



HAL
open science

Division et élongation cellulaire dans l'apex de la racine : diversité de réponses au déficit hydrique

François Bizet

► To cite this version:

François Bizet. Division et élongation cellulaire dans l'apex de la racine : diversité de réponses au déficit hydrique. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0258 . tel-01751287

HAL Id: tel-01751287

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751287v1>

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>

- Université de Lorraine –
Collegium Sciences & Technologies

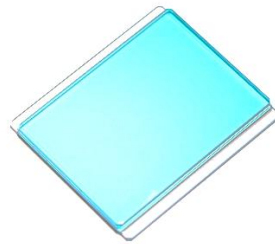
Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de :
Docteur en biologie végétale et forestière

Soutenue publiquement le 10/12/2014 par :

François BIZET

Division et élongation cellulaire dans l'apex de la racine : diversité de réponses au déficit hydrique



Directeur de thèse : André GRANIER

Encadrement :

Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT

Irène HUMMEL

Rapporteurs :

Olivier HAMANT

François TARDIEU

Directeur de recherche, Ecole Normale Supérieure de Lyon

Directeur de recherche, centre INRA de Montpellier

Examineurs :

Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT Chargée de recherche, centre INRA de Nancy

Lionel DUPUY

Chercheur, James Hutton Institute, site de Dundee

André GRANIER

Directeur de recherche, centre INRA de Nancy

Yves JOLIVET

Professeur, Université de Lorraine

Bruno MOULIA

Directeur de recherche, centre INRA de Clermont-Ferrand



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



INRA
SCIENCE & IMPACT



The James
Hutton
Institute



agreenium



arbre



Université de Lorraine, UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières, BP 239, F-54506 Vandœuvre, France

INRA, UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières, F-25420 Champenoux, France

James Hutton Institute, Dundee, DD2 5DA, UK

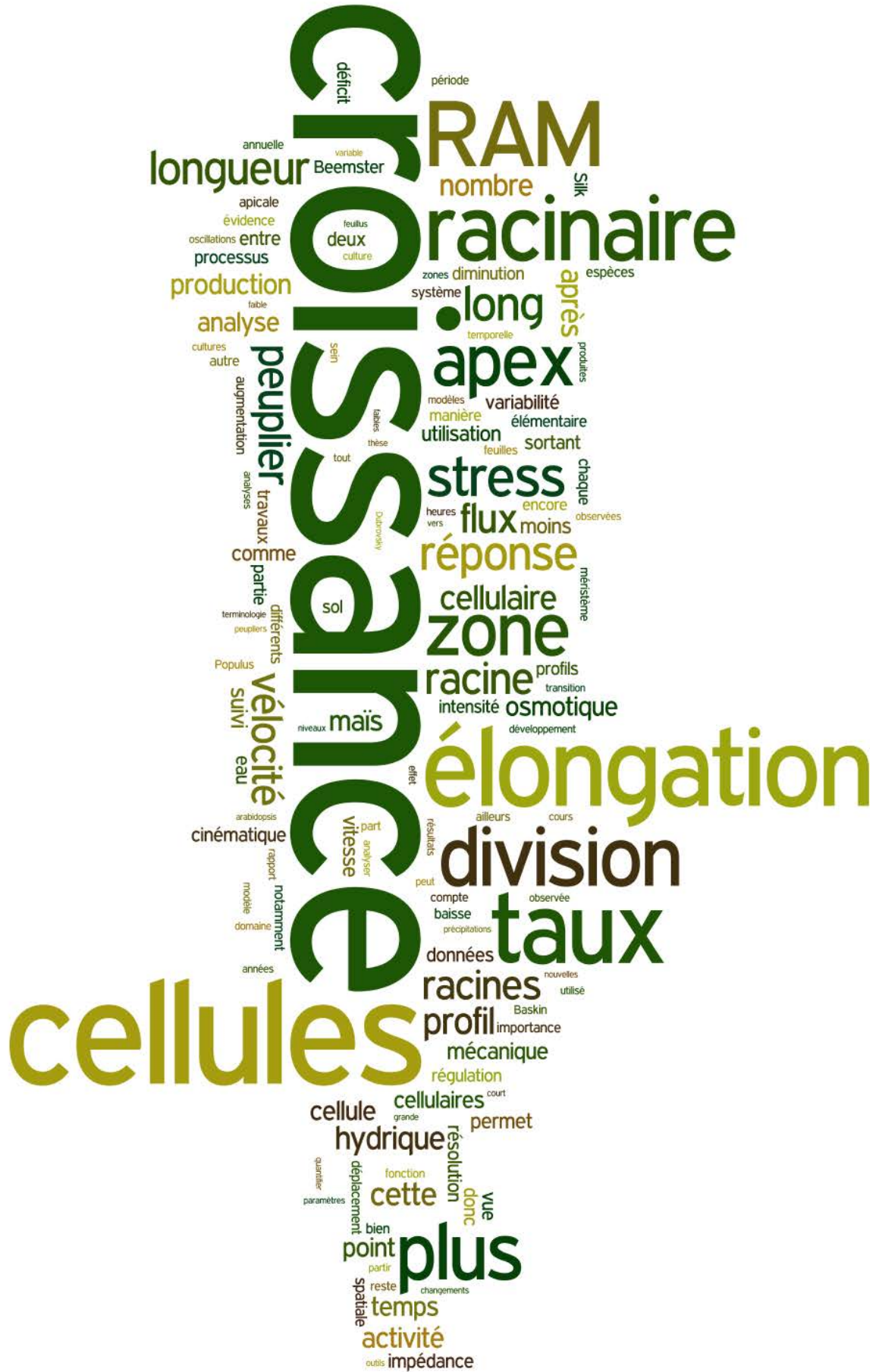


Table des matières

TABLE DES MATIERES	2
REMERCIEMENTS	4
AVANT-PROPOS	5
INTRODUCTION	7
I. LE PEUPLIER : UNE ESPECE MODELE	7
II. DEFICIT HYDRIQUE ET PRODUCTIVITE	9
III. ANALYSE DE LA CROISSANCE RACINAIRE VIA LA CINEMATIQUE	13
IV. DIVISION CELLULAIRE ET PRODUCTION DE CELLULES	16
V. IMPACT D'UN STRESS SUR LA CROISSANCE RACINAIRE	19
OBJECTIFS	22
MATERIEL ET METHODES	25
I. CONDITIONS DE CULTURE	25
A. <i>Milieu de culture</i>	25
B. <i>Préparation des boutures et mise en culture</i>	26
C. <i>Stockage des boutures</i>	27
II. SUIVI DE CROISSANCE SOUS INFRAROUGE	28
A. <i>Prise de vue sous infrarouge</i>	28
B. <i>Dispositif expérimental de phénotypage de la croissance</i>	29
C. <i>Application du stress osmotique</i>	31
III. PRETRAITEMENT DES IMAGES ET ANALYSE DE LA CROISSANCE	32
IV. AJUSTEMENT DES PROFILS DE VELOCITE ET OBTENTION DES INDICATEURS DE CROISSANCE	33
V. PHENOTYPAGE DE LA CROISSANCE EN 3 DIMENSIONS	35
VI. OBTENTION DES PROFILS DE LONGUEUR DE CELLULES	37
A. <i>Inclusion des apex racinaires</i>	37
B. <i>Mesures de la longueur des cellules</i>	38
RESULTATS ET DISCUSSION	40
I. SPECIFICATION EULERIENNE DE LA CROISSANCE	40
A. <i>Variations inter-individus de la croissance en condition témoin</i>	40
B. <i>Covariations entre indicateurs de croissance</i>	41
C. <i>Contributions des croissances cytoplasmique et vacuolaire</i>	42
D. <i>Longueur et Activité du RAM</i>	44
1. <i>Mesure de la longueur du RAM à partir de la longueur des cellules</i>	44
2. <i>Activité du RAM</i>	46
E. <i>Impact du stress osmotique</i>	50
1. <i>Impact sur les profils de croissance</i>	50
2. <i>Impact sur le RAM et son activité</i>	56
II. NOUVELLES METHODES DE MESURE DE LA LONGUEUR DU MERISTEME APICAL RACINAIRE	57
A. <i>Indice de vacuolisation</i>	57
B. <i>Apport de l'infrarouge</i>	58
C. <i>Position de la limite tige-orientée au sein du domaine de transition</i>	61

III.	SPECIFICATION LAGRANGIENNE DE LA CROISSANCE.....	63
A.	<i>Oscillations de croissance</i>	63
B.	<i>Trajectoires de croissance</i>	64
C.	<i>Réponse au stress osmotique</i>	67
IV.	REPONSE DE L'APEX RACINAIRE A LA RENCONTRE D'UN OBSTACLE	69
A.	<i>Elaboration d'un obstacle jouant le rôle de capteur pour mesurer la force générée par la racine en croissance</i>	69
B.	<i>Cinétique de la rencontre avec l'obstacle</i>	71
C.	<i>Module d'élasticité de l'apex racinaire</i>	72
D.	<i>Force critique de flambement de la racine en croissance</i>	73
1.	Racine non contrainte	73
2.	Racine contrainte	73
E.	<i>Cinétique de la croissance d'un apex rencontrant un obstacle</i>	75
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	79
	Vers le phénotypage de la croissance racinaire à haute résolution spatio-temporelle	79
	Variabilité de la croissance racinaire	80
	Implication du flux de cellules dans la croissance de la racine	81
	Inconstance du taux de division.....	81
	Réponse à une impédance mécanique	82
	RÉFÉRENCES	83
	ANNEXES.....	90
I.	CONFERENCES ET PRESENTATIONS	90
II.	MESURE <i>IN VIVO</i> DE LA LONGUEUR ET DE L'ACTIVITE DU MERISTEME APICAL RACINAIRE GRACE A L'INFRAROUGE. (ARTICLE DE RECHERCHE 1).....	94
III.	PLASTICITE DE LA CROISSANCE DES FEUILLES DE PEUPLIER AU DEFICIT HYDRIQUE. (ARTICLE DE RECHERCHE 2)	95
IV.	CURSUS AGREENIUM	96
V.	CHARGE D'ENSEIGNEMENT A L'UNIVERSITE DE LORRAINE	97
VI.	FORMATIONS SUIVIES.....	97

Remerciements

Une page. C'est tout ce que je me suis accordé pour les remerciements. Je serais donc aussi concis que possible et je demande aux personnes concernées de ne pas m'en tenir rigueur. En l'occurrence, la pensée dépasse les mots. En plus je serais gêné d'écrire ce que je pense vraiment :-)) alors que je vais côtoyer la plupart d'entre vous encore un petit paquet de semaines. Pour les multiples raisons qui suivent, je tiens donc à remercier chaleureusement les personnes/organismes suivants :

Les **membres du jury**, rapporteurs et examinateurs, pour le regard critique qu'ils porteront sur ces travaux.

André, pour avoir accepté de signer en bas de la page lors de mon arrivée et avoir gardé un œil bienveillant sur cette thèse.

Béa et Irène, pour votre complémentarité et votre investissement dans l'encadrement de cette thèse. Un (très !) grand merci pour toutes les opportunités que vous m'avez offertes et la bonne ambiance que vous générez. Je pourrais honnêtement écrire encore une page sur votre duo (et sur chacune) mais je vais éviter parce que je sais que vous savez.

Glyn, for your trust when we started discussing about a collaboration. Thanks also for your kindness and your helpful advices all along this common scientific project (not yet finished).

Lionel, pour ta participation et ton aide active sur l'ensemble des travaux réalisés à Dundee. Merci aussi pour tous ces moments conviviaux passés hors boulot. Ça fait du bien parfois d'avoir un regard externe.

Bruno, pour tes visites ponctuelles, sources de discussions et de mises en perspectives qui m'ont bien aidées.

Alexis, pour ton aide décisive sur la mise en place des suivis infrarouges.

Cyril, pour ta présence quasi quotidienne sur les dispositifs de cultures et pour ta sympathie. Ne change rien.

Silvère, pour tes conseils clefs et pour une belle amitié.

Patrick, pour ces innombrables bricolages que tu as toujours réalisés avec le plus grand soin.

Nathalie, pour l'encadrement de Adeline, ta bonne humeur mais aussi pour ton aide sur la mise en culture de plantes dont je tairai le nom.

Maryline, pour ton accueil et ton aide sur l'utilisation du microtome.

Le secrétariat de l'équipe Physiodiv, pour l'aide administrative fournie : **Rosine, Laurence et Adeline**.

Kenneth, for your help concerning setup of bending tests.

Mathilde, pour les mesures de concentration en oxygène dissous dans les solutions de culture, et pour tout ce stress que tu aimes partager allègrement. Merci d'avoir repris avec brio la chambre noire et tous les protocoles qui vont avec.

Tous ceux qui ont apporté tout autant par leur bonne humeur et leur convivialité : **David, Jennifer, Pascal, Agnès, Oliver et Didier** côté Champenoux, **Marie-Noëlle, Yves, Mireille et Joëlle** côté Vandoeuvre. Merci aussi au reste de l'équipe Physiodiv et au plateau technique.

To the **James Hutton Institute** and to the ES group for its warm welcome. Special thanks to **Ben, Gertjan, Djaleh, Amanda, Jennifer, Pil, Dimitris** and **Alison** for all the nice memories that I will keep.

Toutes les personnes qui m'ont aidé dans l'enseignement et m'ont donné des opportunités de progresser. Merci en particulier à **Claire, Dany, Dorine, Pierrick et Valérie**.

A la promotion expérimentale **Agreenium**, pour ces bons moments passés en votre compagnie. Merci plus particulièrement à **Arnaud et Camille**, mes colocataires d'une semaine et à **Hélène** pour l'organisation du séminaire à Bordeaux.

Enfin, merci à ma **famille** pour son soutien permanent et à **Cécile**, sans qui les présents travaux n'auraient pas été les mêmes.

Avant-propos

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein de l'UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières (EEF), à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, centre de Nancy-Lorraine, site de Champenoux). L'équipe « Physiologie et diversité de la réponse aux contraintes » qui m'a accueilli étudie les réponses écophysiologiques des arbres aux contraintes de l'environnement. Les principaux facteurs environnementaux étudiés regroupent la disponibilité en eau du sol, la température et la concentration en ozone dans l'atmosphère. Les expérimentations s'étalent de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'individu sur peuplier, chêne et hêtre. Sous l'impulsion de Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot, la compréhension des mécanismes de contrôle de la croissance racinaire est l'un des champs de recherche de l'équipe. Dans ce contexte, mes travaux ont été menés sur des racines de peuplier obtenues sur des boutures cultivées en hydroponie. La principale contrainte environnementale que j'ai étudiée est le déficit hydrique, simulé par stress osmotique (modification du potentiel osmotique des solutions de culture).

Dans l'introduction, j'explicite le choix de travailler sur peuplier comme espèce d'intérêt à partir de critères essentiellement économiques mais aussi scientifiques et techniques. Je parle ensuite du choix du déficit hydrique comme principale contrainte environnementale d'intérêt et en profite pour évoquer l'importance du système racinaire et de son développement pour faire face à ce stress. Je m'attarde ensuite sur la description des processus cellulaires impliqués dans la croissance de la racine et sur leur analyse par cinématique. Plus particulièrement, je traite en détail du méristème apical racinaire et de son activité puis de l'élongation cellulaire le long de l'apex. Je termine cette partie introductive par une analyse bibliographique de l'impact de facteurs environnementaux sur les paramètres cinématiques décrivant la croissance avant de présenter les objectifs de mes travaux.

Les expérimentations menées incluent un suivi à haute résolution de la croissance le long de l'apex racinaire. Le matériel et méthodes revient rapidement sur les systèmes de culture du laboratoire et décrit en détail le protocole de suivi et d'analyse de croissance que j'ai développé.

J'ai ensuite choisi de présenter et discuter les résultats obtenus dans un même chapitre de résultats et discussion qui présente en détail les points suivants :

- Analyses spatiales de la croissance racinaire le long de l'apex.
- Une nouvelle méthode pour mesurer *in vivo* la longueur du méristème apical racinaire (« *Journal of Experimental Botany* »).
- Analyses temporelles de la croissance racinaire (couplées avec les analyses spatiales dans un manuscrit en préparation pour « *New Phytologist* »).
- Réponses de la racine en croissance à une impédance mécanique (en préparation pour « *Journal of the Royal Society : Interface* »).

Le chapitre conclusions et perspectives est l'occasion pour moi de mettre les résultats présentés à la lumière des objectifs préalablement définis tout en soulevant les limites de nos observations et les possibilités futures.

Les expérimentations concernant les réponses de la racine en croissance à une impédance mécanique ont été effectuées en partenariat avec le James Hutton Institute (JHI, site de Dundee, Ecosse). Deux personnes du JHI sont impliquées dans ce partenariat : le Dr Glyn Bengough, spécialiste de l'impact des conditions physiques du sol sur la croissance racinaire, et le Dr Lionel Dupuy, modélisateur spécialisé dans les systèmes racinaires et la mise en place d'outils d'imagerie adaptés à leur étude. J'ai concrétisé ce projet par un séjour de cinq mois au JHI d'avril à août 2014.

Pour compléter cette présentation des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse, j'ai placé en annexes des documents concernant des activités menées en parallèle. En particulier, j'ai inséré deux articles de recherche rédigés au cours de ma thèse, le premier sur l'activité du méristème apical racinaire, le second sur mes travaux de Master 2 (plasticité de la réponse de la croissance des feuilles de peuplier au déficit hydrique). Ces annexes incluent aussi le détail des enseignements que j'ai donné en tant que doctorant contractuel chargé d'enseignements au sein du secteur biologie de l'université de Lorraine ainsi qu'une liste des formations suivies et des communications qui ont émaillées mes travaux.

L'ensemble de ces travaux ont été rendus possibles grâce au soutien financier du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, du laboratoire d'excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01) et de l'école internationale de recherche Agreenium.

Introduction

I. Le peuplier : une espèce modèle

Le genre *Populus* est vaste et complexe. Il s'étend sur l'ensemble des régions tempérées du globe et regroupe six sections dont trois sont principalement utilisées dans les cultures : Aigeiros, Tacamahaca et Populus (Dillen *et al.*, 2010 ; Figure 1). Le peuplier étudié dans mes travaux de thèse, choisi pour sa facilité de culture en laboratoire et sa sensibilité au stress hydrique (Monclus *et al.*, 2006), est un hybride commercial nommé « Soligo ». Il s'agit d'un peuplier euraméricain (*Populus deltoides* × *Populus nigra*), une catégorie dont les nombreux hybrides commerciaux réunissent huit des dix cultivars les plus utilisés dans les peupleraies françaises, incluant Soligo (Paillassa, 2013). Dans la suite du texte, le terme « peuplier », utilisé au singulier, regroupe plus généralement le genre *Populus* et en particulier les espèces utilisées dans les cultures.

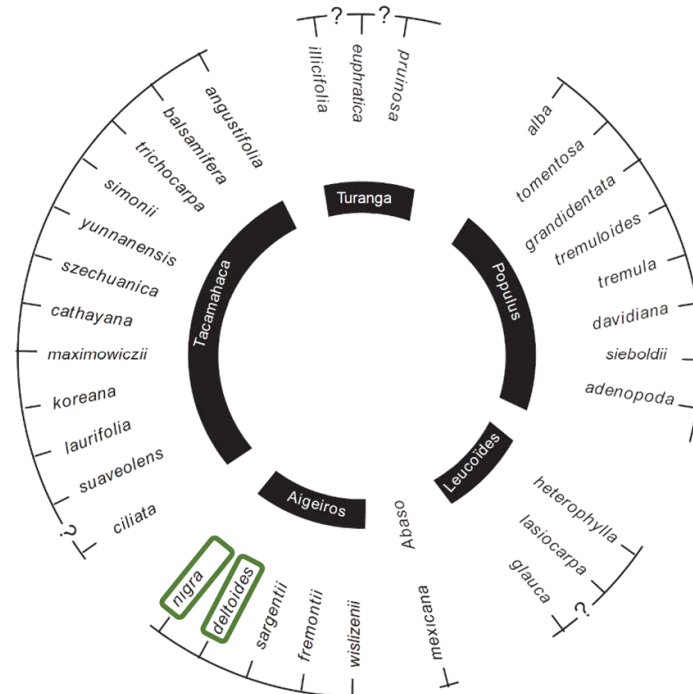


Figure 1 : Le genre *Populus*. Adapté d'après Dillen *et al.*, 2010.

L'inventaire forestier national révèle que le peuplier est l'essence principale pour 2% des forêts françaises de feuillus (Figure 2). Le taux de croissance élevé du peuplier en fait le 6^{ème} feuillu français avec 5% de la production annuelle de bois (Figure 3). Ces chiffres d'apparence faible sont à considérer avec le relief de considérations économiques qui révèlent l'importance du peuplier. Avec 1,3 millions de m³ de bois rond (grumes) prélevés en 2010, le peuplier compte pour 25% de la récolte annuelle de feuillus, derrière le chêne mais juste devant le hêtre (Figure 4). Une importance qui reste toutefois à relativiser par la valeur marchande moindre du peuplier. Cet écart de valeur creuse la différence avec le chêne mais confirme peuplier et hêtre au même rang avec 13% chacun de la valeur marchande des grumes de feuillus (Agreste, 2013) à laquelle il faut ajouter la part du peuplier comme bois de trituration (34% de l'utilisation de la récolte). L'utilisation des peupleraies pour produire de la biomasse énergie est plus que marginale (<1%), relativisant son importance économique dans ce secteur (FAO, 2012).

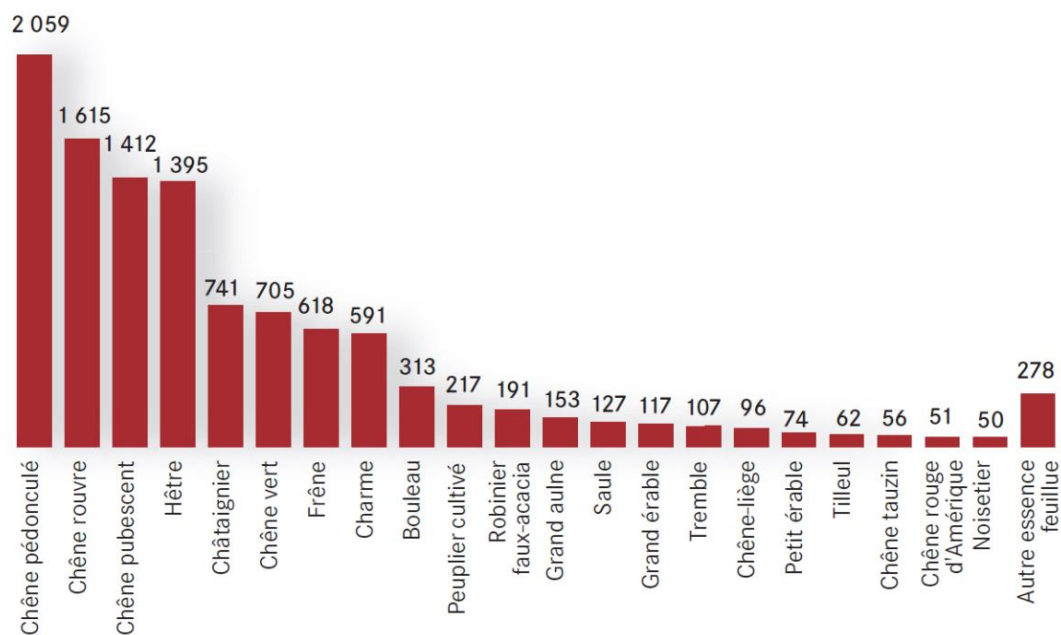


Figure 2 : Part de chaque essence dans les forêts de feuillus françaises (millier d'hectares ; Agreste, 2013).
Données : IGN 2012 - Campagnes d'inventaire 2007 à 2011.

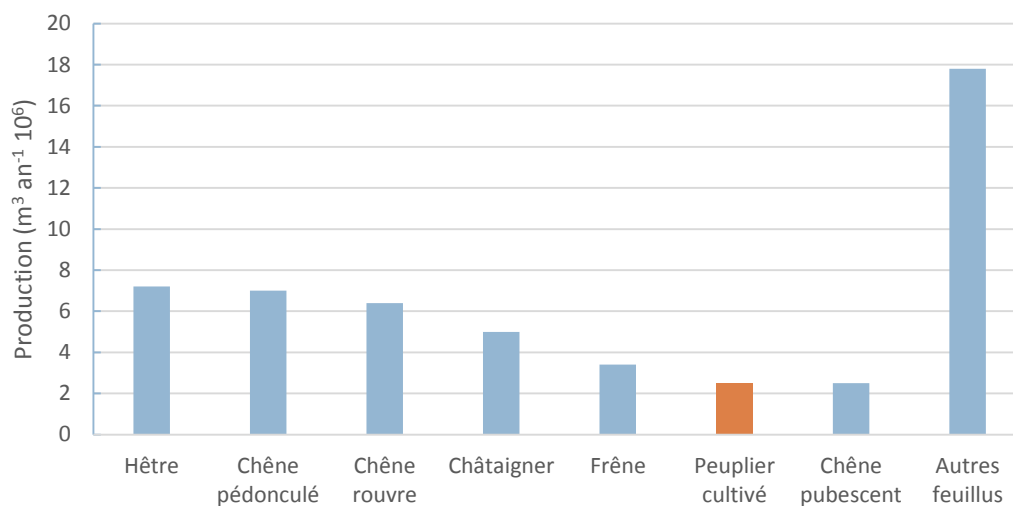


Figure 3 : Production annuelle des essences feuillues.
Données : IGN, 2012 - campagnes d'inventaire 2005 à 2011.

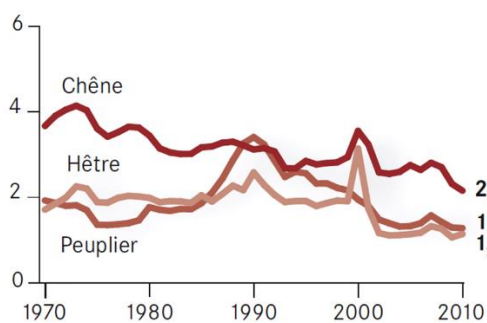


Figure 4 : Récolte de grume sur feuillus (millions de m³ de bois rond sur écorce ; Agreste, 2013).
Données : Agreste - Enquêtes annuelles de branche exploitation forestière.

Ces observations font du peuplier une espèce tout à fait remarquable dans le paysage sylvicole français. La commission internationale du peuplier révèle que la France compte la deuxième plus grande superficie de peupleraies au monde, en augmentation mais loin derrière la Chine (285 800 ha contre 4,3 millions). L'essentiel des surfaces boisées françaises de peupliers sont des plantations (86% ; [FAO, 2012](#)).

Cette importance économique justifie à elle seule le choix du peuplier comme sujet d'étude. Toutefois, d'autres critères pratiques et scientifiques rentrent en ligne de compte. Tout d'abord, la famille des salicacées (peupliers et saules) regroupe des espèces dont la multiplication végétative est extrêmement simple. Le bouturage, réalisé à partir de branches, permet de travailler sur des clones possédant un patrimoine génétique identique et ainsi de contrôler dans les expérimentations la part génotypique de la variabilité interindividuelle. De plus, la croissance rapide des peupliers garantit l'obtention rapide de matériel végétal sur lequel travailler. Enfin, le peuplier est une espèce modèle pour les arbres en génomique fonctionnelle, pour lequel la disponibilité d'un génome de référence facilite grandement l'utilisation d'outils de biologie moléculaire ([Tuskan et al., 2006](#)). De tels outils, bien que peu utilisés dans mes travaux de thèse, sont régulièrement mis en œuvre au sein de l'équipe ([cf annexe 2 : Bizet et al., 2014](#)).

II. Déficit hydrique et productivité

L'eau, de par son rôle fondamental dans des processus biologiques tels que l'homéostasie de la température via la transpiration, ou plus globalement parce qu'elle constitue le milieu réactionnel des réactions biologiques, est une ressource essentielle au développement des végétaux ([Hopkins, 1995](#)). Dans le contexte actuel de changement global, la disponibilité de la ressource en eau sera modifiée à court et moyen termes. Même si des incertitudes demeurent sur l'amplitude des changements à venir, les dernières estimations du panel intergouvernemental sur le changement climatique (IPCC) s'accordent sur des températures en nette hausse dans l'hexagone et ce dès les prochaines décennies (Figure 5 ; [Kirtman et al., 2013](#)).

L'intégration des facteurs climatiques pour estimer les changements attendus, notamment sur le cycle de l'eau, permet de mieux appréhender leurs conséquences potentielles sur la croissance des végétaux. En particulier, les estimations montrent une nette hausse de l'évaporation sur l'ensemble du globe, concomitante avec l'augmentation des températures. Le bilan hydrique (évaporation moins précipitations) reste plutôt négatif en France et ce malgré la tendance à l'augmentation des précipitations (Figure 5). De la même manière, on attend une baisse prononcée de 2 à 3% de l'humidité dans la partie superficielle des sols français (Figure 6 ; [Kirtman et al., 2013](#)). D'un point de vue sylvicole, les conditions environnementales seront donc être de plus en plus contraignantes avec notamment des situations de déficit hydrique plus fréquentes et/ou plus sévères.

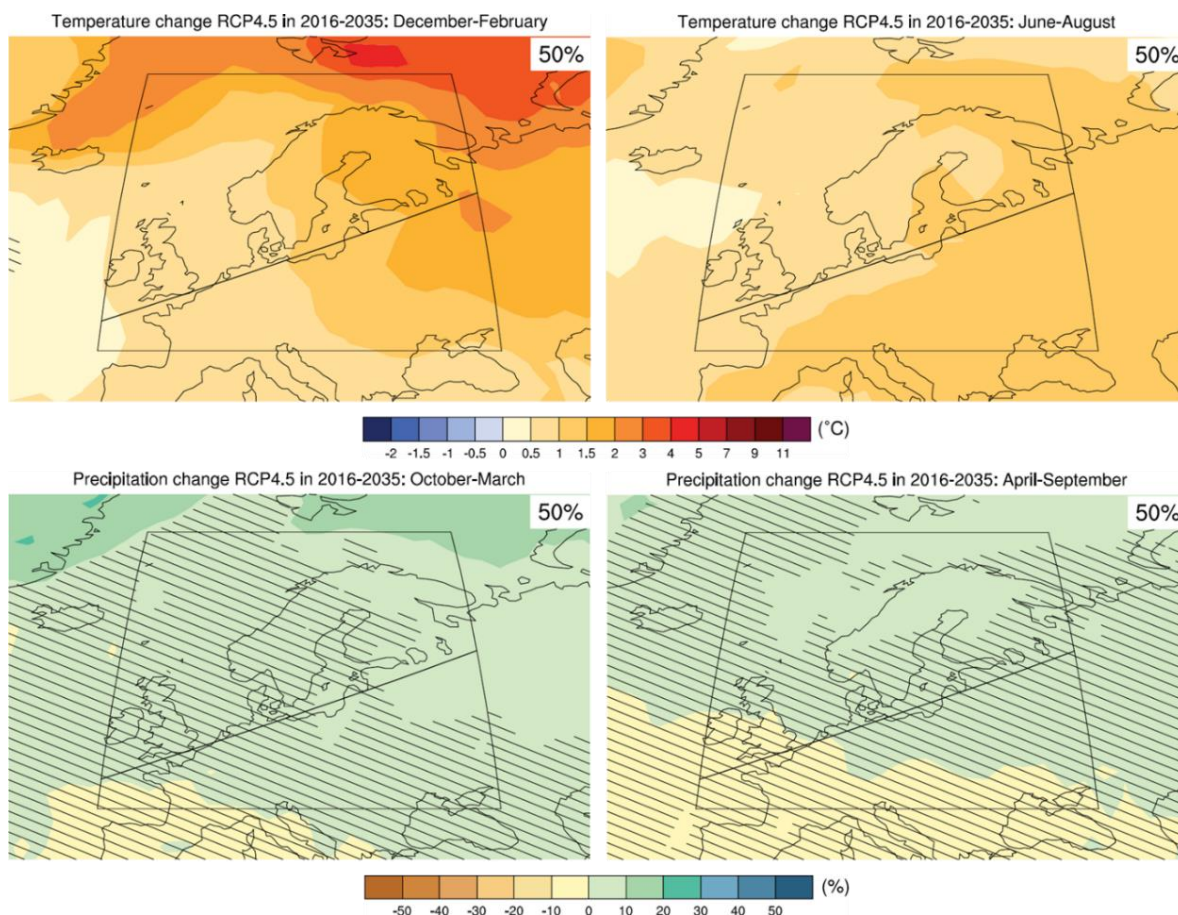


Figure 5 : Changements saisonniers de températures (haut) et de précipitations (bas) pour la période 2016-2035 par rapport à la période 1986-2005 (scénario RCP4.5). Pour chaque point, le 50ème percentile de la distribution des prévisions de plusieurs modèles est présenté. Les hachures indiquent des zones de changement de faible amplitude. D'après [Van Oldenborgh et al., 2013](#).

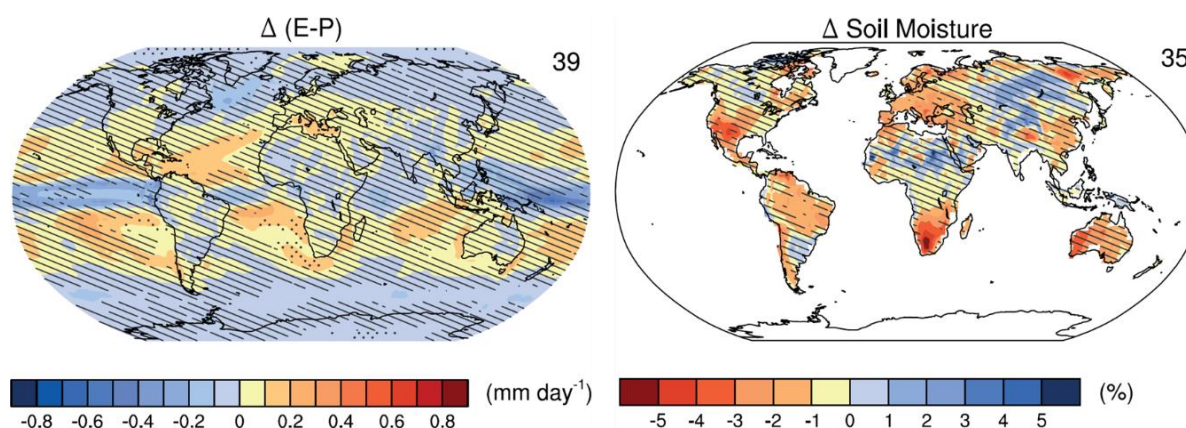


Figure 6 : Moyenne annuelle des changements, projetée pour la période 2016-2035 par rapport à la période 1986-2005, pour le bilan évaporation moins précipitations (E-P, mm jour^{-1}) et pour l'humidité du sol dans les dix premiers centimètres (%). Le nombre de modèles utilisés est indiqué en haut à droite de chaque carte. Les hachures indiquent des zones où les changements estimés sont faibles par rapport à la variabilité interne des modèles. Les pointillés indiquent des régions où la moyenne estimée des modèles dévie significativement de la période simulée 1986-2005 et où au moins 90% des modèles sont d'accord sur le signe du changement. D'après [Kirtman et al., 2013](#).

En écologie, les travaux de Whittaker dans les années 70 montrent que le niveau des précipitations annuelles conditionne la productivité des écosystèmes (Figure 7). Dans l'agriculture, l'analogie avec la présence ou l'absence de système d'irrigation donne des cas bien documentés. Des années 2000 à 2005, on constate sur des cultures de maïs que les surfaces irriguées ont des rendements annuels de 20% plus importants (années « normales ») à 50% plus importants (années avec des épisodes de sécheresse prononcés) par rapport aux exploitations non irriguées (Amigues *et al.*, 2006). Dans les écosystèmes naturels comme dans les cultures, la disponibilité en eau est donc un facteur de premier plan structurant la productivité. Au cours des années 80 déjà et sans doute avant, les sécheresses ont été identifiées comme étant la première cause de perte de rendement des cultures aux Etats-Unis (Boyer, 1982). En France, les sécheresses des dernières décennies ont provoqué des pertes de rendement de l'ordre de 10 à 25% sur la plupart des grandes cultures (blé, maïs, tournesol, sorgho) avec de grandes disparités selon les régions et l'équipement d'irrigation. Bien entendu, les chiffres varient selon les espèces, avec par exemple des pertes plus faibles pour le sorgho (5 à 20%) que pour le maïs (jusqu'à plus de 50% de pertes). Néanmoins, la sécheresse est un événement épisodique qui, même si il est toujours lié à un déficit de la pluviométrie, reste caractérisé en tant qu'événement extrême par la durée des épisodes (nombre de jours consécutifs sans pluie). Sur des écosystèmes forestiers, la sévérité et la récurrence de tels épisodes de sécheresse ont été identifiés comme étant des facteurs majeurs contribuant à l'accélération récente du taux de mortalité des forêts européennes (Bréda *et al.*, 2006).

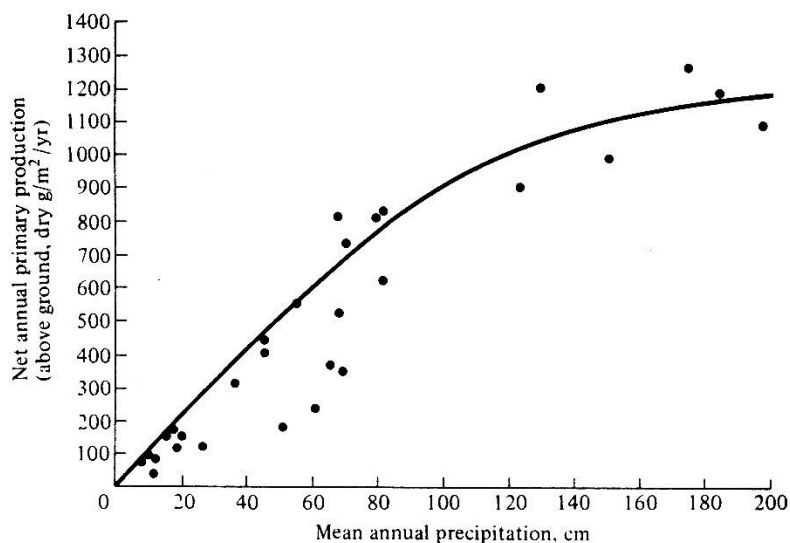


Figure 7 : Productivité annuelle des écosystèmes terrestres en fonction de la pluviométrie annuelle (d'après Whittaker, 1970).

De par leur caractère pérenne, les peupliers plantés aujourd'hui devront être capables de faire face aux changements précédemment énoncés. Les peupliers euraméricains utilisés en sylviculture sont parmi les essences forestières les plus productives mais ils ne peuvent être cultivés qu'en plaines inondables ou dans les terres basses, là où la ressource en eau n'est pas limitante. En effet, parmi les cultivars couramment utilisés, la grande majorité et notamment les cultivars les plus productifs comme Soligo se révèlent être particulièrement sensible à la sécheresse (Monclus *et al.*, 2006). En sylviculture, les sélections variétales des dernières décennies visaient à augmenter la productivité, la qualité du bois, la rectitude des arbres et la résistance aux pathogènes. Une meilleure tolérance au déficit hydrique apparaît comme critère de sélection intéressant pour le développement de

nouveaux cultivars. A ce titre, l'utilisation du système racinaire comme cible de sélections ou d'améliorations est un levier encore largement sous-exploité, que ce soit pour améliorer la résistance aux contraintes environnementales ou les rendements.

En effet, la croissance racinaire est généralement moins impactée par le déficit hydrique que la croissance des parties aériennes. Une diminution du ratio partie aérienne/racinaire est fréquemment observable (Westgate & Boyer, 1985). Cette diminution résulte d'une diminution moins prononcée de la croissance racinaire par rapport à la croissance des parties aériennes. Par ailleurs, des expériences de terrain ont montré que restreindre l'exploration racinaire conduit à une diminution de la productivité (hauteur, surface foliaire) dans des parcelles agricoles en relation avec l'intensité de la restriction (McKenzie et al., 2009). Enfin, la capacité des racines à exploiter l'eau en profondeur est une caractéristique qui permet à certaines espèces de peuplier de se développer dans des environnements semi-arides (cas de *Populus euphratica*, Gries et al., 2003).

La teneur en eau d'un sol est en interaction avec l'impédance mécanique générée par ce sol en réponse à la croissance de la racine. En effet, le potentiel matriciel¹ d'un sol diminue avec sa teneur en eau, conduisant à une impédance mécanique plus élevée (Figure 8). Dans un sol qui s'assèche, la capacité des racines à aller chercher de l'eau dans les zones environnantes est donc plus difficile (Lobet et al., 2014). Selon Bengough et collaborateurs (2011), l'impédance mécanique peut ainsi être la composante majeure de limitation de la croissance racinaire y compris dans des sols encore relativement humide (dès -0,1MPa).

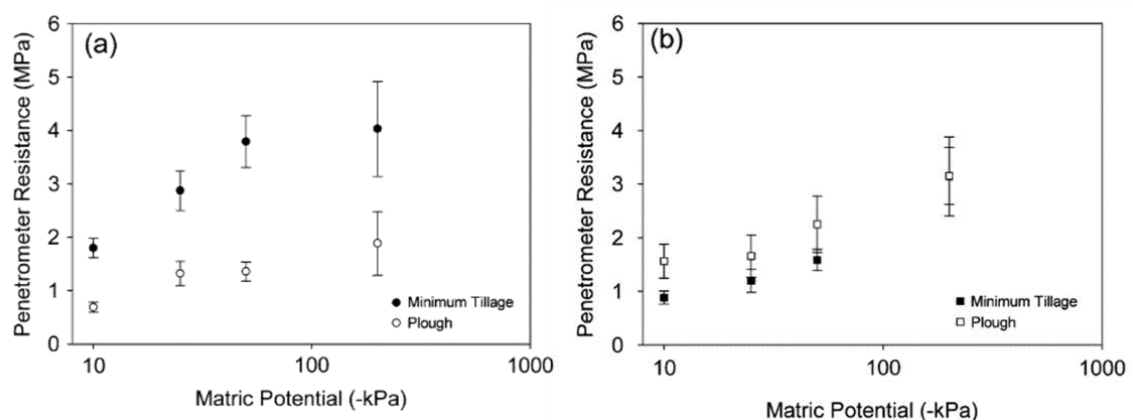


Figure 8 : Résistance mesurée par un pénétromètre en fonction du potentiel matriciel d'un sol sablo-limoneux à une profondeur de 5-10 cm (a) ou 25-30 cm (b). D'après Bengough et al., 2011.

Comprendre comment un stress environnemental ou comment les propriétés mécaniques d'un sol impactent la croissance racinaire est donc d'un intérêt majeur : un système racinaire dont le développement est contraint conduit à une diminution des prélèvements d'eau et de nutriments et donc des rendements. Certains n'hésitent d'ailleurs pas à considérer le système racinaire comme étant la clef vers une seconde révolution verte d'augmentation des rendements et/ou de leur maintien tout en minimisant l'utilisation d'intrants (Gewin, 2010).

¹ Ce potentiel correspond aux forces de rétention exercées par la matrice sol (forces d'imbibition et de capillarité). Plus le potentiel est bas, plus la force de rétention est élevée (sols secs).

III. Analyse de la croissance racinaire via la cinématique

La cinématique est un sous-domaine d'étude de la mécanique qui décrit le mouvement de points, corps et système de corps sans considérer les causes du mouvement. Son utilisation en physiologie végétale est une avancée majeure en termes de compréhension de la croissance. En effet, la cinématique permet non seulement de quantifier la croissance d'un organe mais surtout de mesurer où et à quelle intensité a lieu cette croissance, ce qui n'est pas possible avec une approche traditionnelle de suivi de l'évolution de la surface/longueur d'un organe en croissance.

Dans le cas de la croissance racinaire, l'approche de cinématique consiste de manière simplifiée à suivre la vitesse de déplacement de marques placées le long de l'apex. On retrouve des traces de protocoles de cinématique dès la fin du XIX^{ème} siècle avec les expérimentations de Von Sachs de marquage à l'encre d'apex racinaires (Figure 9). Outre la mise en évidence de la localisation apicale de la croissance dans la racine, cette approche offre une résolution suffisante pour mettre en évidence un gradient de croissance le long de la zone de croissance.

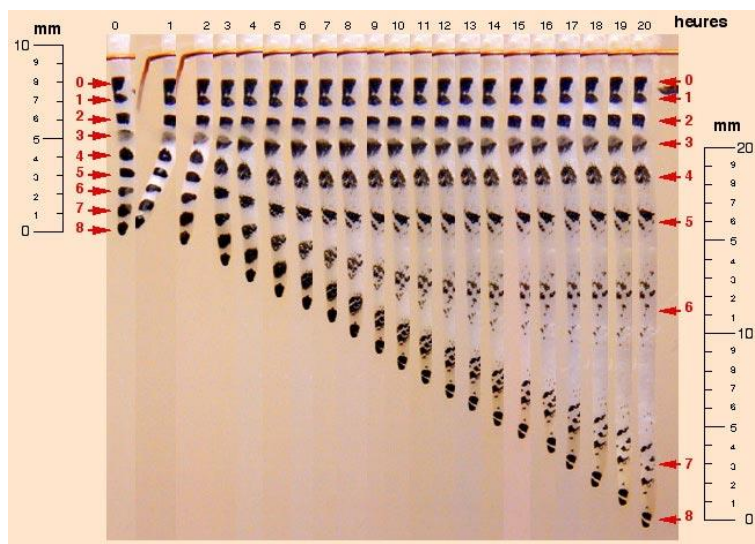


Figure 9 : Reproduction d'une expérience de suivi de croissance racinaire réalisée par Von Sachs en 1882 (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/racine/01-sachs.htm>).

Par la suite, le développement de la photographie permet l'apparition des premières analyses d'images séquentielles. On notera notamment les travaux du botaniste et biophysicien allemand Wilhelm Pfeffer entre 1898 et 1900, qui utilisa un cinématographe pour analyser les mouvements de croissance des végétaux². Dès le début du XX^{ème} siècle, des études utilisant une pellicule déroulée à vitesse constante suivent en continu la croissance d'un apex racinaire pendant plusieurs heures, on parle de « *streak photography* » (List, 1969 ; Erickson & Silk, 1980). La racine est marquée au début du suivi avec des particules de carbone dont le déplacement le long de l'apex racinaire est visible sous forme de traînée (« *streak* » en anglais) sur la pellicule finale (Figure 10). L'utilisation de table à digitaliser permet de mesurer manuellement la vitesse de déplacement des particules le long de l'apex.

² Vidéo accessible sur Dailymotion. http://www.dailymotion.com/video/x1hp9q_wilhem-pfeffer-plant-movement_shortfilms

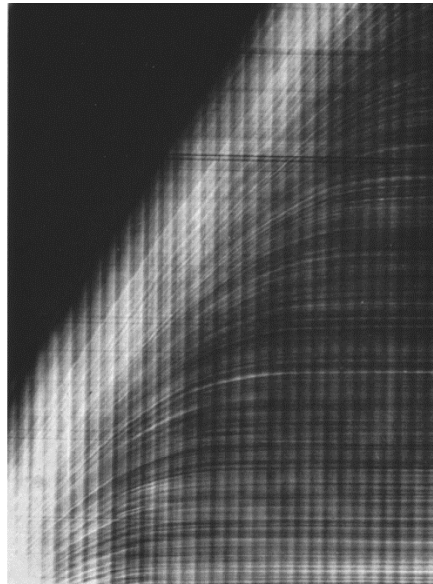


Figure 10 : « Streak photography » d'une racine de maïs. Le début du suivi démarre à gauche. Au fur et à mesure du déroulement de la pellicule vers la droite, l'extrémité de la racine se déplace vers le haut. Les traînées claires sont utilisées pour mesurer les vitesses de déplacement des particules de carbone. Les traînées sombres, verticales et régulièrement espacées, résultent d'irrégularités dans l'indentation des engrenages utilisés pour dérouler la pellicule. D'après [List, 1969](#).

La vitesse de déplacement des particules en fonction de la distance à l'apex, ou profil de vitesse, est la première donnée de sortie de la cinématique. Le point de référence utilisé est l'extrémité de la racine. En s'éloignant de ce point de référence, le cumul de la croissance conduit à une courbe sigmoïde où la vitesse augmente jusqu'à atteindre un plateau (Figure 11A). La vitesse de croissance de la racine (asymptote du profil) ainsi que la longueur de la zone de croissance (distance à partir de laquelle la vitesse n'augmente plus) sont déterminées à partir du profil de vitesse.

Le taux de changement de vitesse de déplacement est calculé en dérivant le profil de vitesse. Ce taux indique la variation de longueur par unité de longueur et de temps d'un segment de petite taille le long de l'apex. Il reflète l'élongation relative des cellules composant ces différents segments. On parle de taux élémentaire d'élongation/croissance relative (REGR ou REER, *Relative Elemental Growth/Elongation Rate*). Le terme « élongation » plutôt que « croissance » est généralement préféré pour les organes dont la croissance se déroule essentiellement dans une unique dimension, ce qui est le cas pour les racines (le long de l'axe longitudinal). Le profil de REGR le long de l'apex est un profil en cloche caractéristique (Figure 11B). Dans la partie la plus apicale, les vitesses très faibles conduisent à un bruit de mesure plus élevé exacerbé par l'étape de dérivation. Ce problème méthodologique a donné naissance à un débat non résolu encore aujourd'hui concernant l'allure du profil de REGR dans cette partie apicale. Le débat n'est pas futile car comme je le décrirai plus tard, le taux de REGR reflète l'activité de division qui a lieu dans cette zone.

Remarque : par définition, un taux élémentaire est un taux relatif. Pour éviter une redondance et simplifier la notation, nous parlerons dorénavant de taux d'élongation élémentaire (*Elemental Elongation Rate*, EER = REGR) tel que défini par [Peters et Baskin \(2006\)](#).

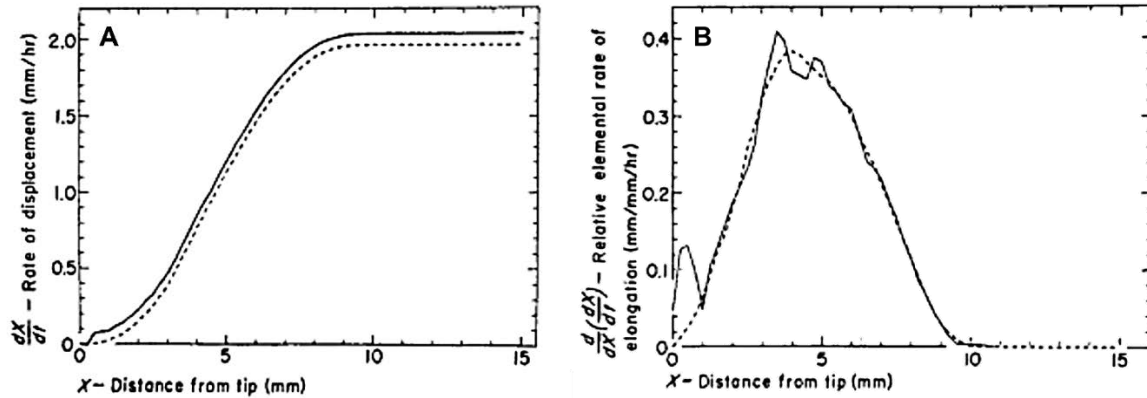


Figure 11 : Profil de vélocité (A) et de taux d'élongation élémentaire (B) le long d'un apex racinaire de maïs. Les courbes en tirets sont des moyennes mobiles. La moyenne mobile du taux d'élongation élémentaire a été fortement corrigé dans sa partie la plus apicale. D'après [Erickson & Sax, 1956](#).

Le profil de vélocité est un profil de croissance intégrée où la vélocité mesurée à une position donnée le long de l'apex traduit la croissance ayant eu lieu en amont (dans la partie plus apicale). Le taux d'élongation élémentaire traduit directement la vitesse d'élongation des cellules le long de l'apex. Ces deux profils décrivent la croissance en fonction de la distance à l'apex. On parle de spécification « spatiale » ou « Eulérienne » de la croissance ([Silk, 1992](#)). Au cours du temps, l'extrémité apicale de la racine est déplacée par l'élongation des cellules en croissance. La relation position~temps suivie par une cellule lors de son déplacement est nommée « trajectoire de croissance » ([Silk & Wagner, 1980](#)). En assumant que le profil de vélocité mesuré est stable au cours du temps, la trajectoire de croissance est l'équivalent mathématique de l'intégrale du profil de vélocité (Figure 12). Ces trois manières de spécifier la croissance le long de l'apex racinaire ont leur intérêt. Le taux d'élongation donne des informations sur l'intensité et la distribution de la croissance le long de la zone de croissance. Le profil de vélocité intègre la croissance le long de l'apex racinaire. La trajectoire de croissance permet de transformer une information spatiale en information temporelle. On parle dans ce dernier cas de spécification « Lagrangienne » de la croissance ([Silk, 1992](#)).

Aujourd'hui, le développement exponentiel des outils d'imagerie numérique et de l'informatique permet d'augmenter d'autant la résolution spatiale et temporelle des suivis cinématiques de croissance d'apex racinaires ou d'autres organes. Si on trouve encore jusqu'à la fin des années 80 de l'acquisition assistée par ordinateur ([Sharp et al., 1988](#)), les analyses d'images sont aujourd'hui en grande partie automatisées par des algorithmes dédiés de suivi de points. On parle de « particle image velocimetry » (PIV). RootFlowRT ([Van der Weele et al., 2003](#)), Kineroot ([Basu et al., 2007](#)), RootTrace ([French et al., 2009](#)) ou encore GrowthTracer ([Iwamoto et al., 2013](#)) sont autant d'exemples récents de logiciels développés pour l'analyse d'images de racines marquées. Chacun présente des avantages ou des particularités sur les méthodes de calcul, la résolution de l'analyse ou les prérequis logiciels. Dans ma thèse, notre choix s'est porté sur l'utilisation de Kineroot, dont l'analyse par contraste de pixel s'avère étonnamment précise sur nos images. Kineroot donne directement accès à un profil de vélocité utilisé pour les analyses subséquentes.

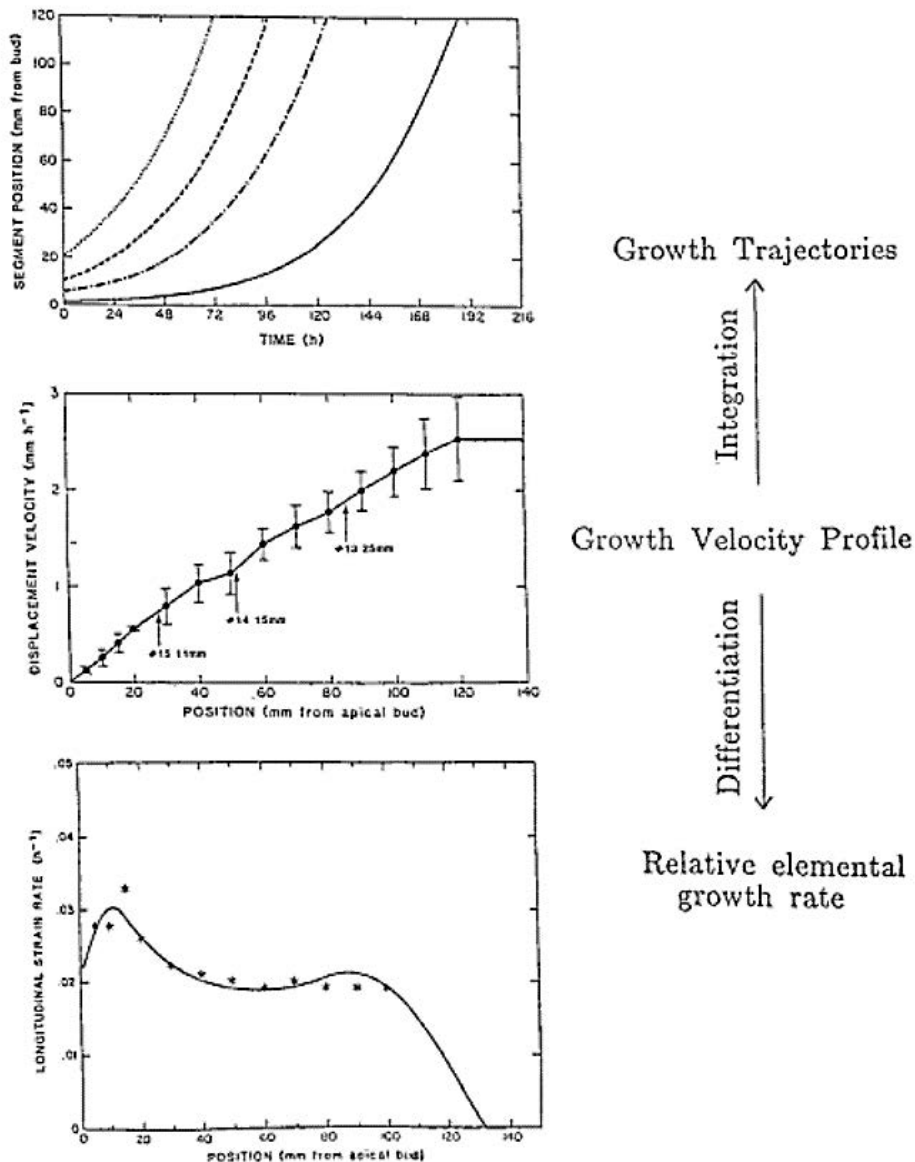


Figure 12 : Spécifications spatiales et temporelle de la croissance obtenues mathématiquement à partir du profil de vitesse. D'après [Silk, 1992](#).

IV. Division cellulaire et production de cellules

L'élongation des cellules permet d'expliquer concrètement le déplacement de l'apex racinaire, mais il ne faut pas négliger l'étape amont de production de ces cellules. En générant un flux de cellules, l'activité de division cellulaire fournit un potentiel de croissance qui est ensuite concrétisé par l'allongement de ces cellules. En ce sens, la croissance racinaire implique deux processus cellulaires fondamentaux : la division et l'élongation cellulaire, qui sont partiellement séparés le long de l'apex racinaire.

L'organisation tissulaire de l'apex racinaire est aujourd'hui bien connue et abondamment documentée, notamment chez *Arabidopsis thaliana* (Dolan *et al.*, 1993 ; Benfey & Scheres, 2000 ; Figure 13). Par rapport à arabis, la principale différence avec les racines de peuplier provient du nombre d'assises cellulaires plus élevé chez ce dernier. En particulier, le cortex, souvent utilisé pour étudier les activités de division et d'élongation, ne compte qu'une seule assise de cellule chez arabis alors qu'on en compte dans notre cas entre sept et neuf chez le peuplier.

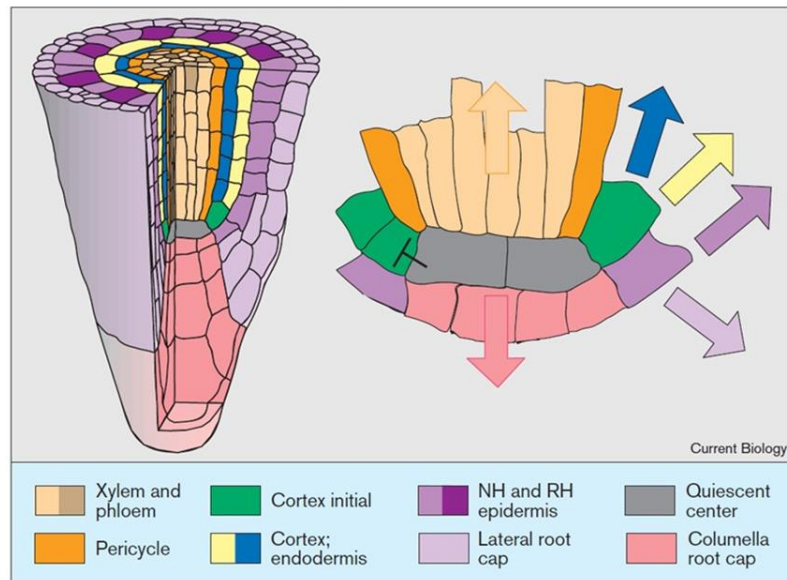


Figure 13: Organisation d'un apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana*. A l'extrémité de la racine, la coiffe protège un centre quiescent entouré de cellules initiales. Ces dernières donnent naissance, en remontant vers la tige, au rhizoderme, cortex, endoderme, péricycle et tissus conducteurs. D'après Benfey & Scheres (2000).

En regard de cette organisation tissulaire précise, la terminologie utilisée pour classifier les différentes zones de croissance fait l'objet d'un débat relativement silencieux où chacun utilise sa propre terminologie (résumé par Ivanov & Dubrovsky, 2013 ; Figure 14). D'une manière générale, tout le monde s'accorde à placer un méristème apical racinaire (RAM), siège des divisions cellulaires, à l'extrémité de l'apex racinaire. Le RAM est suivi d'une zone d'élongation débouchant sur la zone de différenciation puis la zone mature. La difficulté est de placer les limites du RAM. Si le point de départ est de manière univoque positionné au centre quiescent, la limite tige-orientée est bien plus obscure car partiellement confondue avec le début de la zone d'élongation. Cette transition floue a donné naissance à de nombreux termes (méristème basal, zone de transition, zone d'élongation distale) pour qualifier une zone chevauchant parfois mais pas systématiquement le RAM et/ou la zone d'élongation (Figure 14). Dans cette zone, l'activité de division se réduit parallèlement à l'augmentation en longueur des cellules. Par souci de clarté, je conserve tout au long du manuscrit la terminologie proposée par Ivanov & Dubrovsky (2013), qui divise le RAM en un domaine de prolifération (zone de forte probabilité de division cellulaire) côté apical et en un domaine de transition (faible probabilité de division cellulaire) côté distal.

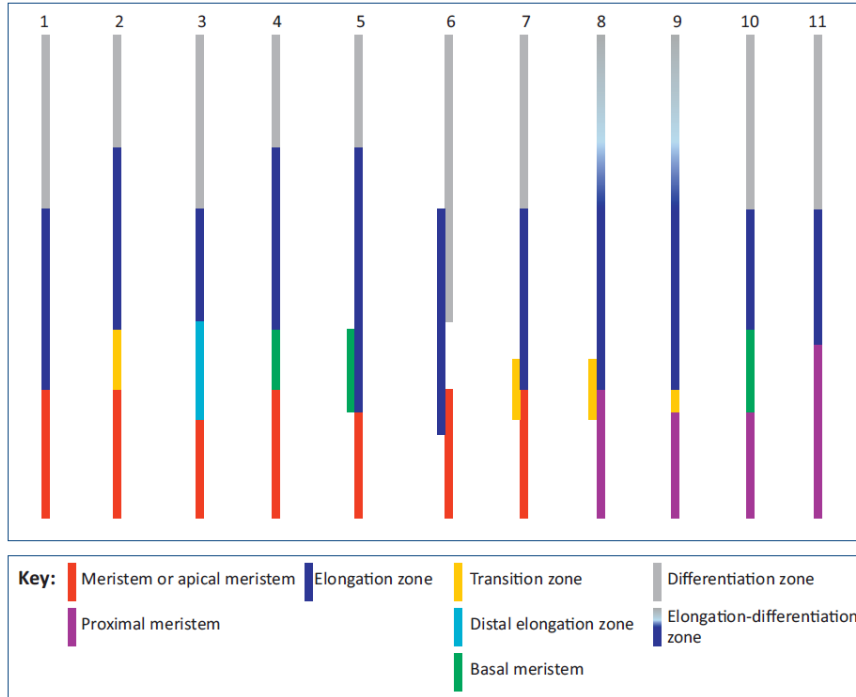


Figure 14 : De l'inconsistance de la terminologie utilisée pour définir la zonation longitudinale de l'apex racinaire. Chaque numéro indique une catégorie de terminologie utilisée par au moins une équipe de recherche dans ses publications (pour plus de détails voir [Ivanov & Dubrovsky, 2013](#)).

Au sein du RAM, la division cellulaire est confinée aux cellules prolifératives du domaine de prolifération et du domaine de transition. L'activité de division du RAM génère un flux de cellules qui pousse les cellules plus anciennes dans la zone d'élongation puis dans la zone mature. Ce flux de cellules est obtenu le long de l'apex racinaire à partir du profil de vélocité (issu de l'analyse cinématique) et de la longueur des cellules (issue de mesures histologiques). Sous l'hypothèse de stabilité temporelle des profils de vélocité et de longueur des cellules, on calcule à l'aide de l'équation 1 un flux de cellules (F) à travers une surface normale à l'axe de la racine. Ce flux intègre l'ensemble des cellules produites en amont de la position considérée le long de l'apex (x).

$$F_x [\text{cellule } h^{-1}] = \frac{v_x [\mu\text{m } h^{-1}]}{l_x [\mu\text{m cellule}^{-1}]} \quad (\text{Equation 1})$$

Le flux de cellules augmente entre deux positions où de nouvelles cellules sont produites. La dérivée spatiale du flux de cellules donne accès au taux local de production de cellules (P ; équation 2).

$$P_x [\text{cellules } \mu\text{m}^{-1} h^{-1}] = \frac{\delta F_x}{\delta x} \quad (\text{Equation 2})$$

Le taux de production local rapporté à la longueur des cellules permet de convertir une production par unité de longueur et de temps, en production par cellule et par unité de temps *i.e.* d'obtenir le taux de division cellulaire (D ; équation 3).

$$D_x [\text{cellule cellule}^{-1} h^{-1}] = P_x \times l_x \quad (\text{Equation 3})$$

Flux de cellule, taux de production et taux de division sont des paramètres cinématiques pertinents pour quantifier et analyser l'activité du RAM ([Beemster & Baskin, 1998](#) ; [Fiorani & Beemster, 2006](#) ; Figure 15).

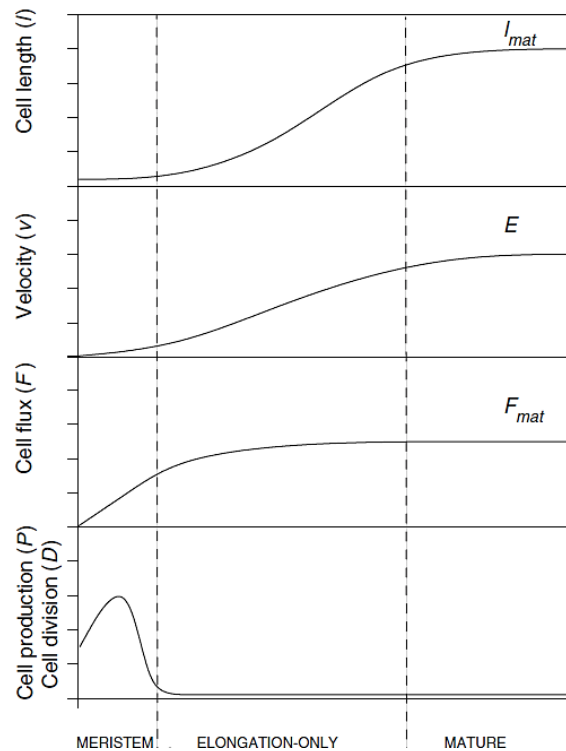


Figure 15 : Principaux paramètres cinématiques dans un modèle linéaire de la zone de croissance (i.e. files de cellules méristématiques de racines et de feuilles de monocotylédones). Les quatre graphiques, du haut vers le bas, représentent des profils théoriques avec des unités arbitraires pour les données brutes mesurées expérimentalement (longueurs des cellules et vélocité), et pour les données calculées (flux de cellules, taux de production et taux de division) pour des cellules du méristème (RAM), de la zone d'élongation, et de la zone mature. D'après [Fiorani & Beemster \(2006\)](#), adapté et étendue de [Silk \(1992\)](#).

V. Impact d'un stress sur la croissance racinaire

Suite à un stress, la vitesse de croissance chez les végétaux montre généralement une réponse aigüe à court terme suivie d'une récupération et d'une accommodation aux nouvelles conditions ([Skirycz & Inzé, 2010](#)). Sur racines de pin, un suivi temporel de la croissance racinaire à différents niveaux de stress osmotique montre après quelques heures une récupération totale ou partielle de la vitesse de croissance voir même une augmentation pour des niveaux de stress faibles ([Triboulot et al., 1995](#) ; Figure 16).

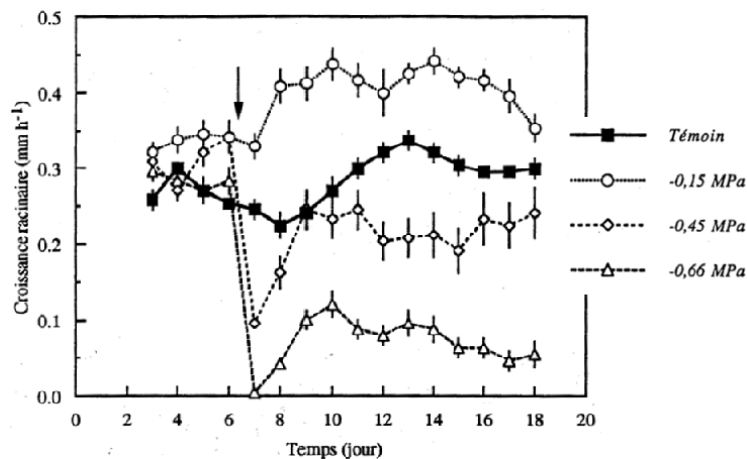


Figure 16 : Evolution de la croissance de racines de *Pin maritime* cultivées en hydroponie en réponse à différents niveaux de stress osmotique. La flèche indique le départ du stress. Adapté d'après [Triboulot et al., 1995](#).

Dans l'apex racinaire, vitesse et taux d'élongation sont impactés de diverses manières selon le type de stress considéré. Des températures plus faibles ont tendances à ralentir l'élongation cellulaire de manière uniforme le long de l'apex comme cela a été montré chez le maïs, sur des feuilles (Salah & Tardieu, 1997) ou des apex racinaires (Pahlavanian & Silk, 1988 ; Figure 17). Le stress hydrique a des impacts contrastés selon les zones considérées. Sur des racines de maïs, une diminution de la longueur de la zone de croissance est observée lors d'un stress hydrique modéré. Le taux d'élongation est aussi réduit, sauf dans la partie la plus apicale (Liang *et al.*, 1997 ; Sharp *et al.*, 1988 ; 2004 ; Yamaguchi & Sharp, 2010 ; Figure 18). Des résultats similaires ont été observés sur des feuilles en croissance (Tardieu *et al.*, 2000). Face à une impédance mécanique élevée, le taux d'élongation le long de l'apex racinaire montre un impact comparable à celui du stress hydrique : diminution de la longueur de la zone de croissance et du taux d'élongation sauf dans la partie la plus apicale (résultats obtenus sur racines de pois ; Croser *et al.*, 2000 ; Bengough *et al.*, 2006 ; Figure 19).

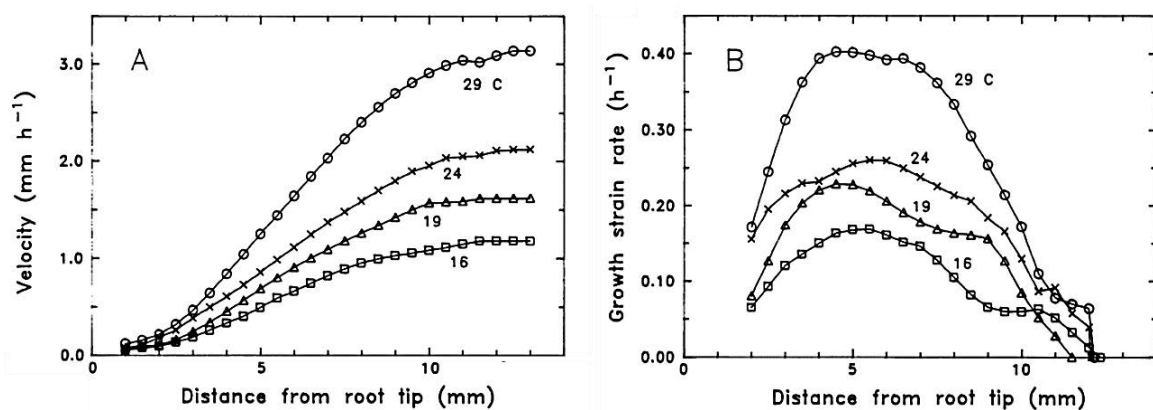


Figure 17 : Profils de vitesse (gauche) et d'élongation (droite) obtenus sur des racines de maïs à divers niveaux de températures (indiquées sur les courbes). « Growth strain rate » est équivalent au taux d'élongation élémentaire. D'après Pahlavanian & Silk, 1988.

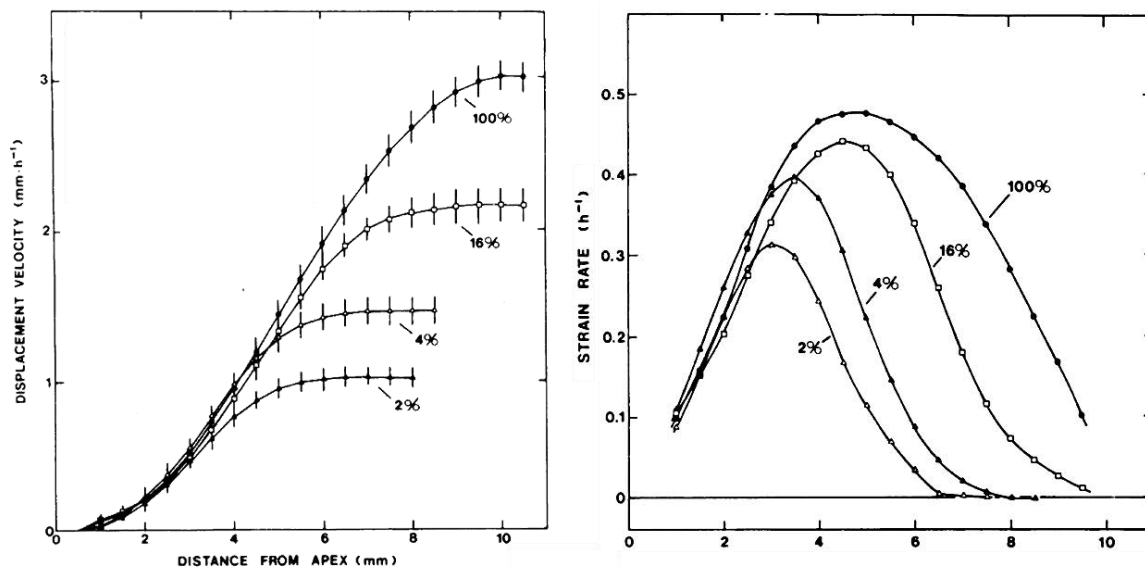


Figure 18 : Profils de vitesse (gauche) et d'élongation (droite) obtenus sur des racines de maïs pour différents niveaux de déficit hydrique (100% = -0,03MPa ; 16% = -0,20MPa ; 4% = -0,81MPa ; 2% = -1,60MPa). « Strain rate » est équivalent au taux d'élongation élémentaire. D'après Sharp *et al.*, 1988.

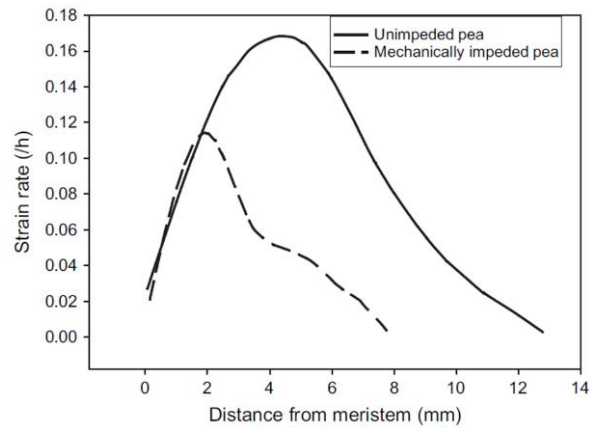


Figure 19 : Profils d'élongation sur des racines de pois soumises ou non à une impédance mécanique. « Strain rate » est équivalent au taux d'élongation élémentaire. Données de Croser *et al.*, 2000.

L'activité de production de cellules du RAM est donnée par le flux de cellules sortant. Ce flux peut être impacté en modifiant le nombre de cellules en division et/ou en modifiant le taux de division de ces cellules. Des impacts sur chacun de ces paramètres ont été reportés sur plusieurs espèces et en réponse à différents types de stress environnementaux. D'une part, un taux de division cellulaire réduit est observé en réponse à des conditions hypoxiques (Díez *et al.*, 1970), à une situation de déficit hydrique (Sacks *et al.*, 1997 ; Dubrovsky *et al.*, 1998) ou à de faibles températures (Barlow & Rathfelder, 1985). D'autre part, la taille du méristème est également réduite sur les feuilles de blé et de maïs en réponse à un déficit hydrique (Schuppler *et al.*, 1998 ; Tardieu *et al.*, 2000) et sur la racine d'arabidopsis en réponse à un stress salin (West *et al.*, 2004). La diminution subséquente du flux de cellules sortant du RAM a été mise en évidence sur des racines de maïs en réponse au déficit hydrique (Sacks *et al.*, 1997 ; ; Figure 20), sur des feuilles de *Lolium perenne* en réponse à une déficience en phosphore (Kavanová *et al.*, 2006) ou encore sur des feuilles de maïs en réponse au froid (Rymen *et al.*, 2007).

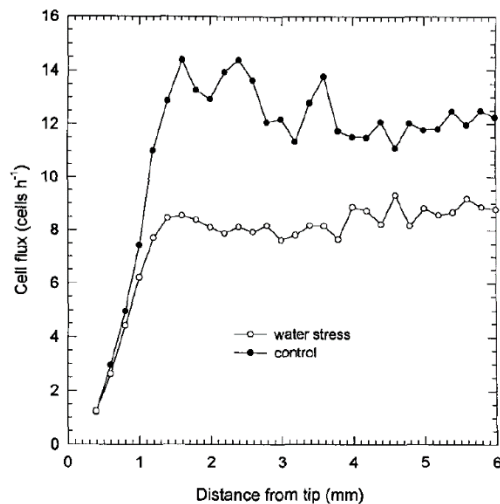


Figure 20 : Profil de flux de cellules le long de l'apex racinaire de maïs en réponse à un déficit hydrique. D'après Sacks *et al.*, 1997.

Objectifs

La croissance d'un apex racinaire est le résultat de l'élongation des cellules qui le compose. Néanmoins, le rôle de la division cellulaire dans cette croissance ne doit pas être ignoré (Beemster *et al.*, 2003). En effet, les cellules végétales ne sont pas des entités capables d'atteindre des tailles infinies. Par conséquent, la mise en place d'un flux continu de nouvelles cellules est un élément indispensable à la croissance indéfinie des racines. Ce flux de cellules est généré par le méristème apical racinaire (RAM). Il fournit à la racine un potentiel de croissance concrétisé lors de l'allongement des cellules produites. Si l'activité d'élongation associée à la division dans le RAM est bien moindre que dans la zone d'élongation, elle n'en reste donc pas moins indispensable. L'équilibre entre division des cellules dans le RAM et allongement des cellules sur l'ensemble de la zone de croissance donne naissance à la stationnarité spatio-temporelle de l'organisation tissulaire de l'apex racinaire (et non des cellules qui le composent, Silk & Erickson, 1979). Par conséquent, division et élongation cellulaires ne doivent pas être considérés comme des processus indépendants mais comme des processus en synergie dans la croissance de l'apex racinaire.

Mathématiquement, la vitesse globale d'élongation d'une racine dépend de la longueur de la zone de croissance et du taux d'élongation des cellules le long de cette zone (Figure 21). De la même manière, le nombre de cellules produites par le RAM dépend de la longueur du RAM et du taux de division cellulaire. En résumé, la croissance racinaire est fonction de l'intensité des processus cellulaires (division et élongation) et de l'amplitude de la zone où ils ont lieu (longueur du RAM et longueur de la zone de croissance ; Baskin, 2012). Cette amplitude dépend directement du nombre et de la longueur des cellules composant chaque zone.

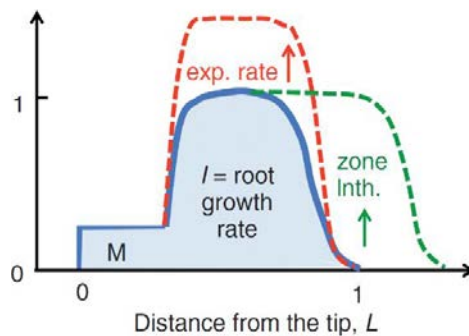


Figure 21 : Impact de l'intensité d'élongation et de la longueur de la zone de croissance sur le taux de croissance d'un apex racinaire. D'après Baskin, 2012.

Dans la régulation de la croissance, les relations entre division et élongation cellulaires sont peu connues. D'un côté, dans des organes à croissance déterminée comme les feuilles, une augmentation de l'intensité de l'un de ces processus entraîne une diminution de l'autre et inversement. Par exemple, une baisse de l'activité de division du méristème (chez des mutants surexprimant des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes) est compensée par une augmentation de l'élongation se traduisant par une augmentation de la longueur finale des cellules (Wang *et al.*, 2000 ; De Veylder *et al.*, 2001). Ce phénomène, qualifié de compensation (Tsukaya, 2003 ; Horiguchi *et al.*, 2006) a en outre été observé sur des organismes entiers (plant de tabac, Hemerly *et al.*, 1995). Par ailleurs, une corégulation de ces deux processus cellulaires est suggérée par l'inhibition similaire de l'activité de

division et d'élongation observée en réponse à différents stress : sur l'hypocotyle de soja (stress hydrique, [Meyer & Boyer, 1972](#)), la feuille de maïs (stress hydrique, [Tardieu *et al.*, 2000](#)) ou la feuille de *Lolium perenne* (déficience en phosphore, [Kavanová *et al.*, 2006](#)). Plusieurs hormones ont été identifiées par leur capacité à réguler simultanément ces deux processus cellulaires en premier desquelles on trouve les auxines ([Braun *et al.*, 2008](#) ; [Perrot-Rechenmann, 2010](#)) mais aussi les gibbérellines et les brassinostéroïdes (résumé par [Sablowski & Dornelas, 2013](#)).

Pour interpréter le contrôle de la croissance racinaire, deux cadres conceptuels antagonistes ont été proposées ([Fiorani *et al.*, 2000](#) ; [Beemster *et al.*, 2003](#)). Dans un modèle de régulation systémique, les longueurs des zones de croissance (zone de division et zone d'élongation) sont spécifiées par des contrôles positionnels *e.g.* des gradients hormonaux : le comportement de chaque cellule est déterminé par les signaux que rencontre la cellule dans la zone où elle se trouve. A l'opposé, dans un modèle de régulation cellulaire, chaque cellule embarque au moment de sa formation des signaux dépendant des conditions initiales. Ces signaux prédéterminent l'histoire de vie de chaque cellule (arrêt de la division, durée et intensité de l'élongation). Dans ce cas, ce ne sont pas les gradients spatiaux observés dans l'apex racinaire qui déterminent la croissance de la racine (régulation spatiale) mais plutôt l'accumulation des comportements cellulaires individuels prédéterminés (régulation temporelle). Toutefois, les organismes biologiques sont des systèmes complexes pour lesquels les comportements individuels des cellules donnent naissance à de nouvelles propriétés au niveau d'organisation supérieur : la morphogenèse dépend à la fois de l'information génétique des cellules et d'un contrôle exercé par l'organisme sur ses cellules ([Hamant & Traas, 2010](#)). Les points de vues systémique et cellulaire ne sont donc pas incompatibles et dans ces travaux, nous souhaitons faire la part entre contrôle systémique et contrôle cellulaire de la croissance racinaire chez le peuplier. Pour cela, nous couplons l'analyse spatiale de la croissance et l'analyse des trajectoires de croissance des cellules le long de l'apex. D'un côté, la représentation Eulérienne des données de croissance (*i.e.* exprimée en fonction d'une coordonnée spatiale, à savoir le long de l'apex racinaire) est le point de vue classique utilisé pour quantifier la croissance le long de l'apex. De l'autre, l'utilisation des trajectoires de croissance (point de vue Lagrangien) pour illustrer et analyser la réponse à un stress hydrique est peu commune bien que prometteuse pour comprendre la physiologie de la réponse aux signaux environnementaux ([Merret *et al.*, 2010](#) ; [Silk & Bogeat-Triboulot, 2014](#)). En utilisant ces différentes spécifications de la croissance, nos objectifs sont (i) de mettre en évidence des liens entre différents indicateurs de croissance (longueur de la zone de croissance, taux d'élongation et de division), (ii) de quantifier spatialement et temporellement l'importance relative de la division et de l'élongation cellulaire et (iii) de mettre en parallèle l'activité de production de cellules avec la croissance de la racine. Au-delà de son intérêt en tant que contrainte environnementale, l'utilisation d'une gamme de stress osmotique doit permettre de générer des taux de croissance différents à même de faciliter la mise en évidence de relations entre les différents processus cellulaires impliqués dans la croissance.

La caractérisation de l'activité du RAM (taux de production de cellules et taux de division cellulaire) est dépendantes du profil de vélocité et donc du taux d'élongation. Hélas, la très faible vélocité associée à un faible taux d'élongation au sein du RAM ne facilite pas cette caractérisation de son activité. C'est la raison pour laquelle des résultats contradictoires ont émergés soutenant tantôt un taux de division constant dans le RAM ([Beemster & Baskin, 1998](#)) tantôt un taux variable avec un profil en cloche ([Sacks *et al.*, 1997](#)). Cette incertitude provient indubitablement d'une faible résolution sur la

mesure du profil de vitesse répercutée sur le profil d'élongation (Erickson & Sax, 1956 ; Figure 11) et de là sur le taux de production et de division cellulaire. Encore récemment, les profils théoriques d'élongation et d'activité du RAM oscillent d'un point de vue à l'autre : constant chez Beemster *et al.* (2003 ; Figure 22), variable pour Fiorani & Beemster (2006 ; Figure 15) pour redevenir constant ensuite (Baskin, 2012 ; Figure 21 pour le taux d'élongation). Si l'utilisation de procédures de lissage trop prononcé peut induire un biais méthodologique conduisant à un profil en cloche (Beemster & Baskin, 1998), le manque de données claires et de consensus ne permet pas encore aujourd'hui de trancher en faveur d'un point de vue ou de l'autre au sein du RAM. Les nouvelles technologies numériques et la facilité d'accès à des puissances de calculs élevées décuplent aujourd'hui le potentiel résolutif spatial et temporel de l'analyse cinématique. En reprenant et en améliorant les méthodologies utilisées dans l'équipe d'accueil et ailleurs (compilé par Rymen *et al.*, 2010), nos objectifs sont (i) d'avoir accès à des données de croissance avec une résolution suffisante pour quantifier l'élongation des cellules dans le RAM et (ii) de calculer des profils de flux de cellules, de taux de production de cellules, et de taux de division.

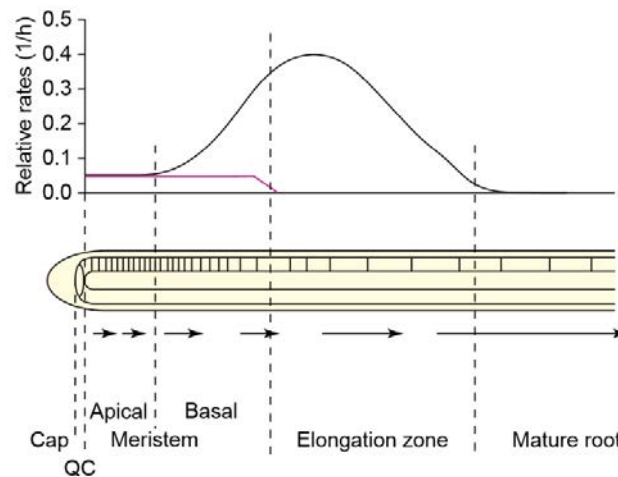


Figure 22 : Courbes théoriques des taux de division (rose) et d'élongation (noir) dans l'apex racinaire. D'après Beemster *et al.*, 2003.

Enfin, la culture en hydroponie que nous utilisons fournit l'énorme avantage de pouvoir observer directement l'apex racinaire tout en autorisant des modifications « à la volée » de son environnement. Force est néanmoins de constater qu'un environnement naturel, même pour une espèce se développant les pieds dans l'eau, est bien loin de ce système de culture. En effet, l'impédance mécanique³ générée par le sol, elle-même hautement corrélée à l'état hydrique de ce sol (Bengough *et al.*, 2011), est une contrainte d'importance absente en culture hydroponique. Nous souhaitons évaluer l'impact de l'impédance mécanique sur la croissance des racines et le comparer à celui généré par un stress osmotique. Pour cela, nous avons mis en place un obstacle générant une impédance mécanique quantifiable dans notre système de culture. Nos objectifs sont (i) de mesurer la force maximale qu'une racine de peuplier en croissance est capable de développer, (ii) de déterminer la dynamique des profils de taux d'élongation élémentaire pendant et après la rencontre avec l'obstacle, (iii) de comprendre les processus mis en jeu lors de la déformation de la racine en réponse à une impédance mécanique et (iv) d'interpréter ces résultats dans le contexte d'un environnement naturel.

³ Mesure de la résistance opposée à un mouvement par une structure soumise à une force donnée.

Matériel et méthodes

La méthodologie de suivi et de caractérisation de la croissance racinaire présentée dans ce chapitre a été développée pendant ma thèse. Toutefois, les parties I.A et I.B sont des protocoles de routine du laboratoire d'accueil. Les parties sur les ajustements de croissance (Chapitre IV) et la microscopie (Chapitre VI) comprennent des outils et méthodes préexistants que j'ai adaptés.

I. Conditions de culture

L'ensemble des expérimentations menées au cours de ma thèse ont été réalisées sur des boutures de peuplier cultivées en hydroponie. L'hydroponie offre l'avantage non négligeable par rapport à une culture en sol de permettre l'observation directe du système racinaire. Les prises de vues en sont considérablement simplifiées. En contrepartie une attention particulière a été accordée au maintien de l'obscurité au niveau des systèmes racinaires. Une chambre noire dépourvue d'entrée de lumière naturelle a été aménagée et utilisée à la fois pour la culture et pour le phénotypage de la croissance.

A. Milieu de culture

La solution utilisée pour la culture en hydroponie est une solution nutritive de Hoagland enrichie en phosphates. Elle contient l'ensemble des macro- et micronutriments essentiels à la croissance des végétaux en concentrations non limitantes (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition de la solution de Hoagland enrichie utilisée pour les expérimentations.

Sel	Formule	Concentration (mM)
Nitrate de potassium	KNO ₃	2,5
Dihydrogénophosphate de potassium	KH ₂ PO ₄	0,8
Sulphate de magnésium heptahydraté	MgSO ₄ , 7H ₂ O	1
Nitrate de calcium tétrahydraté	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	2,3
Acide borique	H ₃ BO ₃	23 × 10 ⁻³
Chlorure de manganèse tétrahydraté	MnCl ₂ , 4H ₂ O	4,6 × 10 ⁻³
Sulphate de zinc heptahydraté	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,4 × 10 ⁻³
Molybdate d'ammonium tétrahydraté	H ₂₄ Mo ₇ N ₆ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,03 × 10 ⁻³
Sulphate de cuivre (II) pentahydraté	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,18 × 10 ⁻³
Acide éthylènediaminetétraacétique ferrique de sodium	FeNaEDTA	20 × 10 ⁻³

La solution est préparée en utilisant de l'eau déminéralisée dont le pH est ensuite ajusté à 5,8 en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium à 1M. Le pH de la solution est modifié par l'activité biologique et notamment les échanges d'ions au niveau des racines. Un suivi de l'évolution du pH sur plusieurs jours montre qu'en l'absence de boutures, le pH est stable (Figure 23). Au contraire, en présence de boutures, le pH de la solution augmente régulièrement (pente de régression linéaire : 0,145 jour⁻¹ ; *p-value* < 0,001). Par conséquent, pour toutes les expériences menées pendant ma thèse, les solutions de culture ont été renouvelées tous les 3-4 jours.

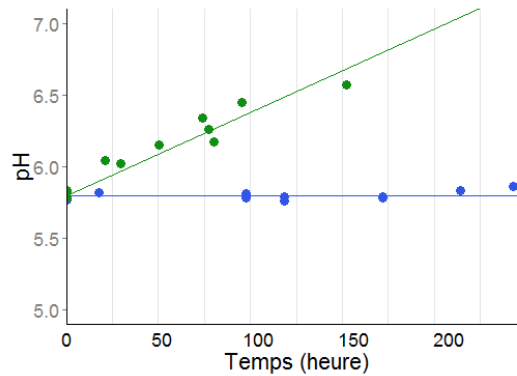


Figure 23: Evolution du pH au cours du temps pour des solutions seules (en bleu) ou contenant des boutures (en vert). Les lignes verticales en gris clair indiquent les jours.

B. Préparation des boutures et mise en culture

Les boutures utilisées proviennent de la pépinière expérimentale de Guéméné-Penfao. Elles ont été commandées tous les ans à la fin de l'hiver puis stockées en chambre froide à 0°C dans des sacs hermétiques. Avant d'être installées dans les bacs de culture, les boutures sont rincées à l'eau puis coupées au sécateur de façon à obtenir des segments d'une longueur de 15cm environ. Les bourgeons sont retirés pour prévenir l'apparition et la croissance de tiges feuillées au cours des suivis de croissance racinaire (Figure 24). En effet, la croissance racinaire est connue pour suivre des cycles journaliers sous dépendance partielle des flux de carbohydrates produits par la photosynthèse des parties aériennes le jour (Ruts *et al.*, 2012).

Les boutures fraîchement coupées sont installées sur les couvercles des bacs de culture via des dispositifs souples en mousse (bandes, bouchons percés). Le système de fixation offre le triple avantage de tenir fermement les boutures tout en étant étanche à la lumière et à l'eau. Les boutures sont facilement extraites du dispositif lors de leur positionnement dans les cuves de suivi de croissance sans casser les racines ni les toucher. Le couvercle contenant les boutures est ensuite placé dans le bac de culture et un bulleur est ajouté dans la solution nutritive. Les ouvertures non utilisées sont closes pour éviter les entrées de lumière (Figure 25).

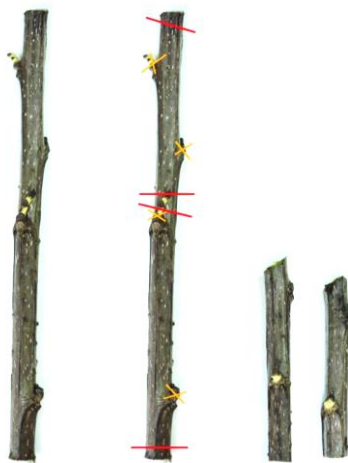


Figure 24 : Bouture de peuplier avant mise en culture. Chaque bouture est coupée en deux et les extrémités sont recoupées (traits rouges). Les bourgeons sont retirés également (croix orange).



Figure 25 : Matériel utilisé pour les cultures hydroponiques.

La température et l'humidité atmosphérique ont été mesurées en continu dans la chambre noire à l'aide d'un enregistreur (Voltcraft DL-180THP). Sur l'ensemble des expérimentations, la température de l'air est restée constante autour de $23,7^{\circ}\text{C} \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ et l'humidité atmosphérique autour de $60\% \pm 4\%$. L'ensemble du matériel utilisé est lavé à l'eau chaude additionnée de javel puis abondamment rincé après chaque utilisation. Les bandes et bouchons sont uniquement rincés à l'eau.

C. Stockage des boutures

Les racines adventives croissent à partir des réserves stockées dans la bouture. Le vieillissement des boutures est un phénomène à prendre en compte dans les expériences. Au bout de six mois de stockage, les réserves des boutures sont entamées, ce qui peut impacter la production de racines et/ou la vitesse de croissance des racines. La déshydratation des boutures au niveau des extrémités coupées ainsi que l'entrée potentielle de pathogènes peuvent également avoir un impact. Pour limiter le vieillissement des boutures, nous avons protégé les boutures stockées en encapuchonnant les extrémités avec de la paraffine. Cette protection a pour objectif de limiter le dessèchement par les extrémités et l'entrée de pathogènes. Après huit mois de stockage à 0°C , les boutures protégées par de la paraffine ont été mises en cultures. Le nombre de racines produites et leur vitesse de croissance moyenne mesurée sur plusieurs jours ont été comparés entre boutures stockées avec ou sans paraffine pendant la même période (Figure 26).

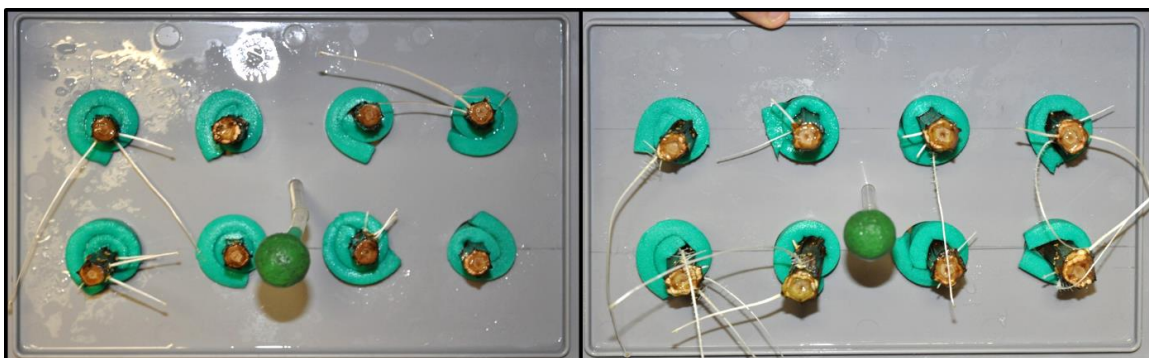


Figure 26 : Racines produites par des boutures stockées sans ou avec capuchons de paraffine après 14 jours de culture (respectivement gauche et droite).

Après deux semaines de culture, la moitié des boutures stockées sans paraffine n'ont pas de racines (Figure 26). Ainsi, le lot de boutures stockées avec de la paraffine a produit presque deux fois plus de racines (24) que le lot de boutures stockées sans paraffine (13, Figure 27). De plus, la moitié des racines de ce lot ont stoppé leur croissance avant d'atteindre 3cm de longueur. La vitesse de croissance moyenne de l'autre moitié est inférieure de 27% à celle du lot stocké avec paraffine. La différence n'est pas significative suite à un faible nombre de réplicas pour le lot stocké sans paraffine (p -value = 0.125, Figure 27).

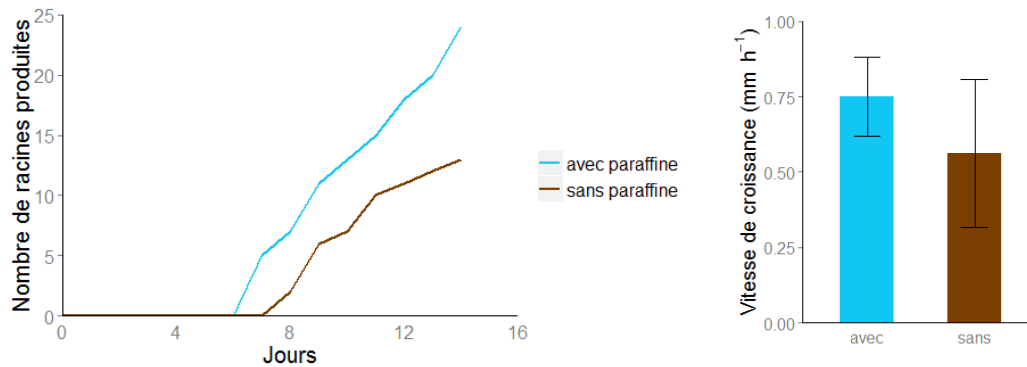


Figure 27 : Impact du vieillissement des boutures. Cumul de racines produites depuis la mise en culture (gauche) et vitesse de croissance des racines produites (droite, barres d'erreur = intervalles de confiance à 95%).

En conclusion, des boutures stockées pendant plusieurs mois avec peu de protection sur les extrémités coupées produisent moins de racines, qui poussent moins vite ou en tout cas moins longtemps. Toutefois, la paraffine n'empêche pas la consommation de carbone par la respiration de maintenance. Ainsi, même si le vieillissement des boutures paraffinées est limité, il est vraisemblablement toujours présent. Pour contrôler ce biais potentiel, les différentes modalités de traitement sont réparties équitablement au cours du temps dans le plan d'expérimentation.

II. Suivi de croissance sous infrarouge

A. Prise de vue sous infrarouge

La prise de vues séquentielles pour réaliser une analyse cinématique de la croissance racinaire nécessite un besoin de marques identifiables d'une photographie à l'autre. Historiquement, pour générer ces marques, la plupart des études utilisent soit de l'encre (Sharp *et al.*, 1988) soit des particules de graphites (Merret *et al.*, 2010). Bien que l'on puisse trouver des exemples ingénieux d'utilisation de ces produits (Wang *et al.*, 2011, qui imprime des motifs sur des feuilles à partir de la technologie des imprimantes à jet d'encre), leur usage pose deux contraintes majeures. D'abord, les marques posées au début du suivi s'espacent au cours du temps, induisant une perte de résolution rapide après seulement quelques heures de croissance. Ensuite, la mise en place de ces marques induit nécessairement un contact avec l'organe phénotypé (racine, feuille) à même d'impacter plus ou moins longuement la croissance (réponse thigmo morphogénétique).

Dans le but d'analyser finement la croissance racinaire, y compris en réponse à un stress osmotique, il était nécessaire de mettre en place un protocole de suivi dans lequel ni le suivi de croissance ni l'application du stress ne nécessite de manipulation de la racine. L'option choisie a été de développer un suivi sous infrarouge proche. Nous avons importé cette technologie en collaboration avec

Alexis Peaucelle (Université Diderot, Paris) et adapté son utilisation d'une boîte de pétri à notre système de culture hydroponique. Deux lampes à diodes électroluminescentes sont utilisées lors des expérimentations. L'intensité et le spectre d'éclairage de chacune sont similaires avec un niveau d'éclairage très faible et maximal autour de 840-850nm (Figure 28). La lumière infrarouge proche présente le double avantage de ne pas être détectée par la racine tout en générant de nombreuses marques le long de la racine (Figure 29). Ces marques proviennent avant tout d'irrégularités de la surface de la racine (creux et bosses). La présence d'une autre information issue de l'infrarouge, non utilisée pour les suivis de croissance mais donnant une zone systématique de forte brillance au sein du RAM sera discutée dans un chapitre ultérieur (Chapitre II).

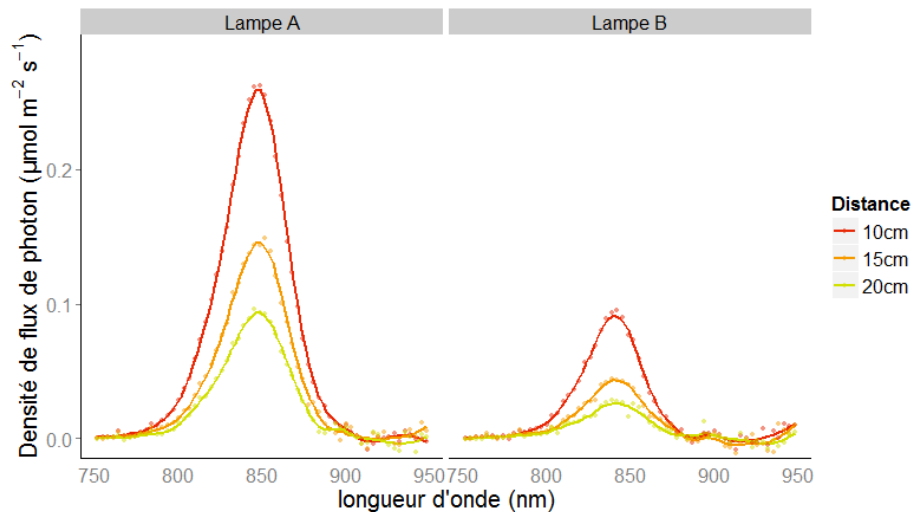


Figure 28 : Densité de flux de photons en fonction de la longueur d'onde pour les deux lampes utilisées placées à différentes distance d'un spectrophotomètre (UniSpec Spectral Analysis System, PP Systems serial N°9722).

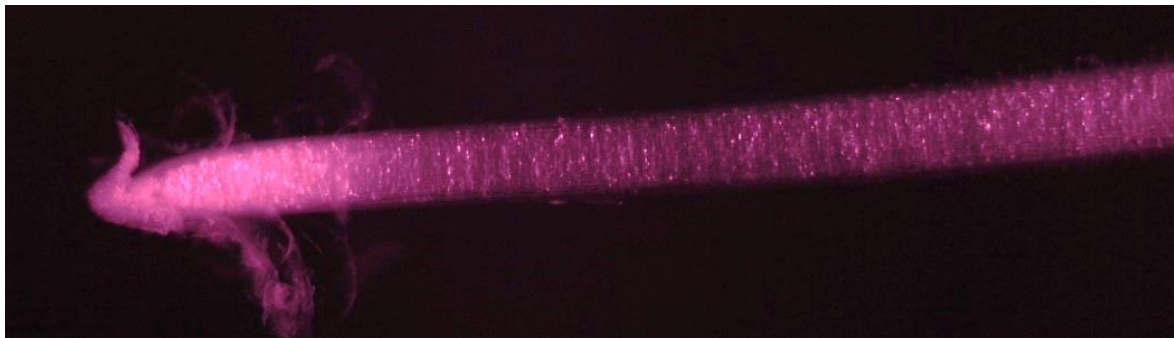


Figure 29 : Apex racinaire sous lumière infrarouge proche.

B. Dispositif expérimental de phénotypage de la croissance

Lorsqu'une bouture porte une racine d'au moins deux à trois centimètres de long, elle est délicatement placée dans une cuve de suivi de croissance en plexiglas®. La longueur minimale de la racine considérée, fixée à deux centimètres, permet d'éviter de prendre en considération des racines juvéniles dont la vitesse de croissance n'a pas encore atteint son palier maximum. La cuve de suivi est reliée à un bac de solution de culture aérée muni d'une pompe qui maintient un flux d'eau constant (Figure 30).

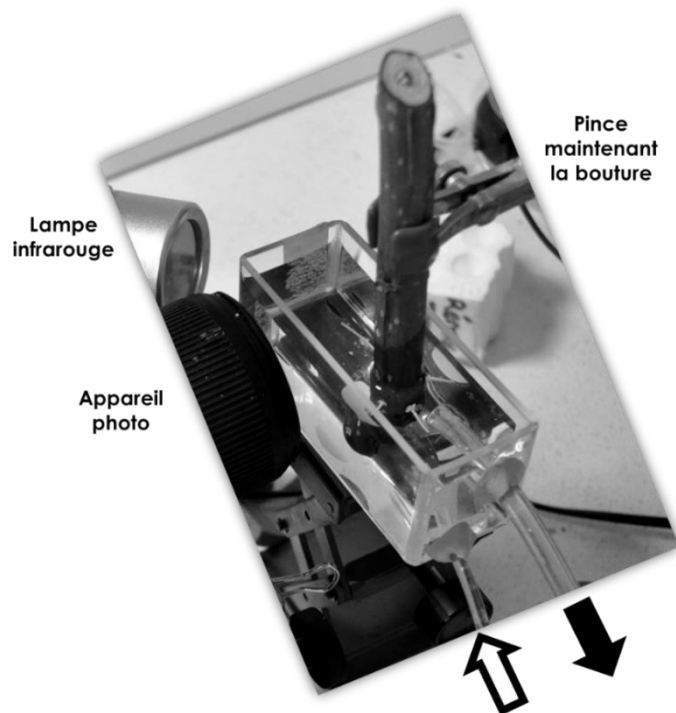


Figure 30 : Cuve de suivi de croissance contenant une bouture. Les flèches du bas indiquent les flux d'entrée et de sortie d'eau.

Les prises de vues sont effectuées avec un appareil photo numérique défiltré (Nikon D80) muni d'un objectif macro (Nikkor 60 mm) et de 56 mm de bague allonge (Kenko). La mise au point est effectuée à distance minimale (autour de 102.5 mm) en déplaçant l'appareil sur un rail optique (Figure 31 ; Figure 32). Dans cette configuration, le grandissement obtenu est légèrement supérieur à 1,4 ce qui correspond à une échelle de 327 pixels mm^{-1} sur les photos. Afin d'automatiser les prises de vues toutes les trois minutes, l'appareil est contrôlé par un ordinateur via le logiciel constructeur dédié (Camera Control Pro v2.0).



Figure 31 : Dispositif de prise de vue incluant la cuve de suivi, la lampe infrarouge et l'appareil photo numérique fixé sur rail optique. En arrière-plan, une deuxième cuve et un deuxième appareil pour suivre plusieurs un autre racine en parallèle.

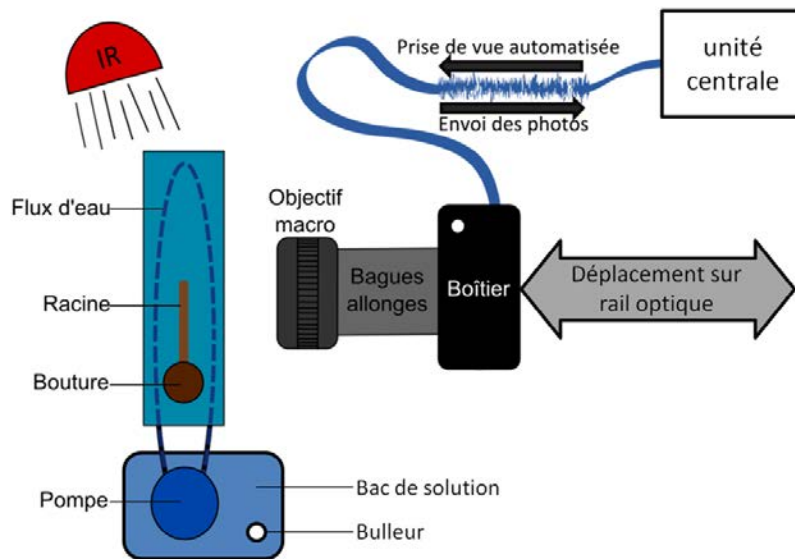


Figure 32 : Schéma du dispositif expérimental de prise de vues, vu du ciel.

C. Application du stress osmotique

Le déficit hydrique est mimé en hydroponie via l'application d'un stress osmotique. Chaque cuve de suivi est connectée à deux bacs de solution : une solution de Hoagland (témoin) et une solution de Hoagland supplémentée avec du polyéthylène glycol (PEG 4000, Merck chemicals). L'application du stress osmotique se fait en modifiant l'arrivée d'eau du bac témoin vers le bac PEG (Figure 33). De cette manière, l'application du stress se fait sans manipuler la racine et sans mettre en pause le suivi de croissance. Des suivis de la pression osmotique montrent que le remplacement de la solution dans la cuve de suivi prend entre 3 et 6 minutes, soit le temps séparant la prise de 2-3 photos.

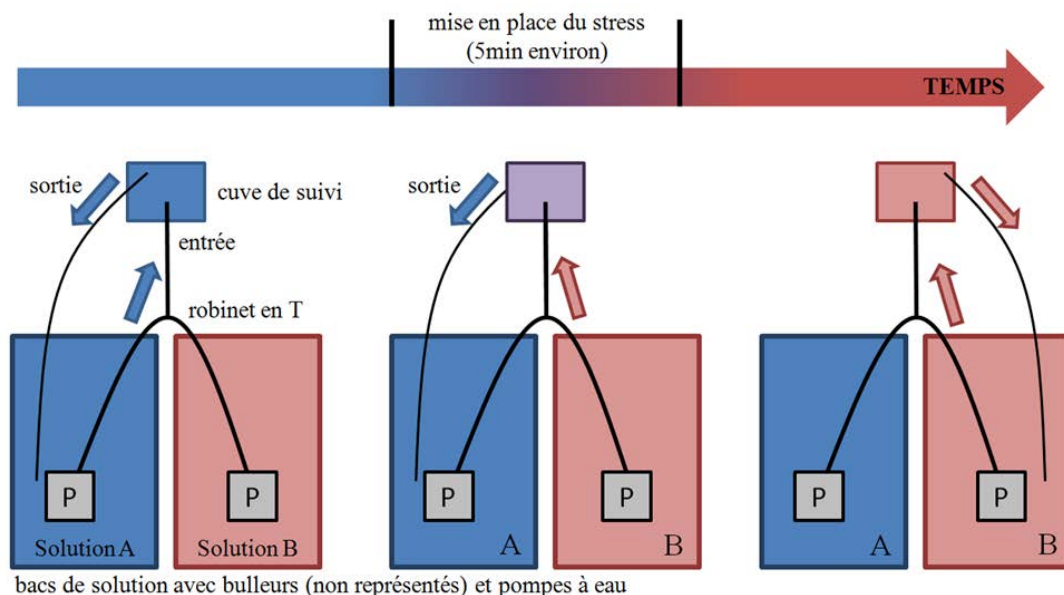


Figure 33 : Représentation schématique du processus de remplacement dans la cuve de suivi d'une solution A par une solution B. A gauche, état initial du système avec une cuve de suivi remplie de solution A, et suivi de croissance en cours. Le bac contenant la solution B est raccordé au robinet en T situé à la sortie des pompes. En changeant l'arrivée d'eau dans la cuve de suivi, la solution B remplace progressivement la solution A. Après environ 5min, la cuve de suivi contient une solution B homogène et le trop plein peut alors être évacué dans le bac B afin de refermer le circuit (à droite).

Nous avons appliqué trois concentrations différentes de PEG de 100, 130, 160g PEG L⁻¹ générant respectivement des niveaux de stress osmotique faibles (0,21MPa), modérés (0,27MPa) et élevés (0,37MPa), déterminés avec un osmomètre à pression de vapeur (Wescor 5500). Le niveau de pression osmotique de la solution de Hoagland utilisée pour les témoins est de 0,04MPa.

La présence d'éventuelles conditions hypoxiques a été contrôlée dans les cuves de suivi avec un oxymètre (HQ40d, Hach®). La concentration en oxygène dissous dans la cuve de suivi est de plus de 8,50mg L⁻¹ d'oxygène dissous y compris pour des concentrations élevées en PEG, soit un taux de saturation proche de 100% à 23-24°C. Ces valeurs témoignent d'une absence d'hypoxie sur l'ensemble des modalités de stress osmotique considérées.

III. Prétraitement des images et analyse de la croissance

Pendant le suivi de croissance racinaire, des prises de vues sont effectuées toutes les trois minutes, pendant plusieurs heures pour chaque racine. Le nombre total de prises de vues effectuées pendant ma thèse dépasse plusieurs dizaines de milliers. Afin de ne pas être débordé et de minimiser les temps de calcul des étapes subséquentes, j'ai adapté des outils de traitements d'images plus conventionnels pour prétraiter les images.

Le prétraitement des images a pour objectifs (i) de minimiser le poids des images tout en conservant la meilleure qualité possible et (ii) d'améliorer le contraste des marques et donc la qualité des analyses cinématique tout en minimisant les temps de calcul. Le premier objectif est atteint en recadrant les images et en les convertissant d'un format de sortie brut (« .nef » chez le constructeur Nikon) vers un format jpeg. La qualité des suivis est renforcée en augmentant les contrastes locaux, ce qui fait mieux ressortir les tâches éparpillées sur la surface de la racine. Enfin, les temps de calcul sont minimisés en convertissant les images en noir et blanc, ce qui permet de travailler ensuite sur un seul canal couleur au lieu de trois (canaux RVB). L'ensemble des opérations est réalisé à l'aide d'un logiciel libre (RawTherapee, v3.0) qui présente le double avantage d'être capable de lire des fichiers nef et de faire du traitement d'image par lot (« *batch processing* »). Le résultat est illustré sur la Figure 34.

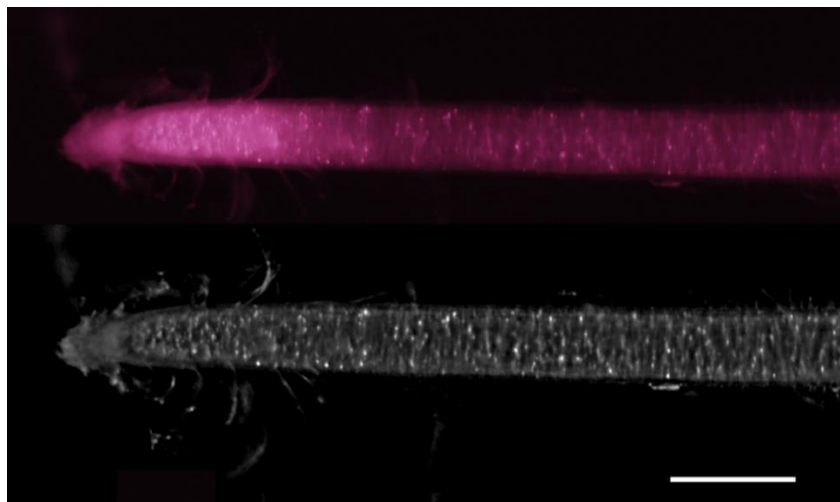


Figure 34 : Comparaison d'une photo de racine recadrée avant (haut, poids=1,900Mo) et après (bas, poids=0,148Mo) prétraitement. La barre d'échelle indique 1 millimètre.

Les images prétraitées sont ensuite analysées avec Kineroot, un utilitaire dédié à l'analyse cinématique de la croissance racinaire (Basu *et al.*, 2007, Matlab R2011b, v7.13.0.564). Des points sont placés le long de l'axe de la racine et un champ de recherche entre deux images consécutives est défini. Le logiciel retrouve la position des points dans l'image suivante en analysant les patrons d'intensité de pixels autour du point recherché et en retrouvant la position de ces patrons dans l'image suivante (Figure 35). Ce type d'analyse d'image est connu sous le nom de « *particle image velocimetry* » (PIV).

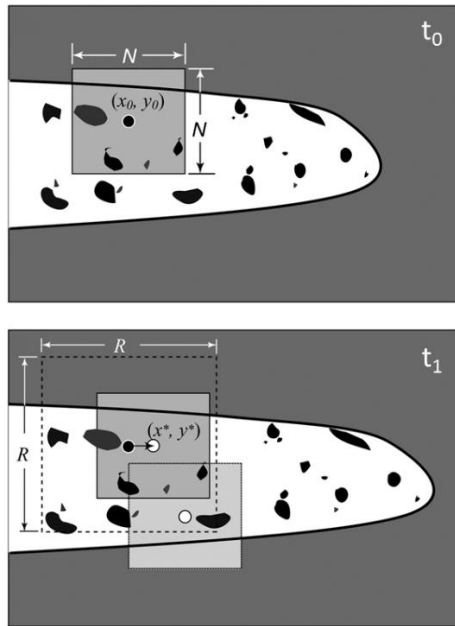


Figure 35 : Recherche de patron sous Kineroot. Au temps t_0 , un point x de coordonnées (x_0, y_0) est défini au centre d'un patron carré de largeur N pixels. Le point x est recherché au temps t_1 dans un champ de recherche de côté R pixels. Le processus est réitéré pour les pas de temps suivants. Adapté d'après Basu *et al.*, 2007.

IV. Ajustement des profils de vitesse et obtention des indicateurs de croissance

En fonction de la racine ou du temps considéré, les profils de vitesse (*i.e.* expriment la vitesse de déplacement des points le long de l'apex racinaire) obtenus sont sigmoïdaux, bilinéaires, ou bien plus généralement le résultat d'un mélange variable de ces deux types de courbes. Afin d'être le plus fidèle possible aux données mesurées, j'ai ajusté la fonction composite définie et décrite par Peters and Baskin (2006). Par souci de clarté, l'équation de cette fonction n'est pas rappelée dans ce manuscrit. Cette fonction est suffisamment souple pour s'ajuster aussi bien à des profils bilinéaires que sigmoïdaux tout en donnant des ajustements plus proches des mesures expérimentales que des équations de croissance plus classiques (*e.g.* équations de Richard ou Gompertz). Les ajustements non linéaires sont réalisés sous R à l'aide du package *nls* (Bates & Watts, 1988 ; Bates & Chambers, 1992). Les valeurs de départ des paramètres sont déterminées par recuit simulé (voir Vialet-Chabrand, 2013). Un exemple d'ajustement est présenté sur la Figure 36.

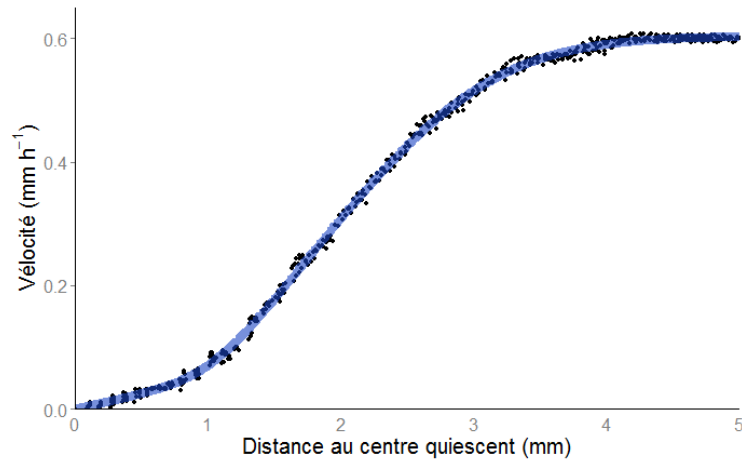


Figure 36 : Profil de vitesse obtenu à partir de l'équation de Peters. Les points noirs représentent les données brutes mesurées pendant 0,2h. La courbe bleue est le résultat de l'ajustement.

La souplesse de l'équation de Peters se paye néanmoins au niveau du nombre de paramètres puisque l'équation en compte six (Figure 37). Pour faire face à ce nombre élevé de paramètres, chaque ajustement est réalisé sur un regroupement de quatre profils de vitesse. L'augmentation du nombre de points utilisés pour les ajustements améliore la convergence du modèle. Un ajustement décrit donc la croissance de la racine pendant 12 minutes (0,2 heure).

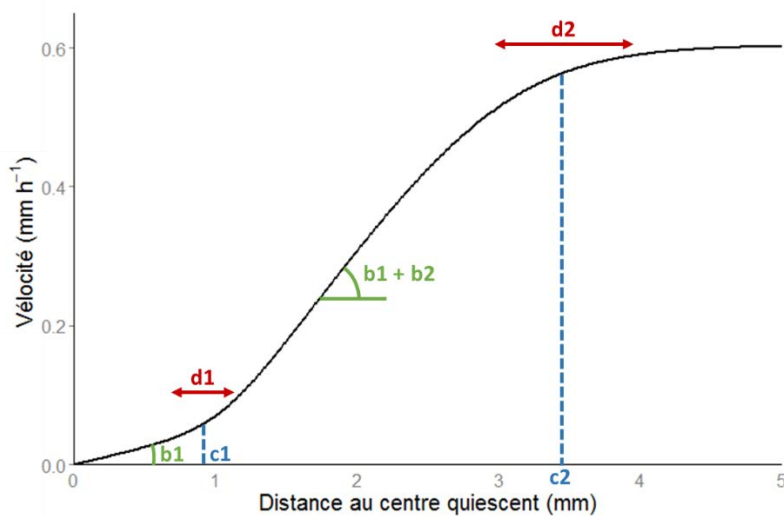


Figure 37 : Paramètres de l'équation de croissance. b_1 et b_2 sont les pentes des domaines linéaires. c_1 et c_2 sont les positions des points d'inflexion de la courbe. d_1 et d_2 caractérisent l'amplitude des inflexions entre les domaines linéaires. Pour plus de détails, voir [Peters & Baskin \(2006\)](#).

L'étape d'ajustement d'une courbe de croissance n'est pas anodine. Elle permet de transformer les données discontinues du suivi en un profil continu le long de la racine. Connaissant l'équation de la courbe et de sa dérivée, il est bien plus aisé et précis d'obtenir les profils de taux d'élongation élémentaire. De plus l'estimation de la vitesse maximale de la racine (sa vitesse de croissance) ou de la longueur de la zone de croissance est aussi facilitée.

Comme présentés sur la Figure 38, les indicateurs de croissance⁴ utilisés pour comparer les différents traitements entre eux sont :

- La vitesse de croissance de la racine (V_{\max}), définie comme l'asymptote du profil de vitesse en $+\infty$.
- Le taux d'élongation élémentaire maximal (EER_{\max}), définie comme étant la valeur maximale du profil d'élongation élémentaire.
- La taille de la zone de croissance (ZC), définie comme étant la distance entre le centre quiescent et le point où la vitesse atteint 94% de la vitesse maximale. La valeur de 94% a été choisie comme compromis englobant la quasi-totalité de la croissance (-6%) sans tendre vers l'infini sur certains profils de courbe particuliers.

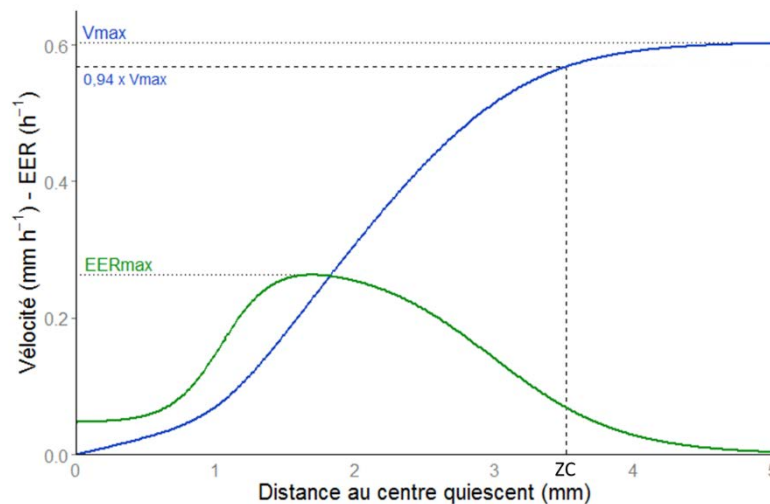


Figure 38 : Indicateurs de croissance déterminés à partir des profils de vitesse et de taux d'élongation élémentaire (EER). ZC : Zone de croissance.

V. Phénotypage de la croissance en 3 dimensions

Lors de la rencontre d'un obstacle opposant une impédance mécanique⁵ élevée, l'apex racinaire se courbe après un court laps de temps, on parle alors de flambement. L'orientation et l'intensité de ce flambement dans un espace en trois dimensions ne peuvent pas être quantifiées à partir d'un unique point de vue. Pour mesurer la courbure et la déformation de la racine, un suivi de croissance en trois dimensions est réalisé avec deux appareils photos placés orthogonalement l'un à l'autre. L'un donne une vue de côté similaire à celle utilisée dans les expériences précédemment décrites, l'autre une vue zénithale de la racine (Figure 39).

Les deux appareils photos utilisés sont des Nikon D5200, garantissant une meilleure résolution que les D80 précédemment utilisés. Cela permet de conserver un grandissement suffisant sans bague allonge pour les suivis de croissance. Les objectifs sont placés plus loin de la racine, laissant de l'espace pour la mise en place d'un obstacle. Le reste du matériel optique utilisé est identique à celui présenté ci-avant (objectif, rail optique, cuve de suivi, etc).

⁴ Le terme *indicateur* de croissance sera ici préféré au terme *paramètre* pour éviter toute confusion avec les paramètres de l'équation de Peters et Baskin.

⁵ Mesure de la résistance opposée à un mouvement par une structure soumise à une force donnée.

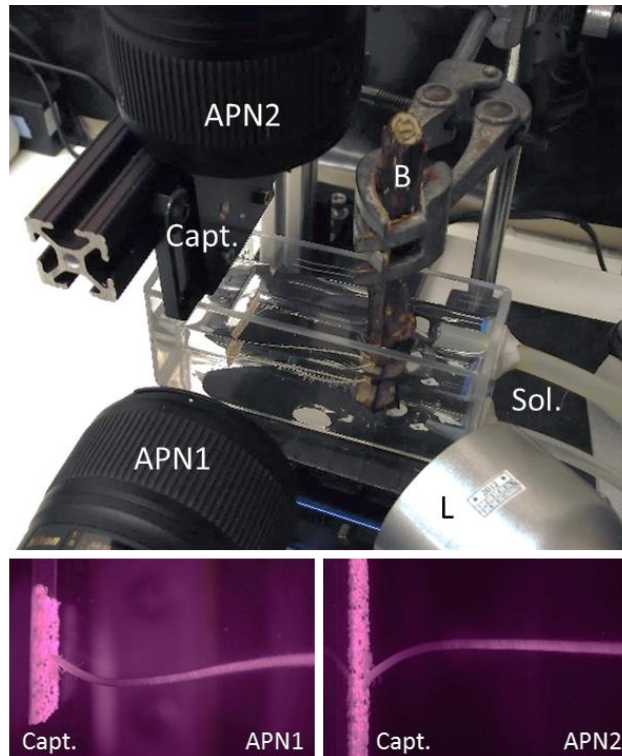


Figure 39 : Système de suivi de croissance en 3 dimensions. La racine est photographiée par deux appareils photo numériques. Vous pouvez également apercevoir l'obstacle qui joue le rôle de capteur de force (cf. Chapitre IV.A). Les photos infrarouges (bas) montrent les points de vue de chaque appareil sur une même racine, qui sont ensuite compilées en un unique suivi 3D. APN : appareil photo numérique ; B : bouture ; Capt : capteur ; L : lampe IR ; Sol : solution nutritive.

Les deux jeux de photos séquentielles sont analysés indépendamment avec Kineroot (Basu *et al.*, 2007) comme précédemment (cf Chapitre III). Les deux jeux de données, obtenus dans les plans spatiaux (XY) et (XZ), partagent un axe commun (X). Ce dernier est utilisé pour fusionner les données et associer à chaque point des coordonnées spatiales (x,y,z). Les coordonnées tridimensionnelles le long de l'axe longitudinal de la racine sont utilisées pour calculer la croissance et la déformation sur cet axe.

Pour chaque point i suivi dans l'espace (XYZ), un vecteur de vitesse est calculé. Ce vecteur peut ensuite être projeté sur n'importe quel axe d'intérêt. L'axe longitudinal de la racine, défini comme étant le vecteur $(i;i+1)$, a été choisi pour projeter le vecteur de vitesse. Nous récupérons ainsi la composante croissance du déplacement du point i le long de cet axe. La somme des projections de chaque point en s'éloignant du centre quiescent donne le profil de vitesse de la racine. Le grandissement plus faible que sur les expérimentations précédentes et une perte de précision au moment de la fusion des deux points de vue conduisent à un niveau de bruit plus élevé. En conséquence, le profil de vitesse n'est pas ajusté avec l'équation de Peters & Baskin en raison de difficultés d'ajustement (cf. Chapitre IV). Une dérivée 3 points décrite par Erickson (1976) est utilisée pour obtenir les taux d'élongation à partir du profil de vitesse. Cette méthodologie minimise le bruit observé mais implique une perte de données d'élongation aux bornes du profil. La courbure relative de l'axe principal est calculée pour chaque point i en mesurant l'angle entre les segments $[i;i+2]$ et $[i;i-2]$. Pour chaque racine et chaque pas de temps, ces différents paramètres de croissance peuvent être représentés et analysés en trois dimensions le long de l'apex racinaire.

VI. Obtention des profils de longueur de cellules

Les profils de longueur de cellule sont déterminés par analyse histologique à partir de coupes longitudinales semi-fines des apex racinaires selon le protocole décrit ci-dessous.

A. Inclusion des apex racinaires

Une fois le suivi de croissance terminé, l'apex racinaire est immédiatement récolté et placé dans une solution de fixation pendant 30 minutes sous vide partiel puis stocké à 4°C afin de limiter toute détérioration ou déformation de l'apex. La solution de fixation utilisée est une solution tampon phosphate salin (PBS, Tableau 2) contenant du paraformaldéhyde (3,5%) et du glutaraldéhyde (0,5%). Nous avons vérifié l'impact de l'étape de fixation sur la morphologie de la racine. La fixation induit une contraction en diamètre non négligeable de 5 à 10% après plus d'une journée dans la solution de fixation. La contraction en longueur est beaucoup plus faible et reste inférieure à 1,5% ce qui garantit la concordance des mesures subséquentes aux profils *in vivo* théoriques sans besoin de correction.

Tableau 2 : Composition de la solution de PBS (Sambrook et al., 1989).

Sel	Formule	Concentration (mM)
Chlorure de sodium	NaCl	136,9
Dihydrogénophosphate de potassium	KH ₂ PO ₄	1,76
Chlorure de potassium	KCl	2,68
Phosphate de sodium dibasique	Na ₂ HPO ₄	8,09

Après quelques semaines de stockage, les échantillons fixés sont rincés à l'eau distillée puis déshydratés via des bains de 30 minutes dans des solutions de concentration croissante en éthanol (30%, 50%, 70%, 80%, 95% et 100%). Les apex sont ensuite infiltrés puis inclus dans une résine à durcissement rapide en suivant les instructions du fabricant (Technovit® 7100). Des coupes longitudinales de 5µm sont réalisées avec un microtome rotatif (Microm HM355S, Thermo Scientific) équipé d'un couteau en carbure de tungstène. Les coupes sont séchées sur une plaque chauffante pendant quelques minutes (40-45°C), colorées au bleu de toluidine 0,1% pendant quelques secondes, rincées et finalement placées entre lame et lamelle avec une solution de montage Eukitt® (Figure 40).

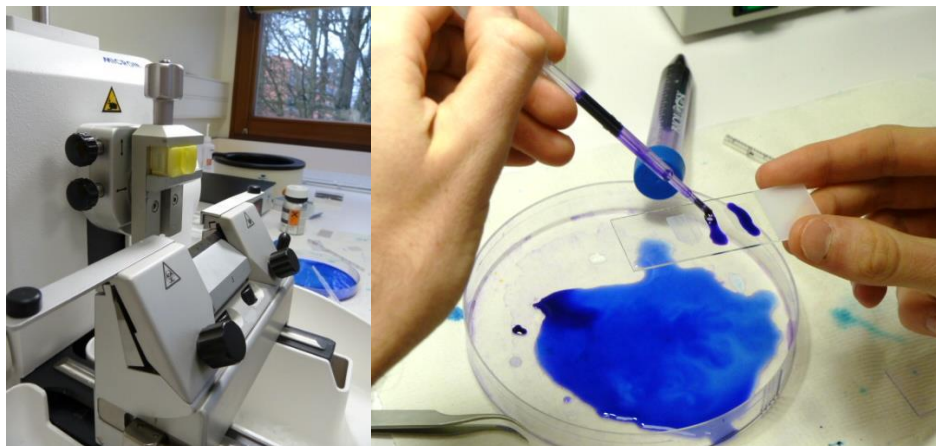


Figure 40 : Microtome rotatif avec un échantillon de racine et le couteau en carbure de tungstène dessous (gauche). Etape de coloration des coupes au bleu de toluidine 0,1% (droite).

Concernant la coloration, j'ai mené un certain nombre d'essais avec des colorants très différents afin d'identifier lequel serait le plus idoine pour les mesures de longueur de cellule. Le colorant recherché doit être le plus spécifique possible aux parois végétales. Les observations, consignées dans le Tableau 3, font ressortir deux colorants bleus : le bleu de méthylène et le bleu de toluidine. Ce dernier a été utilisé pour colorer les coupes longitudinales de racines. Il fournit une coloration prononcée des parois, mais aussi du cytosol dans une moindre mesure. Les autres colorants testés n'ont pas été retenus soit à cause d'une coloration inexistante ou trop faible, soit à cause d'une dégradation de l'échantillon ou d'une toxicité potentielle pour l'utilisateur.

Tableau 3 : Résumé des colorants testés sur les coupes longitudinales de racines.

Colorant	Concentration massique	Solvant	Observations
Bleu astral	≤ 1%	eau	Coloration : parois Coloration très peu prononcée
Bleu de méthylène	≤ 0,1%	eau	Coloration : parois, cytosol, noyaux
Bleu de toluidine	≤ 0,5%	eau	Coloration : parois, cytosol, noyaux
Carmin acétique	0,5%	acide acétique:eau (9:11)	Coloration : 0 Très toxique
Hélianthine	≤ 0,5%	eau	Disloque la coupe
<i>Lignin Pink</i>	1%	eau	Coloration : 0
Noir eriochrome T	0,8%	éthanol 95%	L'éthanol flétrit la coupe
Pyronin G	0,5%	eau	Coloration : parois, résine (!) Coloration très peu prononcée
Rouge acridine	0,5%	eau	Coloration importante de la résine
Rouge de ruthénium	0,5%	eau	Coloration : coiffe et noyaux
Rouge soudan III	0,5%	éthanol 70%	L'éthanol flétrit la coupe
Safranine	0,5%	eau	Coloration importante de la résine
Vert d'iode	1%	Eau	Coloration : parois, cytosol, noyaux Coloration peu prononcé

B. Mesures de la longueur des cellules

Les coupes longitudinales sont photographiées sous microscope avec un grandissement $\times 100$ (camera Leica DFC420C, Leica Microsystems). L'assemblage des photos est ensuite effectué à l'aide d'un logiciel dédié à la réalisation de panoramas (Autopano Giga, Kolor, v2.6.4). Le résultat est visible sur la Figure 41.

Pour mesurer les profils de longueur de cellule, les photos sont traitées avec un logiciel d'analyse d'image, Fiji ([Schindelin et al., 2012](#)). La longueur de chaque cellule est déterminée de manière semi-automatique en utilisant une macro que j'ai écrite à cet effet. Cette macro calcule la distance entre deux parois transversales consécutives. Pour cela, l'utilisateur trace une ligne coupant une cellule en deux dans le sens de sa longueur. La macro détermine l'intensité des couleurs le long de cette ligne. Les parois, qui sont très sombres, ressortent comme étant des pics sur le profil de couleur (Figure 42). La distance entre deux pics est utilisée comme proxy de la longueur d'une cellule. La macro ne considère que les pics les plus externes du profil tracé par l'utilisateur, ce qui permet de ne pas tenir compte du noyau ou d'autres impuretés qui sont parfois présentes.



Figure 41 : Coupe longitudinale d'apex racinaire de peuplier obtenue après assemblage des différentes photographies prises sous microscope. Coloration au bleu de toluidine.

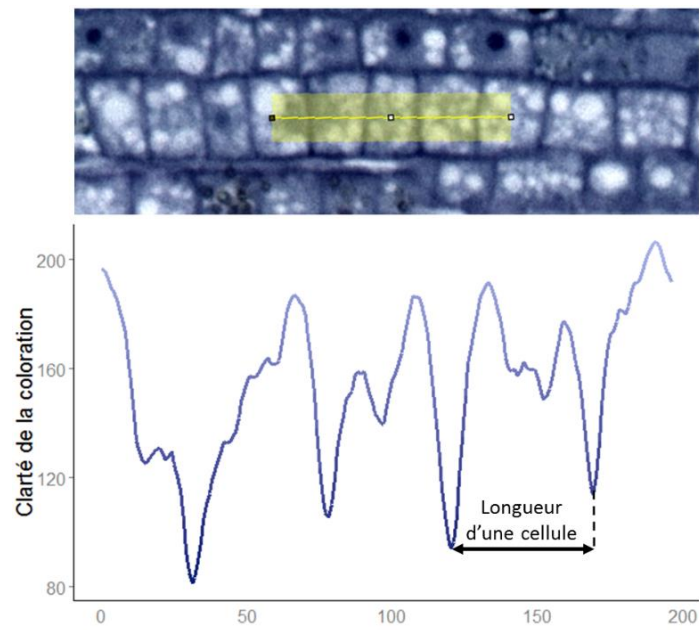


Figure 42 : Mesure de longueur de cellules sous Fiji en utilisant la coloration des parois. Haut : zoom sur la coupe longitudinale avec une ligne droite épaisse coupant plusieurs cellules. Bas : Figure de l'intensité des couleurs le long de la ligne tracée au-dessus. La clarté d'une couleur est codée sur 1 octet et s'étend donc de 0 (noir) à 255 (blanc). La distance entre deux pics de coloration maximale est utilisée comme proxy de la longueur d'une cellule.

Résultats et discussion

I. Spécification Eulérienne de la croissance

A. Variations inter-individus de la croissance en condition témoin

Un suivi de croissance par photographie séquentielle sous infrarouge a été effectué pour 41 racines de peuplier cv. Soligo pendant un temps moyen de 2h30, avant éventuellement l'application d'un stress osmotique. Les profils de vélocité et de taux d'élongation élémentaire (EER) ont été déterminés toutes les 12 minutes. Les indicateurs de croissance (V_{\max} : vitesse de croissance ; ZC : longueur de la zone de croissance ; EER_{\max} : taux maximal d'élongation élémentaire) sont directement mesurés sur ces profils (Figure 38). Pour chaque racine, une valeur moyenne de chaque indicateur a été calculée pour l'ensemble de la période de suivi.

Nous observons une importante hétérogénéité dans la population mesurée. La vitesse de croissance varie de 0,2 mm h⁻¹ à 1 mm h⁻¹ (Figure 43 gauche). De larges variations sont également visibles pour la longueur de la zone de croissance qui s'étend de 1 à 7 mm (Figure 43 milieu) et EER_{\max} , qui varie entre 0,15 et 0,35 h⁻¹ (Figure 43 droite).

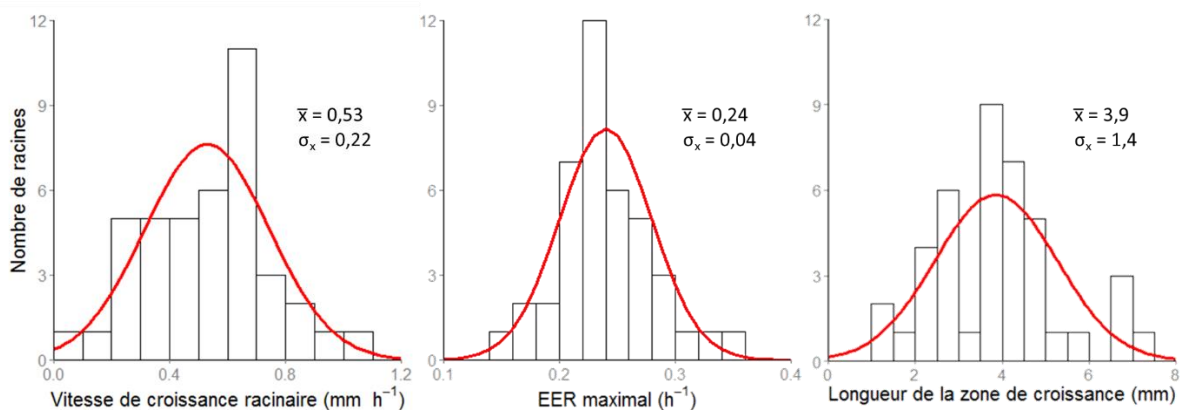


Figure 43 : Répartition des vitesses de croissance (gauche), longueurs de zone de croissance (milieu) et taux d'élongation élémentaire maximaux (droite) mesurés dans la population de peupliers. Les courbes rouges indiquent des distributions normales ajustées dont les paramètres sont indiqués (moyenne et écart type).

La vitesse de croissance mesurée est globalement supérieure à celles de racines de chêne pédonculé et de pin maritime (Tableau 4). Elles sont inférieures aux vitesses de croissance de céréales communes (riz, maïs, sorgho), systématiquement au-delà de 1 mm h⁻¹ voir à plus de 3 mm h⁻¹. Le cas des espèces cultivées en boîte de pétri (arabidopsis, tabac) doit être mis à part puisque ce système de culture hermétique explique vraisemblablement les faibles vitesses mesurées (système aérien comprimé, hypoxie, éclairage du système racinaire). Dans une précédente étude du laboratoire, des racines de peuplier du même génotype poussaient à plus de 1,5 mm h⁻¹ (Merret *et al.*, 2010). Dans cette étude, l'analyse a été conduite sur une sélection de racines à fort taux de croissance alors que les résultats présentés dans ce manuscrit considèrent l'ensemble de la variabilité de la population. L'absence de lumière et de système foliaire dans notre cas peut aussi expliquer les plus faibles vitesses de croissance que nous observons : les racines poussant le plus vite atteignent au maximum un peu plus de 1 mm h⁻¹.

Tableau 4 : Synthèse bibliographiques des vitesses de croissance racinaire mesurées sur différentes espèces.

Espèce	Vitesse de croissance (mm h ⁻¹)	Conditions	Référence
<i>Arabidopsis th.</i> (18 écotypes)	0,07 – 0,34	Boîte de pétri (22°C)	Beemster, 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,2 – 0,5	Boîte de pétri (20°C)	Beemster and Baskin, 1998
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,05 – 0,35	Boîte de pétri (23°C)	Nagel <i>et al.</i> , 2006
<i>Pinus Pinaster</i>	0,25 – 0,35	Hydroponie (19°C)	Triboulot <i>et al.</i> , 1995
<i>Quercus robur</i>	0,01 – 0,5	Vermiculite (24°C)	Pagès, 1995
<i>Populus cv. Soligo</i>	1,5	Hydroponie (21°C)	Merret <i>et al.</i> , 2010
<i>Oryza sativa</i>	1,03	Hydroponie (28°C ; sans lumière)	Iijima & Matsushita, 2011
<i>Oryza sativa</i>	1,3	Vermiculite (25°C)	Iijima <i>et al.</i> , 1998
<i>Zea mays</i>	0,4 - 2	Tourbe et vermiculite (24°C)	Pagès <i>et al.</i> , 2010
<i>Zea mays</i>	1,3 – 2,9	Hydroponie (22°C)	Muller <i>et al.</i> , 1998
<i>Zea mays</i>	1,2 - 3,1	Vermiculite (16-29°C)	Pahlavanian & Silk, 1988
<i>Zea mays</i>	2,5 – 3,5	Vermiculite (29°C)	Sharp <i>et al.</i> , 1988
<i>Glycine sp.</i>	2,5 – 3,0	Vermiculite	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2010
<i>Sorghum bicolor</i>	3,2	Vermiculite (25°C)	Iijima <i>et al.</i> , 1998

B. Covariations entre indicateurs de croissance

La vitesse de croissance de la racine est l'équivalent mathématique de l'intégrale du taux d'élongation élémentaire le long de la zone de croissance. L'hétérogénéité que nous observons entre les profils de croissance peut être expliquée par une relation simple utilisant la longueur de la zone de croissance et l'intensité de l'élongation (Baskin, 2012 ; Figure 21). Le produit de ces deux indicateurs de croissance donne une relation linéaire expliquant 95% de la variance de la croissance entre individus de la population (Figure 44).

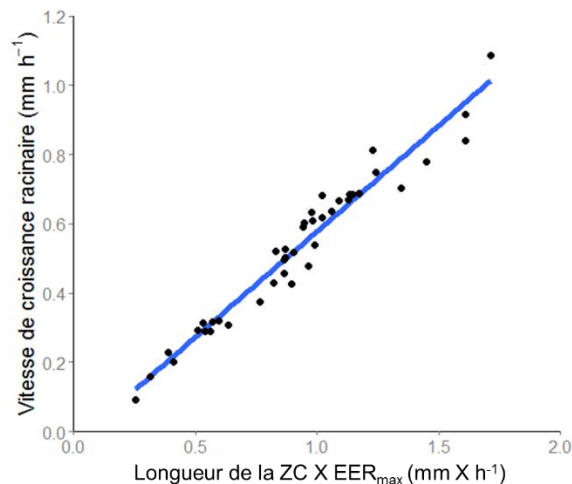


Figure 44 : Relation entre la croissance de l'apex racinaire comme et le produit de la longueur de la zone de croissance et du taux maximal d'élongation élémentaire. ZC : zone de croissance.

Décomposer cette relation en ses deux composantes met en évidence l'importance relative de la longueur de la zone de croissance et de l'intensité de l'élongation pour expliquer l'hétérogénéité des vitesses de croissance (Figure 45). La longueur de la zone de croissance, qui est un indicateur direct

du nombre de cellules en croissance, explique 77% de la variance de croissance dans la population (p -value < 0,001). L'intensité de l'élongation (EER_{max}) explique à peine 10% de cette variance (p -value = 0,025).

Le EER_{max} est un indicateur de la capacité d'élongation des cellules (West, 2004). Des valeurs moyennes de EER_{max} (autour de 0,25 $mm\ mm^{-1}\ h^{-1}$) sont observées pour des vitesses de croissance couvrant toute l'amplitude de la population (de 0,2 à plus de 1 $mm\ h^{-1}$; Figure 45 droite). Par ailleurs, EER_{max} n'est pas corrélé avec la longueur de la zone de croissance (p -value = 0,722). Des valeurs de EER_{max} proches sont mesurées sur soja (près de 0,4 h^{-1} ; Yamaguchi *et al.*, 2010), arabidopsis (0,35 h^{-1} ; Beemster & Baskin, 1998), peuplier (0,3 h^{-1} ; Merret *et al.*, 2010) ou encore maïs (0,25 h^{-1} à 24°C ; Pahlavanian & Silk, 1988). Les vitesses de croissance très différentes qui caractérisent ces espèces (Tableau 4) et nos observations confirment le faible lien entre EER_{max} et vitesse de croissance de la racine, démontrant qu'une même capacité d'élongation est associée à des vitesses de croissance très variables.

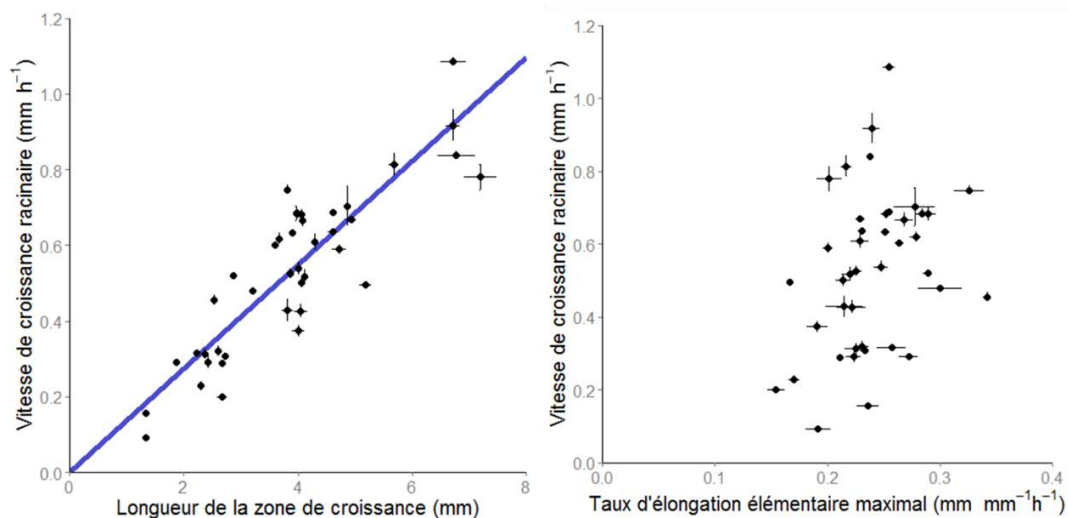


Figure 45 : Relation entre la taille de la zone de croissance (gauche) ou le taux d'élongation élémentaire maximal (droite) avec la vitesse de croissance des racines. Chaque valeur indique la moyenne et l'erreur standard des mesures d'une racine.

C. Contributions des croissances cytoplasmique et vacuolaire

La haute résolution que nous avons utilisée fournit des profils de EER le long de toute la zone de croissance. Dans la partie la plus apicale de la zone de croissance, l'élongation des cellules peut être associée à une activité de division (croissance cytoplasmique). Du côté de la zone mature, elle est le résultat de l'augmentation en volume de la vacuole (croissance vacuolaire). Nous nous sommes intéressés à quantifier la part d'élongation associée à la croissance cytoplasmique et vacuolaire dans nos profils (Figure 46).

La croissance cytoplasmique a lieu dans les cellules prolifératives du RAM. Elle correspond à une élongation intégrée dans le cycle cellulaire (accumulation de macromolécules et d'éléments cellulaires ; Sablowski & Dornelas, 2013). Nous avons quantifié l'élongation cellulaire dans le méristème en utilisant la vélocité mesurée à la sortie du RAM. Même si à cette position une partie de la croissance mesurée est due à de la vacuolisation dans le domaine de transition, la majeure partie reflète la croissance cytoplasmique. Pour estimer la longueur du RAM et déterminer la vélocité à sa

sortie, nous avons utilisé un paramètre de l'équation de [Peters & Baskin \(2006\)](#). Ce paramètre, $c1$, représente le point de transition entre la première et la seconde zone linéaire du profil de vitesse (Figure 37 ; Figure 46). Ce point d'inflexion indique la position où la longueur des cellules commence à augmenter rapidement. Il a déjà été utilisé pour caractériser la longueur du RAM ([Ma, 2003](#) ; [Wuyts et al., 2011](#)). Sa qualité de proxy de la longueur du RAM est discutée plus loin (*cf.* Chapitre II.B).

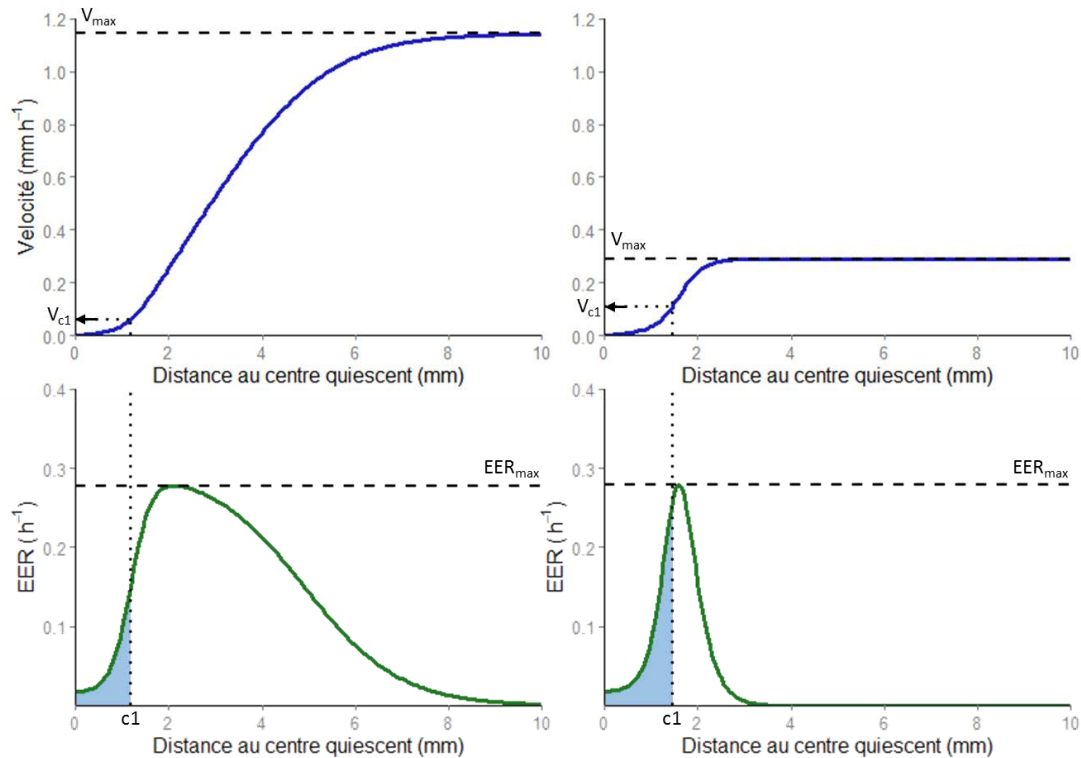


Figure 46 : Profils de vitesse (haut) et de EER (bas) obtenus pour deux racines (gauche et droite) avec des vitesses de croissance (V_{max}) contrastées. Les deux racines ont des valeurs de EER_{max} similaires. La vitesse en sortie de RAM (V_{c1}), est l'équivalent de l'intégrale du EER dans le RAM (coloré en bleu)

Du côté distal, la croissance vacuolaire démarre dans le domaine de transition du RAM et se termine à la fin de la zone de croissance. La vacuolisation est le principal processus impliqué dans l'augmentation en longueur des cellules dans la zone d'élongation ([Brumfield, 1942](#)). Une augmentation du degré de vacuolisation d'une cellule accompagne son augmentation en longueur et indique que la cellule ne se divisera plus ([Achard et al., 2009](#)). Nous avons estimé la croissance par vacuolisation en retranchant la vitesse en sortie de RAM à la vitesse de croissance de la racine (*i.e.* la vitesse maximale).

Dans la population, la vitesse en sortie de RAM est inférieure à $0,15 \text{ mm h}^{-1}$, avec une moyenne de $0,06 \text{ mm h}^{-1}$ qui correspond à 12% de la croissance moyenne des 41 racines ($0,53 \text{ mm h}^{-1}$). La croissance cytoplasmique dans le RAM, bien que non négligeable, ne reflète donc qu'une petite part de la croissance de la racine (Figure 47).

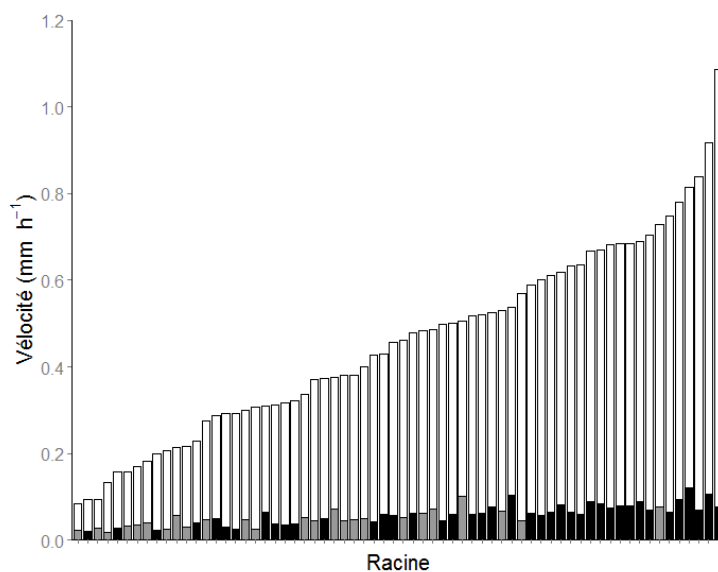


Figure 47 : Vitesse des racines, séparée entre l'élongation dans le RAM (foncé) et hors du RAM (blanc). Les racines dont l'élongation dans le RAM est en noir sont des témoins, celles en grises ont subi un stress osmotique.

D. Longueur et Activité du RAM

1. Mesure de la longueur du RAM à partir de la longueur des cellules

Le RAM est constitué d'un domaine de prolifération cellulaire où les cellules maintiennent de fort taux de division et d'un domaine de transition avec une plus faible probabilité de division cellulaire (Ivanov & Dubrovsky, 2013). La longueur du RAM est définie comme étant la distance entre le centre quiescent et une limite tige-orientée, généralement établie à partir d'un seuil de longueur de cellule (Casamitjana-Martinez *et al.*, 2003 ; Hacham *et al.*, 2011 ; Mouchel, 2004). Ce seuil sépare les petites cellules en prolifération des cellules de plus grande longueur en expansion rapide.

La longueur du méristème est un paramètre d'importance pour estimer son activité de production de cellules. Le nombre de cellules en division dans le RAM génère un flux de cellules potentiellement capable de moduler la croissance racinaire (Baskin, 2012). Ce flux de cellules est défini comme étant l'intégrale du taux de production de cellules le long du RAM, lequel dépend de la densité de cellules en division et du taux de division cellulaire (Erickson & Silk, 1980). Les études portant sur les profils de longueur de cellules ont fournies des preuves fortes que la part proliférative (*i.e.* le pourcentage de cellules en division) dans le domaine de prolifération du RAM est de 100%, y compris suite à des niveaux modérés de stress (Baskin, 2000 ; Ivanov *et al.*, 2002). De plus, la longueur des cellules dans le domaine de prolifération du RAM étant constante, la longueur du RAM est un indicateur direct du nombre de cellules en division (Ivanov, 1997 ; Beemster & Baskin, 1998).

Nous avons déterminé la longueur du RAM à partir des profils de longueurs de cellules mesurées sur des coupes longitudinales. Seules les cellules corticales sont considérées pour les mesures de longueur⁶. Nous avons mesuré de manière exhaustive la longueur des cellules situées dans la partie la plus apicale que nous supposons incluse dans le domaine de prolifération (nous avons considérés les premiers 500 μm depuis le centre quiescent). La distribution des longueurs de cellules montre

⁶ Les références textuelles suivantes concernant les longueurs de cellules sous-entendent systématiquement que nous parlons de cellules corticales.

que 99% de ces cellules ont une longueur inférieure à 22,3 μm (mesuré sur sept racines, Figure 48). Cette valeur est prise comme seuil pour délimiter le RAM de la zone d'élongation. Pour chaque file cellulaire du cortex, nous avons déterminé la distance au centre quiescent de la première cellule dont la longueur est supérieure à ce seuil. A l'échelle de la racine, la limite tige-orientée du RAM est déterminée par la valeur moyenne pour toutes les files de cellules corticales (Figure 49).

Le seuil de 22,3 μm est inférieur à ceux mentionnés chez arabidopsis (40-45 μm ; [Beemster, 2002](#) ; [West, 2004](#)). Toutefois, arabidopsis ne compte qu'une unique couche de cellule corticale. La sortie de méristème est visible par une augmentation brutale de la longueur de cellule dans cette couche, et peut être détectée en utilisant une large gamme de seuil. Il est d'ailleurs possible de ne pas utiliser de seuil absolu mais de considérer la première cellule qui est deux fois plus longue que sa voisine pour définir la sortie du RAM ([González-García et al., 2011](#)). Cette approche n'est pas envisageable chez le peuplier à cause du plus grand nombre de files de cellules. Par ailleurs, notre seuil correspond à environ trois fois la longueur des plus petites cellules corticales (Figure 50), et un tel rapport a déjà été mentionné chez arabidopsis ([Baskin et al., 1995](#) ; [Liu et al., 2013](#)).

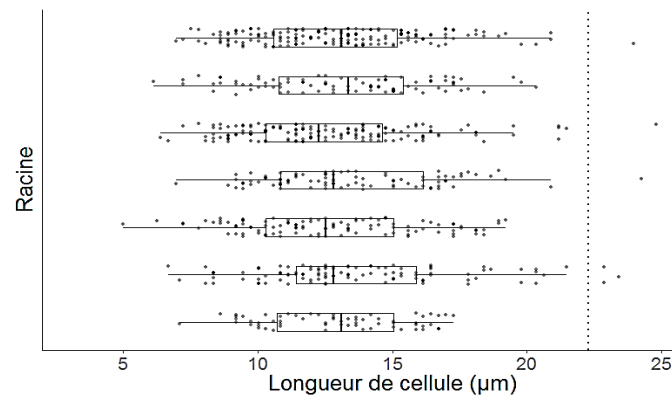


Figure 48: Distribution des longueurs de cellules dans le domaine de prolifération du RAM pour sept racines.

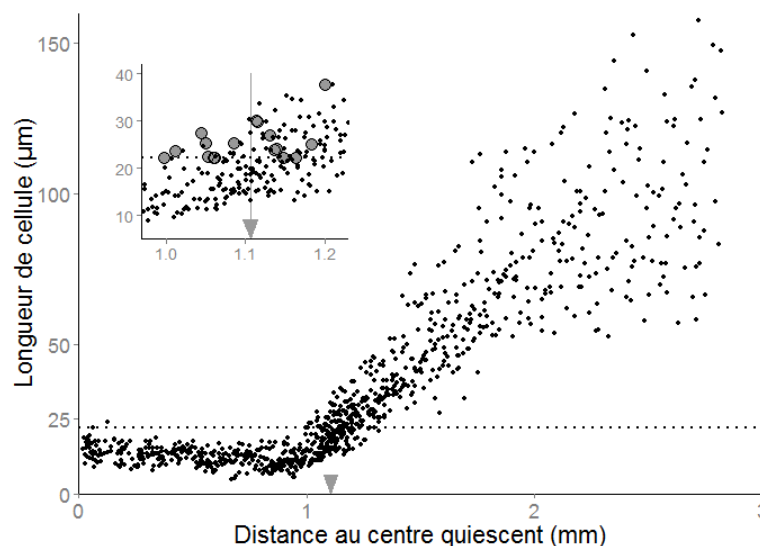


Figure 49: Profil de longueur de cellule obtenu pour une racine. La ligne en pointillés indique le seuil de longueur (22,3 μm) utilisé pour déterminer la position de la limite tige-orientée du RAM (position indiquée par la flèche grise). L'encart en haut à gauche est un zoom sur le profil à la fin du méristème. Les points gris indiquent la première cellule de chaque file corticale à être au-dessus du seuil. La position indiquée par la flèche grise est la distance moyenne des premières cellules au-dessus du seuil.

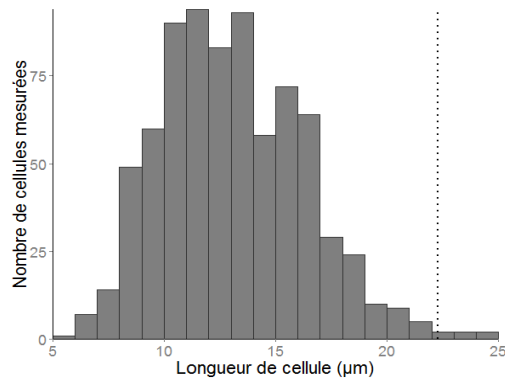


Figure 50: Profil de distribution des longueurs de cellules corticales dans le domaine de prolifération du RAM (intègre les valeurs de sept racines). La ligne en pointillés indique le seuil de longueur (22,3 µm).

Sur les profils de longueur de cellules, une légère diminution de la longueur moyenne des cellules est systématiquement observable entre le centre quiescent et la fin du RAM (Figure 49). Cette constatation a également été mentionnée chez le maïs (Ivanov *et al.*, 2002) et elle est observable chez arabis (Beemster & Baskin, 1998). Une telle baisse traduit un léger déséquilibre dans le domaine de prolifération du RAM entre l’allongement des cellules et la durée du cycle cellulaire : entre deux divisions, l’allongement des cellules n’est pas tout à fait suffisant pour conserver un maintien de leur longueur initiale.

2. Activité du RAM

La haute résolution spatiale et l’utilisation d’une équation de croissance flexible nous permet de mesurer avec précision la vitesse v_x compris dans le domaine de prolifération cellulaire. De plus, la forte densité de mesures histologiques dans le RAM (>500 cellules mm⁻¹) nous garantit même après lissage une bonne fiabilité des profils de longueurs de cellules. Un flux de cellules « instantané » est calculé à la fin de la période de suivi (Figure 51A) défini tel que :

$$F_x [\text{cellule h}^{-1}] = \frac{v_x [\mu\text{m h}^{-1}]}{l_x [\mu\text{m cellule}^{-1}]}$$

Ensuite, en supposant une croissance stable et en utilisant l’équation de continuité (Erickson & Silk, 1980 ; Fiorani & Beemster, 2006 ; cf. Introduction), le taux de production de cellules et le taux de division cellulaire sont calculés le long de l’apex (Figure 51B-C).

Parmi les six racines caractérisées, l’allure du profil de flux de cellules montre une augmentation rapide du flux dans le RAM avant d’atteindre un plateau. Le flux de cellules maximal est variable d’une racine à l’autre, allant du simple au double en sortie de RAM (3-6 cellules h⁻¹ ; Figure 51A). Le taux de production de cellules et le taux de division cellulaire ont des profils similaires le long de l’apex racinaire. Bien que le profil ne soit pas parfaitement parabolique ou en cloche, le taux de division cellulaire n’est pas constant le long du RAM, augmentant avant un déclin rapide (Figure 51C). Dans la zone d’élongation, le bruit autour de zéro visible à la fois sur les profils de taux de production et de taux de division résulte d’un nombre plus faible de mesures, dû à la plus faible densité cellulaire. L’allure de ces courbes contredit la constance supposée des taux de division dans le RAM défendue par Baskin (2012). La croissance en diamètre peut conduire à une sous-estimation du taux de production de cellules et donc du taux de division. Nos racines de peupliers sont larges et peuvent atteindre 0,8 mm. Néanmoins, plus de 50% de la croissance en diamètre est effectué

0,1 mm après le centre quiescent et plus de 80% dans les premiers 0,3 mm du RAM. L'augmentation du taux de division étant observée sur plus d'un millimètre pour certaines racines, elle ne peut pas être le fruit d'un biais technique lié à la croissance en diamètre. Par conséquent, nos résultats chez le peuplier supportent un taux de division qui augmente progressivement du centre quiescent vers la sortie du RAM avant une chute brutale.

Le taux de production cellulaire maximum est similaire pour les six racines (4-5,5 cellule $\text{mm}^{-1} \text{h}^{-1}$; Figure 51B). Le taux de division cellulaire présente un profil similaire à celui du taux de production de cellules et atteint un maximum de 0,05-0,07 cellule $\text{cellule}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Figure 51C). Étant donné la vitesse mesurée dans le RAM, une cellule parcourt plus d'un demi-millimètre en 15 heures. Dans ce contexte, la durée du cycle cellulaire, qui est l'inverse du taux de division cellulaire, ne peut être déterminée que dans la partie la plus apicale du RAM où le taux de croissance reste relativement constant au cours d'un tel intervalle de temps. Ainsi, dans le domaine de prolifération cellulaire, la durée du cycle cellulaire est d'environ 30-35 heures pour quatre racines et 17-20 heures pour les deux autres. Ces durées sont similaires à celles reportées pour *arabidopsis*, s'étalant de 18 à 35 heures selon l'approche utilisée (Fujie *et al.*, 1993 ; Baskin *et al.*, 1995 ; Beemster & Baskin, 1998).

La longueur des cellules en sortie de RAM est similaire entre individus (Figure 52). Par conséquent, la vitesse en sortie de RAM est un indicateur direct du flux de cellules généré par l'activité du RAM. Pour chaque racine, nous calculons le flux en sortie de RAM en divisant la vitesse en sortie de RAM par la longueur médiane des cellules à cette position (17 μm). Le flux de cellules en sortie de RAM obtenu de cette manière est fortement corrélé à la vitesse de croissance de la racine (Figure 53), démontrant un lien entre l'activité du RAM et l'élongation subséquente de la racine. La pente de la relation linéaire indique une longueur moyenne de cellule mature de 143 μm . Les racines situées au dessus ou en dessous de cette relation linéaire présentent respectivement des cellules matures plus longues ou plus courtes. Cette différence de longueur de cellule mature chez certaines racines explique pourquoi dans certains cas on observe pour un même flux de cellules une vitesse de croissance allant du simple au double (Figure 53).

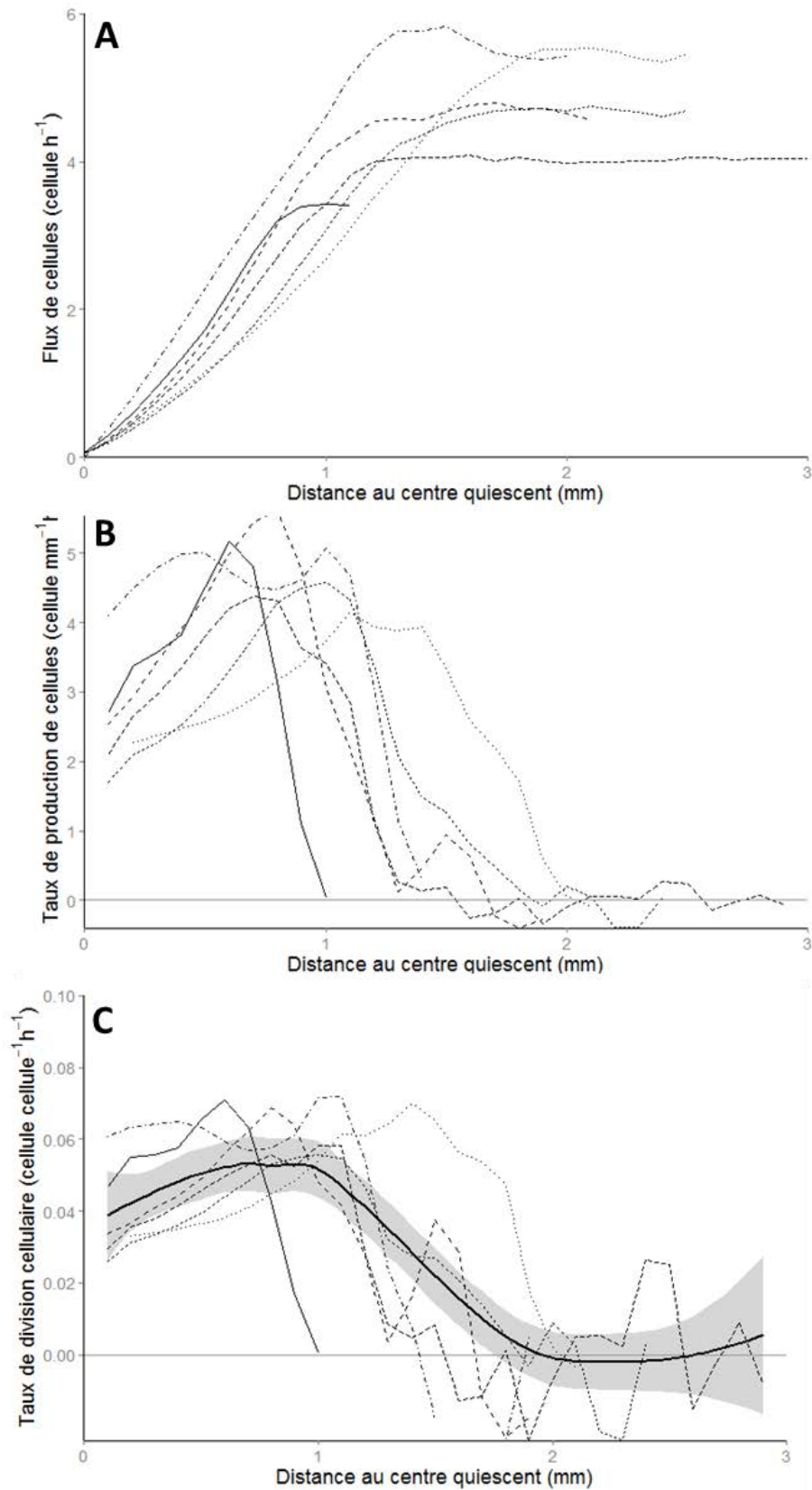


Figure 51 : Flux de cellules (A), taux de production de cellules (B) et taux de division cellulaire (C) le long de l'apex. Les différents types de lignes décrivent différents individus. La ligne pleine en C est une courbe lissée sur l'ensemble de la population.

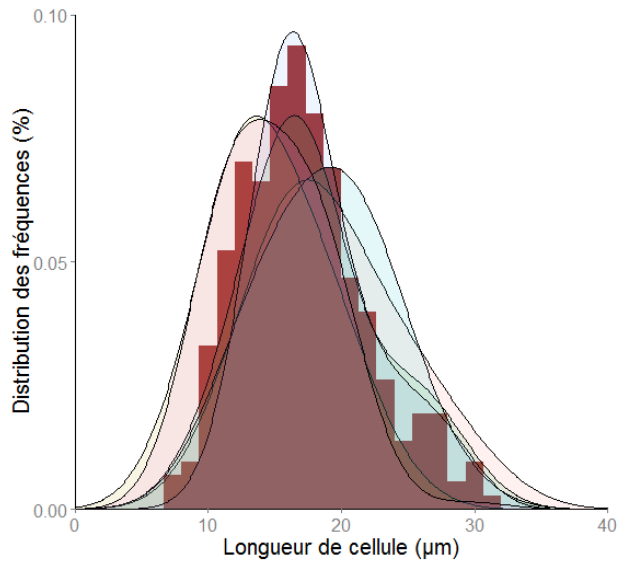


Figure 52 : Distribution des fréquences de longueur de cellule en sortie de RAM $\pm 17 \mu\text{m}$. L'histogramme rouge est la distribution de six racines représentées individuellement par les courbes superposées.

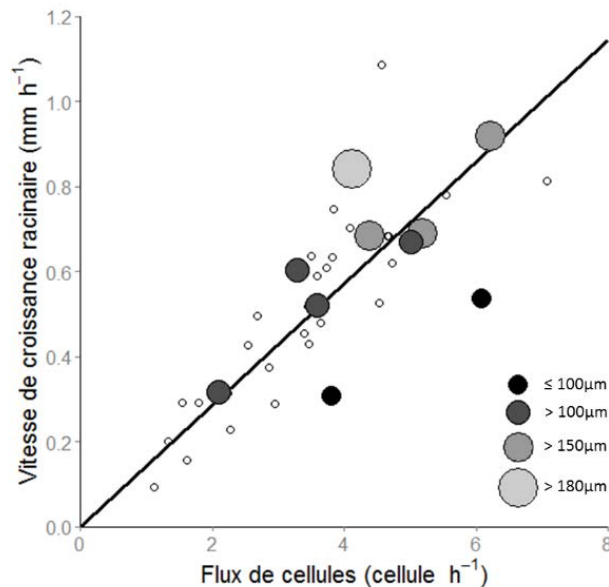


Figure 53 : Relation entre la vitesse de croissance racinaire et le flux de cellules en sortie de RAM. Les racines en niveau de gris sont des racines dont la longueur des cellules matures, symbolisée par le diamètre du point, a été mesurée. Une relation linéaire d'ordonnée nulle est indiquée (pente = 0,143, p -value < 0,001 ; $R^2 = 0,95$).

Le flux de cellules en sortie de RAM est le reflet du nombre de cellules dans le RAM et du taux de division de ces cellules. La longueur des cellules du RAM étant égale entre individus, le nombre de cellules du RAM est proportionnel à la longueur du RAM. La corrélation positive entre la longueur du RAM et la vélocité en sortie de RAM confirme que plus le RAM est grand *i.e.* plus il y a de cellules dans le RAM, plus le flux de cellules généré en sortie est élevé (Figure 54). La variabilité de flux observée pour un même nombre de cellule souligne soit (i) une modification de la fraction proliférative du RAM, soit (ii) un taux de division variable entre individus, soit (iii) les deux. La fraction proliférative du RAM, introduite par [Clowes \(1976\)](#) indique le pourcentage de cellules du RAM en division. Aujourd'hui, de très fortes évidences indiquent que ce ratio est indissociable de 100% même si les premières études de marquage avaient signalées des valeurs inférieures (résumé par [Webster & McLeod, 1980](#)). En effet, si une cellule « rate » un cycle cellulaire dans le RAM, sa

longueur par rapport à ses voisines doit être supérieure d'un facteur 2 puisque la présence de la paroi cellulaire maintient un taux d'élongation similaire entre cellules voisines (Baskin, 2000 ; Ivanov *et al.*, 2002). Les longueurs maximale et minimale mesurées dans le RAM dans le cadre de cette thèse ou sur d'autres espèces (Ivanov, 1971 ; Beemster & Baskin, 1998) ont un rapport de deux, ne mettant pas en évidence de tels cycles « manqués ». En conséquence, si la fraction proliférative est des 100%, la variabilité de l'activité du RAM pour un même nombre de cellules indique un taux de division variable entre individus, ce qui confirme les durées de cycle cellulaire précédemment reportées, variant du simple au double entre individus.

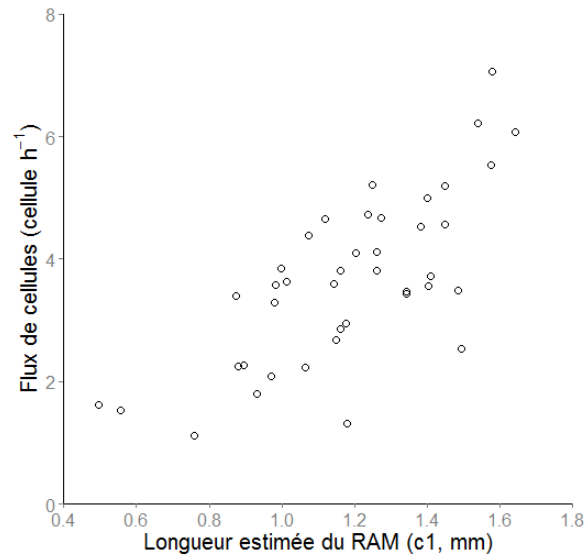


Figure 54 : Relation entre la longueur du RAM, proxy du nombre de cellules du RAM, et le flux de cellules en sortie de RAM.

E. Impact du stress osmotique

1. Impact sur les profils de croissance

La plupart des racines suivies en condition témoin ont subi un stress osmotique. Le suivi de croissance a été maintenu en continu pendant l'application du stress et les quelques heures suivantes. 8 racines ont été soumises à un stress osmotique faible (0,21 MPa, 100g L⁻¹ PEG4000), 11 à un stress osmotique moyen (0,27 MPa, 130g L⁻¹ PEG4000) et 6 à un stress osmotique fort (0,37 MPa, 160 g L⁻¹ PEG4000). Suite au stress osmotique fort, une partie des racines on arrêtées de pousser, ce qui explique le plus faible nombre de réplacas dans cette modalité. Des modalités de stress plus élevées (180 à 200g L⁻¹ PEG4000) ont été testées, mais aucune racine n'a pu maintenir sa croissance plus d'une dizaine d'heure maximum à ce niveau de stress. Un profil moyen de vélocité et d'élongation a été déterminé pour chaque racine en moyennant les différents profils mesurés au cours du temps le long de l'apex racinaire (Figure 55). Chaque profil moyen intègre au minimum deux à trois heures de suivi de croissance. Sur certaines figures, les trois premières heures de réponses de 3 racines ayant été soumises à 180g PEG L⁻¹ sont indiquées pour information. La première heure après application du stress n'est jamais considérée.

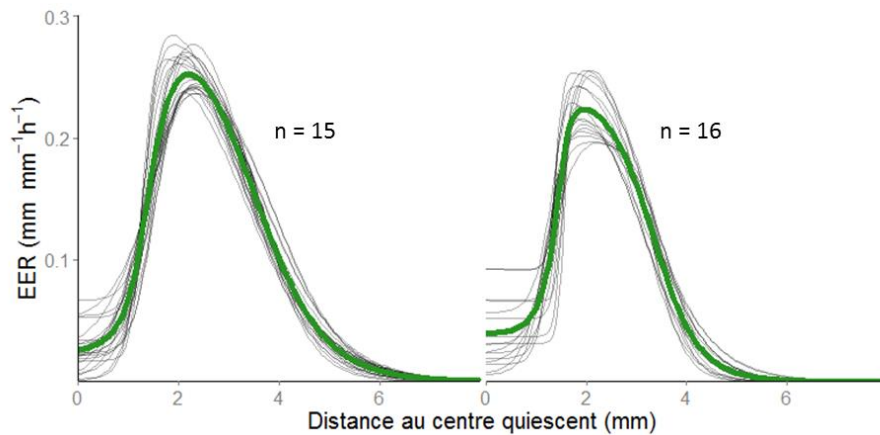


Figure 55 : Profils de EER obtenus pour deux racines. Le profil moyen (vert) est la moyenne des différents profils mesurés au cours du temps le long de l'apex racinaire (n pas de temps). Le pas de temps est de 12 minutes.

Même si la croissance, pour la plupart des racines, est diminuée en réponse au stress osmotique, l'impact du stress sur certaines racines est très faible voire nul (Figure 56). C'est notamment le cas de trois racines sous stress osmotique faible, trois autres sous stress modéré et une sous stress fort. La plupart de ces sept racines (sauf une sous stress faible et une sous stress modéré) ont la particularité d'avoir des vitesses de croissance très faible avant l'application du stress ($<0,35 \text{ mm h}^{-1}$).

La forte hétérogénéité du taux de croissance entre individus ne facilite pas la comparaison entre les différentes modalités de stress osmotique. Pour contourner cette difficulté, un ratio après/avant stress est calculé pour chaque racine afin de mesurer l'impact du stress sur les différents indicateurs de croissance (Figure 57A-C). Le stress osmotique faible ne modifie pas significativement ni le taux de croissance, ni la longueur de la zone de croissance, ni le taux élémentaire d'élongation. Par contre, les stress plus élevés réduisent significativement la vitesse de croissance par rapport à la situation avant stress. La réduction est de plus de 20% pour le stress modéré et de près de 50% pour le stress fort. Concomitante à cette baisse de croissance, la longueur de la zone de croissance est significativement réduite (20-30%) par rapport à la situation avant stress. Contrairement à ces deux indicateurs, le taux maximal d'élongation n'est pas impacté par les trois niveaux de stress osmotique que nous avons testés. L'analyse des impacts individuels ne met pas en évidence un impact différentiel prononcé en fonction de la valeur initiale de l'indicateur de croissance (Figure 57D-F).

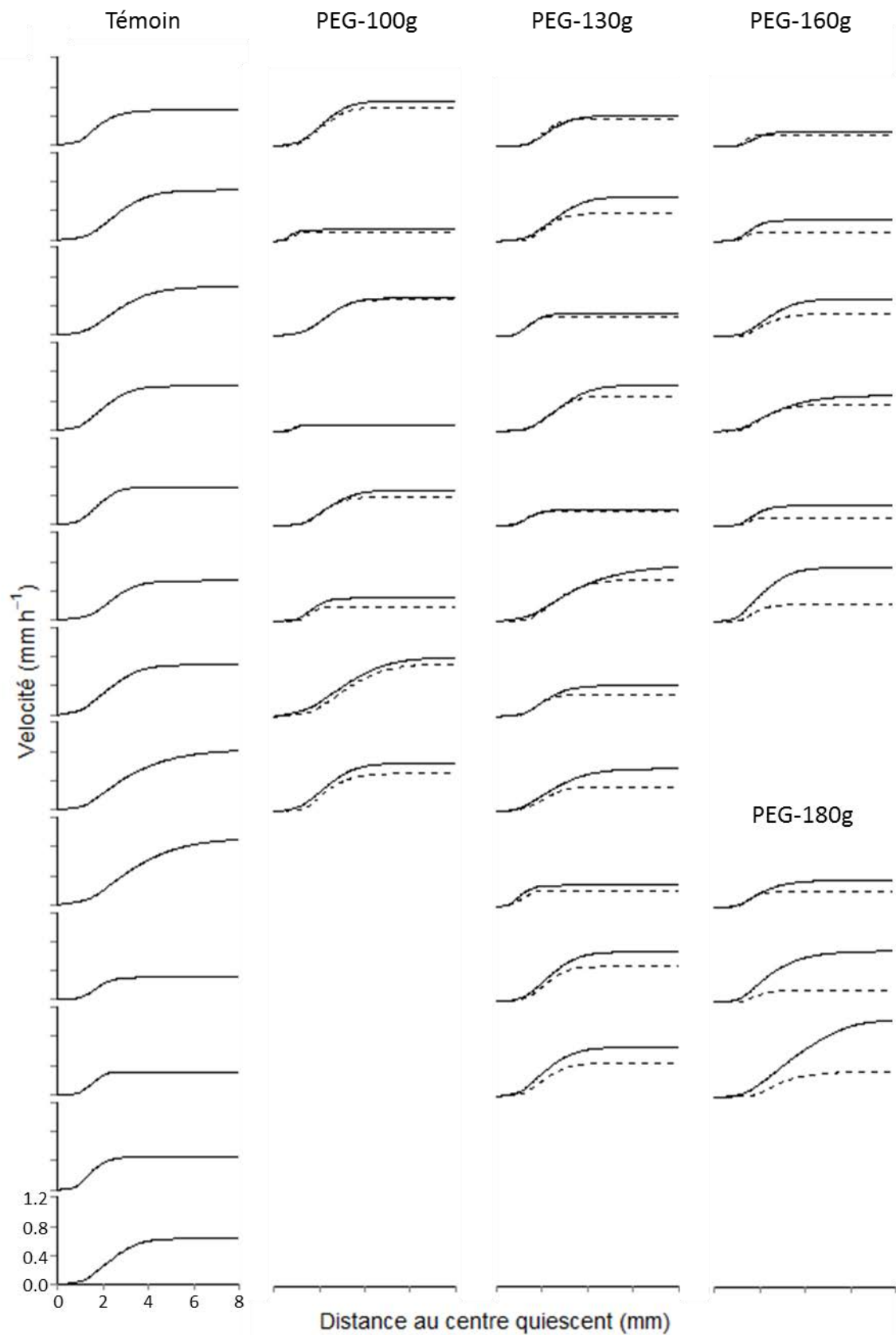


Figure 56 : Profils individuels de vélocité mesurés pour chaque racine avant (trait plein) et après (tirets) stress osmotique.

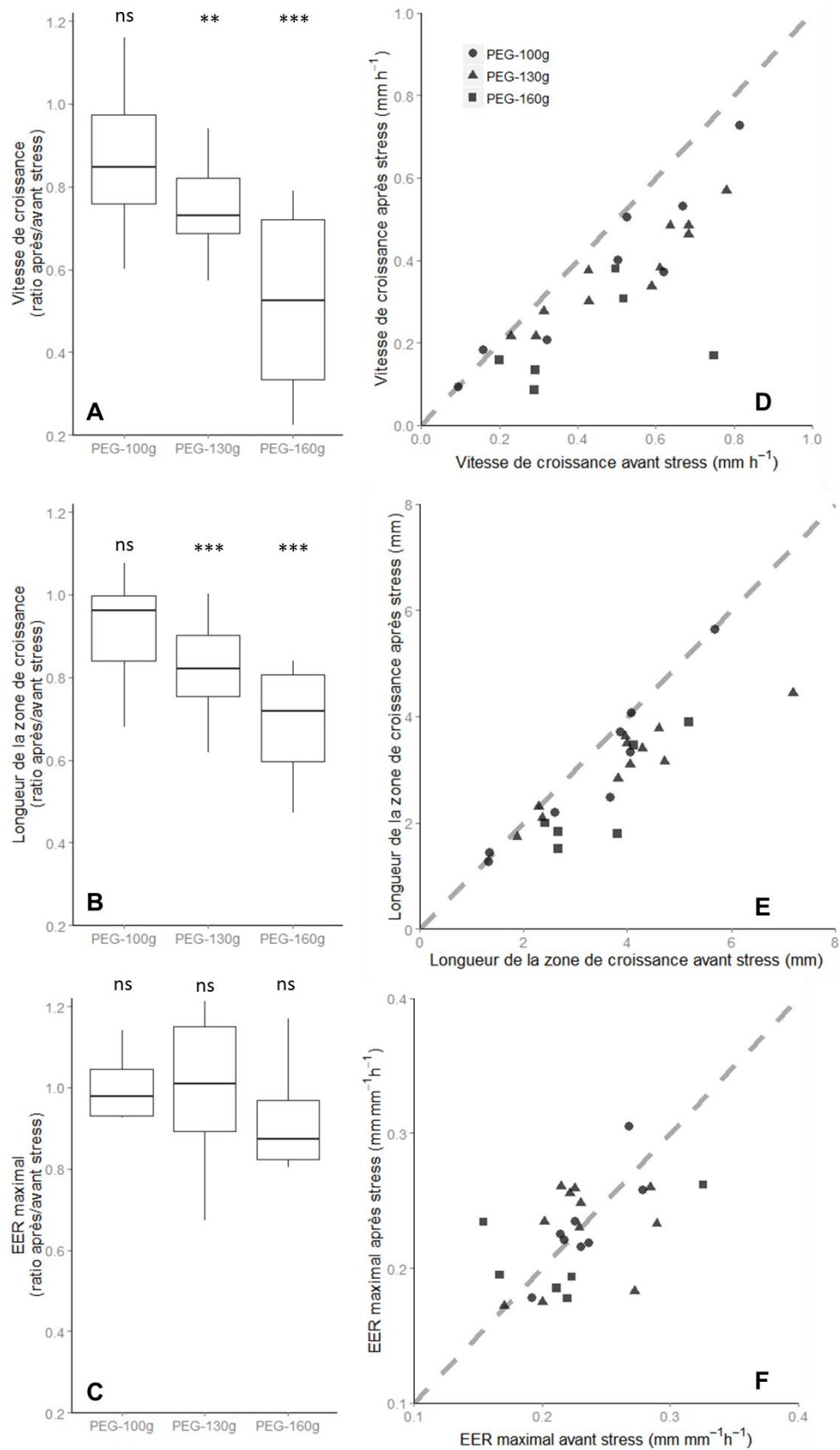


Figure 57 : Impact du stress osmotique sur la vitesse de croissance des racines (haut), la longueur de la zone de croissance (milieu) et le taux maximal d'élongation élémentaire (bas). Des ratios après/avant stress globaux par traitements (A-C) ainsi que les impacts individuels (D-F) sont présentés. Les étoiles indiquent des différences significatives par rapport au témoin (avant stress). La droite en tirets indique une relation 1:1 (soit une absence d'impact du traitement).

Les profils individuels de taux d'élongation élémentaire montrent une diminution marquée de l'élongation dans la partie tige-orientée de la zone de croissance pour les stress osmotiques moyen et fort. L'impact du stress osmotique faible est plus mitigé, avec dans certains cas une réduction de l'élongation relative dans la partie la plus apicale (Figure 58). Les courbes moyennes par traitement permettent de mieux se rendre compte de ces impacts (Figure 59). Sans tenir compte de la grande variabilité dans la population (pas de plage d'erreur) l'impact sur la vitesse maximale est proportionnel à l'intensité du stress et EER_{max} se maintient dans toutes les conditions de stress (bien que légèrement diminué sous stress fort, non significatif). Le profil moyen d'élongation est différemment impacté par les différents niveaux de stress osmotique. Dans la zone méristématique, le taux d'élongation est diminué quelle que soit l'intensité du stress bien qu'il faille noter de grandes disparités individuelles sur cette diminution (Figure 58). Dans le reste de la zone de croissance, l'impact est proportionnel à l'intensité du stress. Cette différence de sensibilité au stress osmotique le long de la zone de croissance montre une plus grande sensibilité du RAM, suggérant un impact sur l'activité de production de cellules y compris sous stress osmotique faible. La longueur de la zone de croissance n'est réduite que sous stress modéré et fort (Figure 57B ; Figure 59). La position relative du maximum d'élongation dans la zone de croissance n'est pas modifiée en réponse au stress.

Les diminutions de la croissance racinaire et de la longueur de la zone de croissance sous stress hydrique sont des réponses communes décrites entre autre chez le maïs (Spollen & Sharp, 1991), le soja (Yamaguchi *et al.*, 2010) ou encore le pin (Triboulot *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été observés sur d'autres organes comme des feuilles de maïs (Tardieu *et al.*, 2000). L'intensité de la perte de croissance pour des niveaux de stress inférieurs à -0,4 MPa souligne la forte sensibilité de la croissance racinaire du peuplier au stress osmotique. Cet impact et l'absence d'effet dore-réponse nette pourraient alternativement indiquer une toxicité du PEG ou une hypoxie induite par ce dernier. Toutefois, le stress osmotique a été appliqué sur une période courte (quelques heures) et en utilisant des molécules de PEG de grande taille (4000 g mol^{-1}), ce qui réduit très grandement le risque de toxicité (Janes, 1974). De plus, aucun changement dans les niveaux d'oxygène n'a été détecté entre les solutions de PEG et les solutions témoins (*cf. Matériel et méthodes*). L'insensibilité du EER_{max} montre de manière intéressante que la capacité des cellules à s'allonger n'est pas affectée chez le peuplier par le stress osmotique. Ce dernier résultat est quelque peu en désaccord avec les patrons de réponse au stress hydrique classique (Sharp *et al.*, 1988 ; Liang *et al.*, 1997) mais a déjà été observé en réponse au stress salin (West, 2004) et à l'application exogène de cytokinines de synthèse (Beemster & Baskin, 2000).

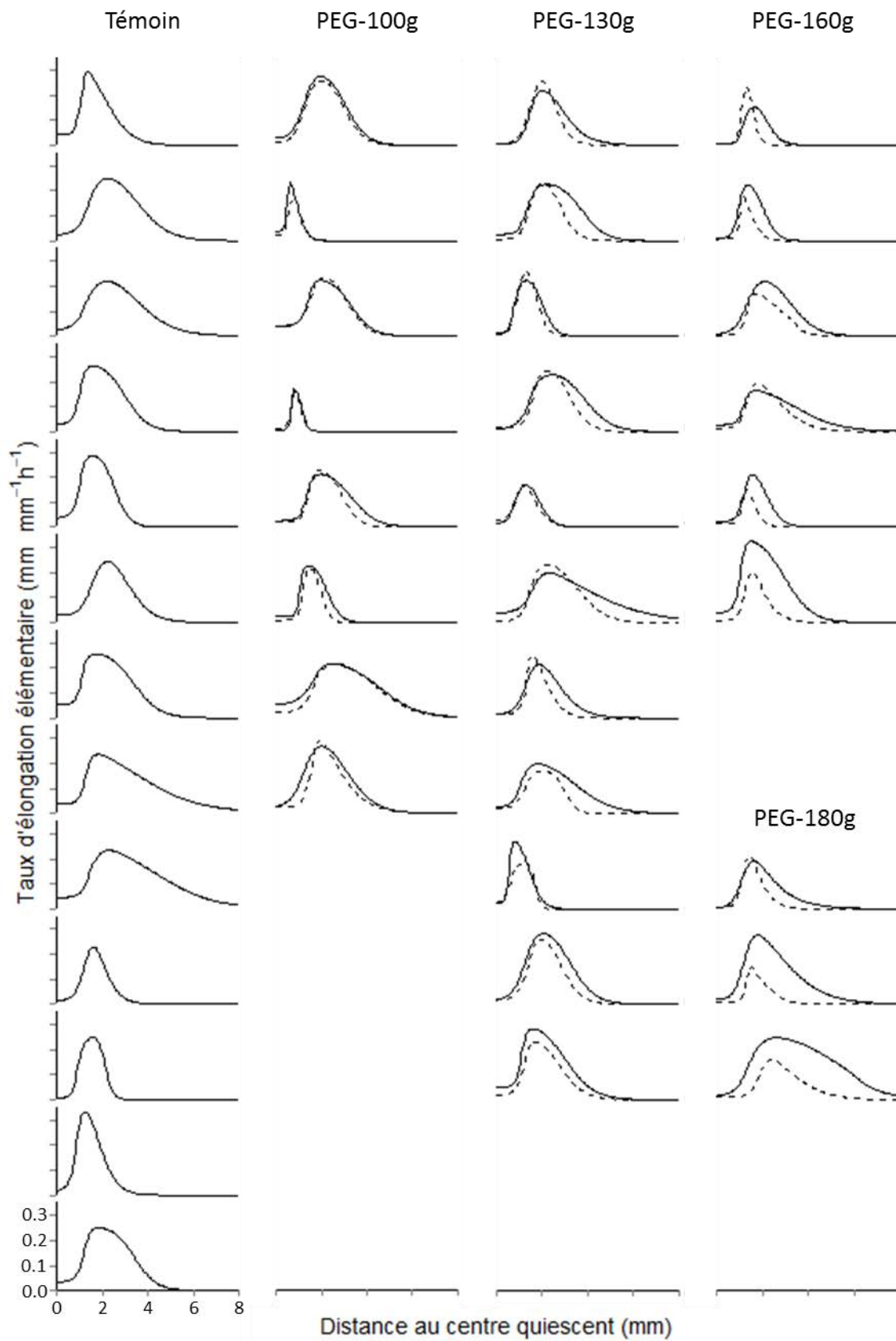


Figure 58 : Profils individuels d'élongation mesurés pour chaque racine avant (trait plein) et après (tirets) stress osmotique.

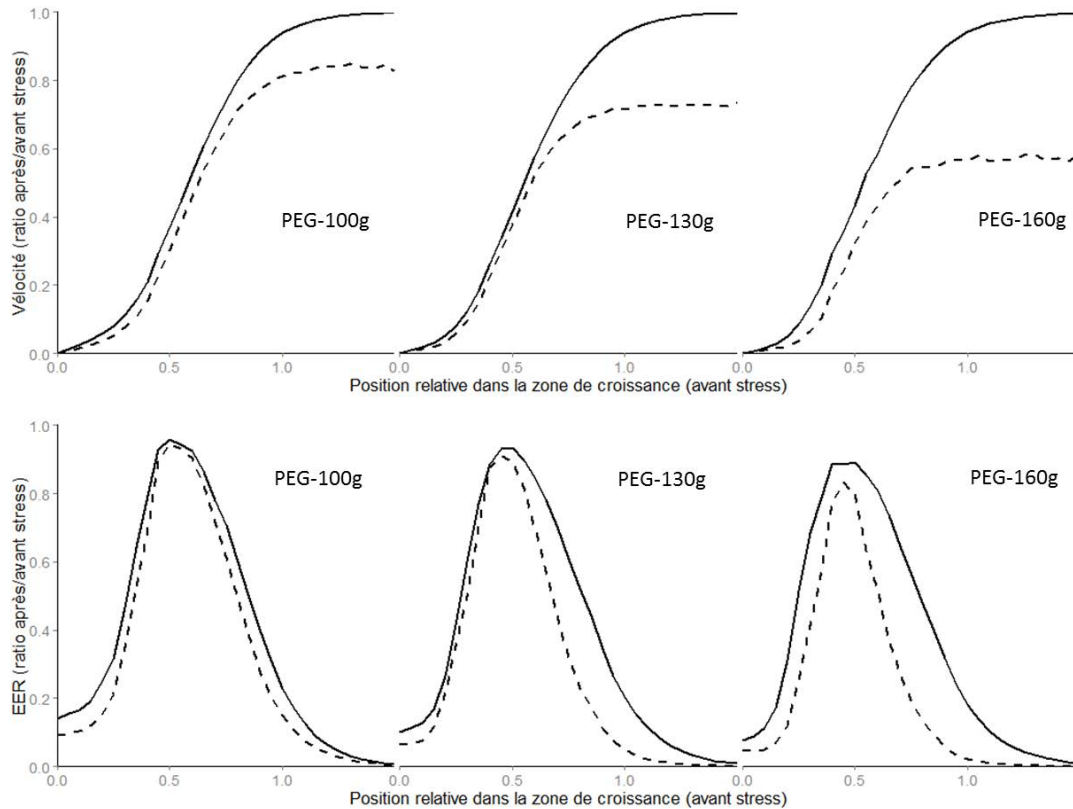


Figure 59 : Profils moyens de vitesse (haut) et de taux d'élongation élémentaire (bas). Ces profils moyens par traitement impliquent la variabilité des racines grâce à l'utilisation d'une échelle relative par rapport au témoin sur les deux axes. Position relative dans la zone de croissance : 0 = centre quiescent ; 1 = fin de la zone de croissance du témoin (94% de la croissance totale effectuée, cf. Figure 38). Courbe en trait plein : témoin ; courbe en tirets : stress osmotique.

2. Impact sur le RAM et son activité

La longueur du RAM n'est pas impactée par le stress osmotique (Figure 60 gauche). De plus, la distribution des fréquences de longueur de cellules dans le RAM est constante quel que soit le traitement (Figure 60 droite). Ces résultats indiquent que le nombre de cellules en division n'est pas impacté par un stress osmotique court. Dans ce contexte, le nombre de cellules produites par le RAM (correspondant au flux de cellules à la sortie du RAM) dépend uniquement du taux de division cellulaire. Etant donné que l'état de division d'une cellule est corrélé à sa longueur (Campilho *et al.*, 2006) et que la croissance cytoplasmique diminue en réponse au stress osmotique (Figure 59), le temps nécessaire pour que les cellules prolifératives atteignent la longueur limite pour achever leur mitose va augmenter. Ainsi, nos données suggèrent une baisse du taux de division cellulaire en réponse à un stress osmotique court. La diminution du flux de cellules pour un RAM de longueur équivalente confirme cette observation (Figure 61 gauche). La diminution est plus marquée pour les RAM les plus longs (pente des relations linéaires significativement différentes). Pour un RAM non affecté en longueur, les racines sous stress court poussent moins vite d'environ $0,2 \text{ mm h}^{-1}$ (Figure 61 milieu). Cette baisse comparable pour toutes les racines est le fruit (i) d'une élongation moins importante dans la zone d'élongation (Figure 59) et (ii) de la diminution du taux de division dans le RAM induisant une chute du flux de cellules sortant du RAM. Notamment la relation entre l'activité du RAM et la vitesse de croissance de la racine n'est pas modifiée suite à l'application du stress osmotique (Figure 61 droite, pentes non différentes significativement).

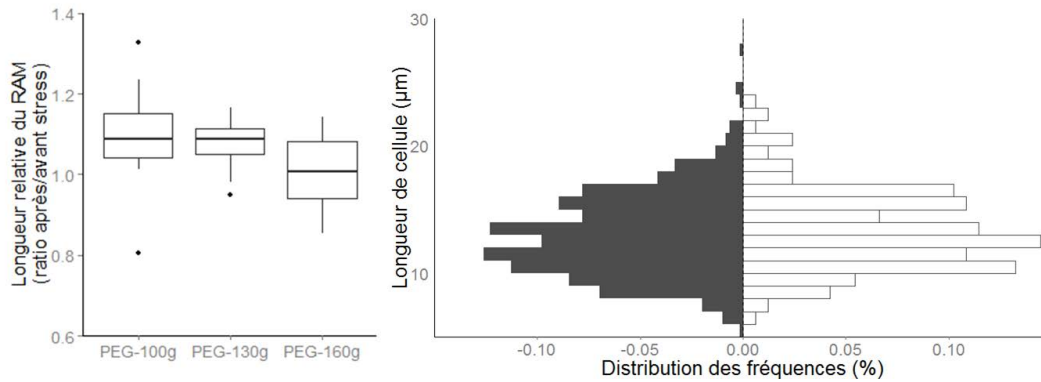


Figure 60 : Impact du stress osmotique sur la longueur estimée du RAM (gauche). Distribution des fréquences de longueur de cellule dans le domaine de prolifération du RAM (droite) pour des racines sous stress osmotique (gris) et témoins (blanc).

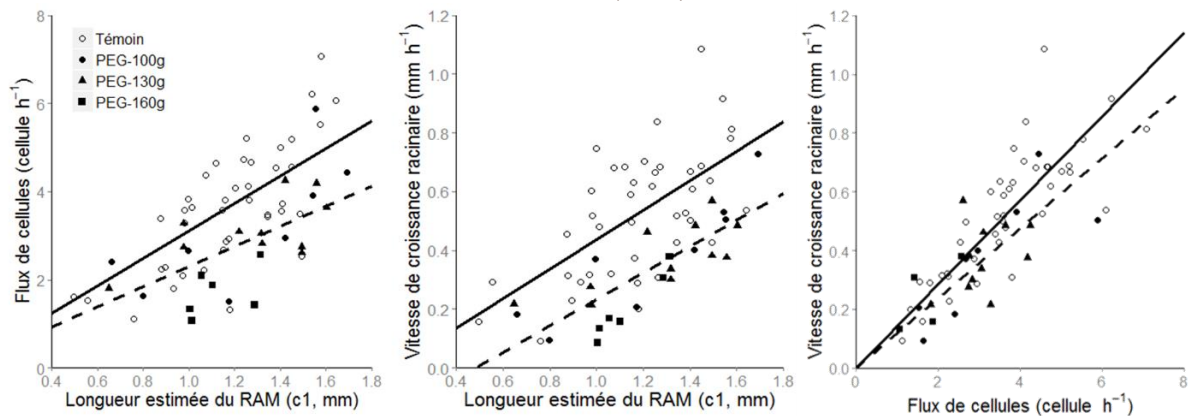


Figure 61 : Relation entre la longueur du RAM et le flux de cellules en sortie de RAM (gauche) ou la vitesse de croissance des racines (milieu) ainsi qu'entre le flux de cellules en sortie de RAM et la vitesse de croissance des racines. Les points blancs indiquent des racines témoins. Les points noirs indiquent les racines ayant subies un stress osmotique (rond = stress faible ; triangle = stress modéré ; carré = stress fort). Une relation linéaire est indiquée pour les racines témoins (trait plein) et l'ensemble des racines stressées (tirets).

II. Nouvelles méthodes de mesure de la longueur du méristème apical racinaire

A. Indice de vacuolisation

A l'échelle de la racine, on attend que l'indice de vacuolisation augmente à partir du domaine de transition du RAM. Pendant que la vacuole s'agrandit, le cytosol est plaqué sur les parois cellulaires. Sur une coupe longitudinale d'un apex racinaire coloré pour mettre en évidence le cytosol, l'intensité de la coloration diminue avec l'augmentation de la vacuolisation des cellules (Figure 41). Pour 28 racines, la longueur du RAM a été alternativement déterminée en utilisant un indice de vacuolisation. Dans cette approche, la longueur du RAM est définie comme étant la distance au centre quiescent à partir de laquelle l'intensité de la coloration, mesurée sur les coupes longitudinales des racines, devient inférieure à 50% de l'intensité maximale. A notre connaissance, l'utilisation d'une coloration histologique n'a encore jamais été employée pour estimer l'intensité de la vacuolisation, bien que cela ait déjà été suggéré (De Veylder *et al.*, 2001). La longueur du RAM déterminée à partir des longueurs de cellules est très fortement corrélée à celle mesurée grâce au degré de vacuolisation (erreur quadratique moyenne, EQM = 0.109 ; Figure 62). L'estimation de la taille du RAM à partir de la coloration de coupe est donc parfaitement envisageable, permettant d'éviter des mesures fastidieuses de longueur de cellule.

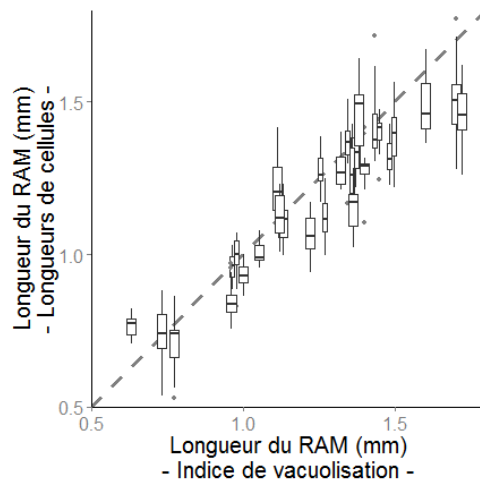


Figure 62: Corrélation entre la longueur du méristème apical racinaire mesurée en utilisant la longueur des cellules ou leur état de vacuolisation. La ligne en tirets indique la relation 1:1.

B. Apport de l'infrarouge

Malgré le gain de temps envisageable par l'utilisation d'un indice de vacuolisation tel que précédemment décrit, les coupes histologiques, associées ou non à des mesures de longueur de cellules prennent un temps important et restreignent les données obtenues à une unique mesure finale. Nous avons développé de nouveaux outils permettant une mesure non-destructive de la longueur du RAM, autorisant notamment un suivi temporel de ses variations. Pour cela, deux possibilités ont été considérées : (i) utiliser directement les images infrarouges brutes de l'apex racinaire ou (ii) utiliser les profils de vélocité calculées lors des analyses cinématiques.

Les patrons mouchetés visibles sur la surface des racines et utilisés pour les suivis de croissance (*cf. Matériel et méthodes*) sont communément observés sur le matériel biologique sous des éclairages laser. Sur les racines, il a été montré que de tels patrons peuvent être associés à une zone de réponse au thigmostimuli (Ribeiro et al., 2014). Nous avons émis l'hypothèse que la lumière infrarouge proche utilisée lors des suivis de croissance est différemment réfléchi en fonction de la densité de cellule et/ou l'orientation des parois cellulaires. Sous illumination infrarouge, une zone de forte clarté est systématiquement observée et mesurable dans la partie la plus apicale de la racine (Figure 29, après la coiffe). Nous avons testé si cette zone peut être un indicateur de densité cellulaire et donc de la taille du RAM. Concernant l'utilisation des profils de vélocité, nous avons testé la robustesse du paramètre $c1$ de l'équation de Peters & Baskin (2006), pour mesurer la longueur du RAM (précédemment utilisé pour quantifier la vélocité en sortie de RAM).

Nous avons comparé la longueur du RAM obtenue à partir des profils de longueur de cellules, estimation la plus classiquement utilisée, à celle de la zone de forte clarté sous infrarouge et à la valeur de $c1$. Une erreur quadratique moyenne (EQM) a été calculée pour estimer la différence moyenne entre les valeurs données par l'une ou l'autre des méthodologies. Les résultats montrent que la zone de forte clarté est un très bon estimateur de la longueur du RAM (EQM = 0,113, Figure 63A), tout comme le paramètre $c1$ (EQM = 0,137, Figure 63B). Une relation 1:1 significative lie ces deux estimateurs (EQM = 0,205), soulignant leur forte dépendance même si les signaux sous-jacents mesurés sont distincts. Finalement, une combinaison mathématique de ces deux estimateurs (la moyenne des deux) fournit le meilleur proxy de la longueur du RAM mesurée à partir des longueurs

de cellule (EQM = 0.073, Figure 63C). Une déviation est régulièrement observée pour les RAM les plus longs (Figure 63A-B). Dans ces cas, il est possible que la longueur du RAM mesurée à partir des longueurs de cellule ne soit pas la meilleure référence possible et que cette méthode surestime légèrement la longueur « réelle » du RAM.

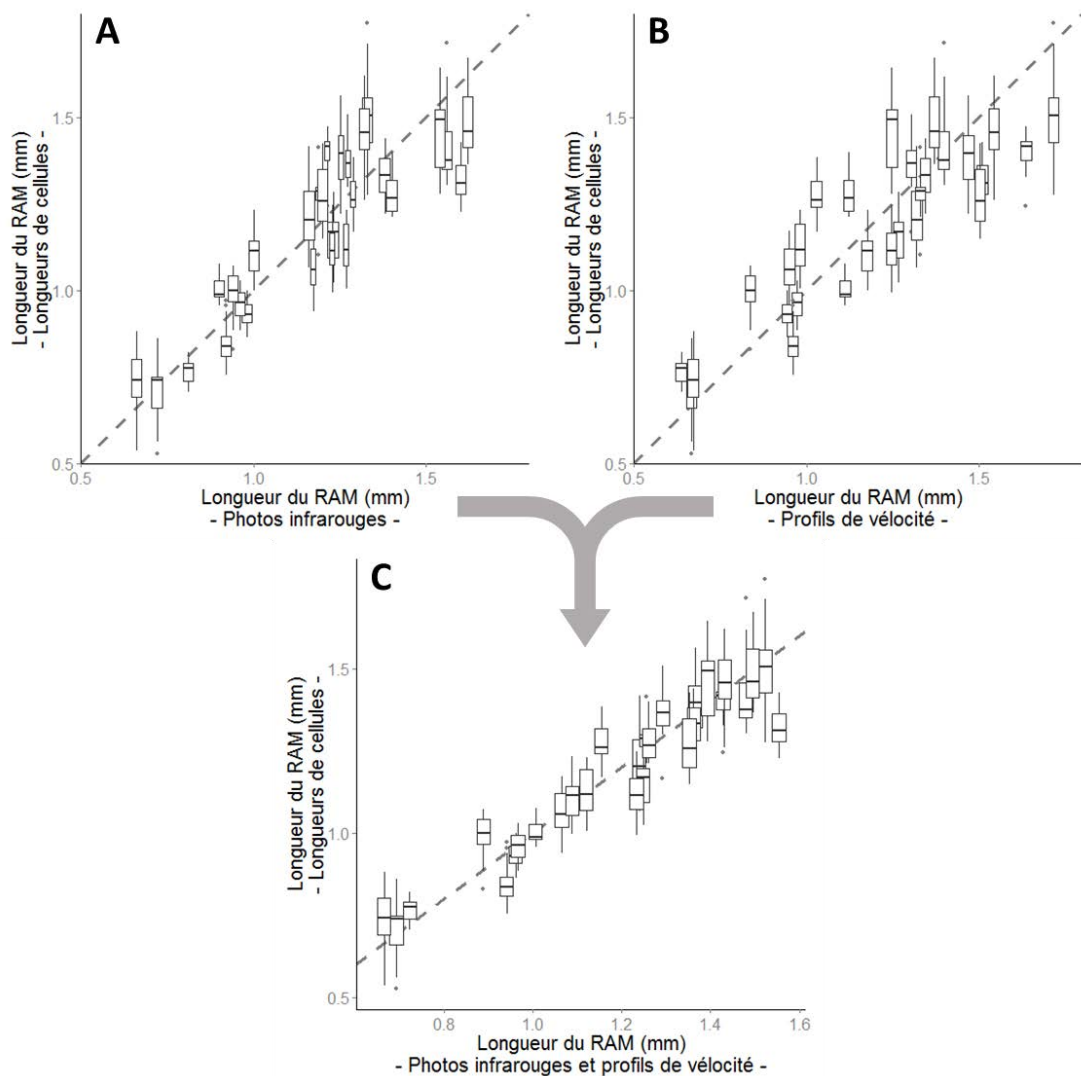


Figure 63: Comparaison des longueurs de méristème obtenues à partir des longueurs de cellule et à partir des profils d'intensité des pixels sur les photos infrarouges (A), du point d'inflexion c_1 sur les profils de vitesse (B) et de la moyenne de ces deux méthodes (C). Les boîtes à moustaches sur l'axe y correspondent aux longueurs mesurées sur différentes couches de cellules corticales. Lignes en tirets = relation 1:1 utilisée pour déterminer l'erreur quadratique moyenne (EQM, cf. texte).

Pour le peuplier, le seuil utilisé pour déterminer la zone de forte clarté sur les photos infrarouge est défini empiriquement à 75% de l'intensité maximale. D'autres seuils (de 60% à 90%) donnent eux aussi d'excellentes relations linéaires mais néanmoins plus éloignées d'une relation 1:1. L'utilisation de l'infrarouge et de c_1 pour mesurer la longueur du RAM est résumée dans la Figure 64.

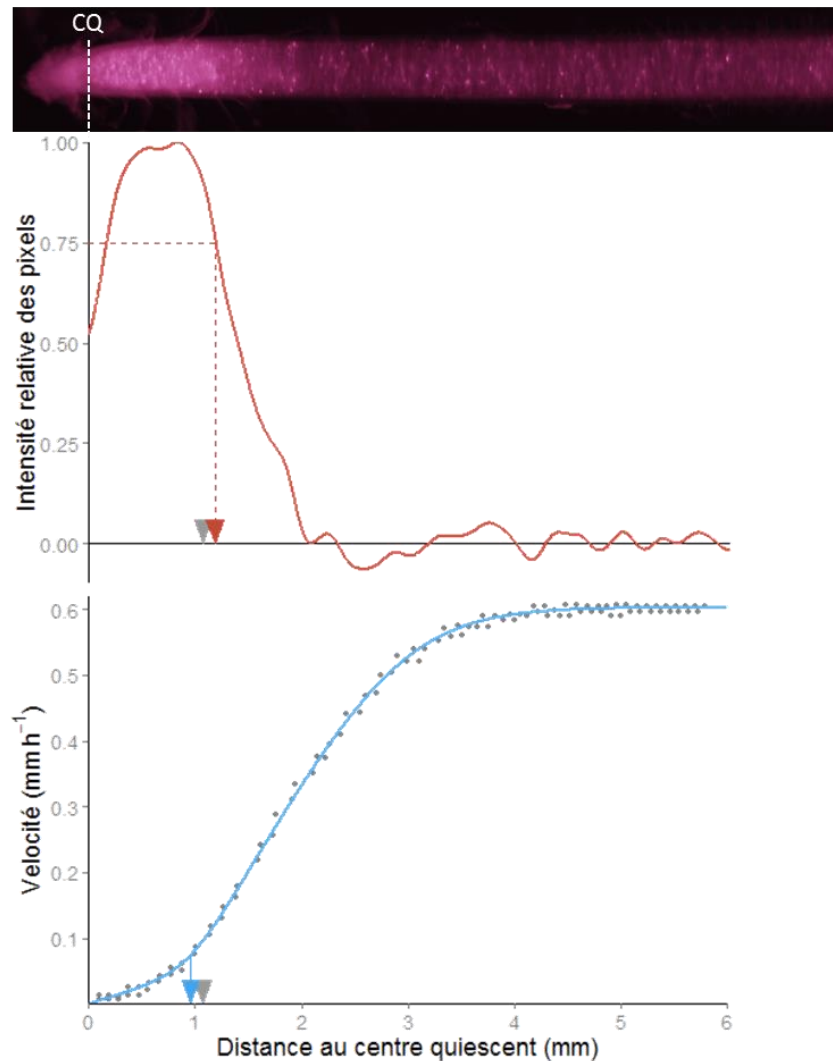


Figure 64: Illustration des mesures de la longueur du méristème à partir des photos infrarouges et des profils de vitesse. La flèche grise indique la longueur de méristème mesurée à partir des profils de longueur de cellule. La moyenne entre le profil d'intensité de pixel (seuil de 75%) et le premier point d'inflexion du profil de vitesse donne la meilleure estimation de la longueur du méristème (cf. Figure 63). CQ: Centre Quiescent.

Nous avons validé notre protocole de mesure non-destructive du RAM en testant sa fiabilité sur un génotype commercial de maïs (Landmark hybride F1) poussant en hydroponie ainsi que sur *arabidopsis* (génotype Col-0 ; Bizet *et al.*, 2014). Une nouvelle relation linéaire très significative est obtenue entre la longueur du RAM issue des profils de longueur de cellule et les estimations *in vivo* (Figure 65). La relation trouvée s'écarte de la relation 1:1, indiquant que même si la méthode fournit une longueur relative de RAM fiable pour comparer des individus (des valeurs faibles sont bien représentatives d'individus ayant des RAM courts et inversement), une étape de calibration est nécessaire pour obtenir des longueurs absolues de RAM par régression linéaire. D'un point de vue biologique, cette déviation peut être le reflet d'une transition plus diffuse chez le maïs entre le RAM et la zone d'élongation. De cette manière, l'infrarouge mesure la présence de cellule proliférative éloignée du centre quiescent et non prise en compte dans les mesures de longueur de cellule si situées après des cellules de grande taille au sein d'une file. Cette hypothèse expliquerait la forte surestimation de la longueur du RAM mesurée avec l'infrarouge par rapport à celle mesurée avec les longueurs de cellules.

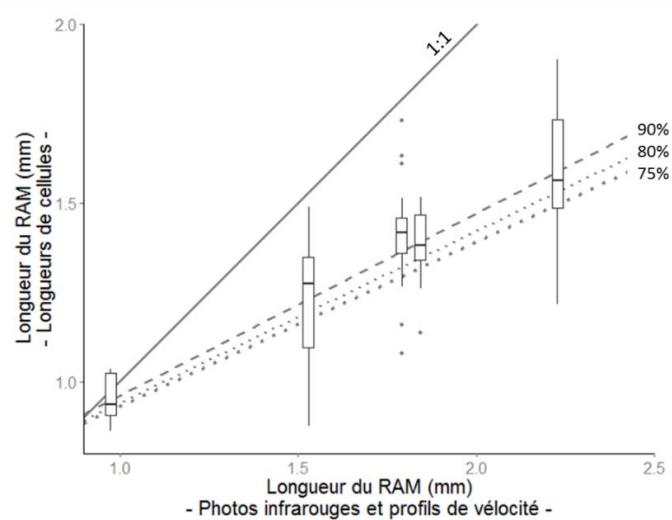


Figure 65: Relation entre la longueur du RAM mesurée à partir des longueurs de cellules et les mesures *in vivo* chez le maïs. Les lignes segmentées indiquent les relations obtenues pour différents seuils de luminosité sous infrarouge. Les boîtes à moustaches sont présentées pour un seuil de 90%. La ligne pleine indique la relation 1:1.

Les mesures *in vivo* de longueur du RAM offrent plusieurs avantages. En contournant une contrainte méthodologique (le protocole de microscopie), cette méthodologie permet (i) d'augmenter le nombre d'individus qui peuvent être intégrés dans un protocole expérimental, (ii) de suivre les variations temporelles de longueur du RAM en réponse à divers signaux, (iii) d'ouvrir ces mesures de longueur du RAM à de nouveaux champs de recherche (*e.g.* par exemple pour estimer l'activité du RAM dans des rhizotrons, [Pagès et al., 2010](#)).

C. Position de la limite tige-orientée au sein du domaine de transition

Par définition, le RAM inclut un domaine de transition où coexistent de la division et de l'expansion cellulaire. Les quatre méthodologies décrites (longueur des cellules, indice de vacuolisation, éclairage infrarouge, profil de vitesse) donnent des limites de RAM concordantes. Nous nous sommes demandés si la limite tige-orientée donnée par ces méthodes couvre ou non l'ensemble du domaine de transition du RAM. Pour répondre à cette question, nous avons caractérisé le flux de cellules avant et après cette limite.

En assumant la stabilité de la croissance, le flux de cellules à une distance donnée correspond au rapport entre la vitesse à cet endroit et la taille moyenne des cellules qui s'y trouvent (*cf.* [Introduction](#) ; [Fiorani and Beemster, 2006](#)). Le flux de cellules à la limite tige-orientée du RAM ($4,8 \pm 0.4$ cellule h^{-1}) est similaire au flux mesuré à la fin de la zone de croissance ($5,1 \pm 1.1$ cellule h^{-1}), confirmant que les cellules ne se divisent plus une fois la sortie du RAM atteinte. Néanmoins, la vitesse en sortie du RAM est faible (moyenne = $0,06$ mm h^{-1}) et hautement variable entre individus (écart-type = 0.02 mm h^{-1}), quelques divisions tardives peuvent être masquées par cette incertitude.

La haute densité cellulaire sur les coupes longitudinales permet d'analyser des populations de cellules en sortie du RAM et au-delà. La microscopie ne fournissant qu'un instantané final et empêchant toute analyse temporelle, nous assumons la stabilité au cours du temps des profils de longueur de cellule. Les suivis de croissance sont utilisés pour estimer le déplacement, après deux heures de croissance, d'une population de cellules initialement localisée à la sortie du RAM. Nous avons mesuré la longueur des cellules de cette population initiale et de la population localisée là où

se serait trouvée la population initiale après deux heures de croissance (Figure 66). En parallèle, à partir des taux d'élongation mesurés pendant les deux heures de suivis, nous avons calculé le gain théorique en longueur des cellules de la population initiale en omettant tout processus de division. Nous avons comparé la distribution des longueurs attendues sans division à la distribution des longueurs mesurées (Figure 67).

Pour les cellules de grande taille, une très bonne correspondance existe entre les distributions observée et théorique, ce qui valide l'hypothèse de stabilité temporelle de la croissance. En se concentrant sur les cellules de petites tailles, on constate que les cellules mesurées sont plus petites qu'attendu sans division (*cf.* hachures dans la Figure 67), ce qui indique que certaines cellules se sont divisées au-delà de la limite tige-orientée du RAM.

Ces observations soulignent que la limite tige-orientée du RAM telle que nous l'avons mesurée est située (i) au-delà du domaine de prolifération cellulaire: la plupart des cellules ne se divisent plus et ne font que s'allonger, et (ii) au sein du domaine de transition: même si certaines cellules sont très fortement vacuolisées, quelques évènements de division ont lieu après cette limite.

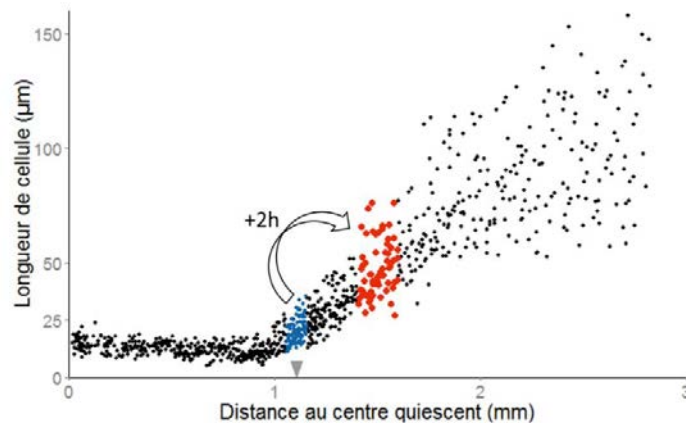


Figure 66: Visualisation des cellules mesurées pour les analyses de population. Les cellules bleues constituent la population mesurée en fin de RAM. En assumant la stabilité temporelle du profil, deux heures de croissance amènent les cellules bleues à la position des rouges. Les longueurs des cellules rouges sont mesurées puis comparées à une population théorique calculée à partir des longueurs des cellules bleues (en supposant l'absence de division).

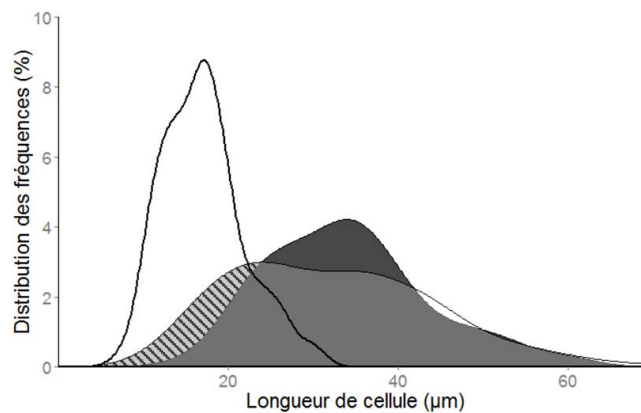


Figure 67: Distributions lissées des fréquences de longueur de cellule. La ligne pleine représente une population initiale localisée au niveau de la limite tige-orientée du RAM (population bleue, Figure 66). La zone en gris clair représente les fréquences mesurées après deux heures de croissance (population rouge, Figure 66). La zone gris foncé correspond aux fréquences attendues à ce même endroit sans activité de division. Les hachures indiquent des cellules plus petites qu'attendu sans division.

III. Spécification Lagrangienne de la croissance

L'analyse de la variabilité spatiale de la croissance le long de l'apex racinaire présentée dans les chapitres précédents repose sur les suivis de croissance de 41 racines. Au total, plus de 300 heures de suivi de croissance à haute fréquence ont été compilées et permettent une analyse temporelle fine.

A. Oscillations de croissance

Les profils de vélocité et de taux d'élongation élémentaire précédemment discutés ont été mesurés toutes les 12 minutes. Les indicateurs de croissance (vitesse de croissance, longueur de la zone de croissance, taux d'élongation élémentaire maximal) sont déterminés sur chaque profil individuel, ce qui permet d'analyser leur dynamique temporelle (*i.e.* d'un profil à l'autre). Les analyses révèlent des oscillations de la vitesse de croissance prononcées au cours du temps. La période des oscillations est comprise entre 45 et 180 minutes. Leur amplitude est de plus ou moins 10-15% pour les cas les plus extrêmes (Figure 68). Il n'est pas exclu que ces oscillations soit liées à la circumnutation des racines. De nombreuses études font état de périodes de circumnutation d'apex caulinaires similaires aux nôtres : 100 minutes chez le haricot (Millet *et al.*, 1984), 120 minutes chez le soja (Adolfson *et al.*, 1998) ou 45 à 120 minutes chez le radis, concombre et tournesol (Kristie & Jolliffe, 1986). Sur des apex racinaires, des périodes de 60 minutes ont été décrites pour des racines de maïs (Walter *et al.*, 2003) et de 120 minutes pour des racines de riz (Iijima & Matsushita, 2011). Si les origines physiologiques de ces oscillations sont peu claires, une corrélation nette a été mise en évidence entre la fréquence de circumnutation et les échanges de protons et d'ions calcium avec la solution de culture (Shabala & Newman, 1997).

Des oscillations de croissance sont également observables dans le RAM (Figure 68 tirets). Ces oscillations sont plus marquées et peuvent atteindre environ 50% autour de la valeur moyenne. Une périodicité du taux d'élongation dans le RAM indiquerait une périodicité de l'activité de production de cellules du RAM. Cette dernière pourrait résulter d'une synchronisation partielle de l'activité de division des cellules. Il a déjà été mis en évidence que l'index mitotique dans les méristèmes de plantes peut atteindre des valeurs maximales et minimales plusieurs fois au cours d'une même journée. Sur racines de betteraves par exemple, la période d'oscillation est d'un peu plus de 3 heures (Chugunkova *et al.*, 1988). Plus l'amplitude des oscillations est importante, plus les divisions cellulaires sont synchronisées (synthèse de Grif *et al.*, 2002).

Une activité cyclique du RAM conduit à la production ponctuelle de cohortes de cellules qui sont poussées dans la zone d'élongation. Nous émettons l'hypothèse que l'existence de ces cohortes peut avoir un impact sur la croissance de la racine et pourrait être la source des oscillations de la vitesse de croissance observées à l'échelle de la racine. L'analyse spectrale⁷ de la dynamique temporelle permet d'extraire les périodes d'oscillations de la vitesse de croissance et de l'activité du RAM pour chaque racine. Les résultats montrent une bonne corrélation des périodes d'oscillations au sein de chaque racine qui appuie cette hypothèse (Figure 69). De plus, la non-synchronisation de ces deux oscillations sur une partie des racines (Figure 68), pourrait être le reflet du délai entre le moment où la cohorte sort du RAM et le moment où elle entre dans une zone d'expansion rapide. Nous ne pouvons également pas exclure que ces oscillations puissent résulter d'un signal provenant de la zone mature, tel qu'un flux d'hormones, qui atteindrait la zone d'élongation avant le RAM.

⁷ En physique, analyse des signaux temporels dans le domaine des fréquences.

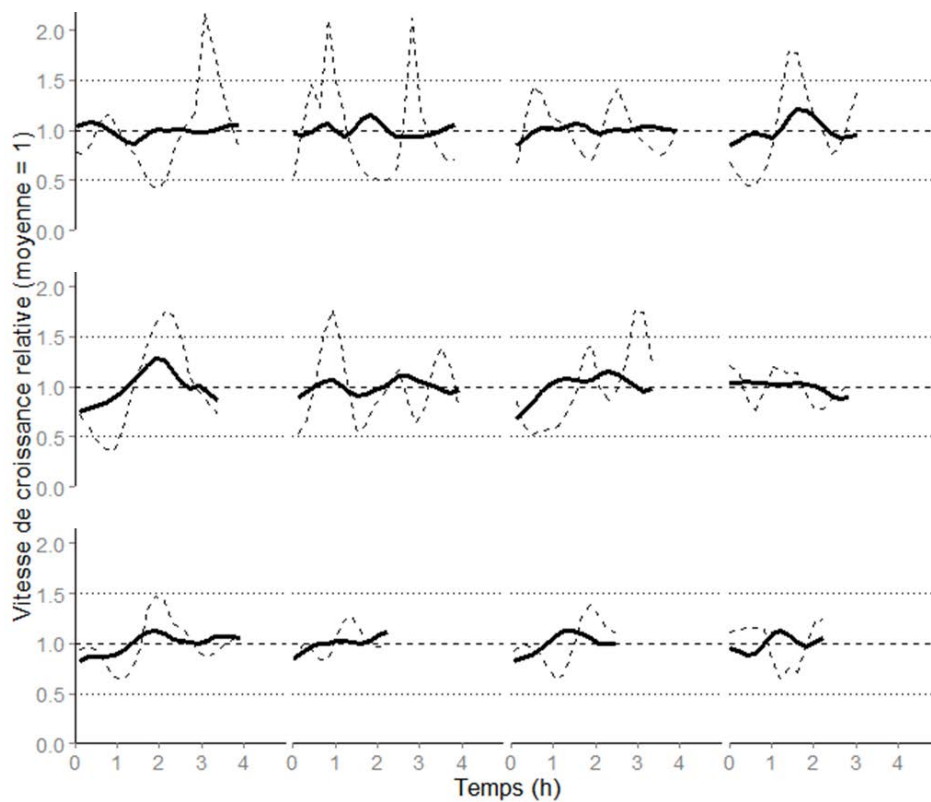


Figure 68 : Oscillations de la croissance (trait plein) et de la vitesse en sortie de RAM (tirets) de 12 racines.

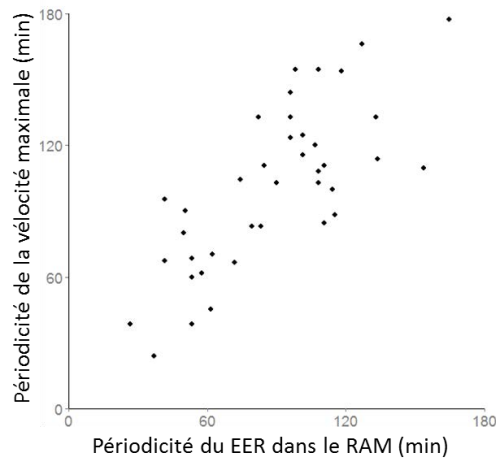


Figure 69 : Relation entre les périodes d'oscillation de croissance de la racine et de vitesse dans le RAM.

B. Trajectoires de croissance

Lorsque le temps de phénotypage est inférieur au temps nécessaire pour qu'une cellule traverse la zone de croissance, il est nécessaire de supposer la stabilité temporelle du profil de vitesse pour calculer une trajectoire de croissance complète (Silk, 1992). Or, la périodicité de la croissance racinaire montre que même sans stress osmotique et sous influence extérieure minimale, la croissance de la racine n'est pas stable à cette résolution temporelle. Toutefois, en condition témoin, les suivis de croissance couvrent au minimum un cycle complet d'oscillation de la vitesse de croissance. En supposant que les oscillations observées sont répétées au cours du temps, nos profils de vitesse moyens peuvent être considérés comme de bons estimateurs de la croissance des racines

sur des temps long. Nous avons donc utilisé ces profils moyens pour calculer la trajectoire de croissance sur les racines témoins d'une particule issue du centre quiescent (Figure 70 gauche).

En synchronisant ces profils temporels pour une particule placée en sortie du RAM au temps $t=0$, il est possible de séparer sur un axe temporel la part de la croissance qui a lieu dans le RAM de celle ayant lieu dans la zone d'élongation (Figure 70 droite). Sans surprise, le temps passé dans le RAM (50 à 150 heures) est très supérieur au temps passé dans la zone d'élongation qui n'excède pas 15 heures pour la grande majorité des racines suivies (Figure 71). A titre de comparaison, les temps moyens reportés chez quatre espèces de poacées sont de 100-150 heures dans le RAM et environ 25 heures dans la zone d'élongation (Fiorani *et al.*, 2000). Sur peuplier, sans connaître ni la longueur du RAM ni la position exacte du centre quiescent, Merret et collaborateurs (2010) ont indiqué des temps de séjour de 38 heures entre 1 et 3 mm depuis la pointe de la coiffe et de 8 heures au-delà.

La décomposition des temps de passage dans le RAM et dans la zone d'élongation selon un gradient croissant de vitesse de croissance montre que les racines présentant un temps de passage long dans le RAM et/ou dans la zone d'élongation ne sont pas nécessairement celles qui poussent le plus vite (Figure 71). Le temps passé dans l'une ou l'autre de ces zones n'est pas corrélé avec la vitesse de croissance des racines. Une autre façon de le visualiser est de regarder la dynamique du taux d'élongation élémentaire le long de ces trajectoires, dans le RAM ou dans la zone d'élongation (Figure 72). La zone d'élongation comprend 80 à 85% de la croissance de la racine (Figure 47). Alors que la vitesse de croissance des racines varie du simple au quintuple, la dynamique temporelle du EER dans la zone d'élongation est étonnamment similaire pour toutes les racines, avec un temps de séjour allant seulement du simple au double (8-15h). Ces éléments mettent en lumière la faible importance du vécu des cellules dans la zone d'élongation (durée et intensité de l'élongation) pour expliquer les variations de croissance d'une racine à l'autre.

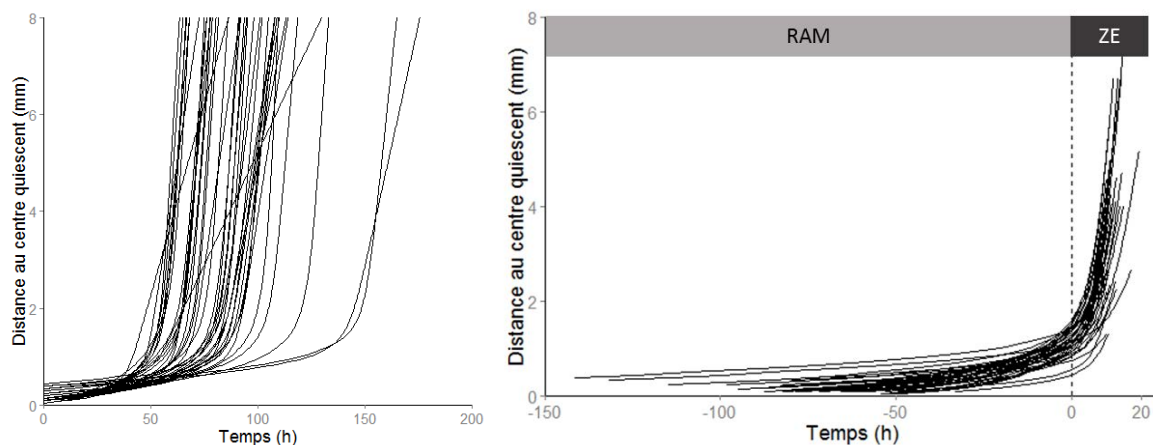


Figure 70 : Trajectoires de croissance calculées à partir des profils individuels de vitesse en condition témoin. Les trajectoires sont alignées de manière à ce que le temps $T=0$ corresponde au centre quiescent (gauche) ou à la sortie du méristème estimé par $c1$ (droite). Dans ce dernier cas, les trajectoires dans la zone d'élongation sont stoppées à la sortie de la zone de croissance.

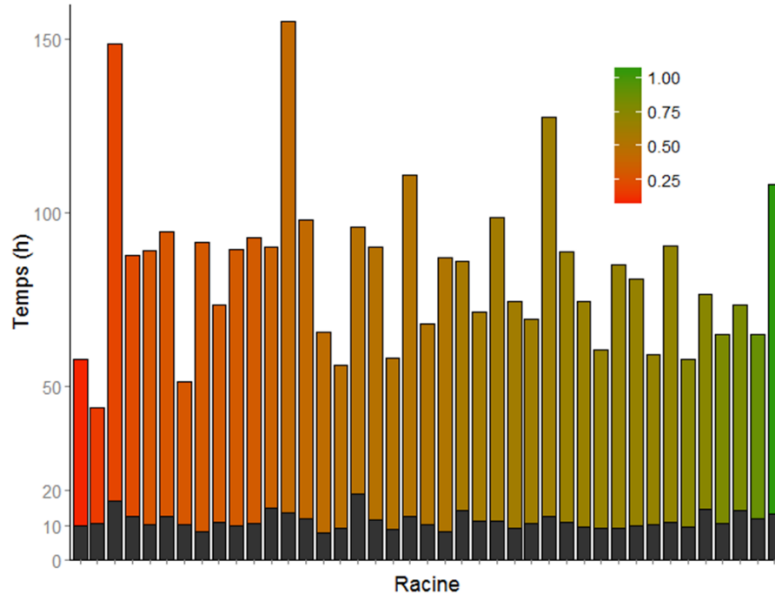


Figure 71 : Temps de la trajectoire de croissance passé dans la zone d'élongation (partie noire) et dans le RAM (partie colorée). Les barres verticales représentent le cumul des deux temps pour chaque racine, classé par ordre croissant de vitesse de croissance (donnée par l'échelle de couleur).

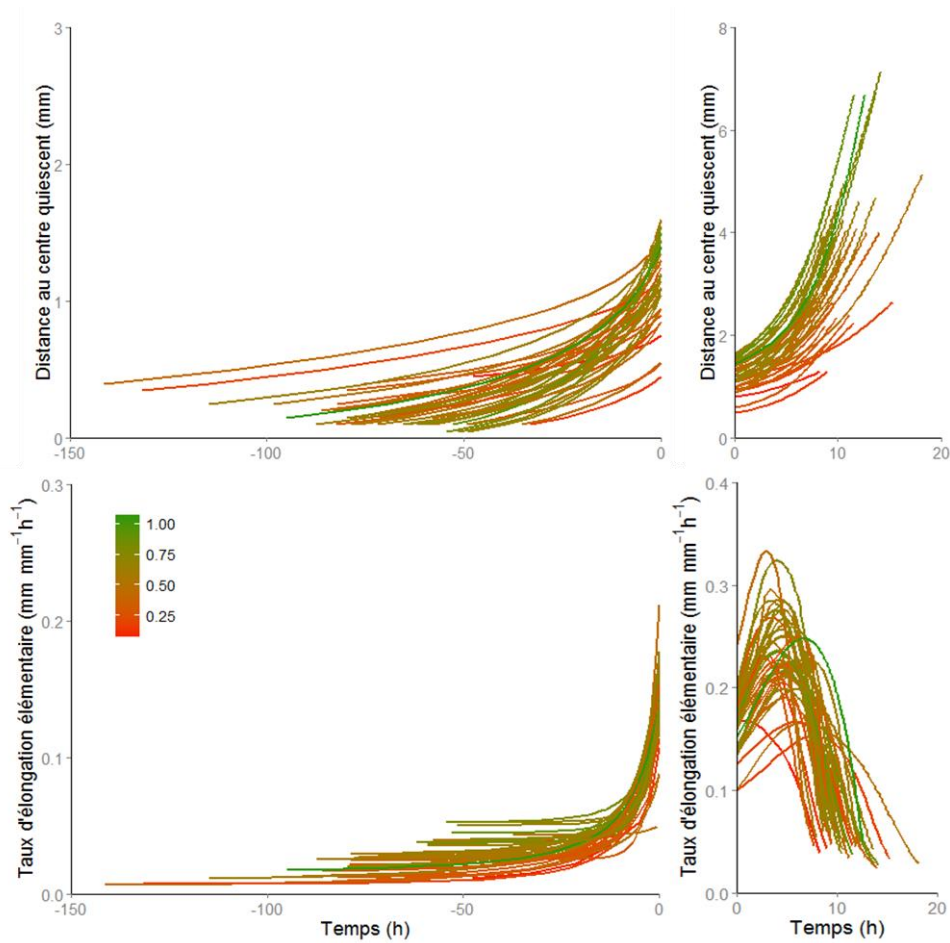


Figure 72 : Détail des trajectoires de croissance individuelles dans la zone d'élongation (haut) et dynamique du taux d'élongation élémentaire le long de ces trajectoires (bas). L'échelle de couleur indique la vitesse de croissance.

C. Réponse au stress osmotique

Suite aux modifications de croissance induites par le stress osmotique, l'analyse temporelle de la croissance via les trajectoires moyennes de croissance devient difficile, voire hasardeuse : il n'est plus possible d'extrapoler un profil de vitesse moyen sur plusieurs dizaines d'heures pour calculer une trajectoire de croissance intégrant l'ensemble de la traversée de la zone de croissance. Néanmoins, la stabilité de la croissance peut tout à fait être assumée sur des pas de temps court, de l'ordre de quelques minutes. Ainsi, notre connaissance exhaustive de l'évolution des profils de vitesse sur plusieurs heures nous permet de calculer les trajectoires partielles sur le temps du suivi. Si les quelques heures de suivi sont trop faibles pour suivre une particule depuis le RAM jusqu'à la fin de la zone de croissance, elles sont en revanche suffisantes pour suivre des particules sur une partie de la zone d'élongation ou pour fournir des indications sur le vécu de cellules au sein du RAM.

Il nous apparaît judicieux de considérer l'évolution de la croissance relative élémentaire d'un apex racinaire dans un espace tridimensionnel incluant la distance au centre quiescent, le temps de suivi et un indicateur de croissance tel que le taux d'élongation élémentaire. La représentation de ces données sous forme de nappe ou vue de dessus avec une couleur pour la 3^{ème} dimension permet de visualiser et de suivre le cheminement d'une particule au cours de son déplacement le long de l'apex (Figure 73). Sur cette nappe, une vue de face permet de retrouver le profil de EER pour chaque pas de temps, une vue de côté donne l'évolution temporelle du EER en chaque position, tandis qu'une vue de dessus représente les trajectoires de croissance. Dans notre cas, les trajectoires de croissance sont partielles puisqu'elles n'incluent pas toute la zone de croissance.

L'utilisation des nappes de croissance permet de visualiser de manière exhaustive l'évolution du profil d'élongation relative (ou de tout autre indicateur) au cours du temps. Les oscillations du taux d'élongation élémentaire maximal et de l'élongation dans le RAM sont nettement visibles (Figure 73). Les trajectoires de croissance partielles montrent que chaque particule traverse plusieurs fois une zone de forte élongation avant de sortir de la zone d'élongation. Ainsi, les cellules ne passent pas par un unique EER_{max} , comme le sous-entend un profil spatial de EER mais au contraire par plusieurs (vraisemblablement deux ou trois). Par conséquent, les profils spatiaux de EER, s'ils indiquent un vécu moyen des cellules le long de l'apex, ne sont que moyennement représentatifs de la dynamique de EER de chaque cellule.

Les nappes de croissance permettent de visualiser l'impact du stress osmotique sur la croissance de la racine le long de l'apex. Sur l'exemple illustré dans la Figure 74 (stress moyen), une diminution prononcée de la croissance suivie d'une récupération partielle rapide est observée après l'application du stress osmotique. Un resserrement du profil d'élongation est nettement visible, montrant la diminution de la longueur de la zone de croissance. La gamme de couleur montre que l'intensité maximale d'élongation est récupérée environ une heure après l'application du stress.

Il nous est difficile d'aller plus loin sur ces analyses spatio-temporelles pour le moment. En effet, les oscillations prononcées et asynchrones du EER sur l'ensemble de la zone en croissance compliquent encore une fois les analyses. Nous sommes notamment limités ici par un temps de suivi court qui, malgré le nombre de racines caractérisées, ne permet pas de regroupement efficace pour séparer la réponse au stress osmotique des variations inter- et surtout intra-individus.

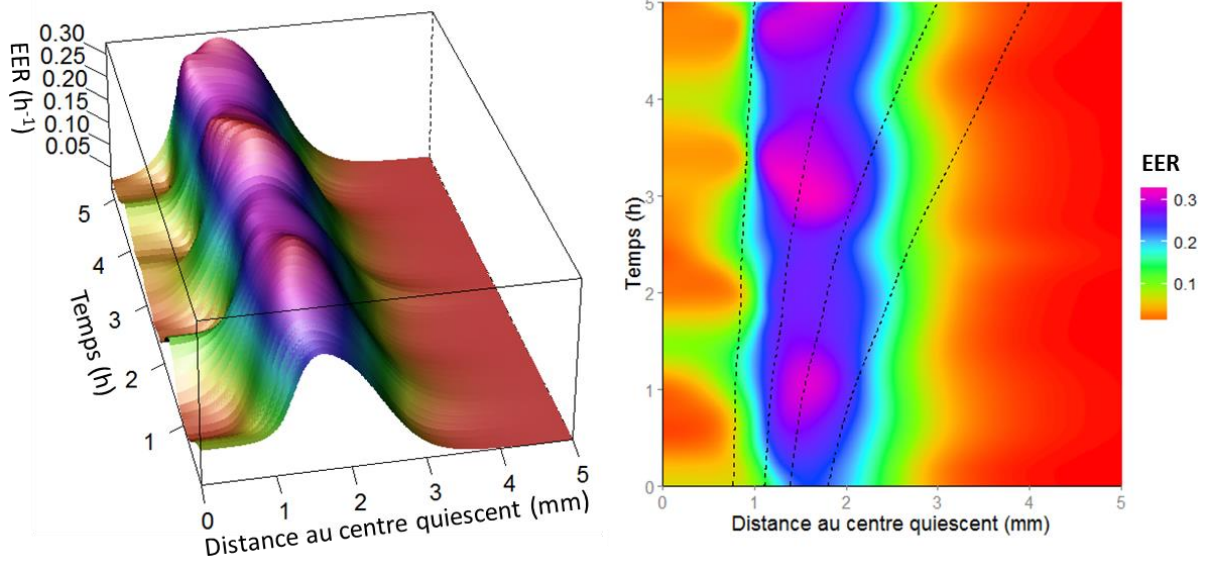


Figure 73 : Nappe de croissance relative élémentaire (gauche) pour une racine en condition témoin. A droite, la nappe est vue de dessus. Les trajectoires de croissances partielles de plusieurs particules sont indiquées par les courbes en tirets.

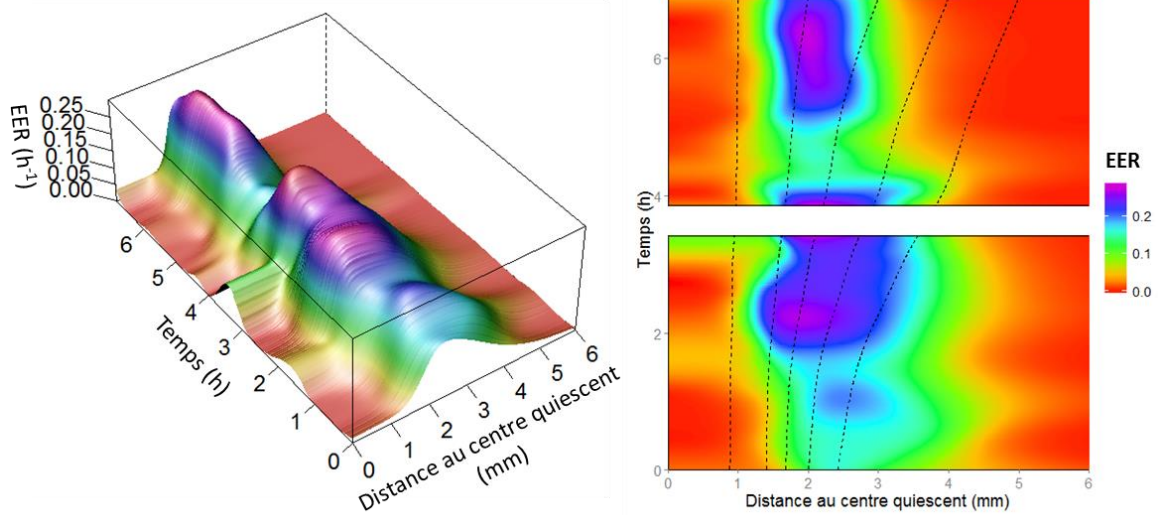


Figure 74 : Nappe de croissance relative élémentaire (gauche) pour une racine ayant subi un stress osmotique au temps $t=3,55$ heures. A droite, la nappe est vue de dessus. La zone blanche, non visualisée en 3D, est un court temps sans suivi créé par un mouvement hors du champ de la caméra de la racine suite à l'ajout du PEG dans la solution de culture. Les trajectoires de croissances partielles de plusieurs particules sont indiquées par les courbes en tirets.

IV. Réponse de l'apex racinaire à la rencontre d'un obstacle

A. Elaboration d'un obstacle jouant le rôle de capteur pour mesurer la force générée par la racine en croissance

Par définition, un capteur transforme une grandeur physique *i.e.* la force appliquée par l'extrémité de la racine, en une autre grandeur physique quantifiable *i.e.* la déformation du capteur. Nous avons conçu un obstacle capable de jouer aussi le rôle de capteur de la force générée par la croissance de la racine. Ce capteur est conçu pour être facilement mis en place dans la cuve de suivi et pour mesurer des forces supposées faibles générées par la croissance de la racine. Il est constitué d'une pièce déformable et d'un ancrage serré de cette pièce (Figure 75). Le principe de fonctionnement du capteur est le suivant : en poussant, la racine exerce une force sur la partie déformable du capteur, générant une déformation enregistrée et mesurée sur les photos infrarouges (cf. Chapitre V). L'intensité de la force appliquée est obtenue à partir de la relation entre cette force et le niveau de déformation mesurée. Cette relation découle de la caractérisation mécanique du matériau de la pièce déformable. Pour ce matériau, notre choix s'est porté sur une lamelle en verre (VWR international, $24 \times 50\text{mm}$, épaisseur 1). Le verre présente l'avantage d'être un matériau purement élastique : les déformations en réponse à une force externe sont réversibles (sauf casse). Ce matériau garantit une forte répétabilité des mesures et une relation linéaire simple entre la déformation de la lamelle et la force appliquée (Figure 76).

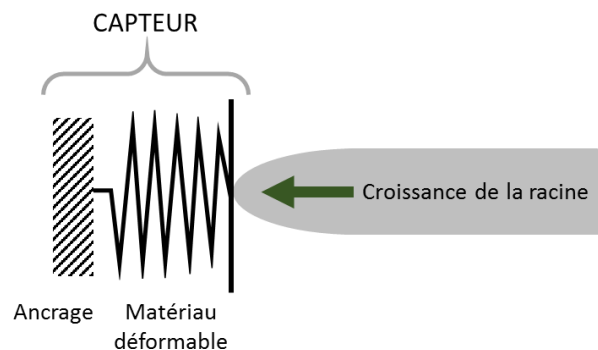


Figure 75 : Schéma de fonctionnement du capteur.

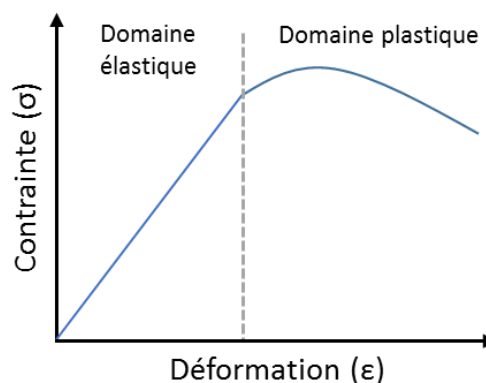


Figure 76 : Relation contrainte - déformation théorique pour un matériau ductile. Dans le domaine élastique, la relation est purement linéaire et aucune déformation n'est définitive, à l'inverse de ce qui se passe dans le domaine plastique.

La faible épaisseur de la lamelle (0,14mm) offre des déformations quantifiables en réponse aux forces très faibles qui devront être enregistrées. La lamelle est fortement ancrée entre deux plaques d'aluminium. L'utilisation d'une pâte d'étanchéité (Terostat VII, Teroson) entre les deux plaques permet d'augmenter la pression de serrage sans casser la lamelle. Un schéma du capteur est visible sur la Figure 77.

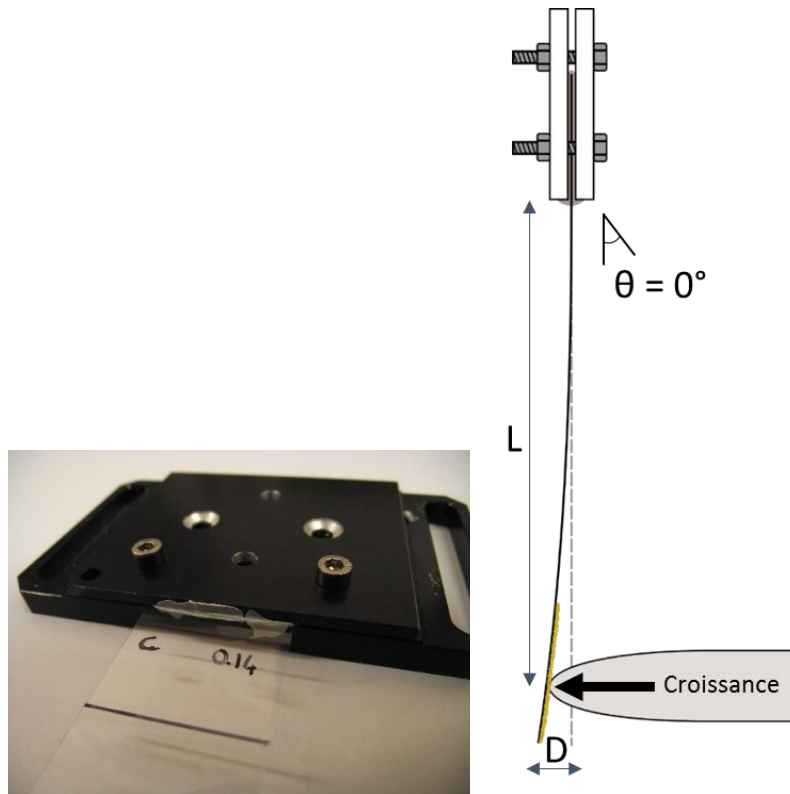


Figure 77 : Système de fixation utilisé pour ancrer la lamelle (gauche). Schéma du capteur de force (droite). L'ancrage permet de maintenir un angle d'insertion (θ) nul lorsqu'une force est appliquée sur la lamelle. Une fine couche de sable est collée à l'extrémité de la lamelle pour empêcher la pointe de la racine de glisser quand elle pousse la lamelle. La déformation est mesurée par le suivi du déplacement D de la pointe de la lamelle.

La théorie des poutres, modèle utilisé en résistance des matériaux pour des objets dont la longueur est grande par rapport aux sections transverses, est utilisée pour caractériser force appliquée (F [N]) sur un matériau homogène ancré d'un côté et libre de l'autre. L'équation 1, applicable dans le domaine de déformation élastique, exprime la force appliquée en fonction du module d'élasticité du matériau (ou module de Young, E [Pa]), du moment d'inertie de la lamelle (I [m⁴]), de sa longueur (L [m]) et de sa déformation (D [m]). Le module d'élasticité est une grandeur mécanique qui caractérise la propension d'un matériau homogène à se déformer en réponse à une contrainte externe.

$$F = \frac{E \times I \times 3 \times D}{L^3} \quad (\text{Equation 1})$$

D et L sont mesurés sur les photos de côté. Le moment d'inertie est déterminé en utilisant la forme de la lamelle (24×50×0,14 mm) à partir de l'équation 2.

$$I = \frac{\text{largeur} \times \text{épaisseur}^3}{12} \quad (\text{Equation 2})$$

Le module d'élasticité de la lamelle a été déterminé à l'aide d'un test normalisé de flexion 3 points réalisé sur une machine universelle de test (Instron 5966). Une cellule de charge de 10 N (± 25 mN à charge maximale) a été utilisée. Le module d'élasticité mesuré de la lamelle en verre est de 85,802 GPa.

Le domaine d'application de la théorie des poutres est vérifié sur l'ensemble du capteur en utilisant le module d'élasticité de la lamelle. Une force déterminée est appliquée sur le capteur et la déformation observée de la lamelle est comparée aux valeurs théoriques obtenues à partir de l'équation 1. La parfaite adéquation entre les valeurs mesurées et théoriques (Figure 78) valide la fonctionnalité du capteur pour mesurer la force générée par la croissance de la racine.

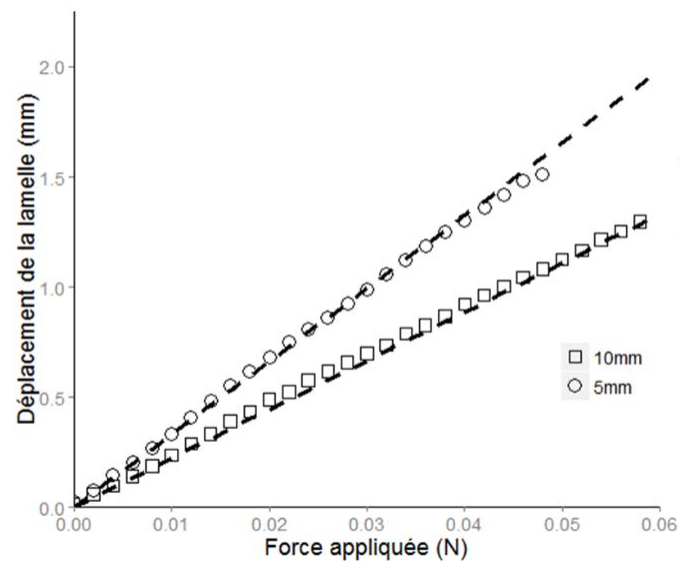


Figure 78 : Déplacement de la pointe de la lamelle en fonction de la force appliquée. La relation est donnée pour les valeurs expérimentales (points) et théoriques (courbes en tirets) déterminée pour une force appliquée à deux distances différentes de l'extrémité de la lamelle.

B. Cinétique de la rencontre avec l'obstacle

Dans cette expérience, l'extrémité de la lamelle est positionnée devant des apex racinaires en croissance, perpendiculairement à l'axe longitudinal de la racine (Figure 79). Après quelques heures de croissance, la pointe de la racine touche la lamelle. La racine en croissance applique alors une force croissante sur le capteur (Figure 79). Après un temps relativement court d'environ 45-60 minutes, la force appliquée atteint un maximum. La force maximale qu'un matériau comme l'apex racinaire applique se définit comme étant la force critique de ce matériau. Une fois cette force critique atteinte, une courbure rapide de la racine est observée, on parle de flambement de la racine. Ce flambement est également visible par le déclin de la force appliquée sur le capteur (Figure 79). Selon la nouvelle orientation de la racine, ce déclin est provisoire ou définitif.

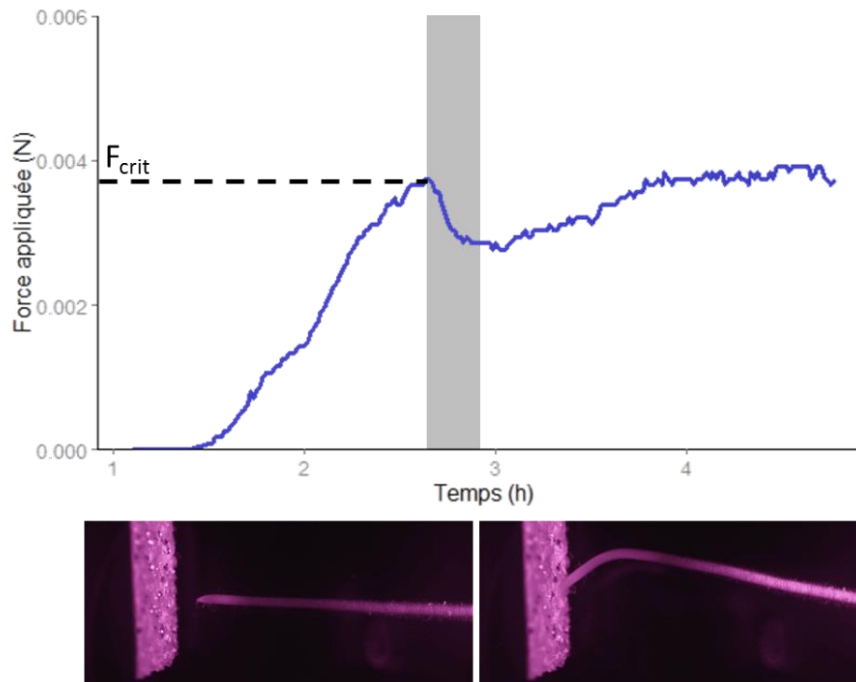


Figure 79 : Evolution de la force appliquée au cours du temps par un apex racinaire rencontrant un obstacle. La zone grisée indique le flambement de la racine une fois la force critique atteinte. Les photos infrarouges en bas montrent un apex racinaire avant et après flambement (respectivement gauche et droite).

C. Module d'élasticité de l'apex racinaire

D'un point de vue mécanique, la morphologie d'un matériau, sa force critique et son module d'élasticité sont trois paramètres connectés. Connaître deux des paramètres permet de déterminer le troisième (Equation 3). Ainsi, il est possible de calculer le module d'élasticité d'une racine connaissant sa morphologie et sa force critique. Inversement, cette force critique peut être déterminée à partir de la morphologie et du module d'élasticité de la racine.

$$F_{crit} = \frac{E \times I \times \pi^2}{(0,7 \times L)^2} \quad (\text{Equation 3})$$

Le moment quadratique (I) est celui d'une poutre de section circulaire (Equation 4). Il dépend uniquement du diamètre (d) de cette poutre. Sur les racines suivies, le diamètre le long de l'axe longitudinal de la racine utilisé correspond au diamètre de la racine mesuré en fin de zone de croissance.

$$I = \frac{\pi \times d^4}{64} \quad (\text{Equation 4})$$

En déplaçant manuellement la bouture contre l'obstacle via un rail optique, la force critique précédant le flambement des racines est déterminée en s'affranchissant de la croissance. Nous mesurons ainsi le module d'élasticité moyen le long de l'apex racinaire de peuplier, établi à $E = 0,157 \pm 0,023$ GPa. Ce module d'élasticité est très faible par rapport à celui de la lamelle mais reste cohérent avec ce qui serait attendu pour un tissu biologique non lignifié. Une valeur proche, de $0,073 \pm 0,008$ GPa a été reporté pour des racines adventives d'orge de diamètre équivalents (0,4-0,6mm) cultivées en hydroponie (Loades *et al.*, 2013).

D. Force critique de flambement de la racine en croissance

1. Racine non contrainte

La force critique d'une racine traduit sa capacité à pousser dans un sol plus ou moins contraint mécaniquement. Une racine capable de générer des forces élevées est plus à même de pousser dans un sol à forte impédance mécanique. Nous émettons l'hypothèse que la racine en croissance est capable de générer une force critique différente (et éventuellement supérieure) à celle générée par un matériau « racine » inerte doté des mêmes caractéristiques morphologiques. Cette différence pourrait résulter de réarrangements internes, par exemple des propriétés pariétales, opérés au cours de la rencontre avec l'obstacle.

Nous avons estimé la force critique de plusieurs racines présentant des morphologies différentes à partir du module d'élasticité moyen précédemment déterminé. Les forces critiques estimées sont comparées aux valeurs mesurées *in vivo* sur des racines en croissance (Figure 80). La relation 1:1 hautement significative obtenue indique que la force critique développée par une racine en croissance est identique à celle du matériau « racine » sans croissance. Notre hypothèse est rejetée. La force critique d'une racine et son flambement subséquent sont des observations prédictibles par des lois mécaniques simples, au moins dans notre système de culture en hydroponie. Dans ce système de mesure, la force critique mesurée est donc une limite purement mécanique du matériau « apex racinaire » quel que soit le taux de croissance de cet apex.

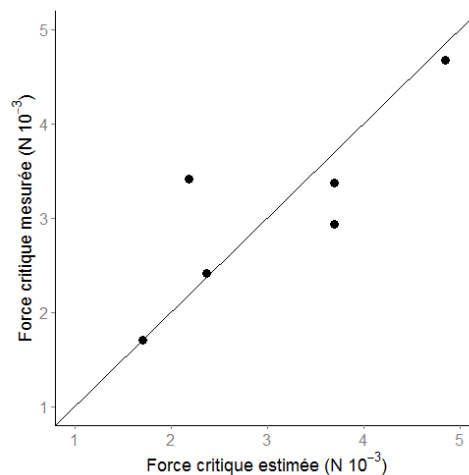


Figure 80 : Comparaison des forces critiques estimées à partir des paramètres morphologiques des racines (longueur totale, diamètre et module d'élasticité) avec les forces critiques mesurées. La ligne est une relation 1:1 (p -value < 0,001).

2. Racine contrainte

Pour progresser dans un sol, un apex racinaire génère des pressions qui peuvent atteindre 1 à 2 MPa (Bengough *et al.*, 2011 ; Schmidt *et al.*, 2013). Bien que la valeur d'impédance mécanique d'un sol mesurée avec un pénétromètre surestime la résistance opposée à la croissance de la racine (Bengough & Mullins, 1990 ; 1991), les forces critiques mesurées (<0,005 N soit <0,006 MPa) sont beaucoup trop faibles pour permettre aux racines de pousser dans un sol même faiblement contraint.

L'utilisation d'un support physique entourant la racine permet d'imiter l'effet d'un sol en précluant son flambement. Pour cela, nous avons fait pousser des racines dans des aiguilles creuses, de diamètre

interne équivalent à celui des racines, et partiellement ouvertes sur un flanc (Figure 81). Le taux de croissance des racines poussant dans les aiguilles ($0,79 \pm 0,12 \text{ mm h}^{-1}$) et celui des racines non contraintes ($0,68 \pm 0,06 \text{ mm h}^{-1}$) ne sont pas statistiquement différents ($p\text{-value} = 0,457$). Par contre, la force appliquée par les racines contraintes augmente pendant cinq à dix heures, un temps bien plus long que pour les racines non contraintes (Figure 82A). La force critique générées par les racines contraintes est plus de cinq fois supérieure à celle générée par les racines non contraintes (Figure 82B).

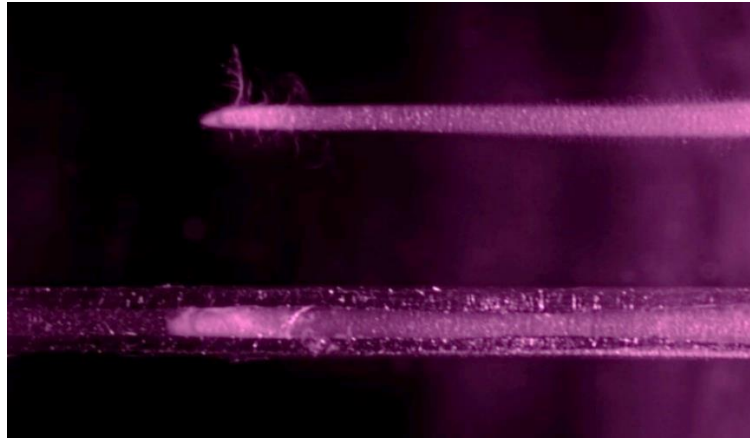


Figure 81 : Racine poussant en hydroponie, sans contrainte (haut) ou contrainte dans une aiguille creuse fournissant un support physique empêchant le flambement de la racine (bas). Les deux racines sont issues de la même bouture, poussent en parallèle et à la même vitesse de croissance.

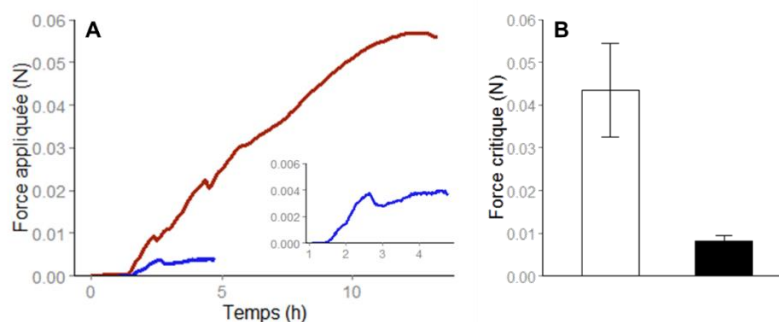


Figure 82 : A-Evolution de la force appliquée sur le capteur au cours du temps pour une racine non contrainte (bleu) et pour une racine poussant dans une aiguille (rouge). L'insert en bas à droite est un zoom sur la racine non contrainte. Notez la différence d'échelle entre les deux. B-Force critique mesurée sur des racines contraintes (blanc) et des racines témoins (noir). La différence entre les deux traitements est hautement significative ($p\text{-value} < 0,001$). Les valeurs indiquées sont les moyennes \pm erreur standard.

En conclusion, la force critique mesurée chez les racines non contraintes définit la limite mécanique qu'est capable de supporter le tissu racinaire avant flambement. Lorsque la racine est contrainte, comme dans un sol, cette limite mécanique est bien plus élevée grâce au support physique fourni par le sol. Les valeurs de force critique obtenues en présence d'un support physique traduisent la capacité maximale de la croissance de l'apex à pousser l'obstacle. Toutefois, même si la valeur moyenne de force critique mesurée est supérieure pour les racines contraintes ($0,045 \text{ N}$ soit $0,057 \text{ MPa}$) par rapport aux racines non contraintes, elle reste inférieure à la résistance opposée par des sols faiblement contraints. Cette sous-estimation est le résultat du flambement différé observé une fois qu'une petite longueur de racine est sortie de l'aiguille en poussant l'obstacle. La démonstration expérimentale de l'apport mécanique du sol sur la capacité des racines à supporter des niveaux d'impédance plus élevé n'en reste pas moins belle.

E. Cinétique de la croissance d'un apex rencontrant un obstacle

Pour analyser la réponse temporelle de l'apex racinaire en termes de croissance et de déformation lors de sa rencontre avec l'obstacle, nous séparons quatre phases distinctes (Figure 83).

- I. Croissance stable mesurée avant la rencontre de l'obstacle.
- II. La racine pousse l'obstacle ($F < F_{crit}$).
- III. Flambement de la racine.
- IV. Croissance mesurée après le flambement de la racine.

Les phases II et III durent respectivement environ 45-60 minutes et 20 minutes. Les phases I et IV sont suivies pendant une à deux heures.

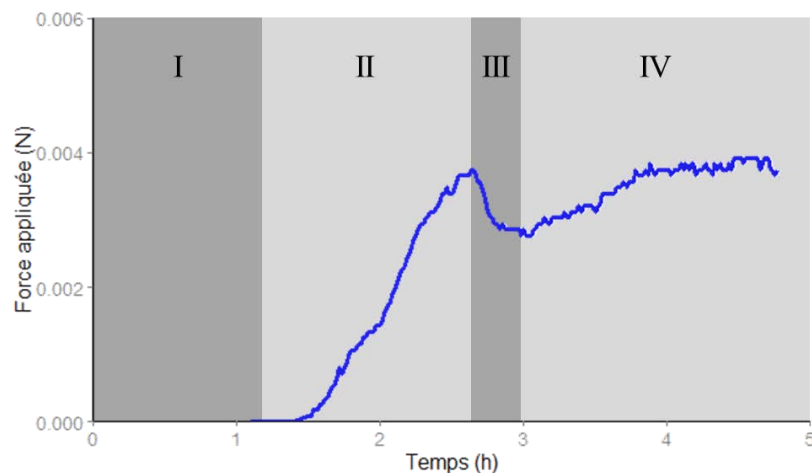


Figure 83 : Visualisation des différentes phases (cf. texte) visibles lors du suivi temporel des forces appliquées sur le capteur par l'apex.

Nous avons déterminés les profils de EER et de courbure de la racine au cours des quatre phases sur quatre racines. La vitesse de croissance et la longueur de la zone de croissance de ces racines sont variables. Pour faire une analyse compilée de toutes ces racines, nous exprimons la distance au centre quiescent en distance relative dans la zone de croissance (par rapport à la valeur avant rencontre de l'obstacle). Selon cette distance, les valeurs inférieures ou égales à 1 sont situées dans la zone de croissance, 0 étant le centre quiescent. Suite à notre procédure de suivi en trois dimensions, les profils de taux d'élongation sont tronqués dans leur partie ascendante sur les tous premiers millimètres (cf. Chapitre V). La comparaison des profils avant/après la rencontre de l'obstacle met en évidence une forte baisse du taux d'élongation ainsi qu'une augmentation de la longueur de la zone de croissance, de la même manière que cela a été reporté sur racine de pois (Croser *et al.*, 1999). Ces observations sont hautement conservées pour toutes les racines malgré une forte hétérogénéité des profils de croissance avant la rencontre avec le capteur (Figure 84).

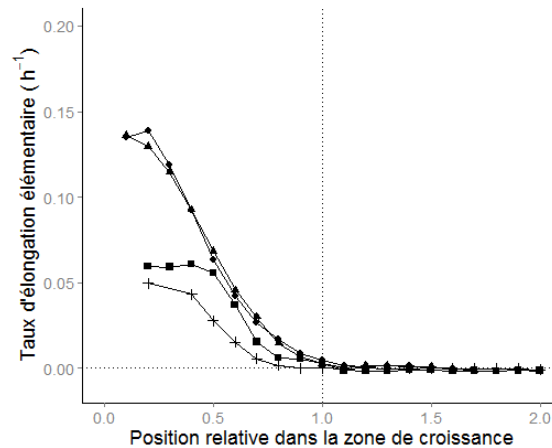


Figure 84 : Taux d'élongation élémentaire mesuré avant la rencontre de l'obstacle chez 4 racines.

Au cours des différentes phases précédemment décrites, une forte modification du taux d'élongation cellulaire et de la courbure le long de l'apex est observée. Dès le contact avec l'obstacle, un déclin brutal de la croissance de la racine est observé avec l'apparition d'une zone de faible compression *i.e.* zone où la longueur des cellules est diminuée. Cette zone de compression couvre la fin de la zone de croissance et s'étend dans la zone mature (Figure 85A-B). La compression s'accroît nettement pendant le flambement de la racine (Figure 85C, zone rouge). Lorsque le flambement est terminé, la zone de compression disparaît mais le taux d'élongation élémentaire reste bien plus faible qu'avant la rencontre de l'obstacle. Notamment, la longueur de la zone de croissance a augmenté (Figure 85D). La courbure rapide du flambement est initiée vers le milieu de la zone de croissance (Figure 85E-G). Une fois le flambement terminé, la zone de courbure maximale est décalée à la fin de la zone de croissance (Figure 85H). Cette position s'éloigne ensuite petit à petit de la pointe de la racine au rythme de la croissance qui a lieu entre la courbure et le centre quiescent.

Les positions de la zone de compression et de courbure de l'apex mettent en évidence la zone de faiblesse mécanique de l'apex racinaire, située à la fin de zone de croissance et peu après. Le diamètre dans cette zone est plus faible par rapport au reste de la zone mature. Sur les coupes longitudinales d'apex analysées dans les chapitres précédents (Figure 41), les analyses histologiques montrent qu'il s'agit également d'une zone de faible densité cellulaire par rapport à la partie plus apicale. Ces observations histologiques corroborent donc le point de vue mécanique. Nous notons toutefois que la courbure est initiée au milieu de la zone de croissance, avant la zone de faiblesse. En outre, la présence d'une zone de faiblesse sur l'apex racinaire souligne un module d'élasticité non constant le long de l'apex. Le module d'élasticité déterminé est un module d'élasticité moyen qui n'intègre pas de variations le long de l'apex. Néanmoins, la capacité du module d'élasticité utilisé à prédire la force critique de flambement des apex indique que ce module est celui qui caractérise la première zone à « craquer » lors du flambement *i.e.* la zone de faiblesse de l'apex. De part et d'autre de cette zone, le module d'élasticité est vraisemblablement plus élevé pour les raisons citées plus haut (densité de parois ou diamètre de la racine plus important).

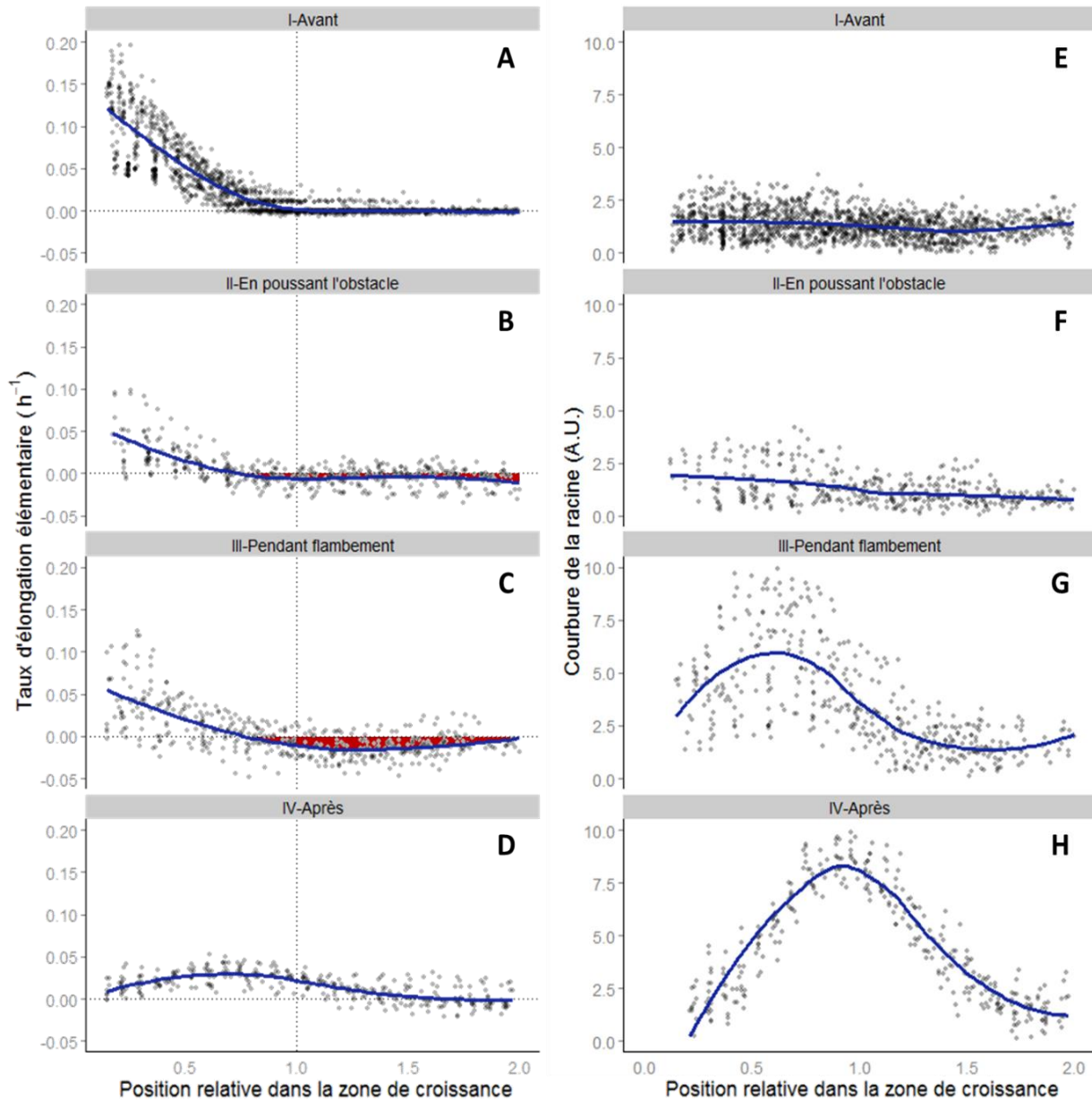


Figure 85 : Analyse temporelle des taux d'élongation élémentaire (gauche) et de la courbure de la racine (droite) en fonction de la position relative dans la zone de croissance définie avant le contact (0 = centre quiescent ; zone de croissance < 1 ; zone mature). Les résultats sont présentés pour 4 racines. Les zones rouges indiquent des zones de compression. Les graphiques sont séparés de haut en bas entre les quatre phases de la rencontre de l'obstacle précédemment explicitées (cf. texte).

Les racines contraintes dans une aiguille poussent l'obstacle pendant plusieurs heures, ce qui permet de mesurer une vitesse de croissance moyenne pendant cette poussée à comparer avec la vitesse de croissance des racines avant la rencontre de l'obstacle (Figure 86). Une réduction de croissance de 30 à 50% est observée pendant que les racines poussent l'obstacle. La réduction est d'autant plus importante que la vitesse de croissance avant rencontre de l'obstacle est faible.

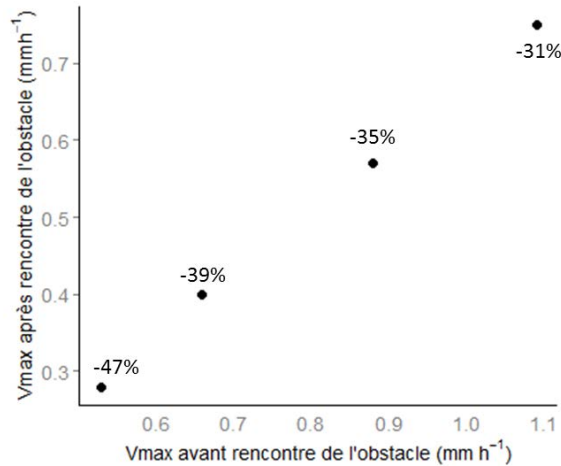


Figure 86 : Impact de la rencontre de l'obstacle sur la vitesse de croissance (V_{max}) des 4 racines contraintes dans une aiguille.

Dans ce chapitre, l'utilisation d'un suivi cinématique en 3 dimensions et d'un capteur de force monté sur mesure nous a permis de mesurer simultanément (i) la forme et la déformation de la racine, (ii) le taux d'élongation élémentaire le long de l'axe, (iii) la force exercée par la racine en croissance. Après avoir quantifié la limite mécanique du matériau racine en condition de culture hydroponique, nous avons démontré que la présence d'un environnement physique autour de la racine, tel que celui fourni par un sol, augmente la limite mécanique en précluant le flambement de la racine (Figure 82). Dans un sol réel, la force maximale que peut appliquer une racine n'est plus une contrainte mécanique générée par le matériau racine mais une limite biologique dont nous nous sommes approchés mais que nous n'avons vraisemblablement pas encore atteint dans ces travaux.

La mise en évidence d'une zone de fragilité à la fin de la zone de croissance met en exergue des propriétés mécaniques non constantes le long de la racine. La comparaison avec les photos infrarouges et avec nos coupes histologiques précédentes souligne l'importance potentielle du diamètre de la racine, de la densité de cellules et ou de la lignification des tissus pour expliquer cette fragilité. L'importance relative de ces différents paramètres morphologiques reste à déterminer.

Enfin, nous observons une réduction prononcée de la croissance suite à la rencontre de l'obstacle. L'importance de cette réduction de croissance dès la rencontre de l'obstacle (*i.e.* alors que l'impédance mécanique est très faible) pourrait indiquer la présence d'un mécanisme de régulation actif déclenché par la rencontre de l'obstacle. Le rôle de la coiffe, fortement écrasée lorsque la racine pousse l'obstacle au début de la rencontre, n'a pas été quantifié ici à cause de limitations techniques. Néanmoins, l'importance de la coiffe dans des mécanismes de perception tel que celui de la gravité (Blancaflor & Masson, 2003) fait peser de lourds soupçons sur l'origine d'un signal biologique dans ce tissu.

Conclusions et perspectives

Vers le phénotypage de la croissance racinaire à haute résolution spatio-temporelle

Des dizaines de milliers de photographies pour des centaines d'heures de suivi, telle est la quantité de données qu'il a été possible d'analyser grâce au protocole de suivi de croissance que j'ai développé. En couplant des outils d'analyse cinématique déjà existants avec du matériel de photographie récent, nous avons pu atteindre une résolution spatiale fine sur des pas de temps très courts. D'ores et déjà, des essais menés sur racines d'arabidopsis ont permis d'obtenir des profils de vitesse sur des racines de moins de 100 μm de diamètre. Si l'épaisseur des racines de peuplier ne permettra pas d'observer directement les cellules, il ne fait aucun doute qu'une résolution cellulaire pourra être atteinte et même dépassée d'ici peu de temps avec une simple amélioration du matériel photographique.

La question de la résolution temporelle des analyses mérite d'être considérée, au moins d'un point de vue pratique dans un premier temps. Le nombre de photos par heure, voir par minute, est un paramètre dont dépendra le temps nécessaire pour calculer les profils de vitesse. Dans notre protocole, des outils de traitement et d'analyse semi-automatiques ont été repris ou développés, autorisant le traitement d'un grand nombre de photos sur des temps d'expérimentation raisonnables. Cela nous a donné accès à une résolution de quelques minutes pour caractériser la réponse au stress osmotique. Cette résolution a été descendue à 1 minute et moins pour la caractérisation du flambement de l'apex. De plus, à résolution spatiale équivalente, un pas de temps courts permet de compenser largement en temps d'analyse PIV (le champ de recherche des marques est moins étendu) le temps « perdu » lors du traitement d'image préliminaire (plus grand nombre de photos).

Le phénotypage de la croissance racinaire à haut débit réalisé dans le cadre de cette thèse s'inscrit d'un point de vue global dans la continuité du développement récent des sciences en « omique ». On pourrait presque parler d'analyse « cinéatomique » d'apex racinaires de peuplier en réponse à divers stress (osmotique et impédance mécanique). De la même manière que notre système de croissance a été adapté pour travailler sur d'autres espèces (maïs, arabidopsis) ou sur différentes questions de recherche (réponse tridimensionnelle de la croissance et de la déformation de l'apex racinaire à une impédance mécanique), il semble envisageable de généraliser ce type d'analyse à d'autres espèces, en réponse à divers contextes environnementaux.

Mesure *in vivo* de la longueur du méristème apical racinaire (RAM)

La longueur du RAM est un bon indicateur de son activité de production de cellules (*cf.* Chapitre II). Toutefois, le RAM est un modèle d'étude qui souffre d'un cadre conceptuel flou et dont l'activité reste difficile à caractériser. Les travaux menés dans ma thèse démontrent la faisabilité de la mesure *in vivo* de la longueur du RAM sur peuplier mais aussi sur maïs, que ce soit par analyse cinématique, par l'utilisation d'un éclairage infrarouge, ou les deux (Figure 63). Nous déterminons ainsi une limite tige-orientée du RAM. A la fin du domaine de transition, la grande majorité des cellules ont arrêtées de se diviser (Figure 67). Cela signifie également qu'une petite fraction de cellules continue de se diviser après le RAM, ce qui est clairement contre-intuitif.

Toutefois, d'un point de vue pratique, prendre en compte la dernière division du RAM serait sans doute un mauvais compromis. Une majeure partie de l'élongation dans le RAM serait alors le fruit d'un allongement par croissance vacuolaire des cellules du domaine de transition. Dans un tel cas, la longueur du RAM ne serait plus un bon proxy de son activité, ce qui compliquerait les analyses et ruinerait l'intérêt d'une caractérisation *in vivo*.

Variabilité de la croissance racinaire

Lorsque nous avons démarré ces travaux et au cours des développements méthodologiques que j'ai effectués, nous avons cherché à minimiser autant que possible les influences environnementales sur le système de culture et de suivi de la croissance. Je pense notamment à l'absence de lumière et surtout de contact avec la racine y compris pendant l'application du stress osmotique. Malgré cela, nous avons obtenu une variabilité de vitesse de croissance importante d'un individu à l'autre. Plus encore, des différences prononcées au sein même des individus sont observées au cours du temps. Dans ces conditions, comment prendre en compte la variabilité intra- et inter-individus pour analyser l'impact du stress osmotique sur la croissance ?

D'un point de vue Eulérien, le calcul de moyennes sur les indicateurs de croissance et sur les profils de croissance le long de l'apex, ainsi que le travail en unités relatives, nous a permis de maîtriser la variabilité au sein des individus pour se placer à l'échelle populationnelle. A cette échelle, la variabilité au sein de la population a été utilisée comme une force à même de nous aider à comprendre quels indicateurs de croissance sont les plus à même d'expliquer les différences de croissance observées. Toutefois, maîtriser la variabilité individuelle nécessite d'être en condition de croissance « stable » ou au moins répétable *i.e.* que les oscillations observées sur les quelques heures de suivi soient les mêmes que celles qui pourraient être observées plus tard. Il est possible d'assumer cette hypothèse en condition témoin et ainsi d'utiliser le profil moyen pour calculer la trajectoire de croissance de chaque racine. Pour étudier la réponse au stress osmotique, nous avons dû calculer les trajectoires de croissance partielles connaissant de manière exhaustive la dynamique du profil de vélocité au cours du temps. S'il est plus difficile d'analyser l'impact du stress osmotique sur la population dans son ensemble, les impacts individuels sont mieux mis en évidence en intégrant la variabilité de croissance propre à chaque racine.

Oscillations de croissance

Les analyses temporelles mettent en évidence des oscillations de la croissance de l'ordre de quelques heures. Ces oscillations, de période variable entre racines, sont observées aussi bien dans le RAM que dans la zone d'élongation (Figure 68). S'il est difficile d'établir un lien de cause à effet, l'homéostasie en longueur des cellules du RAM (Figure 48 ; Figure 52) suppose qu'une hausse cyclique de l'élongation dans le RAM conduit à des variations cycliques du flux sortant de cellule. Par ailleurs, la présence de tels cycles pose la question de la stabilité de la croissance racinaire et du critère utilisé pour vérifier cette stabilité.

Nous avons mis en évidence une corrélation entre la durée des périodes d'oscillation de l'élongation dans le RAM et de la vitesse de croissance. Nous supposons que les flux cycliques de cellules sortant du RAM générés par ces oscillations peuvent être responsables des oscillations de croissance observées. La non synchronisation des cycles dans le RAM et à la fin de la zone de

croissance et la similarité des périodes d'oscillation pour chaque individu (Figure 69) militent en ce sens. L'importance du flux de cellules sortant du RAM dans la régulation de la croissance appuie également cette hypothèse. Un suivi Lagrangien des cohortes de cellules produites cycliquement par le RAM doit permettre de tester cette hypothèse en vérifiant si ces cohortes sont bien les groupes de cellules retrouvés dans la zone d'élongation maximale lors des pics de croissance. Un temps de suivi plus long doit être envisagé pour faire cette analyse : une quinzaine d'heures, correspondant au temps nécessaire pour que les cellules traversent la zone d'élongation depuis la sortie du RAM (Figure 47 ; Figure 72). La question reste donc ouverte quant à l'origine de ces oscillations.

Implication du flux de cellules dans la croissance de la racine

Mathématiquement, la croissance racinaire est l'intégrale du taux d'élongation élémentaire le long de la zone de croissance. Nos données montrent que la longueur de la zone de croissance explique plus que l'intensité de l'élongation la variabilité observée des vitesses de croissance au sein de notre population de racines (Figure 45). D'autres résultats confirment indirectement cette observation. D'une part, l'intensité de l'élongation est le seul indicateur de croissance non impacté par la baisse de croissance induite lors du stress osmotique (Figure 57). D'autre part, la dynamique du taux d'élongation élémentaire le long des trajectoires de croissance est relativement similaire malgré une très forte variabilité interindividuelle de la croissance de la racine (Figure 72). Les différences de croissance racinaire sont donc avant tout le reflet de variations de la longueur de la zone d'élongation qui dépend directement de la production de cellules dans le RAM. En produisant plus ou moins de cellules aux dynamiques d'élongation (durée et intensité) proches, la croissance de la racine est modifiée de manière proportionnelle au flux sortant de cellules du RAM. Cela ne doit toutefois pas oblitérer une potentielle régulation du taux d'élongation qui, même si elle reste mineure, affecte la vitesse de croissance de certaines racines. Mes travaux soutiennent donc un point de vue cellulaire de la croissance de la racine, dans laquelle la longueur de la zone d'élongation reflète le cumul des vécus individuels des cellules produites par le RAM. Une production plus élevée de cellules implique une zone d'élongation plus grande et une vitesse de croissance de la racine supérieure. Pour une même activité de production de cellules, les variations interindividuelles observées sont expliquées par les variations des dynamiques d'élongation des cellules dans la zone d'élongation.

Inconstance du taux de division

Le flux de cellules sortant du RAM est dépendant du nombre de cellules en division et du taux de division de ces cellules. Nos résultats confirment la corrélation positive entre le nombre de cellules en division et le flux de cellules sortant du RAM (Figure 54). Au sein du RAM, le taux de division varie du simple au double d'une racine à l'autre (17-35h). Ainsi, le nombre de cellules en division et le taux de division sont deux paramètres fortement variables dans notre jeu de données. L'importance relative de ces deux paramètres dans la régulation du flux de cellules sortant du RAM reste à déterminer même si, dans les données présentées, le nombre de cellules en division est plus variable d'un individu à l'autre (du simple au triple) que le taux de division (du simple au double, Figure 54). L'homéostasie de la longueur et du nombre de cellules composant le RAM en réponse au stress osmotique (Figure 60), ainsi que la diminution du taux d'élongation dans le RAM

suite au stress osmotique (Figure 61), indique une baisse du taux de division cellulaire conduisant à une baisse de l'activité du RAM et donc du flux de cellules sortant. Cette baisse contribue à expliquer comment, en réponse au stress osmotique, la longueur de la zone de croissance et la vitesse de croissance des racines sont diminuées. Il est toutefois important de souligner que le stress osmotique considéré est un stress court, de seulement quelques heures. La baisse du flux de cellules sortant, si elle est avérée sur cette période de suivi, peut ensuite être contrebalancée par une récupération du taux d'élongation dans le RAM, ou au contraire s'aggraver *e.g.* par une baisse du nombre de cellules en division, non observée à court terme.

Je n'ai pas la prétention de clore le débat sur la constance ou non du taux de division le long du RAM. Néanmoins, dans notre cas particulier, nos données démontrent un taux de production et de division cellulaire croissant à partir du centre quiescent avant un arrêt assez net en sortie de RAM (Figure 51). Toutefois, force est de constater que nos profils, s'ils ne sont pas constants, ne sont pas non plus fondamentalement éloignés d'une constance le long du RAM notamment quand les données de plusieurs individus sont moyennées pour se placer à l'échelle populationnelle.

Réponse à une impédance mécanique

Les travaux menés au James Hutton Institute contribuent à la compréhension du rôle de la structure et de la physiologie des racines (incluant leur diamètre ou encore la longueur de la zone de croissance) dans leur capacité à franchir des obstacles et à pousser dans des sols contraints. Paradoxalement, alors que l'impédance mécanique générée par le sol est une contrainte majeure à la croissance racinaire, c'est l'environnement physique fourni par ce sol qui permet aux racines d'appliquer des forces suffisantes pour progresser. La caractérisation mécanique de l'apex racinaire est un pas essentiel vers la construction de modèles biomécaniques capables de prédire la croissance racinaire en fonction de la dureté d'un sol.

Références

- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GTS, Genschik P.** 2009. Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in *Arabidopsis*. *Current Biology* **19**, 1188–1193.
- Adolfson KA, Sothorn RB, Koukkari WL.** 1998. Ultradian movements of shoots of two species of soybeans *Glycine soja* (Sieb. and Zucc.) and *Glycine max* (L.) Merr. *Chronobiology International* **15**(1):1-11.
- Agreste.** 2013. La forêt et les industries du bois. Graphagri bois, Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 169p.
- Amigues JP, Debaeke P, Itier B, Lemaire G, Seguin B, Tardieu F, Thomas A** (éditeurs). 2006. Sécheresse et agriculture. Réduire la vulnérabilité de l'agriculture à un risque accru de manque d'eau. Expertise scientifique collective, synthèse du rapport, INRA (France), 72 p.
- Barlow PW, Rathfelder EL.** 1985. Cell division and regeneration in primary root meristems of *Zea mays* recovering from cold treatment. *Environmental and experimental botany* **25**, 303–314.
- Baskin TI.** 2000. On the constancy of cell division rate in the root meristem. *The Plant Cell Cycle*. Springer, 1–10.
- Baskin TI.** 2012. Patterns of root growth acclimation: constant processes, changing boundaries. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **2**, 65–73.
- Baskin TI, Cork A, Williamson RE, Gorst JR.** 1995. STUNTED PLANT 1, a gene required for expansion in rapidly elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. *Plant Physiology* **107**, 233–243.
- Basu P, Pal A, Lynch JP, Brown KM.** 2007. A novel image-analysis technique for kinematic study of growth and curvature. *Plant Physiology* **145**, 305–316.
- Bates DM, Watts DG.** 1988. *Nonlinear Regression Analysis and Its Applications*. Eds. Wiley & Sons, 102p.
- Bates DM, Chambers JM.** 1992. Nonlinear models. Chapter 10 of *Statistical Models in S* eds J. M. Chambers and T. J. Hastie, Wadsworth & Brooks/Cole, USA.
- Beemster GTS.** 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.
- Beemster GT, 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, 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 GTS, Fiorani F, Inzé D.** 2003. Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* **8**, 154–158.
- Benfey PN, Scheres B.** 2000. Root development. *Current Biology* **10**, R813–R815.
- Bengough AG, Bransby MF, Hans J, McKenna SJ, Roberts TJ, Valentine TA.** 2006. Root responses to soil physical conditions; growth dynamics from field to cell. *Journal of Experimental Botany* **57**, 437–447.

- Bengough AG, McKenzie BM, Hallett PD, Valentine TA.** 2011. Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. *Journal of Experimental Botany* **62**, 59–68.
- Bengough AG, Mullins CE.** 1990. Mechanical impedance to root growth: a review of experimental techniques and root growth responses. *Journal of soil science* **41**, 341–358.
- Bengough AG, Mullins CE.** 1991. Penetrometer resistance, root penetration resistance and root elongation rate in two sandy loam soils. *Plant and Soil* **131**, 59–66.
- Bizet F, Bogeat-Triboulot M-B, Montpied P, Christophe A, Ningre N, Cohen D, Hummel I.** 2014. Phenotypic plasticity towards water regime: response of leaf growth and underlying candidate genes in *Populus*. *Physiologia Plantarum*. doi: 10.1111/ppl.12271
- Bizet F, Hummel I, Bogeat-Triboulot M-B.** 2014. Length and activity of the root apical meristem reveal *in vivo* by infrared imaging. *Journal of experimental botany*, **66**, 1387–1395. doi:10.1093/jxb/eru488
- Blancaflor EB, Masson PH.** Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant physiology* **133**, 1677–1690.
- Boyer JS.** 1982. Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443–448.
- Braun N, Wyrzykowska J, Muller P, David K, Couch D, Perrot-Rechenmann C, Fleming AJ.** 2008. Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in arabidopsis and tobacco. *The plant cell online* **20**, 2746–2762.
- Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E.** 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science* **63**, 625–644.
- Brumfield RT.** 1942. Cell growth and division in living root meristems. *The American Journal of Botany* **29**, 533–543.
- Campilho A, Garcia B, Toorn H v. d., Wijk H v., Campilho A, Scheres B.** 2006. Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *The Plant Journal* **48**, 619–627.
- Casamitjana-Martinez E, Hofhuis HF, Xu J, Liu C-M, Heidstra R, Scheres B.** 2003. Root-specific *CLE19* overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Current Biology* **13**, 1435–1441.
- Chugunkova TV, Dubrovnaya OV, Shevtsov IA.** 1988. Dynamics of mitotic activity and the time parameters of the cell cycle of root meristems of sugar beet. *DAN USSR* **3**, 81–84.
- Clowes FAL.** 1976. Estimation of growth fractions in meristems of *Zea mays* L. *Annals of Botany* **40**, 933–938.
- Croser C, Bengough AG, Pritchard J.** 1999. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (*Pisum sativum*). I. Rates of cell flux, mitosis, and strain during recovery. *Physiologia Plantarum* **107**, 277–286.
- Croser C, Bengough AG, Pritchard J.** 2000. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (*Pisum sativum*). II. Cell expansion and wall rheology during recovery. *Physiologia Plantarum* **109**, 150–159.
- Díez JL, López-Sáez JF, González-Bernáldez F.** 1970. Growth components in *Allium* roots. *Planta* **91**(2), 87–95.
- Dillen SY, El Kasmoui O, Marron N, Calfapietra C, Ceulemans R.** 2010. Poplar. In *Energy Crops*. Eds. N.G. Halford and A. Karp. Royal Society of Chemistry (SRC). Cambridge, UK. pp 275–300.

- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71–84.
- Dubrovsky JG, Contreras-Burciaga L, Ivanov VB. Cell cycle duration in the root meristem of Sonoran desert cactaceae as estimated by cell-flow and rate-of-cell-production methods. *Annals of Botany* **81**, 619–624.
- Erickson RO, Sax KB. 1956. Elemental growth rate of the primary root of *Zea mays*. *Proceedings of the American Philosophical Society* **100**:487–498.
- Erickson RO. 1976. Modeling of plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 407–434.
- Erickson RO, Silk WK. 1980. The kinematics of plant growth. *Scientific American* **242**(5), 134–151.
- FAO. 2012. Synthèse des rapports d'activité nationaux, 24ème Session de la Commission internationale du peuplier, Dehradun, Inde. Document de travail IPC/12. <http://www.fao.org/forestry/ipc2012/fr/>.
- Fiorani F, Beemster GTS. 2006. Quantitative analyses of cell division in plants. *Plant Molecular Biology* **60**, 963–979.
- Fiorani F, Beemster GT, Bultynck L, Lambers H. 2000. Can meristematic activity determine variation in leaf size and elongation rate among four *Poa* species? A kinematic study. *Plant Physiology* **124**, 845–856.
- French A, Ubeda-Tomas S, Holman TJ, Bennett MJ, Pridmore T. 2009. High-throughput quantification of root growth using a novel image-analysis tool. *Plant Physiology* **150**, 1784–1795.
- Fujie M, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T. 1993. Studies on the behavior of organelles and their nucleoids in the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* (L.) Col. *Planta* **189**, 443–452.
- Gewin V. 2010. Food: an underground revolution. *Nature* **466**, 552–553.
- González-García MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E, Caño-Delgado AI. 2011. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development and stem cells* **138**, 849–859.
- Gries D, Zeng F, Foetzi A, Arndt SK, Bruelheide H, Thomas FM, Zhang X, Runge M. 2003. Growth and water relations of *Tamarix ramosissima* and *Populus euphratica* on Taklamakan desert dunes in relation to depth to a permanent water table. *Plant, cell & environment* **26**, 725–736.
- Grif VG, Ivanov VB, Machs EM. 2002. Cell cycle and its parameters in flowering plants. *Tsitologia* **44**(10), 936–980.
- Hacham Y, Holland N, Butterfield C, Ubeda-Tomas S, Bennett MJ, Chory J, Savaldi-Goldstein S. 2011. Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* **138**, 839–848.
- Hamant O, Traas J. 2010. The mechanics behind plant development. *New Phytologist* **185**, 369–385.
- Hemerly A, Engler JdA, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inzé D, Ferreira P. 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *The EMBO Journal* **14**(16), 3925–3936.
- Hopkins WG. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. Eds. John Wiley & Sons, Inc. 464p.
- Horiguchi G, Ferjani A, Fujikura U, Tsukaya H. 2006. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **119**, 37–42.
- Iijima M, Matsushita N. 2011. A circadian and an ultradian rhythm are both evident in root growth of rice. *Journal of Plant Physiology* **168**, 2072–2080.

- Iijima M, Oribe Y, Horibe Y, 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.
- Ivanov VB.** 1971. Critical size of the cell and its transition to division. I. Sequence of transition to mitosis for sister cells in the corn seedling root tip. *The Soviet Journal of Developmental Biology* **2**, 421–428
- Ivanov VB.** 1997. Relationship between cell proliferation and transition to elongation in plant roots. *International Journal of Developmental Biology* **41**, 907–915.
- Ivanov VB, Dobrochaev AE, Baskin TI.** 2002. What the distribution of cell lengths in the root meristem does and does not reveal about cell division. *Journal of plant growth regulation* **21**, 60–67.
- Ivanov VB, Dubrovsky JG.** 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* **18**, 237–243.
- Iwamoto A, Kondo E, Fujihashi H, Sugiyama M.** 2013. Kinematic study of root elongation in *Arabidopsis thaliana* with a novel image-analysis program. *Journal of Plant Research* **126**, 187–192.
- Janes BE.** 1974. The effect of molecular size, concentration in nutrient solution, and exposure time on the amount and distribution of polyethylene glycol in pepper plants. *Plant Physiology* **54**, 226–230.
- Kavanová M.** 2006. Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiology* **141**, 766–775.
- Kirtman B, Power SB, Adedoyin JA, Boer GJ, Bojariu R, Camilloni I, Doblus-Reyes FJ, Fiore AM, Kimoto M, Meehl GA, Prather M, Sarr A, Schär C, Sutton R, Van Oldenborgh GJ, Vecchi G, Wang HJ.** 2013. Near-term Climate Change: Projections and Predictability. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Kristie DN, Jolliffe PA.** 1986. High-resolution studies of growth oscillations during stem elongation. *Revue canadienne de botanique* **64**(11), 2399–2405.
- Liang BM, Sharp RE, Baskin TI.** 1997. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots (I. Spatial distribution of longitudinal, radial, and tangential expansion rates). *Plant Physiology* **115**, 101–111.
- List Jr A.** 1969. Transient growth responses of the primary roots of *Zea mays*. *Planta* **87**, 1–19.
- Liu Y, Lai N, Gao K, Chen F, Yuan L, Mi G.** 2013. Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana* (G Muday, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e61031.
- Loades KW, Bengough AG, Bransby MF, Hallett PD.** 2013. Biomechanics of nodal, seminal and lateral roots of barley: effects of diameter, waterlogging and mechanical impedance. *Plant and Soil* **370**, 407–418.
- Lobet G, Couvreur V, Meunier F, Javaux M, Draye X.** 2014. Plant water uptake in drying soils. *Plant Physiology* **164**, 1619–1627.
- Ma Z.** 2003. Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiology* **131**, 1381–1390.

- McKenzie BM, Bengough AG, Hallett PD, Thomas WTB, Forster B, McNicol JW. 2009. Deep rooting and drought screening of cereal crops: A novel field-based method and its application. *Field Crops Research* **112**, 165–171.
- Merret R, Moulia B, Hummel I, Cohen D, Dreyer E, Bogeat-Triboulot M-B. 2010. Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanics formalism. *BMC biology* **8**, 18.
- Meyer RF, Boyer JS. 1972. Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* **108**, 77–87.
- Millet B, Melin D, Bonnet B, Ibrahim CA, Mercier J. 1984. Rhythmic circumnutation movement of the shoots in *Phaseolus vulgaris* L. *Chronobiology International* **1**(1), 11–19.
- Monclus R, Dreyer E, Villar M, Delmotte FM, Delay D, Petit J-M, Barbaroux C, Le Thiec D, Brechet C, Brignolas F. 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytologist* **169**, 765–777.
- Mouchel CF. 2004. Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes & Development* **18**, 700–714.
- Muller B, Stosser M, Tardieu F. 1998. Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant, Cell & Environment* **21**, 149–158.
- Nagel KA, Schurr U, Walter A. 2006. Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. *Plant, Cell and Environment* **29**, 1936–1945.
- Van Oldenborgh GJ, Collins M, Arblaster J, Christensen JH, Marotzke J, Power SB, Rummukainen M, Zhou T (eds.). IPCC, 2013: Annex I: Atlas of Global and Regional Climate Projections. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- 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.
- Pagès L, Serra V, Draye X, Doussan C, Pierret A. 2010. Estimating root elongation rates from morphological measurements of the root tip. *Plant and Soil* **328**, 35–44.
- Pahlavanian AM, Silk WK. 1988. Effect of temperature on spatial and temporal aspects of growth in the primary maize root. *Plant Physiology* **87**, 529–532.
- Paillassa E. 2013. Où trouver les cultivars de peuplier pour les plantations 2012-2013 ? *Forêt-entreprise* **208**, 59-61.
- Perrot-Rechenmann C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold spring harbor perspectives in biology* **2**, a001446–a001446.
- Peters WS, Baskin TI. 2006. Tailor-made composite functions as tools in model choice: the case of sigmoidal vs bi-linear growth profiles. *Plant Methods* **2**, 11.
- Ribeiro KM, Barreto B, Pasqual M, White PJ, Braga RA, Dupuy LX. 2014. Continuous, high-resolution biospeckle imaging reveals a discrete zone of activity at the root apex that responds to contact with obstacles. *Annals of Botany* **113**, 555–563.
- Ruts T, Matsubara S, Wiese-Klinkenberg A, Walter A. 2012. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? *Journal of Experimental Botany* **63**, 3339–3351.

- Rymen B, Coppens F, Dhondt S, Fiorani F, Beemster GTS.** 2010. Kinematic analysis of cell division and expansion. In: Hennig L, Köhler C, eds. *Plant Developmental Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 203–227.
- Rymen B, Fiorani F, Kartal F, Vandepoele K, Inze D, Beemster GTS.** 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology* **143**, 1429–1438.
- Sablowski R, Dornelas MC.** 2013. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2703–2714.
- Sacks MM, Silk WK, Burman P.** 1997. Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant Physiology* **114**, 519–527.
- Salah HBH, Tardieu F.** 1997. Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand (a superposition of hydraulic and chemical messages?). *Plant Physiology* **114**, 893–900.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, volume 3, appendix B.12.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al.** 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682.
- Schmidt S, Gregory PJ, Grinev DV, Bengough AG.** 2013. Root elongation rate is correlated with the length of the bare root apex of maize and lupin roots despite contrasting responses of root growth to compact and dry soils. *Plant and Soil* **372**, 609–618.
- Schuppler U, He P-H, John PC, Munns R.** 1998. Effect of water stress on cell division and Cdc2-like cell cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* **117**, 667–678.
- Shabala SN, Newman IA.** 1997. Proton and calcium flux oscillations in the elongation region correlate with root nutation. *Physiologia Plantarum* **100**, 917–926.
- Sharp RE, Silk WK, 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, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT.** 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2343–2351.
- Silk WK, Bogeat-Triboulot M-B.** 2014. Deposition rates in growing tissue: Implications for physiology, molecular biology, and response to environmental variation. *Plant and Soil* **374**, 1–17.
- Silk WK, Erickson RO.** 1979. Kinematics of plant growth. *Journal of Theoretical Biology* **76**, 481–501.
- Silk WK, Wagner KK.** 1980. Growth-sustaining water potential distributions in the primary corn root A noncompartmented continuum model. *Plant Physiology* **66**, 859–863.
- Silk WK.** 1992. Steady form from changing cells. *International Journal of Plant Sciences* **153**, s49–s58.
- Skirycz A, Inzé D.** 2010. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 197–203.
- Spollen WG, Sharp RE.** 1991. Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. *Plant Physiology* **96**, 438–443.

- Tardieu F, Raymond M, Hamard P, granier C, Muller B.** 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1505-1514.
- Triboulot M-B, Pritchard J, Tomos D.** 1995. Stimulation and inhibition of pine root growth by osmotic stress. *New phytologist* **130**, 169–175.
- Tsukaya H.** 2003. Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current opinion in plant biology* **6**, 57–62.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, et al.** 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596–1604.
- De Veylder L, Beemster GT, Beeckman T, Inzé D.** 2001. CKS1At overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *The Plant Journal* **25**, 617–626.
- Vialet-Chabrand S.** 2013. Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique : apport d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne. Thèse, Université de Lorraine, 176p.
- Walter A, Feil R, 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
- Wang L, Beyer ST, Cronk QC, Walus K.** 2011. Delivering high-resolution landmarks using inkjet micropatterning for spatial monitoring of leaf expansion. *Plant methods* **7**, 1–10.
- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC.** 2000. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *The Plant Journal* **24**, 613–623.
- Webster PL, McLeod RD.** 1980. Characteristics of root apical meristem cell population kinetics: a review of analyses and concepts. *Environmental and Experimental Botany* **20**, 335-358.
- Van der Weele CM, Jiang HS, Palaniappan KK, Ivanov VB, Palaniappan K, 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.
- West G, Inzé D, Beemster GTS.** 2004. Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiology* **135**, 1050–1058.
- Westgate ME, 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.
- Whittaker RH.** 1970. *Communities and Ecosystems*. Eds. Macmillan Publishing Co, USA, 352p.
- Wuyts N, Bengough AG, Roberts TJ, Du C, Bransby MF, McKenna SJ, Valentine TA.** 2011. Automated motion estimation of root responses to sucrose in two *Arabidopsis thaliana* genotypes using confocal microscopy. *Planta* **234**, 769–784.
- Yamaguchi M, Sharp RE.** 2010. Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell & Environment* **33**, 590–603.
- Yamaguchi M, Valliyodan B, Zhang J, Lenoble ME, Yu O, Rogers EE, Nguyen HT, Sharp RE.** 2010. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant, Cell & Environment* **33**, 223–243.

Annexes

I. Conférences et présentations

- 2012
 - 1^{er} séminaire résidentiel de l'EIR-Agreenium à Montpellier (*cf.* Annexe IV).
 - Meeting UPRA, issu de la collaboration de l'INRA avec l'UPSC (Umeå Plant Science Centre, Suède). Présentation d'un poster sur mes travaux de M2 ainsi que d'un poster sur mon projet de thèse (Figure 87 ; Figure 88).
 - Journée des étudiants de l'UMR EEF : présentation orale de mon projet de thèse et des travaux réalisés.
 - Comité de thèse : présentation orale de mon projet de thèse, des travaux réalisés et des expérimentations envisagées. Membres du comité : Pierre BERTHOMIEU (B&PMP, Montpellier), Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT (UMR EEF, Nancy), André GRANIER (UMR EEF, Nancy), Irène HUMMEL (UMR EEF, Nancy), Valérie LEGUE (UMR IAM, Nancy) et Alexis PEAUCELLE (Université Diderot, Paris).
- 2013
 - Journée des étudiants de l'UMR EEF : présentation orale détaillée de la méthodologie développée pour les suivis de croissance racinaire.
 - 7^{ème} conférence de l'organisation européenne des sciences végétales (EPSO) : présentation d'un poster sur le système de suivi développé et sur les premiers résultats obtenus (Figure 89).
- 2014
 - Présentation orale au sein du James Hutton Institute (JHI) du système mis en place pour étudier la réponse de la racine à la rencontre d'un obstacle et des résultats obtenus.
 - Séminaire du laboratoire d'excellence ARBRE : présentation du partenariat avec le JHI et des travaux effectués.



Plasticity of gene expression in response to drought in poplar growing leaves

Bizet François, Bogeat-Triboulot Marie-Béatrice, Cohen David, Ningre Nathalie & Hummel Irène

UMR1137, Forest Ecology & Ecophysiology, INRA, Université de Lorraine, F-54280 Champenoux, France

In the context of climatic changes, perennials species will have to face changes in water availability. The sustainability of actual populations relies on individual accommodation capacities which partly depend on phenotypic plasticity *i.e.* the capacity of a genotype to modify its phenotype in response to changes of environmental conditions. Under water deficit, limiting the increase of leaf surface area contributes to limit water losses due to transpiration and thus can be viewed as adaptive phenotypic plasticity. **This study aims at analyzing in poplar growing leaves (i) the expression level of genes involved in leaf growth and (ii) to describe the phenotypic plasticity at a molecular scale. Leaf growth, which depends on cell production and cell expansion, is one of the first parameters to be impacted by water deficit. Both objectives were treated in response to drought and rewatering treatments.**

Experimental Setup

4 poplar genotypes
Beaupré ; Carpaccio
Dorskamp ; Soligo

3 treatments
Control, drought and rewatering

3 stages of leaf maturity
Juvenile, intermediate and mature

Expression of Candidate genes

Candidate genes were identified based on literature survey

Related to cell expansion processes :

- **Aquaporin (TIP1;6 and PIP1;2)**: channels facilitating water flux
- **Expansin (EXPs)**: cell wall relaxation
- **Pectin méthylestérase (PME)**: esterification of homogalacturonan
- **Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH)**: bonds between cellulose and xyloglucans
- **Cellulase (PC)**: cellulose clivage

Drought markers :
PP2C, PYL4 and HB7, their expressions being sensitive to drought (Cohen *et al.*, 2010)

*Schematic representation of the organization of plants primary cell wall (from Cosgrove, 2005)**

Regulation of gene expression in growing leaves as compared to mature leaves. For a given transcript, letters indicate significant differences between comparisons ($\alpha=0,05$). Data obtained on Carpaccio.

Profiling of gene expression (obtained by qPCR)

Regulation of gene expression in leaves under drought and rewatering as compared to control. Data obtained on Carpaccio.

Main Results:

- Transcriptional regulation of drought markers confirmed that all genotypes sensed the drought and rewatering treatments.
- As expected, gene related to cell expansion processes were strongly expressed in the growing leaves (indicating that Poplar homologs are functional)
- High growth rate was associated with strongest gene regulation in response to both drought and rewatering, excepted for Dorskamp
- Following three days of rewatering, growth of the youngest leaves was restored but gene expression remained impacted by the drought (data not shown).

Conversion of gene expression into molecular plasticity indexes

For each genotype, reaction norms were assessed across treatments from molecular data. We applied the Relative Distance Plasticity Index (RDPI), which is a formalism enabling the quantification of phenotypic plasticity among individuals of a given species exposed to distinct environments (Valladares *et al.* 2006)**. Here RDPI were calculated from normalized gene expression.

Some highly plastic (*XTH21*) and less responsive (*XTH28*) genes were identified across all comparisons. Although Dorskamp intermediate leaves exhibited a higher plasticity compared to juvenile and mature stages, no clear pattern of molecular plasticity discriminated genotypes or developmental stages. For some genes, like *PME1*, RDPI did not vary accordingly to a definable pattern

Our work highlight the diversity of the plasticity of gene expression, which differs qualitatively and quantitatively across genotypes and among leaf maturity. Although increasing the number of individuals is required to reduced noises, our results pointed the interest of using a plasticity index to summarize molecular large dataset.

Left: Whisker-plots of gene RDPI are shown for the 4 genotypes and the three stages of leaf development. RDPI values integrate the three applied treatments, median RDPIs varied from 0.1 (low responsive gene) to 0.9 (highly plastic expression).
For clarity, genes are shown in orange = drought markers ; in green = expansins ; in yellow = XTH ; in blue = aquaporins ; in grey = PC and PME.

Conversion of gene expression into molecular plasticity indexes

For each genotype, reaction norms were assessed across treatments from molecular data. We applied the Relative Distance Plasticity Index (RDPI), which is a formalism enabling the quantification of phenotypic plasticity among individuals of a given species exposed to distinct environments (Valladares *et al.* 2006)**. Here RDPI were calculated from normalized gene expression.

Some highly plastic (*XTH21*) and less responsive (*XTH28*) genes were identified across all comparisons. Although Dorskamp intermediate leaves exhibited a higher plasticity compared to juvenile and mature stages, no clear pattern of molecular plasticity discriminated genotypes or developmental stages. For some genes, like *PME1*, RDPI did not vary accordingly to a definable pattern

Our work highlight the diversity of the plasticity of gene expression, which differs qualitatively and quantitatively across genotypes and among leaf maturity. Although increasing the number of individuals is required to reduced noises, our results pointed the interest of using a plasticity index to summarize molecular large dataset.

Left: Whisker-plots of gene RDPI are shown for the 4 genotypes and the three stages of leaf development. RDPI values integrate the three applied treatments, median RDPIs varied from 0.1 (low responsive gene) to 0.9 (highly plastic expression).
For clarity, genes are shown in orange = drought markers ; in green = expansins ; in yellow = XTH ; in blue = aquaporins ; in grey = PC and PME.

* Daniel J. Cosgrove (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:850-861
 ** Valladares F., Sanchez-Gomez D. & Zavala M.A. (2006) Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, 94:1103-1116



4th UPSC-INRA (UPRA) bilateral meeting
26 - 28 March 2012, Umeå Plant Science Centre



Figure 87 : Poster portant sur mes travaux de master 2. Présenté lors du meeting UPRA en 2012.



PhD project:

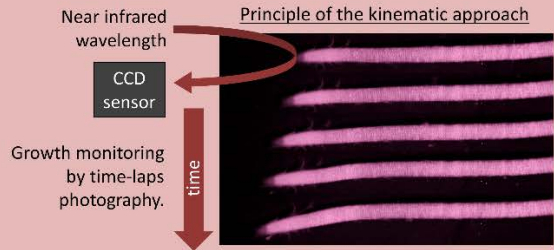
Cell division and cell elongation in the growing root apex: diversity of drought-induced responses

Bizet François, Hummel Irène, Granier André & Bogeat-Triboulot Marie-Béatrice

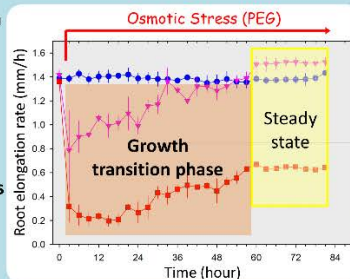
UMR1137, Forest Ecology & Ecophysiology, INRA, Université de Lorraine, F-54280 Champenoux, France

Context:

The great adaptability to environmental constraints of root development is a crucial property of tree functioning. Root system development is responsive to numerous factors of the rhizosphere including water availability. Cellular and molecular mechanisms responsible for this developmental plasticity of tree' roots are almost unknown as well as the diversity of this plasticity.

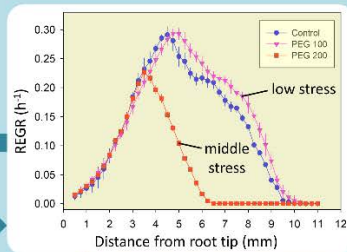


The impact of drought on root growth (lower Relative Elongation Growth Rate and shortened growth zone) has already been described in numerous studies, but the dynamics of growth during the transition phase is still poorly known.



Root apex scale

Growth in function of time
Growth analysis at steady state



adapted from Rémy Merret (2011) PhD thesis, INRA Nancy & Université de Lorraine.

Aim: analyze the evolution of growth parameters (duration of the transition phase, REGR...) during the transition phase in response to different water deficit.

PhD project: study the integrative plasticity of root growth in response to drought at different scales in *Populus sp.*

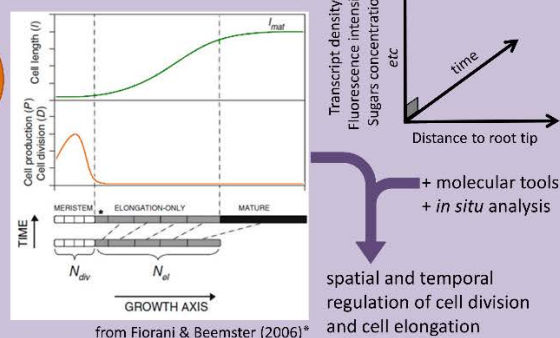
Aim: use modelisation tools to identify and describe different strategies of drought tolerance.

Ecological scale

The diversity of developmental plasticity of root growth in response to drought in different *Populus* species could reflect different strategies of drought tolerance.

Aim: identify molecular and/or cellular parameters that explain differences in sensitivity or tolerance to drought between species.

Cell scale



At a cell scale, root growth relies on two dynamic processes: the meristematic production of cells and their elongation. Both are responsive to environmental factors. While the molecular mechanisms underlying cell division and cell elongation have been depicted, those involved in the synchrony between these cellular processes remain puzzling.

Aims:

- Characterize the impact of a water deficit on cell division and cell elongation and their dynamics during the growth transition phase
- Combine a kinematic approach with molecular tools and *in situ* analyses to decipher the spatial and temporal regulation of cell division and cell elongation.

* Fabio Fiorani & Gerrit T.S. Beemster (2006) Quantitative analysis of cell division in plants. *Plant molecular biology*, 60:963-979.



4th UPSC-INRA (UPRA) bilateral meeting
26 - 28 March 2012, Umeå Plant Science Centre

Figure 88 : Poster portant sur mon projet de thèse. Présenté lors du meeting UPRA en 2012.

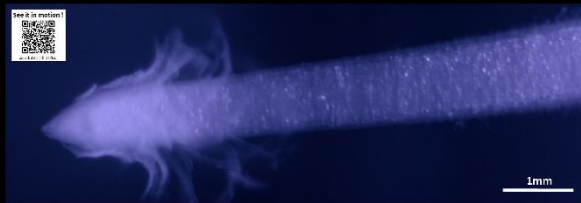


Spatio-temporal evolution of growth components in root apex in response to low water potential.



BIZET François, HUMMEL Irène, PEAUCELLE Alexis, VIALET-CHABRAND Silvère & BOGEAT-TRIBOULOT Marie-Béatrice
UMR1137, Forest Ecology & Ecophysiology, INRA, Université de Lorraine, F-54280 Champenoux, France

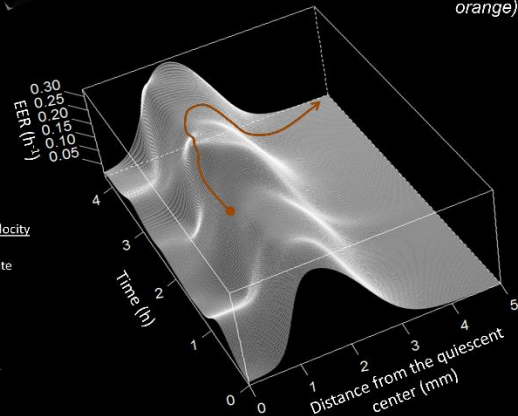
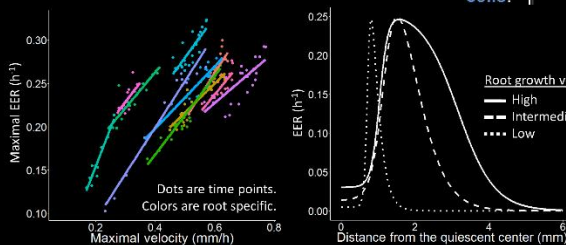
The great adaptability to environmental constraints of root system is a crucial property of plant functioning. Root development is responsive to rhizospheric factors including water availability. Following a drought event, lowered elongation rates and shortened growth zones are often reported by comparing distinct **growth steady states**. Here we focus on the **dynamics of growth change** between two steady states i.e. during the growth transition phase, which is still poorly documented.



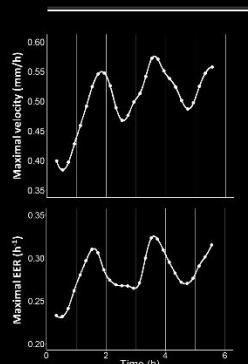
We monitored root growth with **time-lapse photography** under **infrared illumination** on **Populus roots**. The hydroponic disposal and the natural marking under infrared light allow continuous growth monitoring and the application of an osmotic stress without any root manipulation. Velocity profiles were used to determine **Elemental Elongation Rate (EER)** profiles.

The high spatial and temporal resolution allow us to draw a **wireframe representation of growth** for each root (see below). From a **Lagrangian point of view**, the temporal variation of the Elemental Elongation Rate (EER) can be extracted for any particle (in orange).

Inter-individual comparison shows that a same maximal EER is associated with a large range of root growth velocity. **Root growth seems to primarily depend on the size of the growth zone (number of elongating cells and duration of cell elongation) rather than on the stretching capacity of cells.**

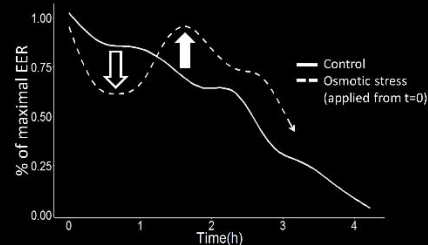


Nevertheless, for a given individual, measurements along time show that most growth parameters positively covariate. Thus, **for a given root, variations of growth velocity results firstly from modifications of the stretching capacity of cells.**



The cyclic variations observed with a constant period (about 1-2 hours) suggest complex interactions between intra-cellular processes (water uptake, enzymatic activities, etc).

Lagrangian specification of EER is determined for particles positioned at the maximal EER position at $t=0$. In response to an osmotic stress, EER rapidly decreases and a **recovery mechanism** is effective a few hours after stress application.



7th EPSO Conference
1-4 September 2013, Porto Heli, Greece



Figure 89 : Poster portant sur les résultats des suivis de croissance racinaire. Présenté lors du séminaire EPSO en 2013.

II. Mesure *in vivo* de la longueur et de l'activité du méristème apical racinaire grâce à l'infrarouge. (article de recherche 1)

Titre : Length and activity of the root apical meristem revealed *in vivo* by infrared imaging.

Auteurs : François Bizet, Irène Hummel, Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot.

Journal : Journal of experimental botany

DOI : 10.1093/jxb/eru488

III. Plasticité de la croissance des feuilles de peuplier au déficit hydrique. (article de recherche 2)

Titre : Phenotypic plasticity towards water regime: response of leaf growth and underlying candidate genes in *Populus*.

Auteurs : François Bizet, Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot, Pierre Montpied, Angélique Christophe, Nathalie Ningre, David Cohen and Irène Hummel.

Journal : Physiologia Plantarum

DOI : 10.1111/ppl.12271

IV. Cursus Agreenium

En plus de mes activités de thèse et d'enseignement, je fais partie de l'école internationale de recherche Agreenium (EIR-A), école créée récemment regroupant plusieurs organismes de recherche. Pour rester le plus fidèle possible aux objectifs fixés par cette école pour ses doctorants, je vous ai retranscrit ci-dessous la présentation de cette école par Stéphane GUILBERT, son directeur.

« *Présentation de l'EIR-A*

Dans le cadre de ses activités de promotion de la mobilité internationale et de renforcement de l'attractivité du dispositif d'enseignement supérieur et de recherche de ses membres, Agreenium a créé une Ecole Internationale de Recherche. En partenariat avec ses membres et leurs partenaires (universités et écoles doctorales), l'EIR-A propose la construction d'un parcours doctoral d'excellence validé par le label Agreenium. En matière de construction de parcours, l'EIR-A propose à des doctorants sélectionnés sur des critères de motivation, d'ambition et de potentiel professionnel :

- i) une formation complémentaire avec des modules transversaux, des modules disciplinaires ainsi qu'un ensemble d'activités à caractère transversal,*
- ii) une expérience à l'international (e.g. 3 mois dans un laboratoire étranger),*
- iii) un suivi personnalisé par un référent Agreenium pour la construction d'un parcours d'excellence (à partir des modules et activités proposés par l'EIR-A et par l'ED de rattachement du doctorant),*
- iv) un tutorat individuel par un consultant en ressources humaines spécialiste du placement des jeunes docteurs et des métiers à l'international et*
- v) une validation par un label EIR-A (délivré par Agreenium) qui viendra en complément du diplôme de doctorat (délivré par l'établissement dont relève l'Ecole doctorale de rattachement du doctorant).*

Ce label qui valide un parcours d'excellence spécifique doit contribuer à accroître le rayonnement du dispositif français de recherche et d'enseignement supérieur en Agronomie, alimentation, environnement et santé publique vétérinaire. Il s'appuie sur les référentiels européens qui considèrent le doctorant comme un jeune professionnel et le placent au cœur du dispositif. Il qualifie un parcours professionnalisant et ouvert à l'international ainsi qu'aux grands enjeux et controverses de société liés à l'alimentation et à la durabilité des systèmes agronomiques tout en consolidant et développant le réseau professionnel du doctorant ainsi que ses capacités d'analyse. Il s'appuie sur un partenariat avec les professionnels (entreprises, professionnels du développement de l'innovation et du transfert de technologie, ONG, etc.) qui est en cours de constitution.

Le séminaire résidentiel annuel est animé par une quinzaine d'experts internationaux venant du monde de la recherche comme du monde socio-économique.

Stéphane Guilbert, directeur d'Agreenium »

V. Charge d'enseignement à l'université de Lorraine

En tant que doctorant contractuel chargé d'enseignement, j'ai effectué une charge d'enseignement de 194,5h équivalent TD (ETD) en parallèle de la thèse. Je mets ci-dessous le détail des enseignements, effectués au sein du secteur biologie de l'université de Lorraine. Ils ont été donnés surtout à des étudiants de licence 2 (L2) et de licence 3 (L3) et touchent des domaines assez variés allant de la biologie moléculaire jusqu'à l'écologie avec toutefois une nette dominance de physiologie végétale.

- Cours de Master 2
 - *Plasticité phénotypique et processus évolutifs* (1h puis 2h/groupe ; 7,5h ETD)
- TP de Licence 3
 - Etude des mécanismes de fermeture et d'ouverture des stomates chez *Tradescantia* (4h/groupe ; 28h au total)
 - Mise en évidence de l'expression différentielle de gènes impliqués dans la tolérance et l'hyper-accumulation du Zn chez *Arabidopsis* (10h/groupe ; 30h au total)
- TP/TD de Licence 2
 - Effets de l'auxine dans la croissance des végétaux (7h puis 6h/groupe ; 78h au total)
 - Cycles de reproduction chez les mousses et les fougères (4h/groupe ; 16h au total)
 - Cycles biogéochimiques de l'azote et du phosphore, comparaison entre une plantation d'eucalyptus et une savane au Congo (2h/groupe ; 12h au total)
 - Les formes d'humus et leur variabilité spatiale et temporelle (2h/groupe ; 12h au total)
- Autres
 - Visites des serres du jardin botanique du Montet (L2 ; 2h/groupe ; 10h au total)
 - Visite des installations de suivi de croissance racinaire (M2 ; 0,5h/groupe ; 1h au total)
- Préparation de sujets d'examens
 - Sujet sur mon cours "*Plasticité phénotypique*" comptant pour 50% de l'examen final (1ère session)
 - Sujet sur les visites des serres comptant pour 25% de l'examen final (2ème session)
- Corrections de copies : concerne les sujets mentionnés ci-dessus ainsi qu'une partie des comptes rendus de TP récupérés lors de mes enseignements de L3 et L2 (entre 70 et 120 copies/an)

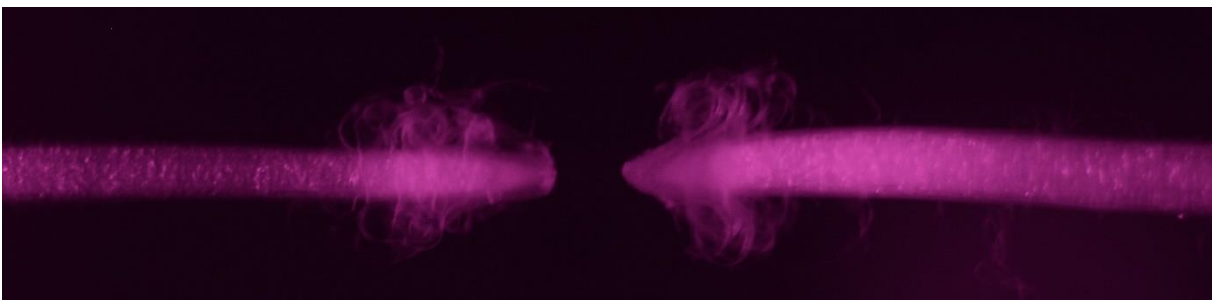
VI. Formations suivies

L'école doctorale *Ressources, Procédés, Produits, Environnement* (RP2E) demande à ce qu'un certain nombre de formations obligatoires soit réalisées au cours de la thèse (Tableau 5). De par mon statut de doctorant contractuel chargé d'enseignement, la plupart de mes formations dépendaient du Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur (CIES). Vous trouverez ci-dessous le listing des formations que j'ai suivies. J'ai volontairement omis le détail du contenu pour ne pas alourdir le document, en espérant que dans les plupart des cas les intitulés soient relativement explicites.

Tableau 5 : récapitulatif des formations demandées par l'école doctorale RP2E.

Type de formation	Nombre	Durée
Modules "scientifiques"	2	1 semaine
	1 ^{ère} année : 4	
Modules "professionnels" (CIES)	2 ^{ème} année : 2	2 jours
	3 ^{ème} année : 1	
Séminaires résidentiels (CIES)	3 (1/année de thèse)	3 jours

- Modules "scientifiques"
 - Mars 2012 : *Les techniques d'études in situ de la cellule* par Valérie LEGUE (UMR IAM ; il s'agit d'une formation généraliste sur les techniques de microscopie photonique et électronique)
 - Mars 2012 : Séminaire résidentiel de l'EIR-Agreonium (*cf.* Annexe III)
- Modules "professionnels"
 - Février 2012 : *Gestion des relations difficiles* par Dominique PROUDHON (*team debugger*)
 - Février 2012 : *Prévention et Secours Civique niveau 1* (PSC1) par Françoise CORNAT (secouriste)
 - Février 2012 : *Formation à la communication orale* par Gaël LEVEUGLE (comédien)
 - Avril 2012 : *La magie de l'enseignement* par Pierre SCHOTT (enseignant et magicien amateur)
 - 2013 : *Formation à la pédagogie universitaire* par Laëtitia GERARD (Centre de ressources en Innovation Pédagogique de l'Université de Lorraine)
 - Novembre 2013 : *Élaborer son projet professionnel et se préparer à sa recherche d'emploi* par Catherine DREYER (pôle Ressources Humaines du centre INRA de Nancy-Lorraine) et Catherine FAYARD (APEC Nancy)
 - Janvier 2014 : *Développer ses capacités à communiquer et à manager* par Chantal PUCCIO (directrice artistique de la scène internationale de Vandœuvre)
- Stages résidentiels de l'école doctorale :
 - *Préparer/animer/évaluer un cours* par Laëtitia GERARD (Centre de ressources en Innovation Pédagogique de l'Université de Lorraine)
 - *Les droits et les devoirs des enseignants* par Sarah Weber (Directrice des affaires juridique de l'université de Lorraine)
 - *L'intégration des étudiants handicapés à l'université* par Yves Cardellini (sous-directeur Vie étudiante et Relais handicap de l'Université de Lorraine)
- Formations hors cursus de l'école doctorale :
 - Juin-juillet 2013 : école d'été « Des racines et des ailes » sur les outils et les approches de modélisation des systèmes racinaires. Organisé à Montpellier par l'INRA, UMR Eco&Sols.



Division et élongation cellulaire dans l'apex de la racine : diversité de réponses au déficit hydrique.

La capacité d'une plante à réguler sa croissance racinaire est une composante importante de l'acclimatation aux stress environnementaux. A l'échelle cellulaire, cette régulation est effectuée via le contrôle de la division et de l'élongation des cellules mais les rôles respectifs de chaque processus et leurs interactions sont peu connus. Notamment, l'activité de production de cellules du méristème apical racinaire (RAM) est trop souvent négligée. Dans cette thèse, l'analyse spatiale de la croissance le long de l'apex racinaire et l'analyse temporelle des trajectoires de croissance des cellules ont été couplées pour comprendre les liens existants entre division et élongation cellulaire. Pour cela, j'ai développé un système de phénotypage de la croissance à haute résolution spatio-temporelle qui a été appliqué à l'étude de racines d'un peuplier euraméricain (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) en réponse à différents stress (stress osmotique, impédance mécanique). Une forte variabilité du taux de croissance racinaire entre individus ainsi que des variations individuelles cycliques de la croissance ont été observées malgré des conditions environnementales contrôlées. L'utilisation de cette variabilité couplée à la quantification de l'activité du RAM a mis en évidence l'importance du taux de production de cellules pour soutenir la croissance racinaire. Ces travaux analysent une nouvelle échelle de variations spatiales et temporelles de la croissance peu prise en compte jusqu'à présent. Hautement applicable à d'autres questions scientifiques, l'analyse du devenir des cellules une fois sortie du RAM est également discutée pour des conditions de croissance non stables.

Cell division and cell elongation in the growing root apex: diversity of drought-induced responses.

Regulation of root growth is a crucial capacity of plants for acclimatization to environmental stresses. At cell scale, this regulation is controlled through cell division and cell elongation but respective importance of these processes and interactions between them are still poorly known. Notably, the cell production activity of the root apical meristem (RAM) is often excluded. During this thesis, spatial analyses of growth along the root apex were coupled with temporal analyses of cell trajectories in order to decipher the links between cell division and cell elongation. This required the setup of a system for phenotyping root growth at a high spatiotemporal resolution which was applied to study the growth of roots from an euramerican poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) in response to different environmental stresses (osmotic stress or mechanical impedance). An important variability of root growth rate between individuals as well as individual cyclic variations of growth along time were observed despite tightly controlled environmental conditions. Use of this variability coupled with quantification of the RAM activity led us to a better understanding of the importance of the cell production rate for sustaining root growth. This work analyses a new spatiotemporal scale of growth variability poorly considered. Widely applicable to others scientific questioning, temporal analyses of cell fate once produced in the RAM is also discussed for non-steady growth conditions.