protoxylem tracheary element position in pea seedlings. *American Journal of Botany*, 75, 414-424.
- Ruzicka K., Simaskova M., Duclercq J., Petrasek J., Zazimalova E., Simon S., Friml J., Van Montagu MCE. and Benková E. (2009)** Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 4284–4289.
- Rymen B., Fiorani F., Kartal F., Vandepoele K., Inzé D. and Beemster GT. (2007)** Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology*, 143, 1429-1438.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P. and Scheres B. (1999)** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, 99, 463–472.
- von Sachs JV. (1882)** *Vorlesungen über Pflanzenphysiologie (Lectures on the Physiology of Plants)*. New York, USA: Oxford.
- Sade N., Vinocur BJ., Diber A., Shatil A., Ronen G., Nissan H., Wallach R., Karchi H. and Moshelion M. (2008)** Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist*, 181, 651-661.
- Saito C., Ueda T., Abe H., Wada Y., Kuroiwa T., Hisada A., Furuya M. and Nakano A. (2002)** A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 29, 245–255.
- Sato K. and Nakano A. (2007)** Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters*, 581, 2076-2082.
- Schmundt D., Stitt M., Jähne B. and Schurr U. (1998)** Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *Plant Journal*, 16, 505–514.
- Schünmann PH. and Ougham HJ. (1996)** Identification of three cDNA clones expressed in the leaf extension zone and with altered patterns of expression in the slender mutant of barley:

a tonoplast intrinsic protein, a putative structural protein and protochlorophyllide oxidoreductase. *Plant Molecular Biology*, 31, 529-537.

Schüssler MD., Alexandersson E., Bienert GP., Kichey T., Laursen KH., Johanson U., Kjellbom P., Schjoerring JK. and Jahn TP. (2008). The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 56, 756-767.

Sieben C., Mikosch M., Brandizzi F. and Homann U. (2008) Interaction of the K⁺-channel KAT1 with the coat protein complex II coat component Sec24 depends on a di-acidic endoplasmic reticulum export motif. *Plant Journal*, 56, 997-1006.

Schurr U. and Schulze ED. (1995) The concentration of xylem sap constituents in root exudate and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell and Environment*, 18, 409-420.

Secchi F., MacIver B., Zeidel ML. and Zwieniecki MA. (2009) Functional analysis of putative genes encoding the PIP2 water channel subfamily in *Populus trichocarpa*. *Tree Physiology*, 29, 1467-1477.

Secchi F. and 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. *Plant Cell and Environment*, 33, 1285-1297.

Sharp RE. and Davis WJ. (1979) Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta*, 174, 43-49.

Sharp RE., Silk WK. and Hsiao TC. (1988) Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial-distribution of expansive growth. *Plant Physiology*, 87, 50-57.

Sharp RE., Hsiao TC. and Silk WK. (1990) Growth of the maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology*, 93, 1337-1346.

Shimomura S. (2006) Identification of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Plasma Membrane Protein Interacting with the C-terminus of Auxin-binding Protein 1: A Photoaffinity Crosslinking Study . *Plant Molecular Biology*, 60, 663-677.

Silk WK. and Erickson RO. (1979) Kinematics of Plant Growth. *Journal of Theoretical Biology*, 76, 481-501.

Silk WK. and Wagner KK. (1980) Growth-sustaining Water Potential Distributions in the Primary Corn Root: A NONCOMPARTMENTED CONTINUUM MODEL. *Plant Physiology*, 66, 859-863.

Silk WK. (1984) Quantitative descriptions of development. *Annual Review of Plant Biology*, 35, 479-518.

Silk WK., Walter RC. and Labavitch J. (1984) Uronide Deposition Rates in the Primary Root of *Zea mays*. *Plant Physiology*, 74, 721-726.

- Silk WK., Hsiao TC., Diederhoben U. and Matson C. (1986)** Spatial distributions of potassium, solutes and their deposition rates in the growth zone of the primary corn root. *Plant Physiology*, 82, 853–858.
- Silk WK. (1992)** Steady form from changing cells. *International Journal of Plant Science*, 153, S49-S58.
- Silk WK. (2006)** Moving with the flow: what transport laws reveal about cell division and expansion. *Journal of Plant Research*, 119, 23-29.
- Skirycz A., De Bodt S., Obata T., De Clercq I., Claeys H., De Rycke R., Andriankaja M., Van Aken O., Van Breusegem F., Fernie AR. and Inzé D. (2010)** Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiology*, 152, 226-244.
- Skirycz A. and Inzé D (2010)** More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 197-203.
- Soto G., Allewa K., Mazzella MA., Amodeo G. and Muschietti JP. (2008)** AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Letters*, 582, 4077-4082.
- Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno MA., Busch W., Van Norman JM., Vernoux T., Brady SM., Dewitte W., Murray JA. and Benfey PN. (2010)** Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature*, 466, 128-132.
- Spollen WG. and Sharp RE. (1991)** Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. *Plant Physiology*, 96, 438-443.
- Spollen WG., Tao W., Valliyodan B., Chen K., Hejlek LG., Kim JJ., Lenoble ME., Zhu J., Bohnert HJ., Henderson D., Schachtman DP., Davis GE., Springer GK., Sharp RE. and Nguyen HT. (2008)** Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. *BMC Plant Biology*, 8, 32.
- Stadler R. and Sauer N. (1996)** The Arabidopsis thaliana AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta*, 109, 299–306.
- Stadler R., Wright KM., Lauterbach C., Amon G., Gahrtz M., Feuerstein A., Oparka KJ. and Sauer N. (2005)** Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant Journal*, 41, 319-331.
- Stern H. and Hotta Y. (1973)** Biochemical control of meiosis. *Annual Review of Genetics*, 7, 37-66.
- Suga S., Komatsu S. and Maeshima M. (2002)** Aquaporin isoforms responsive to salt and water tresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 43, 1229–1237.

Suga S. and Maeshima M. (2004) Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant and Cell Physiology*, 45, 823-830.

Supatto W., Debarre D., Moulia B., Brouzes E., Martin JL., Farge E. and Beaurepaire E. (2005) In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 1047–1052.

Swarup R., Kramer EM., Perry P., Knox K., Leyser HMO., Haseloff J., Beemster GT., Bhalerao R. and Bennett MJ. (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology*, 7, 1057–1065.

Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wiren N. and Fujiwara T. (2006) *The Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, 18, 1498-1509.

Tian Q., Uhlir NJ. and Reed JW. (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 14, 301–319.

Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Tajkhorshid E., Neutze R. and Kjellbom P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439, 688-694.

Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu DT., Bligny R. and Maurel C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 425, 393–397.

Tuskan GA., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R., Bhalerao P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen GL., Cooper D., Coutinho PM., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Déjardin A., dePamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leplé JC., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson DR., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai CJ., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y. and Rokhsar D. (2006) The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 1596-1604.

Triboulot MB. (1996) Effets du stress osmotique et de la carence en potassium sur la croissance racinaire du pin maritime. Etude biomécanique du grandissement cellulaire. *Thèse de l'Université Henri Poincaré – Nancy I*, 1-85.

- Truernit E. and Sauer N. (1995)** The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H₂O symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, 196, 564–570.
- Truesdell C. (1977)** A First Course in Rational Continuum Mechanics. *New York: Academic*.
- Tyerman SD., Niemitz CM. and Bramley H. (2002)** Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment*, 25, 173-194.
- Umeda M., Shimotohno A. and Yamaguchi M. (2005)** Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in Plants. *Plant and Cell Physiology*, 46, 1437-1442.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. and Speleman F. (2002)** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, RESEARCH0034.
- Verdoucq L., Grondin A. and Maurel C. (2008)** Structure–function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochemical Journal*, 415, 409-416.
- Volkov V., Hachez C., Moshelion M., Draye X., Chaumont F. and Fricke W. (2007)** Water permeability differs between growing and non-growing barley leaf tissues. *Journal of Experimental Botany*, 58, 377-390.
- Walter A., Spies H., Terjung S., Kuesters R., Kirchgeßner N. and Schurr U. (2002)** Spatio-temporal dynamics of expansion growth in roots: automatic quantification of diurnal course and temperature response by digital image sequence processing. *Journal of Experimental Botany*, 53, 689–698.
- Walter A., Feil R. and Schurr U. (2003)** Expansion dynamics, metabolite composition and substance transfer of the primary root growth zone of *Zea mays* L. grown in different external nutrient availabilities. *Plant Cell and Environment*, 26, 1451–1466.
- Walter A. and Schurr U. (2005)** Dynamics of leaf and root growth—endogenous control versus environmental impact. *Annals of Botany*, 95, 891–900.
- Walter A., Christ MM., Barron-Gafford GA., Grieve KA., Murthy R. and Rascher U. (2005)** The effect of elevated CO₂ on diel leaf growth cycle, leaf carbohydrate content and canopy growth performance of *Populus deltoïdes*. *Global Change Biology*, 11, 1207–1219.
- Walter A., Silk WK. and Schurr U. (2009)** Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 279-304.
- Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler AJ., Crosby WL. and Fowke LC. (1998)** ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal*, 15, 501-510.

- Wang H., Zhou Y., Bird DA. and Fowke LC. (2008)** Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Microscopy*, 231, 234-246.
- van Der Weele CM., Jiang HS., Palaniappan KK., Ivanov VB., Palaniappan K. and Baskin TI. (2003)** A new algorithm for computational image analysis of deformable motion at high spatial and temporal resolution applied to root growth. Roughly uniform elongation in the meristem and also, after an abrupt acceleration, in the elongation zone. *Plant Physiology*, 132, 1138–1148.
- Wei W., Alexandersson E., Goldack D., Miller AJ., Kjellbom PO. and Fricke W. (2007)** HvPIP1;6, a Barley (*Hordeum vulgare* L.) Plasma Membrane Water Channel Particularly Expressed in Growing Compared with Non-Growing Leaf Tissues. *Plant and Cell Physiology*, 48, 1132–1147.
- Weijers D., Schlereth A., Ehrismann JS., Schwank G., Kientz M. and Jurgens G. (2006)** Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis. *Developmental Cell*, 10, 265–270.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H. and Schmulling T. (2003)** Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, 15, 2532–2550.
- West G., Inzé D. and Beemster GT. (2004)** Cell Cycle Modulation in the Response of the Primary Root of Arabidopsis to Salt Stress. *Plant Physiology*, 135, 1050-1058.
- Westgate ME. and Boyer JS (1985)** Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta*, 164, 540–549.
- Wiegiers BS., Cheer AY. and Silk WK. (2009)** Modeling the hydraulics of root growth in three dimensions with phloem water sources. *Plant Physiology*, 150, 2092-2103.
- Wiese A., Christ MM., Virnich O., Schurr U. and Walter A. (2007)** Spatio-temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist*, 174, 752–761.
- Willats WG., McCartney L., Mackie W. and Knox JP. (2001)** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9–27.
- Wu Y., Sharp RE., Durachko DM. and Cosgrove DJ. (1996)** Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology*, 111, 765-772.
- Wu Y., Thorne ET., Sharp RE. and Cosgrove DJ. (2001)** Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiology*, 126, 1471-1479.
- Xu J. and Scheres B. (2005)** Cell polarity: ROPing the ends together. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 613-618.

Zardoya R. (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein. *Biology of the Cell*, 97, 397-414.

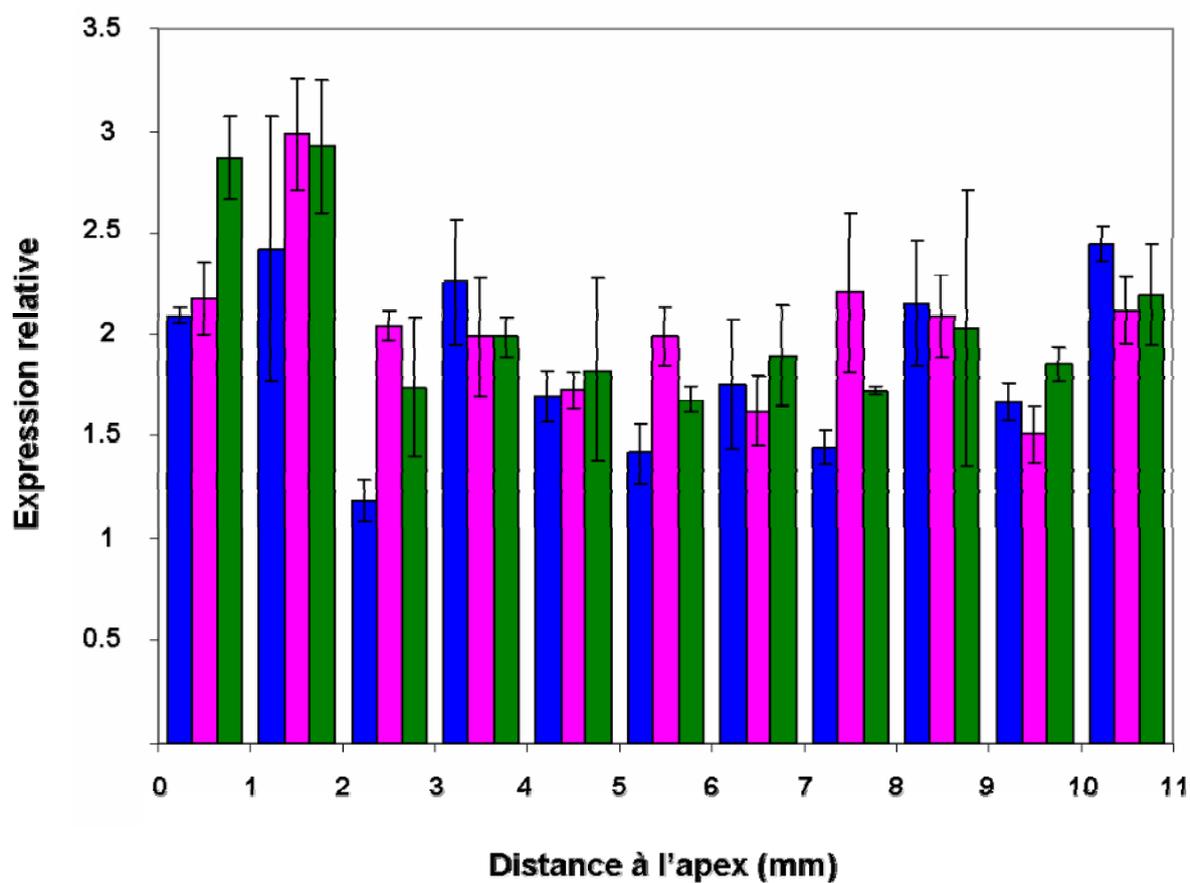
Zelazny E., Borst JW., Muylaert M., Batoko H., Hemminga MA. and Chaumont F. (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 12359–12364.

Zelazny E., Micielica U., Borst JW., Hemminga MA. and Chaumont F (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant Journal*, 57, 346-355.

Zhang K., Letham DS. and John PC. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta*, 200, 2-12.

Zhu J., Alvarez S., Marsh EL., Lenoble ME., Cho IJ., Sivaguru M., Chen S., Nguyen HT., Wu Y., Schachtman DP. and Sharp RE. (2007) Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit. *Plant Physiology*, 145, 1533-1548.

Annexes



Annexe 1 : Niveau d'expression de *PtADH* dans chaque segment le long de l'apex dans les trois états de croissance. L'expression est normalisée par rapport à *PtTIP1;1*. Bleu = témoin, Rose = stress osmotique modéré, Vert = Stress osmotique fort. Moyenne \pm e.s., N=3.

	Nombre de répétitions			Normalité : test de Shapiro-Wilk						Test de Welch (t-test sans nécessité d'égalité des variances)			
	Témoin	Stress 100	Stress 200	Témoin		Stress 100		stress 200		Témoin vs Stress 100		Témoin vs Stress 200	
				P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf
VC0	6	6	6	0,121	1	0,389	1	0,234	1	0,306	1	0,491	1
VC3	6	6	6	0,712	1	0,403	1	0,560	1	0,003	0,084	2,70E-05	0,001
VC6	6	6	6	0,855	1	0,482	1	0,862	1	0,000	0,013	7,28E-08	0,000
VC9	6	6	6	0,308	1	0,031	0,892	0,803	1	0,000	0,000	3,42E-09	0,000
VC12	6	6	6	0,332	1	0,144	1	0,440	1	0,000	0,002	2,49E-12	0,000
VC15	6	6	6	0,182	1	0,995	1	0,047	1	0,000	0,000	4,31E-13	0,000
VC18	6	6	6	0,803	1	0,330	1	0,608	1	0,000	0,000	2,75E-11	0,000
VC21	6	6	6	0,294	1	0,079	1	0,270	1	0,001	0,020	2,64E-12	0,000
VC24	6	6	6	0,424	1	0,269	1	0,486	1	0,000	0,000	6,53E-08	0,000
VC27	6	6	6	0,204	1	0,230	1	0,561	1	0,000	0,001	4,60E-09	0,000
VC30	6	6	6	0,682	1	0,175	1	0,098	1	0,000	0,002	3,23E-09	0,000
VC33	6	6	6	0,979	1	0,723	1	0,394	1	0,117	1	2,74E-09	0,000
VC36	6	6	6	0,231	1	0,909	1	0,092	1	0,000	0,006	5,31E-08	0,000
VC39	6	6	6	0,439	1	0,054	1	0,330	1	0,002	0,050	2,87E-06	0,000
VC42	6	6	6	0,427	1	0,219	1	0,743	1	0,061	1	4,64E-13	0,000
VC45	6	6	6	0,453	1	0,777	1	0,658	1	0,099	1	3,33E-10	0,000
VC48	6	6	6	0,148	1	0,632	1	0,507	1	0,127	1	1,63E-08	0,000
VC51	6	6	6	0,386	1	0,355	1	0,062	1	0,577	1	1,17E-11	0,000
VC54	6	6	6	0,661	1	0,196	1	0,152	1	0,599	1	4,53E-11	0,000
VC57	6	6	6	0,687	1	0,288	1	0,554	1	0,052	1	5,94E-07	0,000
VC60	6	6	6	0,766	1	0,365	1	0,004	0,115	0,012	0,351	7,13E-09	0,000
VC63	6	6	6	0,924	1	0,264	1	0,568	1	0,002	0,052	8,38E-09	0,000
VC66	6	6	6	0,978	1	0,991	1	0,022	0,634	0,000	0,002	8,48E-11	0,000
VC69	6	6	6	0,495	1	0,173	1	0,963	1	0,000	0,003	7,04E-11	0,000
VC72	6	6	6	0,119	1	0,013	0,381	0,771	1	0,000	0,006	4,22E-12	0,000
VC75	6	6	6	0,098	1	0,090	1	0,897	1	0,000	0,003	6,45E-13	0,000
VC78	4	5	5	0,972	1	0,763	1	0,748	1	0,000	0,012	8,22E-07	0,000
VC81	3	3	3	0,301	1	0,510	1	0,411	1	0,010	0,287	1,91E-06	0,000
VC84	3	3	3	0,785	1	0,297	1	0,175	1	0,019	0,549	2,23E-05	0,001

Résultats des tests statistiques : impact des 2 niveaux de stress sur de la vitesse de croissance. VCn correspond à la vitesse de croissance au temps t « n heures après le début de l'expérience ». La normalité de la distribution des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (avec alpha=5%). Une recherche des faux positifs a été effectuée avec le test de Bonferonni (p-value Bonf., alpha= 5%). L'homoscédasticité n'a pas été vérifiée dans certaines comparaisons, le test de Welch a été utilisé pour tester l'impact des déficits hydriques sur la vitesse de croissance. Les valeurs en rouge correspondent aux valeurs significatives (P < 0.05).

	Nombre de répétitions	Normalité : test de Shapiro-Wilk						Test de Welch (t-test sans nécessité d'égalité des variances)			
		Témoïn		Stress 100		stress 200		Témoïn vs Stress 100		Témoïn vs Stress 200	
		P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf
V.0.5mm	6	0,205	1	0,943	1	0,473	1	0,520	1	0,849	1
V.0.75mm	6	0,427	1	0,858	1	0,784	1	0,258	1	0,936	1
V.1mm	6	0,957	1	0,898	1	0,492	1	0,688	1	0,837	1
V.1.25mm	6	0,197	1	0,816	1	0,562	1	0,891	1	0,808	1
V.1.5mm	6	0,380	1	0,799	1	0,653	1	0,780	1	0,844	1
V.1.75mm	6	0,494	1	0,485	1	0,689	1	0,792	1	0,881	1
V.2mm	6	0,478	1	0,675	1	0,629	1	0,973	1	0,832	1
V.2.25mm	6	0,622	1	0,369	1	0,696	1	0,956	1	0,819	1
V.2.5mm	6	0,305	1	0,436	1	0,680	1	0,554	1	0,744	1
V.2.75mm	6	0,145	1	0,308	1	0,677	1	0,396	1	0,651	1
V.3mm	6	0,115	1	0,150	1	0,664	1	0,583	1	0,657	1
V.3.25mm	6	0,108	1	0,314	1	0,971	1	0,245	1	0,632	1
V.3.5mm	6	0,160	1	0,153	1	0,969	1	0,032	1	0,346	1
V3.75mm	6	0,230	1	0,090	1	0,970	1	0,041	1	0,351	1
V.4mm	6	0,288	1	0,105	1	0,520	1	0,036	1	0,144	1
V.4.25mm	6	0,249	1	0,096	1	0,517	1	0,025	1	0,004	0,163
V.4.5mm	6	0,782	1	0,145	1	0,518	1	0,007	0,306	0,000	0,004
V.4.75mm	6	0,896	1	0,159	1	0,515	1	0,015	0,687	0,000	0,001
V.5mm	6	0,189	1	0,147	1	0,516	1	0,039	1	0,000	0,000
V.5.25mm	6	0,177	1	0,402	1	0,515	1	0,098	1	0,000	0,000
V.5.5mm	6	0,195	1	0,973	1	0,519	1	0,634	1	0,000	0,000
V.5.75mm	6	0,226	1	0,995	1	0,518	1	0,313	1	0,000	0,000
V.6mm	6	0,228	1	0,872	1	0,521	1	0,976	1	0,000	0,000
V.6.25mm	6	0,222	1	1,000	1	0,521	1	0,540	1	0,000	0,000
V.6.5mm	6	0,214	1	0,768	1	0,521	1	0,773	1	0,000	0,000
V.6.75mm	6	0,210	1	1,000	1	0,521	1	0,892	1	0,000	0,000
V.7mm	6	0,218	1	1,000	1	0,521	1	0,455	1	0,000	0,000
V.7.25mm	6	0,252	1	0,767	1	0,521	1	0,216	1	0,000	0,000
V.7.5mm	6	0,223	1	0,754	1	0,521	1	0,266	1	0,000	0,000
V.7.75mm	6	0,217	1	0,906	1	0,521	1	0,264	1	0,000	0,000
V.8mm	6	0,279	1	0,864	1	0,521	1	0,087	1	0,000	0,000
V.8.25mm	6	0,273	1	0,377	1	0,521	1	0,030	1	0,000	0,000
V.8.5mm	6	0,252	1	0,313	1	0,521	1	0,031	1	0,000	0,000
V.8.75mm	6	0,595	1	0,953	1	0,521	1	0,008	0,373	0,000	0,000
V.9mm	6	0,157	1	0,913	1	0,521	1	0,004	0,186	0,000	0,000
V.9.25mm	6	0,184	1	0,775	1	0,521	1	0,002	0,083	0,000	0,000
V.9.5mm	6	0,204	1	0,974	1	0,521	1	0,001	0,061	0,000	0,000
V.9.75mm	6	0,204	1	0,960	1	0,521	1	0,001	0,047	0,000	0,000
V.10mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000
V.10.25mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000
V.10.5mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000
V.10.75mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000
V.11mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000
V.11.25mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000
V.11.5mm	6	0,204	1	0,865	1	0,521	1	0,001	0,031	0,000	0,000

Résultats des tests statistiques : impact des 2 niveaux de stress sur de la vitesse de croissance. V.XXmm correspond à la vélocité à la position x en mm. La normalité de la distribution des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (avec $\alpha=5\%$). Une recherche des faux positifs a été effectuée avec le test de Bonferonni (p-value Bonf., $\alpha=5\%$). L'homoscédasticité n'a pas été vérifiée dans certaines comparaisons, le test de Welsh a été utilisé pour tester l'impact des déficits hydriques sur la vitesse de croissance. Les valeurs en rouge correspondent aux valeurs significatives ($P < 0.05$).

		Normalité : test de Shapiro-Wilk						Test de Welch (t-test sans nécessité d'égalité des variances)			
Nombre de répétitions		Témoin		Stress 100		stress 200		Témoin vs Stress 100		Témoin vs Stress 200	
mm	T/100/200	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf	P-value	P-value Bonf
R.0.5	6	0,725	1	0,875	1	0,628	1	0,531	1	8E-01	1
R.0.75	6	0,810	1	0,724	1	0,562	1	0,887	1	8E-01	1
R.1	6	0,944	1	0,595	1	0,700	1	0,973	1	8E-01	1
R.1.25	6	0,723	1	0,339	1	0,733	1	0,563	1	9E-01	1
R.1.5	6	0,337	1	0,388	1	0,672	1	0,751	1	9E-01	1
R.1.75	6	0,811	1	0,178	1	0,663	1	0,823	1	8E-01	1
R.2	6	0,414	1	0,181	1	0,696	1	0,406	1	6E-01	1
R.2.25	6	0,571	1	0,188	1	0,671	1	0,013	0,483	2E-01	1
R.2.5	6	0,906	1	0,147	1	0,629	1	0,025	0,966	3E-01	1
R.2.75	6	0,419	1	0,165	1	0,972	1	0,021	0,811	4E-01	1
R.3	6	0,707	1	0,086	1	0,864	1	0,002	0,073	1E-01	1
R.3.25	6	0,686	1	0,173	1	0,836	1	0,002	0,061	3E-01	1
R.3.5	6	0,629	1	0,800	1	0,223	1	0,005	0,190	1E-01	1
R3.75	6	0,888	1	0,673	1	0,085	1	0,006	0,220	4E-03	0,149
R.4	6	0,779	1	0,798	1	0,053	1	0,003	0,102	3E-04	0,010
R.4.25	6	0,261	1	0,999	1	0,077	1	0,014	0,533	5E-06	0,000
R.4.5	6	0,636	1	1,000	1	0,526	1	0,443	1	2E-08	0,000
R.4.75	6	0,191	1	0,458	1	0,521	1	0,097	1	7E-09	0,000
R.5	6	0,277	1	0,634	1	0,515	1	0,000	0,007	3E-09	0,000
R.5.25	6	0,111	1	0,830	1	0,520	1	0,001	0,020	1E-09	0,000
R.5.5	6	0,688	1	0,955	1	0,522	1	0,000	0,003	1E-09	0,000
R.5.75	6	0,812	1	0,837	1	0,487	1	0,000	0,001	5E-09	0,000
R.6	6	0,193	1	0,791	1	0,539	1	0,002	0,062	5E-09	0,000
R.6.25	6	0,122	1	0,986	1	0,378	1	0,009	0,352	7E-09	0,000
R.6.5	6	0,131	1	0,911	1			0,081	1	6E-09	0,000
R.6.75	6	0,785	1	0,609	1			0,002	0,080	3E-08	0,000
R.7	6	0,651	1	0,694	1			0,000	0,014	1E-07	0,000
R.7.25	6	0,443	1	0,611	1			0,001	0,035	3E-07	0,000
R.7.5	6	0,599	1	0,759	1			0,000	0,003	2E-08	0,000
R.7.75	6	0,971	1	0,985	1			0,000	0,000	1E-08	0,000
R.8	6	0,360	1	0,938	1			0,000	0,002	2E-08	0,000
R.8.25	6	0,375	1	0,637	1			0,000	0,000	3E-07	0,000
R.8.5	6	0,496	1	0,513	1			0,000	0,001	1E-07	0,000
R.8.75	6	0,475	1	0,319	1			0,001	0,029	1E-07	0,000
R.9	6	0,017	0,637	0,140	1			0,000	0,003	1E-05	0,001
R.9.25	6	0,002	0,063	0,673	1			0,006	0,228	4E-03	0,165
R.9.5	6	0,170	1	0,447	1			0,002	0,085	3E-02	1
R.9.75	6	0,109	1	0,412	1			0,024	0,926	3E-02	1

Résultats des tests statistiques : impact des 2 niveaux de stress sur de la vitesse de croissance. R.XX correspond à la valeur de REGR à la position x en mm. La normalité de la distribution des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (avec alpha=5%). Une recherche des faux positifs a été effectuée avec le test de Bonferonni (p-value Bonf., alpha=5%). L'homoscédasticité n'étant pas vérifiée dans certaines comparaisons, le test de Welch a été utilisé pour tester l'impact des déficits hydriques sur la vitesse de croissance. Les valeurs en rouge correspondent aux valeurs significatives ($P < 0.05$).

Condition	Racine	plage de temps :	Vitesse de croissance moyenne (n=8 points)	pente (a)	Coefficient de détermination R ²	Fobs = CMreg/ Cmres	Ho = il n'y a pas de relation linéaire entre la vitesse et le temps de mesure		Conclusion, incrément relatif de vitesse en % (a/v _{moyen} *100)
							Fseuil 1,6 ,P=0,95= 5.99	Conclusion	
Témoin	O	54-75	1,36	0,0046	0,933	84,2	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		0,3
Témoin	I	57-78	1,41	0,0015	0,406	4,1	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Témoin	G	54-75	1,35	-0,0014	0,197	1,5	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Témoin	C	63-84	1,40	0,0000	0,000	0,0	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Témoin	E	63-84	1,41	0,0015	0,152	1,1	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Témoin	AG	63-84	1,38	0,0018	0,184	1,3	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress modéré	P	57-78	1,53	0,0054	0,515	6,4	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		0,4
Stress modéré	Q	57-78	1,49	0,0020	0,042	0,3	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress modéré	R	54-75	1,45	0,0062	0,838	31,0	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		0,4
Stress modéré	T	63-84	1,50	0,0009	0,726	15,9	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		0,1
Stress modéré	U	63-84	1,48	-0,0022	0,440	4,7	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress modéré	V	63-84	1,52	-0,0021	0,296	2,5	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress fort	Y	54-75	0,63	0,0013	0,123	0,8	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress fort	Z	54-75	0,63	-0,0007	0,041	0,3	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress fort	AB	57-78	0,64	0,0003	0,022	0,1	Fobs<Fseuil, Ho acceptée la pente est a priori nulle		
Stress fort	AE	63-84	0,61	-0,0058	0,780	21,3	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		-1,0
Stress fort	AD	63-84	0,58	0,0042	0,710	14,7	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		0,7
Stress fort	AF	63-84	0,55	0,0012	0,672	12,3	Fobs>Fseuil, Ho rejetée v=at+b (1)		0,2

Résultats des tests de stationnarité de la croissance. La régression linéaire vitesse de croissance et temps de mesure a été testée par analyse de variance (test de R², H0=il n'y a pas de relation linéaire entre les variables). Si F< Fcritique, on accepte H0, la pente est a priori nulle. Si F est > F de rejet, on rejette H0, la pente est significative. Dans ce cas, l'incrément relatif de la vitesse (le coefficient de variation) est alors calculé.

**Contrôle moléculaire de la croissance sous déficit hydrique:
Analyse cinématique et régulation de l'expression des aquaporines *TIP1*
dans l'apex de la racine du peuplier**

Résumé: Cette étude porte sur le contrôle moléculaire de l'expansion cellulaire dans l'apex de la racine du peuplier. L'étude a été focalisée sur la régulation de l'expression des aquaporines *TIP1s* sous deux niveaux de déficit hydrique. Un cadre conceptuel, combinant analyse de la densité de transcrits (PCR quantitative) à haute résolution spatiale et un formalisme de la mécanique des fluides, a été établi pour décrire la régulation de l'expression des gènes dans le temps et l'espace, le long d'apex. Deux états de croissance contrastés ont été étudiés : un où la croissance de l'apex de la racine est rétablie (après 3 jours de stress modéré, 80 mosmol kg⁻¹, 100 g L⁻¹ de polyéthylène glycol PEG à 3500 g mol⁻¹) et un où elle est réduite (après 3 jours de stress fort, 250 mosmol kg⁻¹, 200 g L⁻¹ de PEG). L'analyse cinématique a révélé une sensibilité différentielle de la vitesse d'allongement relatif (REGR) selon le niveau de stress et la position le long de l'apex. Au niveau moléculaire, nous montrons que lorsque la croissance est réduite, l'expression de la plupart des *TIP1s* est induite précocement dans le temps et l'espace, générant un décalage des pics de densité de transcrits dans les premiers millimètres de l'apex, zone où la croissance des cellules est maintenue. Ce décalage était accompagné, pour certaines *TIP1s*, d'une augmentation de la densité de transcrits. Cependant les niveaux d'induction/répression n'étaient jamais plus élevés que dans la condition témoin, soulignant qu'une forte densité de transcrits n'est pas forcément synonyme d'une forte induction de l'expression. En effet le temps d'induction, rarement pris en compte, a un impact fort sur l'accumulation des transcrits. Parmi les patrons de densité de transcrits, nous avons détecté que seul celui de *PtTIP1;4* coïncidait avec le profil de REGR quel que soit le traitement. De plus, la régulation de son expression apparaît suivre un patron temporel similaire dans tous les traitements, bien que la taille de la zone de croissance varie. Ces deux arguments (profil de densité et régulation d'expression) soutiennent l'hypothèse d'un lien entre cette aquaporine et l'expansion cellulaire. Focalisé sur la combinaison de deux processus dynamiques, l'expansion cellulaire et l'expression des gènes, ma thèse a mis en évidence que les conclusions tirées de l'analyse de ces processus sont influencées par la façon dont le temps, l'espace et l'âge sont considérés.

Mots clés : *croissance ; racine ; aquaporine ; régulation d'expression ; cinématique ; dérivée matérielle ; déficit hydrique ; peuplier*

**Molecular control of growth under water deficit:
Kinematic analysis and regulation of expression of *TIP1* aquaporins
in the poplar root apex**

Abstract: This study considers the molecular control of cell expansion in poplar root apex. The study was focused on the regulation of the *TIP1* aquaporins expression under two levels of water deficit. A conceptual framework combining transcript density analysis (quantitative PCR) at a high spatial resolution and a fluid mechanics formalism was established to describe the regulation of gene expression in time and space along the root apex. Two contrasting growth status were both studied: root growth rate is either restored (after three days of moderate stress, 80 mmol kg⁻¹, 100 g L⁻¹ polyethylene glycol PEG 3500 g mol⁻¹) or root growth rate is reduced (after 3 days of high stress, 250 mosmol kg⁻¹, 200 g L⁻¹ PEG). Kinematic analysis revealed a differential sensitivity of the relative elemental growth rate (REGR) according to the stress level and to the coordinate along the apex. At the molecular level, we showed that growth reduction was associated with a precocious induction of most *TIP1s* expression both in time and space, shifting the maximal densities of transcripts towards the first millimeters of the apex, where cell expansion was maintained. This shift came along for some *TIP1s* with a higher density level than in controls. Meanwhile the induction/repression levels were never stronger than in the control condition underlying that a high transcript density does not mean a high transcriptional induction. The duration of induction strongly impacts the transcript accumulation while being hardly taken into account. Among the profiles of transcript density, we detected that solely the *PtTIP1;4* profile overlapped the REGR profile, whatever the condition. Moreover, its expression regulation followed a similar temporal pattern in every treatment, even if the size of the growth zone varied. These two clues (density and expression regulation profiles) support the hypothesis of a functional link between this aquaporin and cell expansion. Focused on the combination of two dynamic processes, cell expansion and gene expression, my thesis showed that the conclusions issued from the analyses of these processes are influenced by the way time, space and age are considered.

Keywords : growth, root, aquaporin, gene expression regulation, kinematic, material derivative, water deficit, poplar