



Accommodation des peupliers aux sollicitations mécaniques répétées : localisation tissulaire et recherche d'acteurs moléculaires.

Sébastien Ribeiro

► To cite this version:

Sébastien Ribeiro. Accommodation des peupliers aux sollicitations mécaniques répétées : localisation tissulaire et recherche d'acteurs moléculaires.. 2013, 25 p. + annexes. hal-01269064

HAL Id: hal-01269064

<https://hal.science/hal-01269064>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



MASTER II Biologie et Environnement

**SPECIALITE : Génomique, Ecophysiologie et Productions Végétales
(GEPV)**

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR :

Ribeiro Sébastien

SUJET :

**Accommodation des peupliers aux sollicitations mécaniques
répétées : localisation tissulaire et recherche d'acteurs moléculaires
impliqués dans la mécanoperception**

Responsable du Stage :

Nathalie LEBLANC-FOURNIER

UMR PIAF 547

Université Blaise Pascal

Les Cézeaux, 24 avenue des Landais

63177 Aubière



Juin 2013

Résumé

Les plantes sont capables de percevoir et de répondre aux sollicitations mécaniques répétées telles que le vent. Chez le peuplier, des études précédentes ont montré que les plantes perçoivent différemment deux flexions successives de leur tige. Elles acclimatent leur sensibilité : c'est l'accommodation. Les réponses physiologiques et morphologiques au vent sont bien décrites aujourd'hui mais les mécanismes moléculaires impliqués dans la mécanoperception et sa régulation restent incertains. Des études globales réalisées sur des tiges entières de peupliers ayant subi des flexions répétées, ont mis en évidence l'implication de gènes dits mécano-régulés dont fait partie *PtaZFP2*, marqueur moléculaire précoce de ce phénomène. Pour mieux comprendre la mécanoperception et sa régulation, nous avons cherché à localiser au niveau tissulaire l'expression de plusieurs gènes mécano-régulés suite à une ou deux flexions. Nous avons montré que l'accommodation se mettait en place précocement et de manière hétérogène au sein de la tige. De plus, nos résultats suggèrent une plus grande sensibilité au signal mécanique des cellules du jeune xylème secondaire. Pour mieux définir le rôle de *PtaZFP2* dans ce phénomène d'accommodation, une recherche des partenaires protéiques de *PtaZFP2* a été initiée par la technique double hybride en levures.

Mots clés : sollicitations mécaniques répétées, accommodation, *PtaZFP2*, double hybride, peuplier.

Abstract

During their development, plants are able to perceive and respond to multiple mechanical loadings such as wind. In poplar, the effects of successive bendings showed that plants attenuated their responses by adjusting their sensitivity. This process was called accommodation. Physiological and morphological responses to wind are now well described but little is known about the molecular mechanisms. Previous transcriptional studies, performed on poplar bent stems, highlighted the involvement of several mechanoresponsive genes including *PtaZFP2*, a molecular marker of accommodation. To understand the mechanoperception and its regulation, we localized the expression of several mechanoresponsive genes in different parts of stem after one or two bendings. We showed that the accommodation process was established early and heterogeneously within the stem. Moreover, our results suggest a greater sensitivity to mechanical signal of the young secondary xylem cells. To better investigate the role of *PtaZFP2* in accommodation, we used a yeast two-hybrid system to search for *PtaZFP2* protein partners.

Key words : mechanical stimulus, accommodation, *PtaZFP2*, two-hybrid system, *Populus*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Jean-Louis Julien de m'avoir accueilli au sein de l'UMR PIAF. Il a été celui qui, dès ma première année de licence, m'a donné le goût des sciences du végétal.

Un GRAND MERCI à ma responsable de stage Nathalie Leblanc-Fournier de m'avoir si bien encadré durant ce stage. De m'avoir fait confiance, d'avoir toujours été à mon écoute et de m'avoir aidé à améliorer ma pratique, ma rigueur et mes connaissances.

Je remercie Jérôme Franchel pour son aide et pour ses conseils. Merci également pour nous avoir supporté Estelle et moi (surtout Estelle) dans ton bureau pendant ces 6 mois de stage.

Merci à Nicole Brunel pour son aide précieuse en cytologie, à Sylvaine Labernia pour tous ces broyages qu'elle a fait pour moi et à Christelle Boisselet pour avoir pris soin de mes peupliers et pour m'avoir expliqué les fondamentaux en culture *in vitro*. Merci à toutes les trois pour vos conseils et pour votre gentillesse.

Je remercie Ludovic Martin (1^{er} prix Bravo !) pour être simplement Ludovic Martin ! Tu n'as jamais hésité à m'aider lorsque j'étais perdu et à répondre à toutes mes questions. Merci à Kévin Tocquard (non mais allô quoi, tu t'appelles Tocquard et t'es même pas un tocard, allô !) pour tous ces délires et pour ta franchise.

MERCI à tous les enseignants chercheurs du PIAF pour leur sympathie et leur bonne humeur mais aussi pour leur professionnalisme et leurs conseils avisés. Merci à Catherine Lenne, Mélanie Décourteix, Patricia Drevet, Philippe Malagoli, Stéphane Herbette, Boris Fumanal, Aurélie Gousset, Philippe Label, Valérie Pujade-Renaud et Jean-Stephane Venisse. J'ai beaucoup appris à vos côtés, que ce soit au sein du PIAF que lors des cours passionnants et vivants que certains m'ont délivré durant tout mon cursus universitaire.

Je remercie également Eric, Aude, Béatrice, Marine, Razik, Chaima, David et Marie pour leur sympathie et leur disponibilité.

Je tiens également à remercier tous les membres du GDEC pour m'avoir accepté au sein de leur laboratoire quand je cherchais des réponses sur le double hybride. Merci notamment à Julie Bednarek pour m'avoir aidé avec mes "têtes de Mickey".

Enfin, MERCI à mes deux copines de voyage : Emilie (alias Mamie ou La traître) et Estelle (alias *Juglans regia* ou L'odieuse). Vous m'en avez fait voir de toutes les couleurs mais sans vous ce stage n'aurait pas été pareil.

LISTE DES ABREVIATIONS

Aba : Auréobasidine

AD : Activating Domain

Adé : Adénine

ADNc : ADN complémentaire

AGP : Arabino Galactan Protein

AP : APETALA

C2H2-ZFP : Cysteine2/Histidine2 Zinc
Finger Protein

CaM : Calmoduline

CML : Calmodulin-Like protein

CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide

DBD : DNA Binding Domain

EAR: ERF-associated-Amphilic Repressor

ERF : Ethylene-Response Factor

HDAC : Histones Dé-ACétylases

His : Histidine

Leu : Leucine

LOS : Low expression of OSmotically
responsive

MAP : Microtubule Associated-Protein

MCA : Mechanosensitive Channel of *A.
thaliana*

MS : Murashige et Skoog

MscS: Mechanosensitive channel with
Small conductance

MSL : MscS-Like

NLS : Nuclear Localization Signal

pb : paire de base

PCR2 : Plant Cadmium Resistance 2

PIAF: Physique et physiologie Intégratives
de l'Arbre Fruitier et forestier

Pta : *Populus tremula x alba*

Pti : *Populus trichocarpa*

QALGGH : Glutamine-Alanine-Leucine-
Glycine-Glycine-Histidine

QR : Quantité Relative

RING : Really Interesting New Gene

RLK : Receptor Like Kinase

RT-PCR : Real Time Polymerase Chain
Reaction

SAC : Stretch-Activated Calcium

SD : Synthetic Dextrose

TAE : Tris-Acetate-EDTA

Trp : Tryptophane

UAS : Upstream Activation Sequence

UMR : Unité Mixte de Recherche

WAK : Wall Associated Kinase

XET : Xyloglucane EndoTransglycosylase

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PARTIE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES SOLlicitATIONS MECANQUES CHEZ LES PLANTES	2
1.1. NATURE DES SOLlicitATIONS MECANQUES	2
1.2. REPONSES MORPHOLOGIQUES DES PLANTES AUX SOLlicitATIONS MECANQUES EXTERNES PROVOQUEES PAR LE VENT	2
1.3. SIGNAUX PHYSIQUES PERÇUS	3
1.4. REPONSES DES PLANTES AUX FLEXIONS REPETÉES	4
2. ACTEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA MECANOPERCEPTION.....	6
2.1. LES ACTEURS DE LA PERCEPTION DU SIGNAL MECANIQUE	6
2.2. LES ACTEURS PRECOCES DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL	7
2.3. GENES CANDIDATS IMPLIQUES DANS L'ACCOMMODATION	7
<i>PtaZFP2</i>	7
<i>Analyse transcriptomique suite à une flexion de la tige du peuplier</i>	9
3. OBJECTIF DE L'ETUDE	10

PARTIE II - TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. MATERIELS ET METHODES.....	11
1.1. ANALYSE SPATIO-TEMPORELLE DE L'ACCOMMODATION	11
<i>Plants de peuplier et conditions de culture</i>	11
<i>Traitements mécaniques et prélèvements</i>	11
<i>Immunolocalisation in situ</i>	11
<i>Extraction des ARN totaux et Rétro-transcription en ADN complémentaire (ADNc)</i>	12
<i>PCR quantitative en temps réel</i>	12
1.2. RECHERCHE DE PARTENAIRES PROTÉIQUES DE P _{TaZFP2} PAR DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES	13
<i>Principe du double hybride en levures</i>	13
<i>Construction de la banque d'ADNc dans la souche Y187</i>	13
<i>Construction des appâts dans la souche Y2HGold</i>	14

<i>Test d'autoactivation et de toxicité des protéines appâts.....</i>	<i>15</i>
<i>Rencontre entre les souches de levures Y187 et Y2HGold ou "mating"</i>	<i>15</i>
2. RESULTATS	16
2.1. ANALYSE SPATIO-TEMPORELLE DE L'ACCOMMODATION	16
<i>Les mécanismes liés à l'accommodation sont-ils mis en place précocement ?</i>	<i>16</i>
<i>Les mécanismes liés à l'accommodation ont-ils lieu dans toutes les parties de la tige ?</i>	<i>17</i>
<i>Régulation du gène MSL1 et localisation de sa protéine.....</i>	<i>18</i>
<i>Recherche de nouveaux candidats de la mécanoperception et de l'accommodation</i>	<i>18</i>
2.2. RECHERCHE DE PARTENAIRES PROTÉIQUES DE PTAZFP2 PAR DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES	20
<i>Construction des plasmides recombinants pGADT7-Rec et pGBKT7 dans les souches de levures Y187 et Y2HGold.....</i>	<i>20</i>
<i>Test d'auto-activation et test de toxicité des protéines appâts.....</i>	<i>20</i>
<i>Rencontre entre la souche Y187 et la souche Y2HGold</i>	<i>21</i>

PARTIE III - DISCUSSION - PERSPECTIVES -CONCLUSION

1. LOCALISATION TISSULAIRE DES REPONSES MOLECULAIRES DU PEUPLIER SUITE A UNE FLEXION DE LA TIGE	22
2. MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE D'ACCOMMODATION AU NIVEAU MOLECULAIRE	23
3. DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES.....	24

INTRODUCTION

Les plantes sont incapables de se mouvoir et sont par conséquent soumises en permanence aux contraintes de l'environnement (variation d'intensité lumineuse, températures extrêmes, vent...). Jusqu'à récemment, les contraintes mécaniques étaient très peu considérées. Pourtant, il est admis aujourd'hui que les sollicitations mécaniques sont des signaux importants pour réguler la croissance des plantes. En effet, au cours de leur développement, les plantes sont dans une situation instable, elles poussent vers le haut quand la gravité ou le vent tendent à les faire plier. La perception de ces sollicitations ou mécanoperception est donc essentielle pour le bon développement de la plante. De plus, des modifications majeures sont à prévoir dans un futur proche due aux changements globaux qui influenceront le paysage. Ceci est d'autant plus vrai pour les plantes pérennes qui doivent survivre au cours des saisons. Ainsi, les modèles de prédiction climatique prévoient une augmentation de la violence et la fréquence des tempêtes alors que le vent moyen ne sera pas modifié. Les plantes ne pourront alors pas s'acclimater à ce vent violent soudain. Les habitudes des sylvicultures devront être modifiées pour trouver des essences qui résistent à l'ensemble de ces changements climatiques.

Dans ce contexte d'étude, le but de ce stage est de mieux comprendre les acteurs moléculaires impliqués dans la mécanoperception et sa régulation chez le peuplier, suite à une ou plusieurs sollicitations mécaniques. Une première partie bibliographique fera le point sur les connaissances actuelles des réponses morphologiques des plantes aux sollicitations mécaniques. Puis, une deuxième partie présentera les acteurs moléculaires précoces impliqués dans la voie de signalisation de la mécanoperception suite à des sollicitations répétées de tiges de peupliers. Enfin, nous décrirons les approches qui ont été développées pour répondre aux objectifs poursuivis tout au long du stage.

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1 – Impact du vent sur la croissance longitudinale de plants de luzerne (*Medicago sativa*) cultivés en plein champs (Mouli  et Combes, 2004)

Les plants de luzerne au centre de la photo sont entourés d'un grillage métallique limitant leur course au vent. Ils sont significativement plus grands que les plants de luzernes non protégés du vent, ce qui met en évidence le rôle central des sollicitations mécaniques dans la croissance longitudinale des plantes.

1. LES SOLLICITATIONS MECANQUES CHEZ LES PLANTES

1.1. NATURE DES SOLLICITATIONS MECANQUES

Dans la nature, les plantes font face à deux types de sollicitations mécaniques : les signaux internes et les signaux externes. Les signaux mécaniques internes peuvent être perçus à différents niveaux d'organisation. Au niveau cellulaire, la pression de turgescence exerce une force homogène et multidirectionnelle sur la paroi cellulaire (Schopfer, 2006). Au niveau tissulaire, les cellules sont affectées par les propriétés mécaniques des cellules avoisinantes. Ainsi, dans un tissu en croissance tel que le méristème apical, des contraintes liées à un différentiel de croissance entre les cellules (appelées autocontraintes) vont être générées, déclenchant un réarrangement des microtubules (Hamant *et al.*, 2008). A l'échelle de l'organisme entier, sous l'effet de leur propre poids, les végétaux sont également capables de percevoir leur orientation par rapport à la gravité terrestre (Sack, 1991 ; Telewski, 2006) et déclencher le redressement de leurs axes en fonction du signal gravitationnel perçu. Cette réponse repose sur des signaux mécaniques internes *via* la sédimentation d'organites particuliers au niveau cellulaire (statolithes). Chez les espèces ligneuses, la réponse gravitropique se caractérise par la mise en place d'un bois de réaction (bois de tension chez les Angiospermes et bois de compression chez les Gymnospermes ; Pilate *et al.*, 2004). Les signaux mécaniques externes regroupent les flexions, les oscillations et les torsions de certains organes de la plante induites par le vent. On retrouve également dans cette catégorie, les signaux induits par le toucher comme le poids de la neige, l'impact de la pluie ou de la grêle ou encore les activités anthropiques (tuteurage, palissage). L'effet de ce type de sollicitations mécaniques sur la croissance des plantes est appelé thigmomorphogenèse (Boyer, 1967 ; Jaffe, 1973). Dans ce rapport nous nous intéresserons uniquement aux sollicitations mécaniques provoquées par le vent.

1.2. REPONSES MORPHOLOGIQUES DES PLANTES AUX SOLLICITATIONS MECANQUES EXTERNES PROVOQUEES PAR LE VENT

Depuis de nombreuses années, les études portant sur l'impact du vent sur la croissance longitudinale de la partie aérienne des plantes (herbacées et ligneuses) ont mis en évidence une diminution de la croissance en hauteur des tiges. Par exemple, en conditions naturelles, les travaux de Moulia et Combes (2004) ont montré que des plants de luzerne (*Medicago sativa*) protégés par un grillage (limitant donc leur course au vent) présentaient une croissance en longueur significativement plus importante que les plantes soumises à l'effet du vent (**Figure 1**). Ces résultats observés en plein champs ont été validés en laboratoire en mimant l'effet du

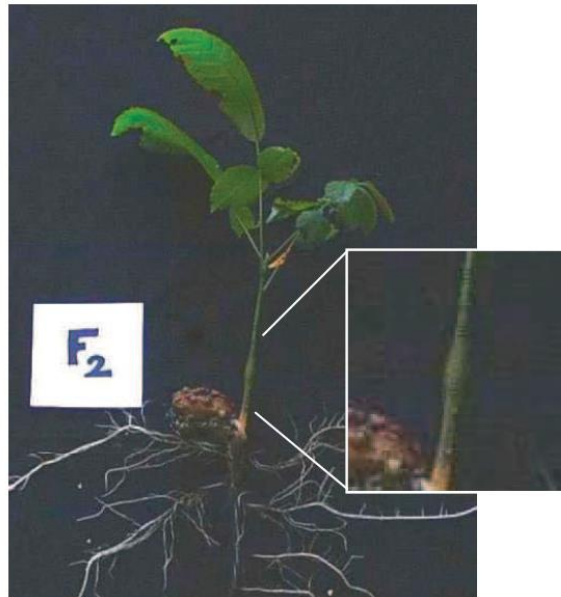


Figure 2 – Impact de flexions répétées sur la croissance radiale d'un jeune noyer (*Juglans regia*) (Crouzet, 2002)

Le noyer âgé de 3 semaines a été fléchi une fois par jour pendant une semaine. Après 7 jours de traitement, on observe un bourrelet localisé au niveau de la zone fléchie correspondant à une augmentation en diamètre de la tige.

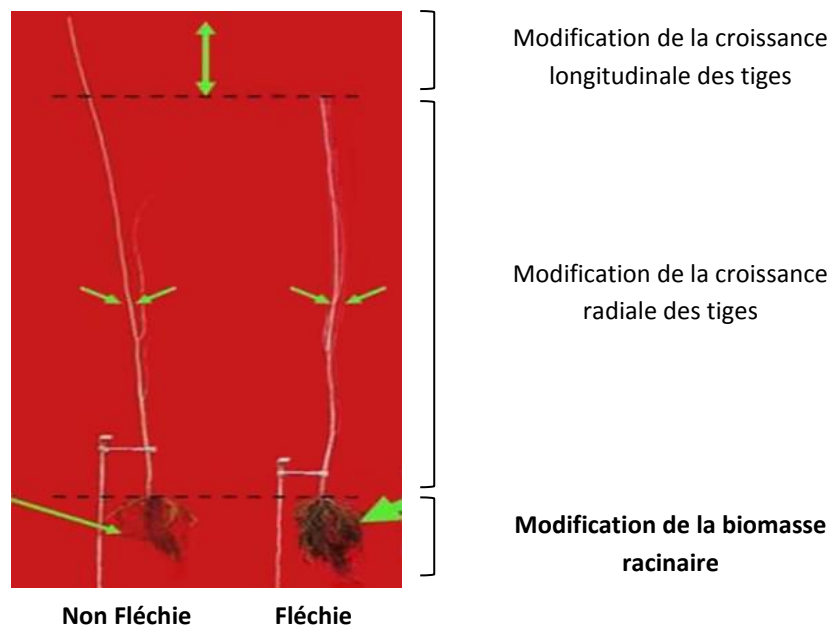


Figure 3 –Impact de flexions répétées sur la croissance racinaire de merisiers (*Prunus avium*) (Coutand et al., 2008)

Un merisier a été fléchi une fois toutes les trois heures pendant six semaines (à droite) et son phénotype a été comparé à un merisier non fléchi (à gauche). La plante sollicitée par un stress mécanique de type flexion est plus petite, présente une tige plus épaisse et possède une biomasse racinaire plus importante que la plante non sollicitée. Les différences entre les deux conditions sont indiquées par des flèches vertes.

vent par l'application d'une flexion sur des tiges de plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* ; Coutand *et al.*, 2000) mais aussi sur des plantes ligneuses telles que le pin (*Pinus contorta* ; Meng *et al.*, 2006).

Chez les espèces ligneuses, les études montrent globalement que les sollicitations mécaniques induites par le vent provoquent également une augmentation de la croissance radiale des tiges (Telewski et Pruyn, 1998 ; Pruyn *et al.*, 2000 ; Coutand *et al.*, 2008 ; Leblanc-Fournier *et al.*, 2008 ; Porter *et al.*, 2009). Par exemple, de jeunes noyers (*Juglans regia*) fléchis une fois par jour pendant une semaine, présentent un diamètre trois fois plus grand, au niveau de la zone sollicitée, que celui des individus non traités (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008 ; **Figure 2**). Chez le peuplier, une flexion de tige déclenche un arrêt de la croissance radiale pendant 2h suivie d'une augmentation de cette croissance pendant 3 à 5 jours (Coutand, Martin *et al.*, 2009).

Chez certaines espèces, l'application de flexions répétées sur une tige s'accompagne de la formation d'un bois différent de celui des tiges non sollicitées. Ce bois particulier est appelé "bois de flexion". Il a été mis en évidence chez le peuplier par Kern *et al.* (2005). Il est caractérisé par des vaisseaux moins nombreux par rapport à un bois "normal" et disposés en cercle.

Enfin, de nombreuses études sur les espèces ligneuses et herbacées rapportent une modification du volume et de la structure des racines après un stress mécanique de type flexion, ce qui augmenterait l'ancrage de la plante au sol. Goodman et Ennos (1996) ont ainsi démontré que des plants de maïs et de tournesol présentent des racines plus rigides et plus grosses suite à une flexion de la tige. Chez les ligneux, Coutand *et al* (2008) ont montré, sur le merisier (*Prunus avium*), que des plants protégés des effets du vent par des tubex (protection en plastique disposée autour de la tige), ont une biomasse racinaire significativement réduite par rapport à des plants protégés du vent mais stimulés mécaniquement (**Figure 3**).

1.3. SIGNAUX PHYSIQUES PERÇUS

Le stress mécanique appliqué à une plante est difficilement contrôlable et reproductible. Il dépend beaucoup de l'expérimentateur et du phénotype de l'espèce. Afin de mieux contrôler le stimulus appliqué à la plante, il a donc fallu mettre en évidence la variable mécanique perçue lors d'une sollicitation mécanique et proposer un modèle permettant de la quantifier.

Lors d'une flexion de la tige, deux variables physiques peuvent être perçues : des contraintes et des déformations. Les contraintes correspondent à la quantité des forces appliquées par unité de surface. Au cours de la flexion d'une tige, elles correspondent à des compressions du côté interne de la courbure et à des tensions du côté externe de la zone de courbure (**Figure 4-A**).

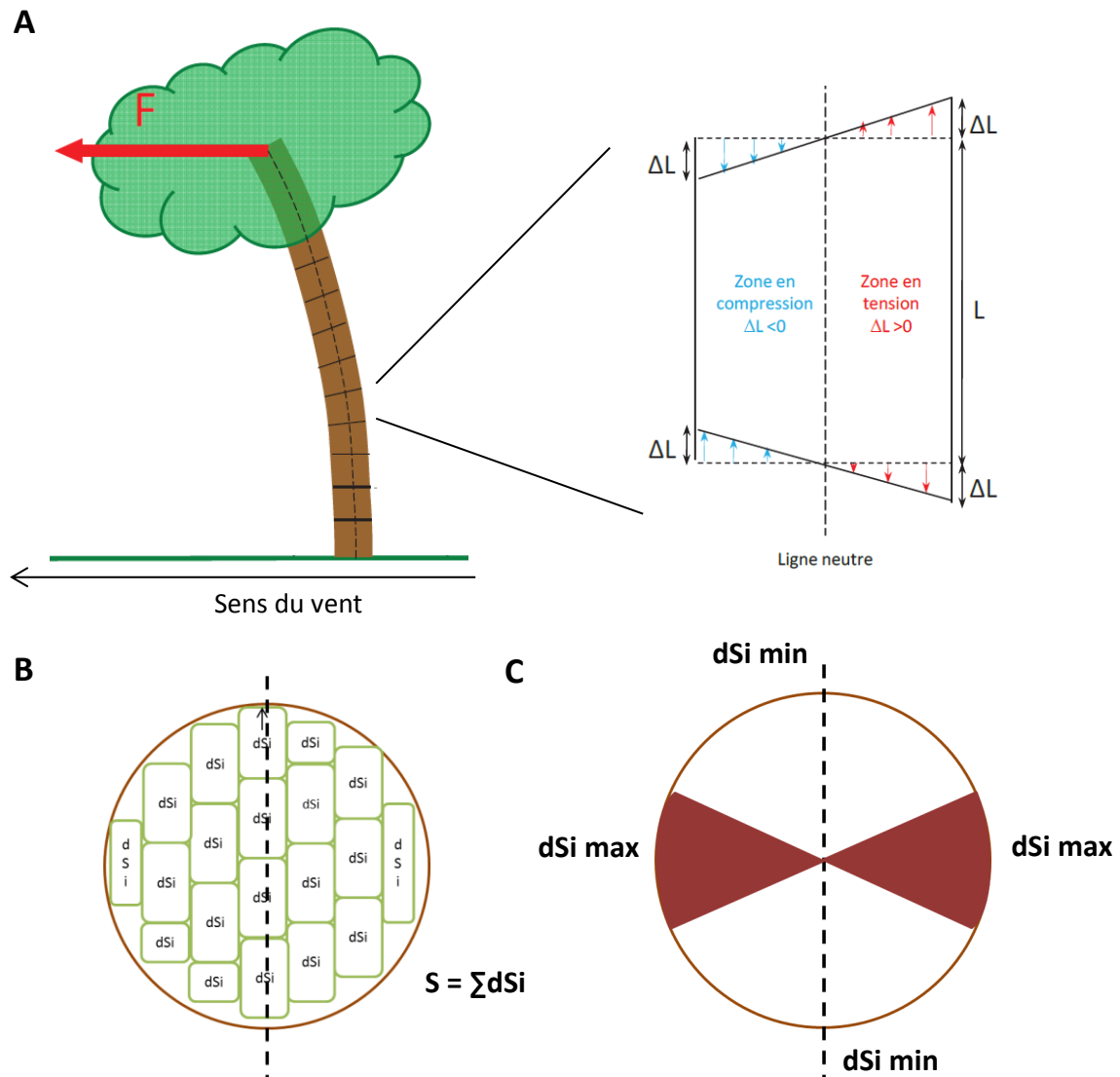


Figure 4 – Signaux physiques perçus par la plante lors d'une flexion de sa tige

(A) L'effet mécanique du vent peut être comparé à une flexion due à une force F . Cette flexion provoque des contraintes (flèches rouges et bleues) et des déformations longitudinales (ΔL) sur une section de la tige. Les contraintes correspondent à des compressions du côté interne de la courbure et à des tensions du côté externe. Les déformations correspondent à des raccourcissements ($\Delta L < 0$) et à des extensions ($\Delta L > 0$). (B) Lors d'une déformation de la tige, chaque cellule émet un signal dSi qui s'additionne pour former un signal S dépendant de la "somme des déformations" appliquée à la zone fléchée de cette tige. (C) La flexion provoque une hétérogénéité des champs de déformation au sein de la section de la tige. La déformation est maximale à la périphérie de la tige ($dSi \text{ max}$) et est minimale au niveau de la ligne neutre (représentée en pointillée).

La déformation (différence de longueur d'un élément) se traduit par des raccourcissements et des extensions. La différence de longueur ΔL est la même des deux côtés de la tige fléchie mais est de signe opposé. Ainsi, la zone située du côté interne de la courbure voit sa longueur diminuer (ΔL négatif) alors que la zone opposée s'allonge (ΔL positif) (**Figure 4-A**).

Coutand et Moulia (2000) ont démontré que la déformation induite par la sollicitation mécanique est la variable pertinente pour expliquer les réponses observées dans le cas de la réponse en élongation pour des tiges de tomates. Ce résultat a été confirmé par Coutand, Martin *et al.* (2009) en étudiant la croissance en diamètre de tiges de peupliers soumis à des flexions. De plus, une corrélation entre la déformation imposée par la flexion et l'expression locale d'un gène mécano-régulé, *PtaZFP2*, a pu être démontrée (Coutand, Martin *et al.*, 2009). Ainsi, un modèle intégratif de la mécanoperception appelé "somme des déformations" a pu être proposé par Moulia *et al.* (2011). Ce modèle suppose que chaque cellule perçoit sa propre déformation et génère en réponse un signal dSi. Les signaux émis par les cellules déformées s'additionnent pour former un signal systémique cumulé S (**Figure 4-B**) qui agit à distance sur la zone de croissance où il déclenche localement une réponse. De plus, l'intensité de la déformation est différente au sein de la tige : plus on s'éloigne de la ligne neutre et plus la déformation est importante. Elle est maximale à la périphérie de la tige (**Figure 4-C**). Cependant, un doute subsiste quant au rôle des contraintes lors d'une sollicitation mécanique même si aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les contraintes et la réponse de croissance. Chez le peuplier, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent l'apparition d'un bois différent entre le côté comprimé et le côté tendu de la tige alors que la déformation est la même en valeur absolue (Ludovic Martin, 2009). Une question se pose alors : Est-ce que le fait d'avoir des déformations de signe opposé de chaque côté de la tige suffit à induire la formation d'un bois différent ou est-ce que les contraintes sont aussi perçues par la plante ?

Grâce à l'identification et à la compréhension de la variable physique perçue par la plante au cours d'une flexion on peut quantifier l'intensité du stimulus appliqué à la plante et mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés. On peut aussi comparer l'effet de flexions répétées sur la croissance ou sur l'expression de gènes impliqués dans la mécanotransduction.

1.4. REPONSES DES PLANTES AUX FLEXIONS REPETEEES

Nous venons de voir que les plantes s'acclimatent à leur environnement mécanique fluctuant en adoptant des stratégies réduisant leur prise au vent : en diminuant leur croissance en hauteur, en augmentant leur croissance en diamètre et en favorisant leur croissance racinaire permettant

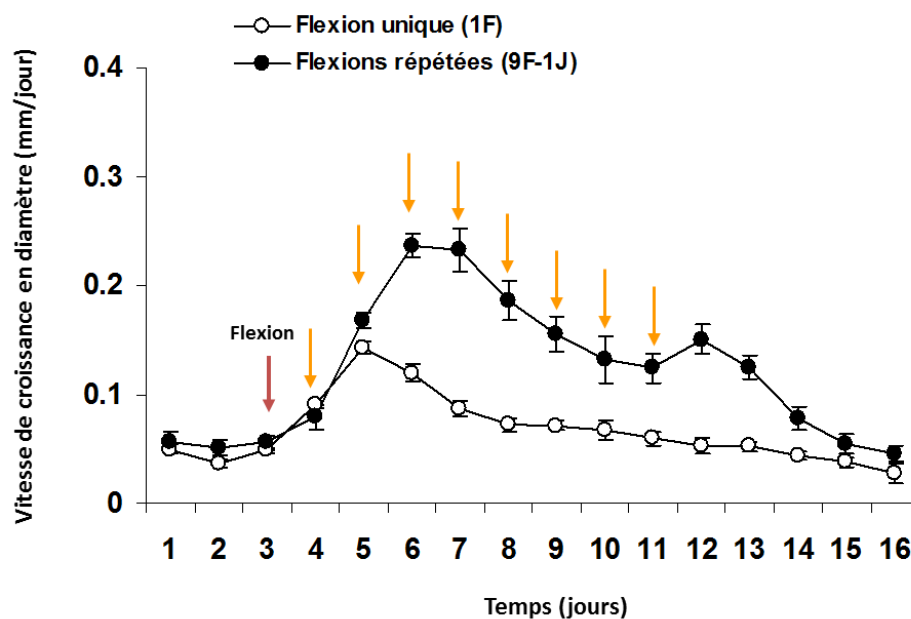


Figure 5 – Comparaison entre l'effet d'une flexion unique et l'effet de flexions répétées sur la croissance journalière en diamètre de tiges de peupliers (Martin *et al.*, 2010)

Les valeurs de croissance journalière en diamètre ont été obtenues après 1 ou 9 flexions transitoires séparées de 24h. Les flèches indiquent les jours durant lesquels la flexion de la tige a été appliquée. Les cercles ouverts et fermés sont les moyennes de 10 ou 6 enregistrements indépendants, respectivement après une seule (courbe avec cercles blancs, 1F) ou plusieurs flexions répétées quotidiennement (courbe avec cercles noirs, 9F-1J).

d'avoir un meilleur ancrage au sol. Dans ce cas comment expliquer que certains arbres atteignent plusieurs dizaines de mètres de haut sachant que dans la nature la fréquence moyenne d'une vibration de la tige d'une plante soumise au vent est de 1 à 5 Hertz (60 à 300 flexions par minute) et que l'alternance entre épisodes venteux et jours sans vent est en moyenne de l'ordre d'un jour (Stull, 1988). Les plantes semblent ne pas répondre à toutes les sollicitations mécaniques qu'elles perçoivent. Telewski et Pruyn (1998) ont mis en évidence ce phénomène en montrant que la croissance en épaisseur de jeunes ormes (*Ulmus americana*) n'était pas significativement différente entre des plantes fléchies un faible nombre de fois par jour (5 fois par jour) et des plantes fléchies un grand nombre de fois par jour (80 fois par jour) pendant 3 semaines. De plus, Martin *et al.* (2010) ont appuyé ces travaux en montrant que les effets des flexions répétées sur la croissance journalière en diamètre de tiges de peupliers n'étaient pas additifs (**Figure 5**). En effet, l'application de 9 flexions successives séparées de 24h montre que la plante ne répond qu'aux 3 premières flexions, la quatrième flexion n'ayant pas d'impact sur la vitesse de croissance en diamètre des tiges. Ces résultats suggèrent que les végétaux ajustent leur sensibilité à des flexions multiples : c'est ce qu'on appelle l'accommodation ou encore appelé désensibilisation. En d'autres termes, la mécanoperception semble être minutieusement contrôlée et régulée.

On peut émettre comme hypothèse que les produits des gènes de réponse aux sollicitations mécaniques exerceraient un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de la mécanoperception. Ce rétrocontrôle pourrait avoir lieu (i) au niveau de la perception du signal mécanique en diminuant soit la quantité, soit la sensibilité des mécanorécepteurs, (ii) au niveau de la partie transduction du signal et (iii) les gènes de réponse de la mécanoperception pourraient réguler leur propre expression ou celles d'autres gènes mécano-régulés. Tous ces mécanismes pourraient être additifs et se mettre en place lors de la première flexion. Par conséquent, après l'application d'une seconde flexion, les réponses seraient atténuées.

Comme le phénomène d'accommodation est directement lié au phénomène de mécanoperception, pour évaluer ces hypothèses il s'agit tout d'abord de faire le point sur les connaissances actuelles des structures capables de percevoir et de répondre aux sollicitations mécaniques.

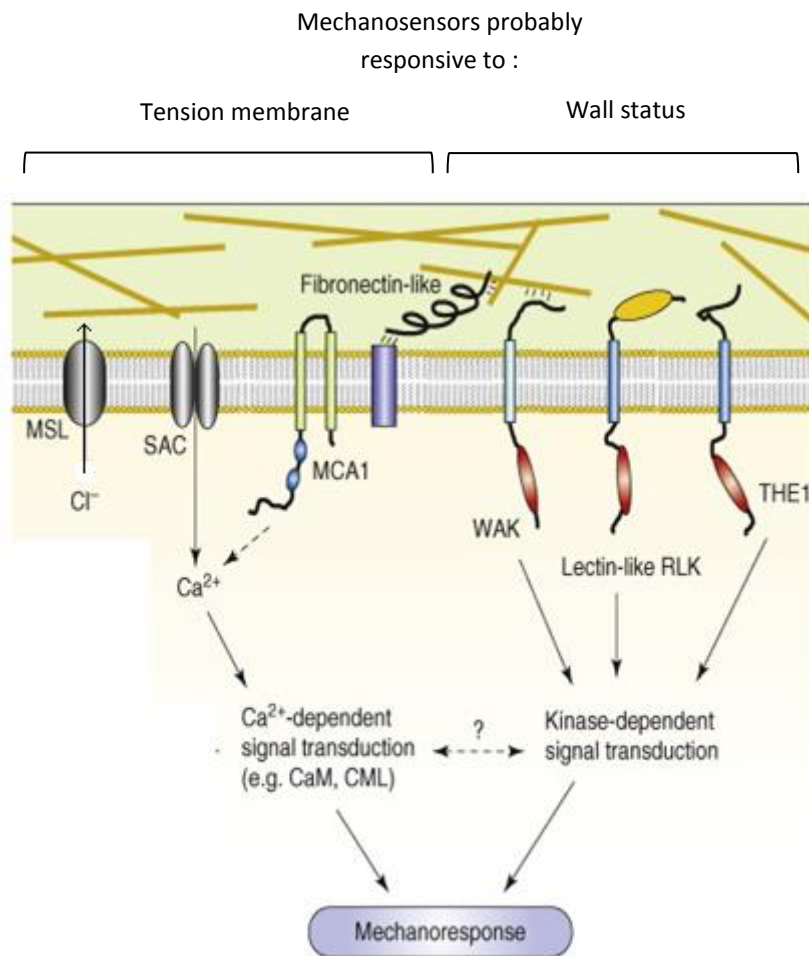


Figure 6 – Modèle de mécanoperception proposé par Monshausen et Gilroy (2009).

Les mécanosenseurs appartiennent probablement à deux catégories : ceux activés par la tension de la membrane comme par exemple la famille des MSL pour MscS-Like (Small-Conductance Mechanosensitive Channels) perméables aux ions Cl⁻, et ceux contrôlant le statut de la paroi et/ou faisant le lien entre la paroi et la membrane plasmique. SAC (Stretch-Activated Ca²⁺) représente un canal calcique mécanosensible identifié par électrophysiologie mais pas encore cloné. Les RLKs (Receptor Like Kinases) comme les WAKs, (Wall-Associated Kinases), les THE1 (THESEUS1) et la lectine like RLK fournissent des modèles du fonctionnement des senseurs de la paroi. Ils élicitent probablement des signaux dépendants des protéines kinases qui peuvent relayer directement l'information mécanique à des gènes mécanosensibles par exemple ou interagir avec une cascade de signalisation Ca²⁺ dépendante qui, aujourd'hui, reste le signal de transduction des événements mécaniques le mieux caractérisé chez les plantes.

MCA, Mechanosensitive Channel in *Arabidopsis* ; CaM, Calmodulin ; CML, CalModulin-Like.

2. ACTEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA MECANOPERCEPTION

2.1. LES ACTEURS DE LA PERCEPTION DU SIGNAL MECANIQUE

Selon Monshausen et Gilroy (2009), il existe deux types de mécanosenseurs : ceux activés par la tension de la membrane et ceux contrôlant le statut de la paroi et/ou faisant le lien entre la paroi et la membrane plasmique (**Figure 6**).

Les canaux mécanosensibles, dont l'ouverture dépend d'une déformation de la membrane plasmique, appartiennent à la première catégorie de mécanosenseurs. Chez les plantes, les premiers canaux mécanosensibles identifiés ont été mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Haswell et Meyerowitz, 2006). Ils sont appelés canaux MSL (Small-Conductance Mechanosensitive Channels Like) car ils sont homologues aux canaux MscS retrouvés chez la bactérie *Escherichia coli*. Ces canaux, suite à une tension de la membrane permettent le passage d'ions Cl^- , transformant ainsi un signal mécanique en un signal électrochimique. On compte 10 MSL chez *A. thaliana* dont les plus connus sont MSL2 et MSL3 retrouvés sur les membranes des chloroplastes (Haswell et Meyerowitz, 2006). MSL9 et MSL10 sont localisés sur la membrane plasmique des cellules racinaires (Haswell *et al.*, 2008). Chez le peuplier, une analyse bioinformatique de la base de données de *Populus trichocarpa* a permis d'isoler 12 MSL. Parmi ces gènes, *MSL1*, *MSL2b*, *MSL4* et *MSL9* ont un profil intéressant car ils s'expriment dans la tige et pourraient être impliqués dans la réponse à la flexion. Récemment, des canaux calciques mécanosensibles d'autres types ont été mis en évidence sur les racines d'*A. thaliana* : il s'agit de MCA1 et MCA2 (Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010), protéine membranaire laissant passer les ions calcium à travers les cellules. Chez le peuplier, un seul MCA dont l'expression n'est pas stimulée lors d'une flexion de la tige a été identifié.

Chez les plantes, les études actuelles suggèrent l'existence d'un continuum CPMCW (Cytosqueleton – Plasma Membrane – Cell Wall) où des protéines assureraient un lien physique entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi végétale (Jaffe *et al.*, 2002). La nature exacte de ces protéines fait encore débat. Ainsi, Baluska *et al.* en 2003 proposent plusieurs candidats de la liaison entre le cytosquelette et la paroi : les WAKs (Wall-Associated Kinases), les AGPs (ArabinoGalactan Proteins), les pectines, les celluloses synthases, les formines, les myosines de classe VIII spécifiques aux plantes, les phospholipases D et les callose synthases (**Figure 6**). A ce jour, aucun lien n'a été fait entre l'un de ces mécanosenseurs et la réponse des plantes au vent.

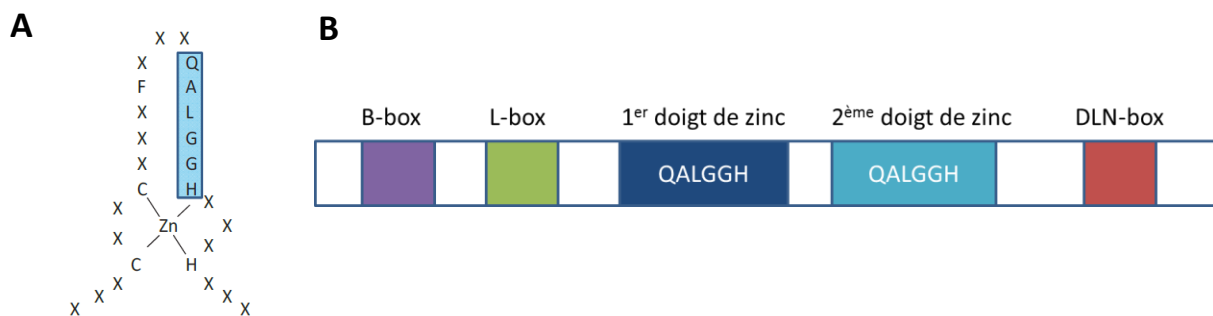


Figure 7 – Structure de la protéine PtaZFP2

(A) Représentation schématique de la structure d'un doigt de zinc de type C2H2 chez les plantes (la séquence conservée QALGGH est surlignée en bleu). (B) Représentation schématique des principaux domaines de la protéine PtaZFP2.

2.2. LES ACTEURS PRECOCES DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL

Le calcium joue un rôle important suite à une sollicitation mécanique, il s'agit du messenger secondaire le mieux caractérisé jusqu'à présent. En effet, une augmentation intracellulaire rapide et transitoire de calcium cytosolique a été observée chez des plants d'*A. thaliana* exposés au vent (Legue *et al.*, 1997) et suite au toucher et à la courbure au niveau des racines (Monshausen *et al.*, 2009).

L'expression de nombreux gènes est modifiée suite à un stress mécanique dont certains gènes de la famille des *TOUCH* (*TCH1* à 4 ; Braam et Davis 1990). Les gènes *TCH1* à 3 codent des calmodulines ou calmodulin-like (CML), protéines impliquées dans la fixation du calcium. Le gène *TCH4* code une XET (Xyloglucane EndoTransglycosylase), enzyme capable de modifier la structure des xyloglucanes, composants de la paroi des cellules végétales, indiquant un impact des sollicitations mécaniques dans la modification des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire (Xu *et al.*, 1995). Les protéines kinases semblent également jouer un rôle important dans la voie de signalisation de la mécanoperception. Il a été montré que des phosphorylations protéiques étaient impliquées dans l'expression de *TCH3* en réponse au stress mécanique (Wright *et al.*, 2002).

De plus, une analyse globale de type puce à ADN réalisée par Lee *et al* en 2005 sur des plantules d'*A. thaliana* montre que 2.5% des gènes sont modifiés 30 minutes après une sollicitation mécanique, dont des gènes *TCH*, *CML* et les gènes codant des protéines kinases.

Chez le peuplier, les travaux de Martin *et al.* (2010) ont également montré l'implication d'homologues des gènes *TCH2*, *TCH4* et des *CML* tels que *CML42* dans les phénomènes de mécanoperception et d'accommodation. Chez toutes ces espèces, le lien entre ces acteurs moléculaires et la mécanoperception reste toutefois à établir.

2.3. GENES CANDIDATS IMPLIQUES DANS L'ACCOMMODATION

PtaZFP2

Le gène *PtaZFP2*, pour *Populus tremula x alba* Zinc Finger Protein 2, code un facteur de transcription de la famille des protéines à doigts de zinc. Parmi les différents types de protéines à doigts de zinc, *PtaZFP2* fait partie des C2H2-ZFP (2 résidus Cystéine et 2 résidus Histidine se liant à l'atome de zinc) (**Figure 7-A**) qui constitue un des groupes de facteur de transcription le plus abondant et le plus étudié chez les espèces Eucaryotes (Wolfe *et al.*, 2000). Ces protéines présentent, pour la plupart, un motif QALGGH très conservé au niveau de leurs doigts de zinc, où chaque acide aminé qui le compose est essentiel dans l'interaction de la protéine avec son ADN cible (**Figure 7-B**). Elles ont été reconnues comme ayant un rôle dans

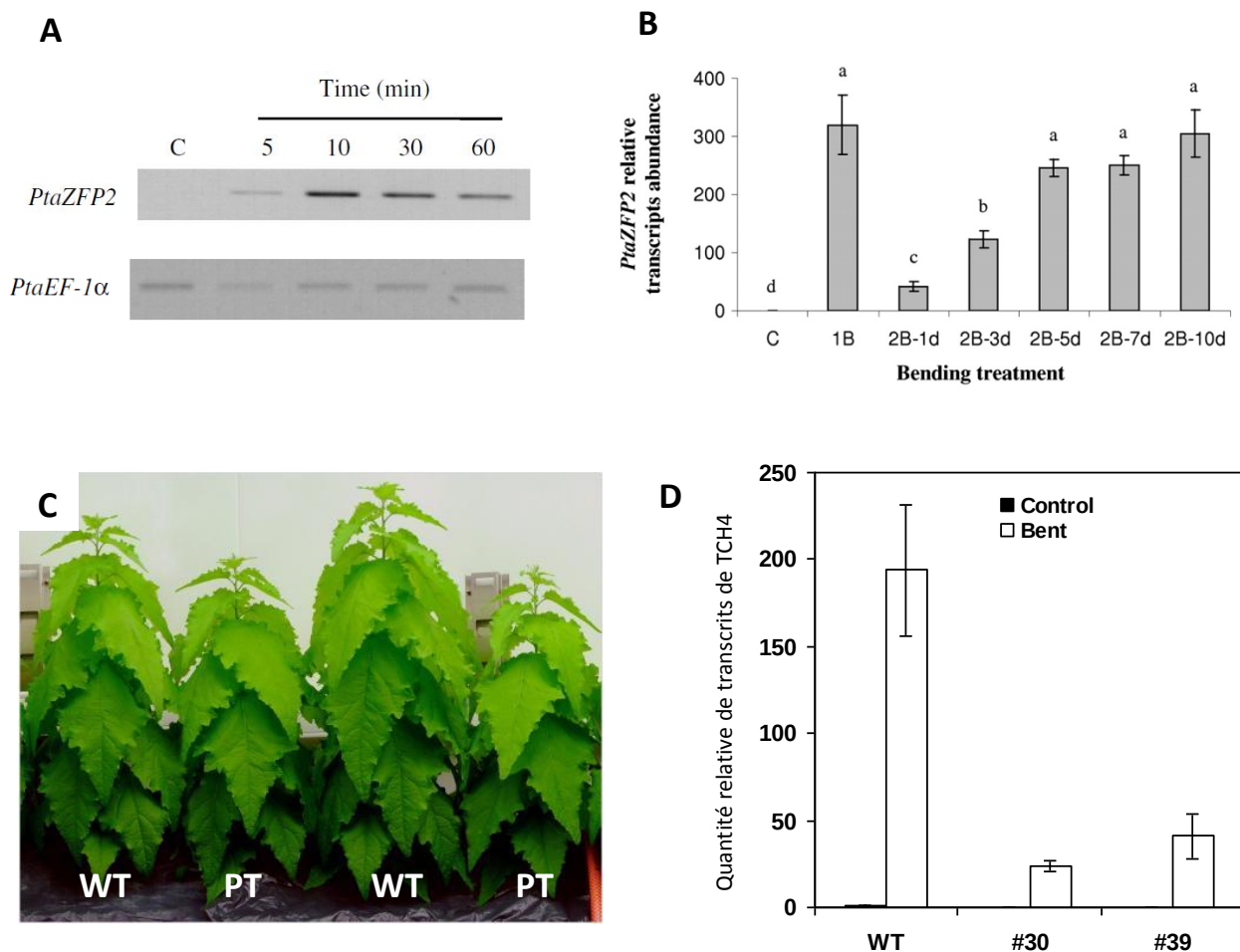


Figure 8 –Rôle de la protéine PtaZFP2 dans la mécanoperception et dans le phénomène d'accommodation

(A) Accumulation au cours du temps de transcrits de *PtaZFP2* après une flexion de la tige (Martin *et al.*, 2009). Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges de plantes contrôles non fléchies (C) et fléchies une fois puis prélevés à différents temps (5, 10, 30 et 60 minutes après la flexion). L'abondance de transcrits de *PtaZFP2* a été analysée par RT-PCR utilisant des amorces spécifiques. L'abondance de transcrits de *EF1α* est utilisé comme contrôle. **(B)** Effets de deux flexions de tiges de peupliers, séparées de 1 à 10 jours, sur l'expression du gène *PtaZFP2* (Martin *et al.*, 2010). Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges contrôles non fléchies (C), fléchies une seule fois (1B) ou fléchies deux fois (2B). Les deux flexions ont été séparées de 1 (1d), 3 (3d), 5 (5d), 7 (7d) ou 10 jours (10d). Pour chaque condition, le prélèvement de la tige a eu lieu 30 minutes après la dernière flexion. L'abondance relative de transcrits de *PtaZFP2* a été déterminée par PCR en temps réel. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la quantité relative des transcrits pour chaque traitement pour 4 répétitions indépendantes de cette expérience. Les valeurs notées par des lettres différentes sont significativement différentes (test de Newman et Keuls, $P < 0.05$). **(C)** Comparaison entre les phénotypes de peupliers sauvages (WT) et de peupliers transgéniques sur-exprimant le gène *ZFP2* (PT) (Martin *et al.*, non publié). **(D)** Abondance relative de transcrits de *TCH4* chez des plantes sauvages (WT) et transgéniques (#30 et #39) fléchies une fois (Bent) ou non fléchies (Control) (Martin *et al.*, non publié).

le développement, l'organogenèse et dans les voies de défense et de réponse des plantes aux stress abiotiques tels que le froid, la blessure, la gravité, la flexion et le stress salin (Ciftci-Yilmaz *et al.*, 2007). Même s'il n'est pas spécifique d'un seul stress, *PtaZFP2* a été montré comme étant un marqueur moléculaire précoce de la mécanoperception chez le peuplier. En effet, en réponse à un stress mécanique de type flexion, une accumulation importante, rapide et transitoire de transcrits de *PtaZFP2* est observée dès 5 minutes après une flexion de la tige (**Figure 8-A**). Les transcrits s'accumulent ensuite fortement jusqu'à 30 minutes après la flexion puis reviennent à un niveau de base dans les 2 heures (Martin *et al.*, 2009). *PtaZFP2* a également été montré comme étant un bon marqueur moléculaire du phénomène d'accommodation. Comme pour les deux autres gènes mécano-régulés (*TCH4* et *CML42*), le niveau de transcrits de *PtaZFP2* est plus faible suite à une deuxième flexion appliquée 24 heures après la première que lors d'une flexion unique (Martin *et al.*, 2010) (**Figure 8-B**). De plus, les mêmes auteurs ont montré qu'il faut entre 3 à 5 jours entre deux flexions pour retrouver une accumulation de transcrits semblable à celle d'une flexion unique. Ces résultats confirment au niveau moléculaire que la plante est temporairement désensibilisée après l'application d'une première flexion.

Pour comprendre le rôle de *PtaZFP2* au cours de la réponse à une flexion, des peupliers transgéniques surexprimant *PtaZFP2* ont été produits (Ludovic Martin, 2009). Ces peupliers présentent une diminution de la croissance en hauteur des plantes (**Figure 8-C**) (Martin *et al.*, non publié). Au niveau moléculaire, la surexpression de *PtaZFP2* entraîne une diminution de l'expression des gènes *TCH* après l'application d'une flexion de la tige, comme si ces plantes étaient désensibilisées (**Figure 8-D**). Plus surprenant, les plantes transgéniques sont également altérées dans l'expression de *PtaZFP2* (endogène) lors d'un stress mécanique. Donc, *PtaZFP2* semble exercer un rétrocontrôle négatif sur sa propre expression lorsqu'il est surexprimé et lors d'une flexion de la tige (non montré). Ces données suggèrent une activité de répression de la protéine. Or, la protéine *PtaZFP2* possède une séquence consensus (L/F)DLN(L/F)XP nommé la DLN-box, impliquée dans des interactions protéine-protéine (**Figure 7-B**). Ce motif a également été retrouvé dans les facteurs de transcriptions AP2/ERF (Apetala2/Ethylene-Responsive element binding Factor) où il est défini comme le domaine EAR pour ERF Amphiphilic Repression (Ohta *et al.*, 2001; Kazan, 2006 ; Kagale *et al.*, 2010). Les protéines contenant ce motif EAR sont décrites comme étant des répresseurs transcriptionnels et joueraient un rôle clé en régulant négativement l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus développementaux et physiologiques (Kagale *et al.*, 2010). De plus, des études récentes ont révélé que les mécanismes liés à cette répression pourraient être contrôlés

Tableau 1 – Cinétique d'expression de quelques gènes différentiellement exprimés dans l'analyse transcriptomique suite à une flexion de la tige de peuplier et présentant un profil particulier

7 gènes ont été sélectionnés parmi 70 gènes présentant deux profils d'expression particuliers. Un profil où les gènes sont réprimés (-) 30 minutes et induits (+) 72h après une flexion de la tige : *MAP70*, *LOS4*, *LOS2* et *MYB69*. Un profil où les gènes sont induits 30 minutes et réprimés 72h après une flexion : *PtaRHE1*, *PCR2* et *ANK*. Les cases grisées représentent des points de la cinétique où l'expression n'est pas significativement différente du témoin non fléchi.

Prélèvement après une flexion	30'	2h	24h	72h
Expression gènes puce ADN	-	-		+
<i>MAP70</i>	-0,57	-0,54		0,59
<i>LOS4</i>	-0,54			0,58
<i>LOS2</i>	-0,48			0,49
<i>MYB69</i>	-0,71			0,50
Expression gènes puce ADN	+	+		-
<i>PtaRHE1</i>	3,14	1,11		-0,50
<i>PCR2</i>	2,36	1,65		-0,51
<i>ANK</i>	1,87			-0,45

par des phénomènes épigénétiques (Hill et Perry, 2008). En effet, des travaux d'interaction protéine-protéine par double hybride en levures ont montré que la protéine TOPLESS, en lien avec des Histones Dé-ACétylases (HDAC), interagit avec plusieurs protéines possédant le motif EAR, dont certaines protéines à doigts de zinc (Causier *et al.*, 2012). La protéine PtaZFP2 pourrait donc réguler la voie de signalisation du signal mécanique via ce type de processus épigénétique.

D'autres motifs sont retrouvés dans la séquence protéique de PtaZFP2 (**Figure 7-B**). On peut évoquer la B-box située du côté N-terminal et la L-box riche en Leucine située généralement entre la B-box et le premier doigt de zinc (Sakamoto *et al.*, 2000). Alors que la B-Box semble être un signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal), la L-box semble jouer un rôle dans l'interaction protéine-protéine ou dans le maintien de la structure repliée (Sakamoto *et al.*, 2000).

Analyse transcriptomique suite à une flexion de la tige du peuplier

Pour mieux comprendre les étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier et en particulier sa régulation au cours de l'accommodation, une approche transcriptomique par puce à ADN comprenant plusieurs points de cinétique suite à une flexion (30 min, 2h, 24h et 72h) ou deux flexions (séparées de 24h avec un prélèvement 30 min après la dernière flexion) de tiges de peupliers a été menée au sein de l'équipe. Ces expériences ont permis de mettre en évidence 3106 gènes dont l'expression est régulée suite à une flexion et révèlent que la régulation de 85% de ces gènes est modifiée lors d'une seconde flexion. Parmi ces 3106 gènes, quelques-uns ont un profil particulier en lien avec la cinétique de désensibilisation. Certains gènes sont réprimés 30 minutes et induits 72h après une flexion de la tige. Ils pourraient alors être impliqués dans la mise en place des mécanismes de sensibilisation de la plante. D'autres gènes sont induits à 30 minutes et réprimés à 72h, et pourraient ainsi correspondre à des répresseurs de la voie de signalisation du signal mécanique. Le point 72h correspond au moment où la plante retrouve sa sensibilité mais aussi où elle répond à la flexion en augmentant sa croissance radiale donc une partie des gènes pourrait être impliquée dans ce deuxième phénomène.

Nous avons choisi 7 gènes qui présentent ces profils pour analyser leur expression lors de l'accommodation du peuplier (**Tableau 1**). Ces gènes ont été choisis pour leurs fonctions putatives en lien ou non avec la voie de signalisation décrite précédemment. Ainsi, parmi les gènes induits à 30 minutes, nous avons choisi *PCR2* (*Plant Cadmium Resistance 2*) codant un transporteur de zinc et de calcium chez *A. thaliana* (Song *et al.*, 2010). Le gène *ANK*, dont la

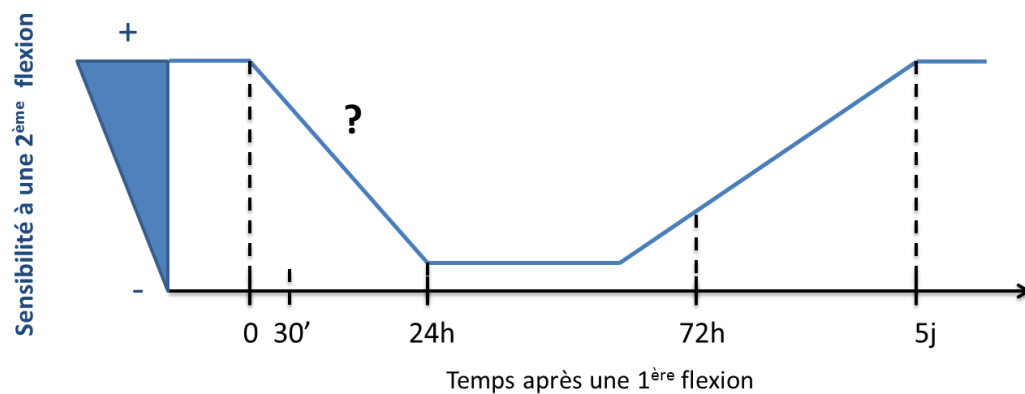


Figure 9 – Cinétique simplifiée de la sensibilité à la flexion du peuplier

Représentation schématique de la cinétique de la sensibilité de la tige du peuplier suite à l'application d'une seconde flexion séparée de 30 minutes (30'), 24 heures (24h), 72 heures (72h) et 5 jours (5j) de la première. Cette cinétique est déduite à partir des profils d'expression de gènes mécano-régulés. La perte de sensibilité entre 0 et 24h reste à définir.

fonction n'est pas connue, code une protéine membranaire contenant un motif ankyrin impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines, dont des protéines du cytosquelette (Sedgwick et Smerdon, 1999). Ce motif est présent dans de nombreuses protéines telles que des protéines à doigts de zinc, des kinases ou encore des protéines RING (Really Interesting New Gene ; Becerra *et al.*, 2004). Enfin, le gène *PtaRHE1* codant une E3 ligase de type RING chez le peuplier (Bopopi *et al.*, 2010) fait partie des gènes les plus fortement régulés lors d'une flexion. Cette protéine membranaire (Serrano *et al.*, 2006) joue un rôle dans la dégradation d'autres protéines via le complexe ubiquitine-protéasome. Parmi les gènes induits à 72h, *LOS4* (*Low expression of OSmotically responsive gene 4*) code une hélicase, protéine impliquée dans la tolérance au froid (Gong *et al.*, 2002). *LOS2* code une énalase, protéine bi-fonctionnelle, impliquée dans la réponse au froid et capable de réprimer l'expression de gènes de type C2H2 (Lee *et al.*, 2002). Enfin, en témoins potentiels de la mise en place des mécanismes de croissance radiale, nous avons choisi des gènes codant des protéines en lien avec la mise en place de la paroi secondaire chez *A. thaliana* : *MAP70* (*Microtubule Associated-Protein*), code une protéine associée aux microtubules (Pesquet *et al.*, 2010) et *MYB69* (Myb proto-oncogene protein 69) code un facteur de transcription de la famille des MYB (Zhong *et al.*, 2008).

3. OBJECTIF DE L'ETUDE

Les travaux menés sur l'accommodation du peuplier suite à une sollicitation mécanique de type vent ont permis de mettre au point une cinétique de désensibilisation (**Figure 9**). Nous savons aujourd'hui qu'en séparant deux flexions de 24h, la plante est désensibilisée (i.e. qu'elle ne répond pas à la deuxième flexion avec la même intensité que lors de la première flexion) et un retour de cette sensibilité est observé 3 à 5 jours après la dernière flexion. Cependant, on ne sait pas si cette désensibilisation a lieu pour des temps plus précoces (i.e. inférieur à 24h). De plus, toutes les études menées jusqu'à présent ont été réalisées sur tige entière, ne prenant donc pas en compte les modifications locales des paramètres physiques déclenchées par une flexion. Une partie de mon travail a donc été de mieux caractériser temporellement et spatialement les réponses moléculaires précoces suite à une ou deux flexions de la tige de peuplier en étudiant l'expression de certains gènes déjà identifiés comme étant mécano-régulés sur des temps plus courts et en séparant différentes parties de la tige. Cette étude a également été menée pour de nouveaux gènes candidats impliqués dans la mécanoperception et identifiés à l'aide d'une approche transcriptomique. Dans un second temps, pour mieux comprendre le rôle de *PtaZFP2* dans la désensibilisation, des partenaires protéiques de *PtaZFP2* ont été recherchés par double hybride en levure.

PARTIE II

TRAVAIL EXPERIMENTAL

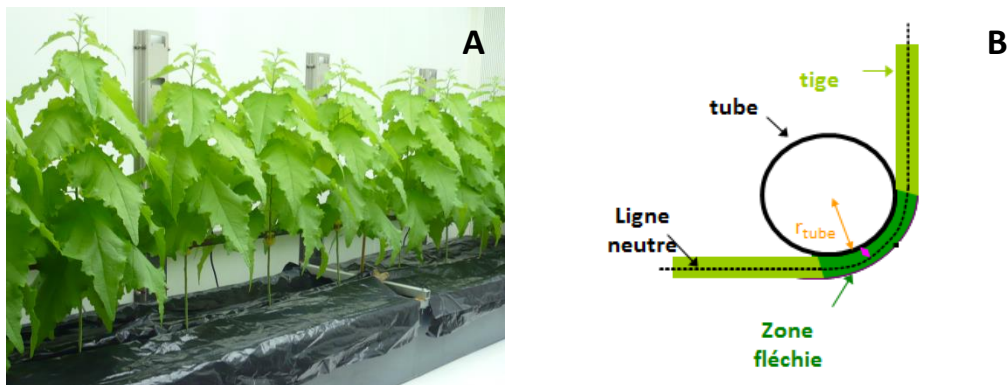


Figure 10 – Mise en place d'une sollicitation mécanique chez des plants de peuplier cultivés en environnement contrôlé

(A) Plants de peupliers de 3 mois en culture hydroponique, positionnés verticalement à l'aide d'un support métallique. (B) Représentation schématisée du dispositif permettant de fléchir les tiges de peupliers. La tige est maintenue contre le tube en plastique pendant quelques secondes puis retourne à sa position d'origine jusqu'au prélèvement de la zone fléchie (en vert foncé). La ligne neutre représente la partie de la tige qui subit le moins de déformation.

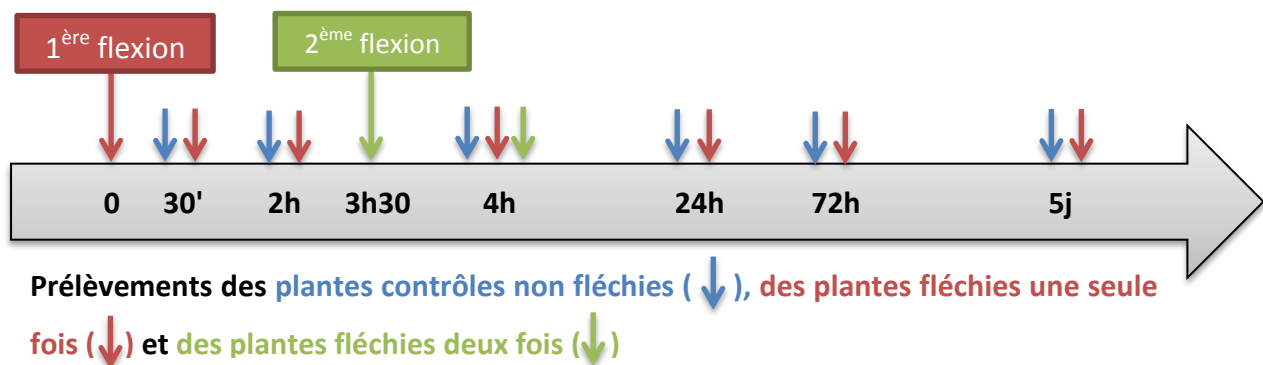


Figure 11 – Cinétique de prélèvements des plants de peupliers utilisés dans la mise en évidence du phénomène d'accommodation

La zone fléchie de tiges de peupliers a été prélevée à différents temps et selon trois types de traitements différents. Des tiges de plantes contrôles n'ont pas été fléchies puis prélevées 30 min, 2h, 4h, 24h, 72h et 5 jours après le temps 0 (flèches bleues). Des tiges ont été fléchies une fois et prélevées 30 min, 2h, 4h, 24h, 72h et 5 jours après la flexion (flèches rouges). Des tiges ont été fléchies une deuxième fois 3h30 après la première flexion et prélevées 30 min après la deuxième flexion (flèches vertes).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. ANALYSE SPATIO-TEMPORELLE DE L'ACCOMMODATION

Plants de peuplier et conditions de culture

Les peupliers hybrides *Populus tremula* et *Populus alba* (clone INRA 717-1B4) sont obtenus par micropropagation *in vitro* sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Après 4 à 6 semaines de multiplication végétative, les plants sont acclimatés en environnement contrôlé (16h de jour ($40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 24°C et 8h de nuit à 20°C, dans une humidité relative de 70±10%), dans une solution nutritive adaptée (**Annexe 1**), pendant encore 4 semaines. Les traitements et les prélèvements sont ainsi réalisés sur des jeunes peupliers de 2 à 3 mois dont les tiges font en moyenne 60 cm de hauteur pour 5,1 mm de diamètre (**Figure 10-A**).

Traitements mécaniques et prélèvements

Une flexion est appliquée à la partie basale de la tige (10 cm au-dessus du collet) à l'aide d'un tube en plastique dont on connaît le diamètre. Comme décrit dans la **Figure 10-B**, le tube est positionné contre la tige de peuplier puis cette dernière est fléchie manuellement pendant quelques secondes. Le fait de connaître le diamètre de la tige et du tube permet de quantifier le niveau de sollicitations mécaniques appliqué à chaque plante, à l'aide du calcul de la "somme des déformations" (Coutand, Martin *et al.*, 2009). Les peupliers étant morphologiquement très homogènes, il a été appliqué une déformation maximale de 2% à chacune des plantes. La zone fléchie de la tige (4 cm) a été prélevée à différents temps (30 min, 2h, 4h, 24h, 72h et 5 jours) après une seule flexion. Afin de mettre en évidence le phénomène d'accommodation, d'autres plantes ont subi une deuxième flexion réalisée 3h30 après la première et les prélèvements sont effectués 30 minutes après la seconde flexion. Des prélèvements de tiges sur des plantes témoins non fléchies ont également été réalisés d'après les mêmes cinétiques (**Figure 11**).

La tige a été séparée en quatre parties. Elle est divisée en deux, pour séparer la face comprimée de la face tendue. Puis l'écorce et le bois de chaque face sont détachés l'une de l'autre. Enfin, chaque échantillon est congelé à l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Dans le même temps, la face comprimée et la face tendue de la tige de peuplier sont séparées afin de réaliser une immunolocalisation *in situ*.

Immunolocalisation in situ

Le matériel végétal est inclus dans la paraffine selon le protocole décrit par Brunel *et al.* (2002). Les coupes histologiques d'une épaisseur de 10 μm sont obtenues à l'aide d'un microtome Microm HM 340^E (Thermo Scientific). Elles sont déposées sur des lames SuperFrost® Plus (Fisher Scientific, Elancourt, France) puis sont déparaffinées et déshydratées (Brunel *et al.*,

Tableau 2 – Séquences et caractéristiques des amorces nucléotidiques utilisées pour les amplifications par PCR quantitative

Les amorces sont dessinées en prenant uniquement la partie codante du gène grâce au site <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> de manière à optimiser leur spécificité vis-à-vis du gène considéré et à diminuer le risque de formation de dimères ou de structures secondaires.

Gènes	Amorces	Séquences (5' vers 3')	Nombre de pb	Tm en °C
<i>EF1- α</i>	Sens	GCAGATGATTGCGTTTGC	19	60
	Anti-sens	TGTAACCAACCTTCTTCAGG	20	
<i>UBC</i>	Sens	CCCGGCTCTAACCATATCCA	20	60
	Anti-sens	GGGTCCAGCTTCTTGCACTC	20	
<i>PtaZFP2</i>	Sens	CGTGCGAGTCACAAGAAACC	20	60
	Anti-sens	CACAGAACTCTCTTGCTGCT	20	
<i>CML42</i>	Sens	AGATCAGGCTAGGATGAGAC	20	60
	Anti-sens	CCCAACTTCCTCAACACG	18	
<i>TCH4</i>	Sens	CAAGGCAGGAGAGGTTG	17	60
	Anti-sens	ACAGGTAATGCAAGGACG	18	
<i>MAP70</i>	Sens	GAGGGAGGTACCATTCTCTCG	21	58
	Anti-sens	TAGCAGCCGCTTCTCTCTTC	20	
<i>LOS4</i>	Sens	CTTGACAGGATTGGTAGGG	20	58
	Anti-sens	CCAGCTTCCTTGAGAGCAAC	20	
<i>LOS2</i>	Sens	GCGTTTCTCTGACCTTGGAC	20	58
	Anti-sens	TCACCACTCAAGGGCTTCT	20	
<i>MYB69</i>	Sens	GAGACCACTTGCTTTGAATGAA	22	60
	Anti-sens	TGCTTCATAACCATCACCA	20	
<i>PtaRHE1</i>	Sens	CCCGTTCCAGAAGGTTCAAA	20	58
	Anti-sens	AAGCGGGTTCGGGTCTGT	18	
<i>PCR2</i>	Sens	GGTCCAAATTAAGGACGCAAT	21	60
	Anti-sens	GTCCCTGCAAACCTCTTTGC	20	
<i>ANK</i>	Sens	GAAGCTGCTTGACCAAAAGG	20	60
	Anti-sens	ACTTGGCTTCATGGATTGG	20	

Tableau 3 – Composition du mélange réactionnel utilisé pour la qPCR

Le Mix SybrGreen est issu du kit MESA Green qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Assay with fluorescein (Eurogentec). Les amorces utilisées sont celles décrites dans le **Tableau 2**.

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
Eau stérile	4.5
Mix SybrGreen (2X)	7.5
Amorces Sens et Anti-sens (10 µM)	0.5 chacune
ADNc dilués au 1/40	2

2002). L'immunolocalisation *in situ* est réalisée suivant le protocole décrit par Dusotoit-Coucaud *et al.* (2010). L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre un peptide synthétique spécifique de la protéine membranaire MSL1 produits par Covalab. L'anticorps secondaire est couplé à la phosphatase alcaline, c'est un anticorps anti-lapin synthétisé chez la chèvre (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). La révélation est réalisée grâce au kit "Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate" (Bio-Rad, Marnes-laCoquette, France). Les coupes ont été montées entre lames et lamelles en utilisant un milieu de montage Eukitt® (Euromedex, Mündelsheim, France). Les lames ont été observées et photographiées grâce à un microscope Axioplan 2 (Zeiss) couplé à une caméra digitale (AxioCam HR, Zeiss) et au logiciel AxioVisio Rel 4.8 (Zeiss).

Extraction des ARN totaux et Rétro-transcription en ADN complémentaire (ADNc)

Afin d'extraire les ARN totaux de tiges de peupliers, chaque zone de la tige a été broyée séparément dans de l'azote liquide. L'extraction a été réalisée à partir de 150 mg en utilisant du tampon d'extraction CTAB décrit par Chang *et al.* (1993). Afin de s'assurer de la réussite et de la pureté de l'extraction d'ARN, une mesure au Nanodrop de l'absorption de l'échantillon à deux longueurs d'onde (260 et 280 nm) et une analyse sur un gel agarose à 2% TAE 0.5 X sont réalisées. Une reverse transcription est effectuée à partir de 1 µg d'ARN totaux afin d'obtenir de l'ADNc simple brin grâce à l'action de la transcriptase inverse du kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Enfin, les échantillons d'ADNc sont dilués au 1/40 et stockés à -20°C.

PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est une technique destinée à quantifier la quantité d'ARN présente dans un échantillon par l'amplification de l'ADNc du transcrit d'un gène d'intérêt en présence d'un agent fluorescent : le SybrGreen. La spécificité de l'amplification est obtenue à l'aide d'un couple d'amorces spécifique du gène d'intérêt (**Tableau 2**). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à la fluorescence du SybrGreen dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons. Une gamme de dilution d'ADNc a été réalisée pour tester l'efficacité des amorces. La mesure des Ct des différents échantillons à un niveau de fluorescence identique permet une quantification relative. Si l'efficacité d'amplification est maximale (=1), une différence de Ct de 1 cycle d'amplification correspond à 2 fois la quantité d'ADN initial. Pour corriger le biais d'extraction et la variation d'efficacité de la transcription inverse qui peuvent faire varier la quantité d'ADNc initial, on rapporte la quantité pour chaque gène à celle de gènes de référence dont l'expression est censée

Tableau 4 – Programme d'amplification pour le thermocycleur de la qPCR

Phase 1 - dénaturation initiale de l'ADN	3' à 95°C
Phase 2 (x40) (1) : dénaturation thermique de l'ADN (2) : hybridation des amorces (3) : élongation	(1) 10'' à 95°C (2) 10'' à 58°C ou 60°C (3) 15'' à 72°C
Phase 3 – Dissociation produits PCR	1' à 95°C
Phase 4 (x71) – Etablissement de la courbe de fusion	10'' à 60°C + 0.5°C par cycle jusqu'à atteindre 90°C

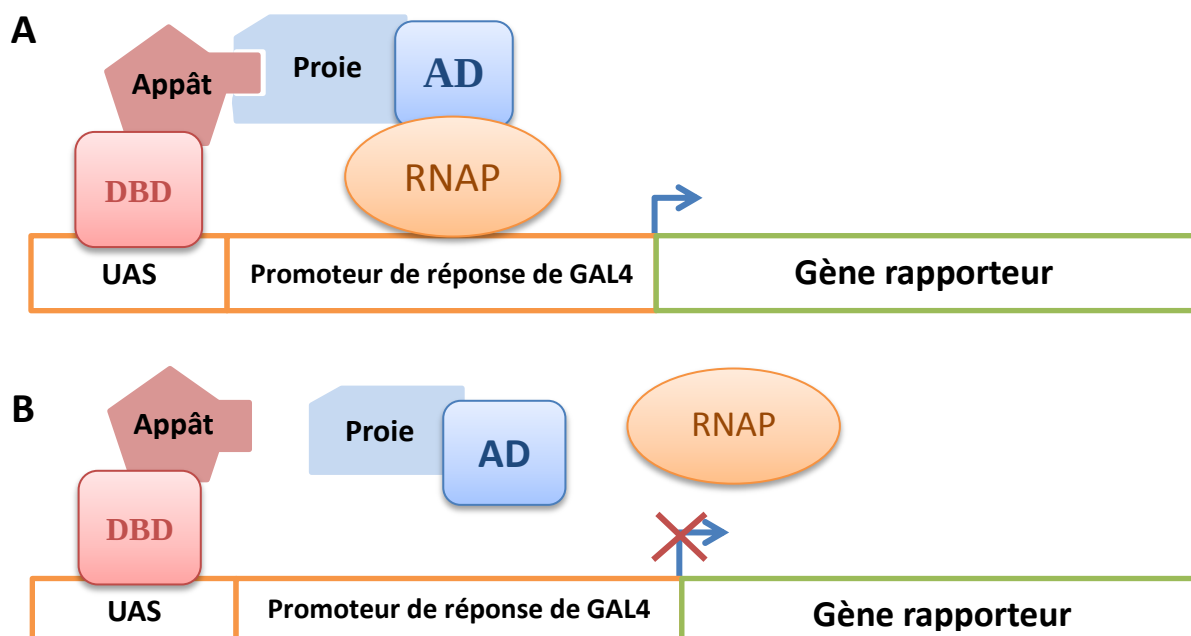


Figure 12 – Principe du double hybride en levures

Une protéine appât est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DBD) du facteur de transcription (FT) GAL4 et une protéine proie est fusionnée au domaine d'activation (AD) du FT GAL4. La souche de levure employée contient des gènes rapporteurs en aval d'un promoteur contenant une région régulatrice (UAS) fixatrice du domaine DBD du FT de GAL4. Si la protéine appât et la protéine proie interagissent spontanément l'une avec l'autre (**A**), il y aura rapprochement du domaine AD de GAL4 au niveau du promoteur de réponse de GAL4 et donc reconstitution d'un facteur transcriptionnel actif. Ce qui aura pour conséquence de recruter la machinerie transcriptionnelle de la levure et d'activer les gènes rapporteurs. Les gènes rapporteurs permettent le criblage rapide des levures dans lesquelles s'est déroulée l'interaction entre les partenaires protéiques. Dans le cas où les deux protéines n'interagissent pas entre elles (**B**), il n'y a pas de transcription des gènes rapporteurs mais on peut tout de même observer un phénotype dans le cas de faux positifs.

DBD, DNA Binding Domain ; AD, Activating Domain ; UAS, Upstream Activation Sequence ; RNAP, ARN Polymérase

être stable dans les conditions étudiées. Dans ce but, ont été utilisés les deux gènes de normalisations suivants : EF1- α et Ubiquitine. L'expression relative de chaque gène (QR) est ainsi calculée à l'aide de la formule suivante :

$$QR = \frac{(1 + E_{cible})^{(Ct_{témoin} - Ct_{échantillon})_{cible}}}{(1 + E_{réf})^{(Ct_{témoin} - Ct_{échantillon})_{réf}}}$$

La réaction PCR et le programme d'amplification du thermocycleur sont présentés dans les **Tableaux 3 et 4**, respectivement.

1.2. RECHERCHE DE PARTENAIRES PROTÉIQUES DE PtaZFP2 PAR DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES

Principe du double hybride en levures

Le système double hybride en levures est une technique de clonage *in vivo* permettant de détecter une interaction physique entre deux partenaires protéiques. Cette technique est basée sur la capacité des domaines de liaison à l'ADN (DBD) et d'activation de la transcription (AD) du facteur de transcription GAL4 à fonctionner de manière indépendante. Dans le système du double hybride, ces deux domaines sont séparés et chacun est fusionné à des protéines d'intérêt appelées protéines appâts et protéines proies. Ainsi, c'est l'interaction entre ces deux types de protéines qui permettra de reconstituer un facteur de transcription actif. Il y aura alors transcription de gènes rapporteurs et apparition d'un phénotype simple à analyser chez l'hôte du système double hybride (**Figure 12**). La totalité du protocole de double hybride a été réalisée à l'aide du système Matchmaker™ de Clontech. Seuls les points importants et les différences avec le protocole d'origine seront détaillés.

Construction de la banque d'ADNc dans la souche Y187

La banque ADNc a été réalisée à partir d'ARN totaux de tige de peupliers prélevés 30 minutes et 2 heures après une sollicitation mécanique, à l'aide du kit Make Your Own "Mate and Plate" Library System (Clontech). La synthèse d'ADNc a été entreprise à partir d'1 µg d'ARN totaux en prenant 0.5 µg de chaque condition (30 minutes et 2 heures) et de 10 µM d'amorces oligo-dT CDSIII (**Figure 13**). Puis une amplification des ADNc simple brin par PCR longue distance a été effectuée sur 20 cycles, à l'aide du kit Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Enfin, 3 µg d'ADNc double brin ont été purifiés sur colonne CHROMA SPIN™ TE-400 afin de ne sélectionner que les molécules dont la taille est supérieure à 200 pb.

La construction de la banque ADNc est faite dans la souche de levure Y187. Il s'agit d'une souche modifiée de *Saccharomyces cerevisiae*, commercialisée par Clontech. C'est une souche

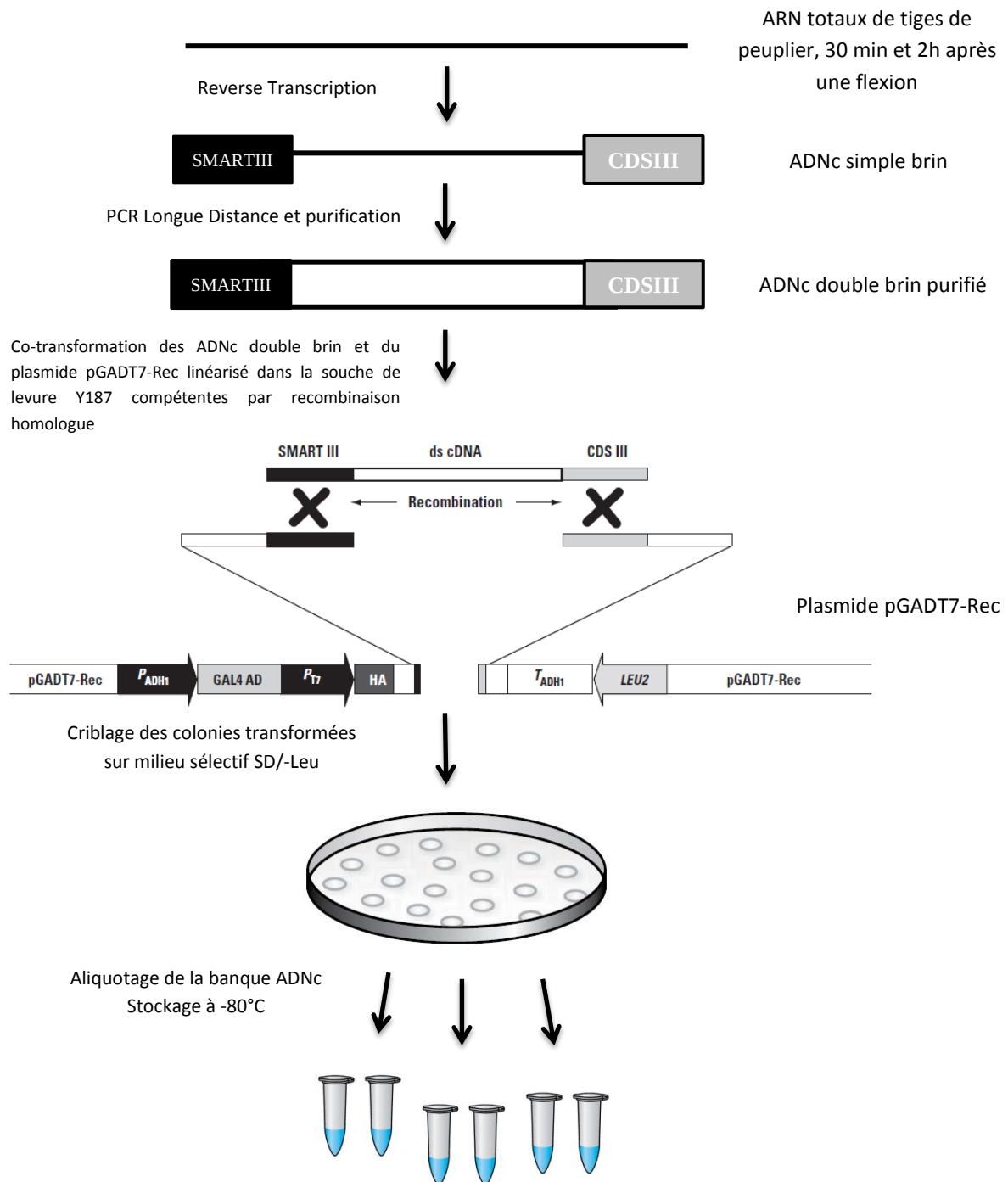


Figure 13 – Schéma simplifié de la construction de la banque ADNc dans la souche de levure Y187 selon le protocole Make Your Own "Mate and Plate" Library System (Clontech)

La construction de banque ADNc dans les cellules de levures Y187 repose sur un clonage par recombinaison *in vivo* directement dans la levure entre les séquences adaptatrices flanquant les ADNc double brin (SMART III et CDS III) et des séquences homologues dans le plasmide pGADT7-Rec (Clontech). Le vecteur pGADT7-Rec contenant le gène codant une enzyme de la biosynthèse de la leucine (LEU2) permettant le criblage des levures transformées sur du milieu sélectif SD/-Leu.

haploïde, de type sexuel MAT α , auxotrophe pour l'adénine, l'histidine, la leucine et le tryptophane et délétées pour les gènes GAL4 et GAL80 (**Annexe 2**).

Les levures Y187 ont été rendues compétentes, puis co-transformées à grande échelle (library-scale) par choc thermique avec 2 μ g d'ADNc double brin purifiés et 3 μ g de plasmide pGADT7-Rec linéarisé (**Annexe 3**) à l'aide du kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech). Cette étape permet l'insertion des ADNc dans le vecteur pGADT7-Rec en aval du domaine AD du facteur de transcription GAL4. Les levures sont ensuite étalées sur du milieu sélectif SD/-Leu (**Annexe 4**) et incubées pendant 3 jours à 30°C afin de ne sélectionner que celles ayant intégré la banque ADNc. Puis un titrage de la banque est déterminé, à partir de cellules de levures diluées au 1/10 et au 1/100, l'aide de la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Volume déposé sur la boîte (ml)}} * \text{facteur de dilution} = \text{cfu/ml}$$

La banque doit contenir au minimum 1 million de clones indépendants. Enfin, la totalité des levures transformées sont collectées dans 400 ml de milieu de culture 1X YPDA (**Annexe 4**) additionné de 75% glycérol, aliquotées et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Construction des appâts dans la souche Y2HGold

Deux appâts ont été créés pour la technique de double hybride, il s'agit de la séquence codante de *PtaZFP2* avec ou sans domaine répresseur DLN. Les appâts sont clonés dans le plasmide pGBKT7 en aval du domaine DBD du facteur de transcription GAL4 (**Annexe 3**), puis transformés dans la souche de levure Y2HGold. Cette dernière est de type sexuel MAT α , elle est haploïde, auxotrophe pour l'adénine, l'histidine, la leucine et le tryptophane et délétées pour les gènes GAL4 et GAL80 (**Annexe 2**). De plus, elle possède 4 gènes rapporteurs, sous le contrôle d'un promoteur contenant le cis-élément de fixation du facteur de transcription GAL4, exprimés seulement lors d'une interaction protéine-protéine. Les gènes rapporteurs sont *AURIC*, *MEL1*, *HIS3* et *ADE2* (**Annexe 5**).

Pour cloner ZFP2 avec ou sans DLN dans le plasmide pGBKT7, une PCR est réalisée à partir de 100 ng de plasmide contenant la séquence codante de ZFP2 à l'aide du kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) et des amorces présentées en **Annexe 6**. Les produits PCR sont purifiés grâce au kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Illustra). Puis la réaction de ligation est effectuée grâce au kit In-Fusion® Ready Vector Cloning (Clontech) en mélangeant 50 ng de produits PCR avec 100 ng de plasmide pGBKT7 précédemment digéré par les enzymes de restrictions BamH1 et EcoR1. Enfin, des bactéries compétentes JM109 sont transformées par choc thermique avec les produits de ligation In-Fusion. La construction

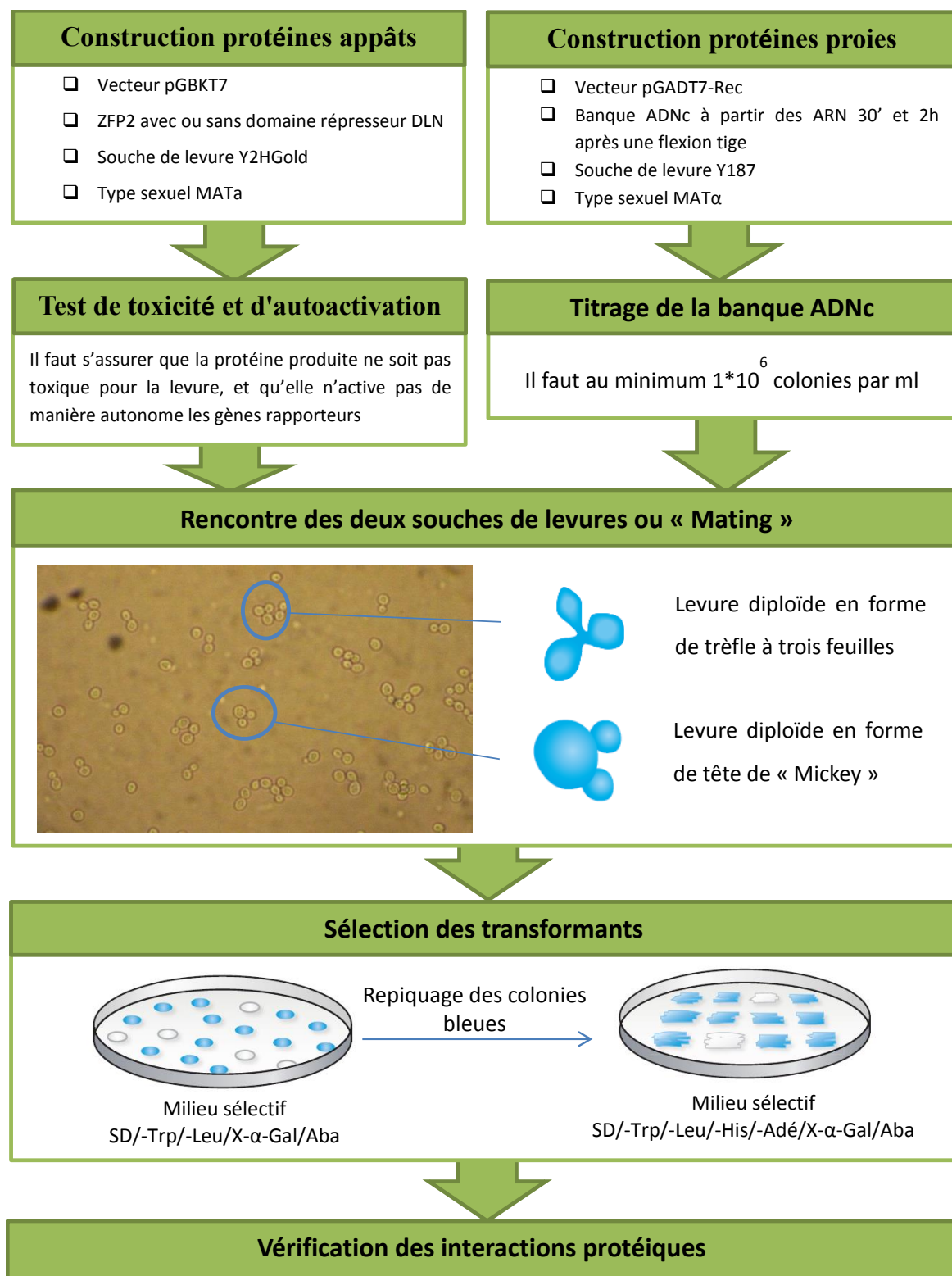


Figure 14 – Démarche expérimentale de la technique de double hybride en levure

pGBKT7-ZFP2 avec ou sans domaine DLN est vérifiée par séquençage avec les amorces utilisées lors de la PCR (**Annexe 6**), et le plasmide recombinant est extrait à l'aide du kit Plasmid Mini (QIAGEN). La souche de levure Y2HGold est rendue compétente et transformée avec 100 ng de la construction pGBKT7-ZFP2 avec ou sans DLN (transformation à petite échelle ou "small-scale") à l'aide du kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech) selon les recommandations des fournisseurs. Les levures transformées sont sélectionnées sur du milieu sélectif SD/-Trp (**Annexe 4**) et incubées pendant 3 jours à 30°C.

Test d'autoactivation et de toxicité des protéines appâts

La technique de double hybride donne de nombreux faux positifs dont l'auto-activation peut être à l'origine. Ce test permet de vérifier si les protéines appâts n'activent pas de manière autonome les gènes rapporteurs en l'absence de protéines proies. Il est réalisé en transformant les levures Y2HGold avec 100 ng du plasmide recombinant pGBKT7 contenant l'insert ZFP2 avec ou sans domaine répresseur qui sont ensuite étalées sur du milieu sélectif SD/-Trp contenant soit de l'Auréobasidine (Aba), soit du X- α -Gal (analogue du X-Gal) (**Annexe 4**). Pour tester si la protéine ZFP2 n'est pas toxique quand elle s'exprime dans une levure, les colonies Y2HGold sont transformées avec 100 ng de la construction plasmidique contenant l'appât puis comparées avec des levures transformées avec 100 ng du plasmide pGBKT7 vide, puis sont étalées sur du milieu SD/-Trp.

Rencontre entre les souches de levures Y187 et Y2HGold ou "mating"

Les souches Y187 et Y2HGold étant de type sexuel différent, elles peuvent se rencontrer naturellement et fusionner formant ainsi une cellule de levure diploïde très caractéristique, cadre nécessaire à l'interaction entre les protéines recombinantes. Un résumé des différentes étapes de la technique de double hybride en levure est présentée **Figure 14**. Pour faire rencontrer les levures, une culture liquide ($DO_{600nm} = 0.8$) de la souche Y2HGold contenant la protéine appât est mise au contact d'un aliquot de 1 ml de la banque ADNc selon le protocole Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech). Le mélange est incubé jusqu'à atteindre $\frac{3}{4}$ de cellules de levures diploïdes (20 à 24h). Une partie des levures diploïdes est ensuite diluée au 1/10, 1/100 et 1/1000 et étalée sur les milieux sélectifs SD/-Leu, SD/-Trp et SD/-Trp/-Leu (**Annexe 4**) et incubées pendant 3 jours à 30°C. Les colonies poussant sur le milieu sélectif SD/-Trp/-Leu vont permettre de calculer l'efficacité de rencontre (ou "mating") grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de clones diploïdes (cfu/ml)}}{\text{Nombre de partenaires limitant (cfu/ml)}} * 100 = \text{Pourcentage de Diploïdes}$$

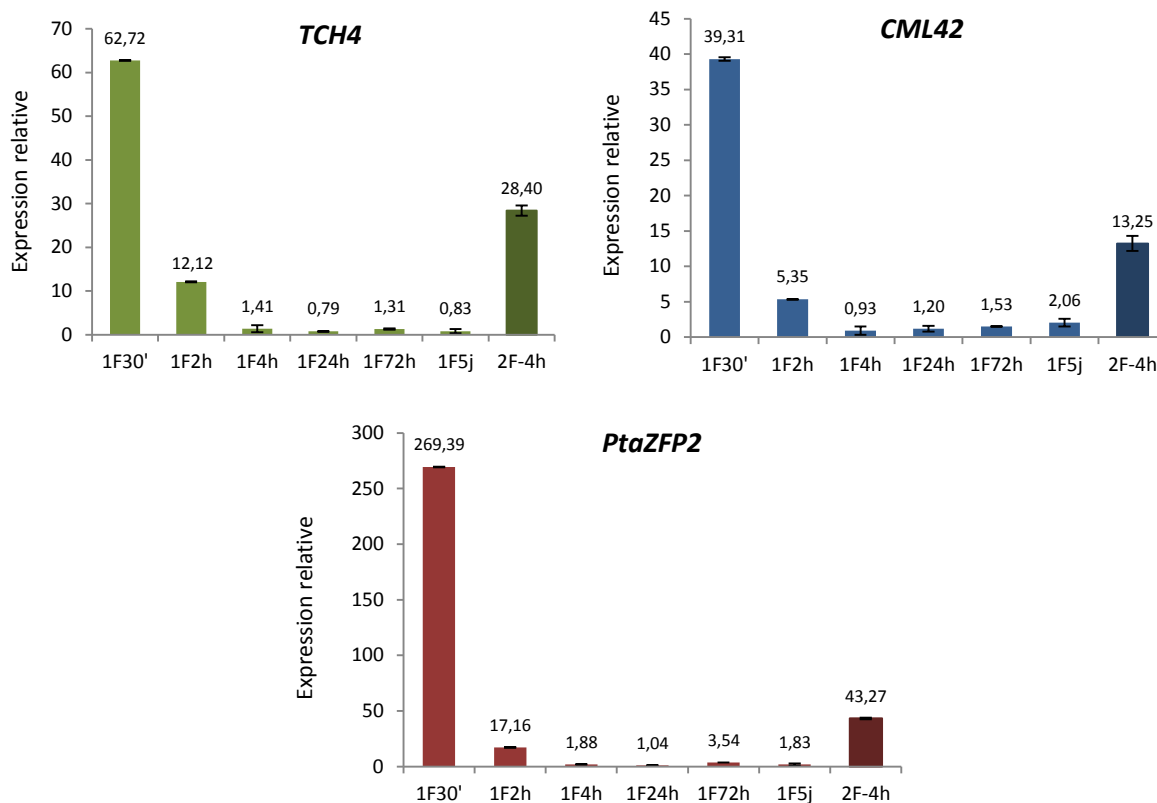


Figure 15 – Cinétique d'accumulation des transcrits de *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2* au cours du temps suite à une et deux flexions de la tige de peupliers

Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges non fléchies (abscisse 1) fléchies une seule fois (1F) et fléchies deux fois (2F). Les prélèvements ont été effectués 30 minutes (1F30'), 2h (1F2h), 4h (1F4h), 24h (1F24h), 72h (1F72h) et 5 jours (1F5j) après la première flexion. La seconde flexion est appliquée 3h30 après la première et la tige est prélevée 30' après la deuxième flexion (2F-4h). L'abondance relative de transcrits des gènes *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2* a été déterminée par PCR en temps réel. L'expression est rapportée à la moyenne des gènes de références *EF1-α* et *UBC* et normalisée par rapport à des plantes témoins non fléchies. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la quantité relative des transcrits pour chaque traitement pour 3 à 6 répétitions techniques indépendantes car seulement une à deux plantes ont été utilisées pour cette expérience.

Nombre de clones diploïdes = (Nombre de colonies présentes sur la boîte de dilution SD/-Trp/-Leu)/Volume de levures déposé sur boîte (en ml)) x volume final de la suspension de cellules (en ml) x facteur de dilution. Nombre de partenaires limitant (correspond soit à l'appât, soit à la proie) = (Nombre de colonies présentes sur la boîte de dilution SD/-Trp ou SD/-Leu)/Volume de levures déposé sur boîte (en ml)) x facteur de dilution.

Il est impératif qu'au minimum un million de cellules de levure diploïdes soit criblé au risque de ne pas détecter ensuite de vraies interactions sur le milieu de sélection SD/-Trp /-Leu/X- α -Gal/Aba. Le reste de la suspension de levures diploïdes est étalée sur du milieu SD/-Trp /-Leu/X- α -Gal/Aba et incubée pendant 3 jours à 30°C. Seuls les clones bleus poussant sur le milieu avec l'auréobasidine présentent une interaction entre les protéines appâts et proies, du fait de l'activation de l'expression des gènes rapporteurs *MEL1* et *AUR1-C* respectivement. Afin d'éliminer le plus de faux positifs possible, ces colonies sont repiquées individuellement sur du milieu SD/-Trp /-Leu/-Adé/-His/X- α -Gal/Aba, puis incubées 3 jours à 30°C.

2. RESULTATS

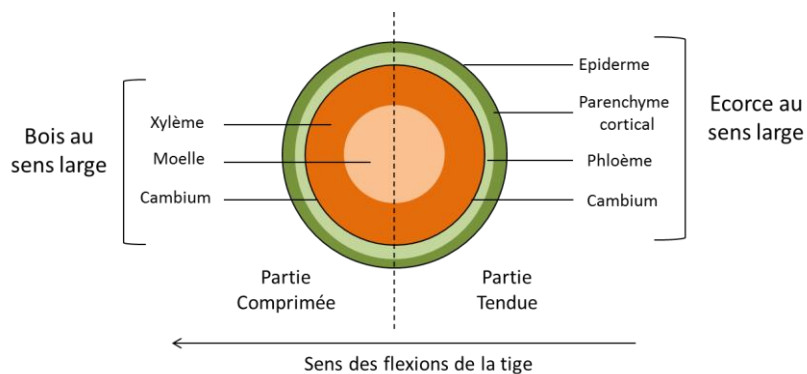
2.1. ANALYSE SPATIO-TEMPORELLE DE L'ACCOMMODATION

Les mécanismes liés à l'accommodation sont-ils mis en place précocement ?

Suite à l'étude de la cinétique des réponses moléculaires après une sollicitation mécanique de la tige de peupliers, Martin *et al.* (2010) ont montré qu'en séparant deux flexions de 24h la plante était désensibilisée. Afin de confirmer ces résultats et de mettre en évidence ce phénomène de désensibilisation sur des temps plus courts que 24h, une analyse préliminaire d'expression relative par Q-PCR de trois gènes mécano-régulés (*TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2*) a été entreprise au cours du temps sur tige entière (**Figure 15**). Malgré les différences d'abondance relative de transcrits de *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2*, leurs profils d'expression sont similaires suite à l'application d'une seule flexion de la tige (1F). On observe une forte augmentation de transcrits 30 minutes après la flexion (1F30') par rapport à des plantes contrôles non fléchies. Cette augmentation est plus prononcée pour le gène *PtaZFP2* : le niveau d'expression est presque 270 fois plus élevé chez les plantes fléchies par rapport aux plantes témoins. Puis les niveaux relatifs de transcrits diminuent très rapidement 2h après la flexion (1F2h) (d'un facteur 5 pour *TCH4* jusqu'à un facteur 15 dans le cas de *PtaZFP2*) pour atteindre un niveau de base à 4h (1F4h) restant stable jusqu'à 5 jours. Ces observations confirment que les 3 gènes mécano-régulés étudiés sont induits très précocement (dès 30 min) et de manière transitoire.

Si on réduit le temps à 4h pour appliquer la deuxième flexion (2F-4h), le niveau d'induction de l'accumulation de transcrits de *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2* est 3 à 6 fois plus faible que lors de

A



B

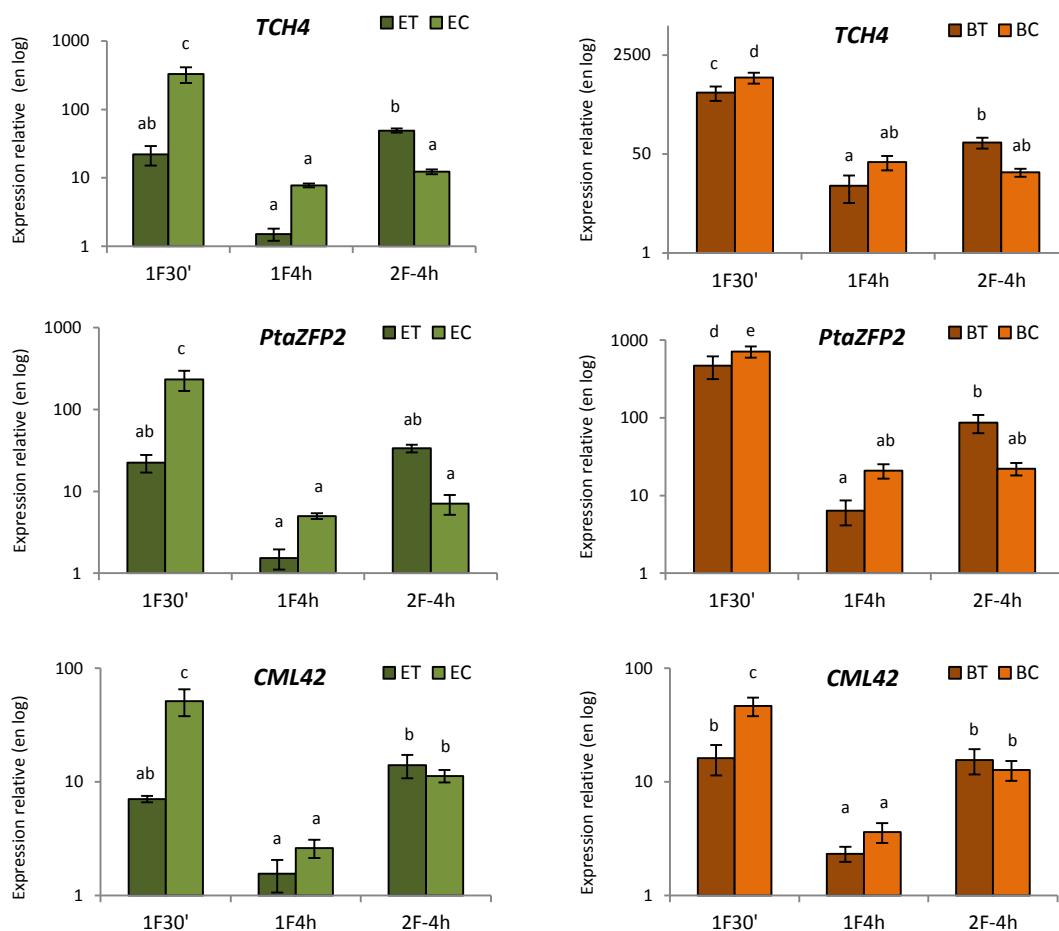


Figure 16 – Localisation de l'expression des gènes *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2* dans les différentes parties de la tige de peuplier après une ou deux flexions

(A) Représentation schématique des différentes zones de la tige prélevées pour les analyses d'expression de gènes par Q-PCR. (B) Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges non fléchies (abscisse 1), fléchies une seule fois (1F) et fléchies deux fois (2F). Les prélèvements ont été effectués 30' (1F30') et 4h (1F4h) après la première flexion. La seconde flexion est appliquée 3h30 après la première et la tige est prélevée 30' après la deuxième flexion (2F-4h). Les tissus de la tige sont séparés en quatre parties : écorce tendue (ET), écorce comprimée (BC), bois tendu (BT) et bois comprimé (BC). L'abondance relative a été déterminée par Q-PCR. L'expression est rapportée à la moyenne des gènes de références *EF1-α* et *UBC* et normalisée par rapport à des plantes témoins non fléchies. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la quantité relative des transcrits pour chaque traitement pour 4 répétitions indépendantes techniques et biologiques de cette expérience. Les valeurs notées par des lettres différentes sont significativement différentes (test Anova, P < 0.05).

la première flexion. Ces résultats montrent que 4h après l'application d'une flexion, les mécanismes liés à la désensibilisation sont déjà mis en place dans la tige.

Les mécanismes liés à l'accommodation ont-ils lieu dans toutes les parties de la tige ?

Jusqu'à présent, les travaux menés sur le phénomène d'accommodation ont été réalisés sur tige entière. Dans le but de vérifier si les mécanismes liés à la désensibilisation concernent toutes les zones de la tige, des tiges de peupliers sont divisées en quatre parties (**Figure 16-A**). La **Figure 16-A** décrit de manière très simplifiée la composition tissulaire des échantillonnages bois et écorce. L'échantillon bois comprend le xylème et la moelle. L'échantillon écorce comprend l'épiderme, le parenchyme cortical et le tissu phloémien. Suite au détachement de ces deux parties, le cambium peut se retrouver soit dans le bois, soit dans l'écorce. Enfin, la partie comprimée de la tige est séparée de la partie tendue.

La **Figure 16-B** représente l'abondance relative de transcrits des gènes *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2* dans les différentes parties de la tige prélevées 30 min (1F30') et 4h (1F4h) après la sollicitation mécanique et suite à une seconde flexion séparée de 3h30 de la première et prélevées 30 min après la deuxième flexion (2F-4h). On remarque dans un premier temps que quelque soit le gène étudié, les transcrits s'accumulent plus fortement dans la partie comprimée de la tige (bois et écorce) que dans la partie tendue suite à une seule flexion (1F30' et 1F4h). De plus, les gènes *TCH4* et *PtaZFP2* s'expriment plus dans le bois que dans l'écorce. En effet, les niveaux relatifs de transcrits de ces gènes sont 3 fois plus élevés dans le bois comprimé que dans l'écorce comprimée et 25 fois plus dans le bois tendu que dans l'écorce tendue, 30 minutes après une flexion de la tige. On n'observe cependant pas de différences significatives d'expression entre le bois et l'écorce pour le gène *CML42*. Ces résultats suggèrent des comportements différents au sein de la tige suite à une sollicitation mécanique. Si on applique deux flexions séparées de 4h, on observe également une hétérogénéité dans l'expression des gènes mécano-régulés. Quelque soit le gène, l'abondance relative de transcrits est 4 à 40 fois plus faible lors de la deuxième flexion par rapport à la première, au niveau de la partie comprimée de la tige seulement (bois et écorce). Dans la partie tendue, tous les gènes s'expriment autant ou plus dans l'écorce suite à la seconde flexion. Dans le bois, *TCH4* et *PtaZFP2* s'expriment 5 à 7 fois moins alors que la régulation de *CML42* est la même suite à une ou deux flexions.

Les cellules semblent être plus fortement désensibilisées dans la partie comprimée de la tige que dans la partie tendue. Les mécanismes liés à l'accommodation ne sont donc pas homogènes au sein de la tige entière.

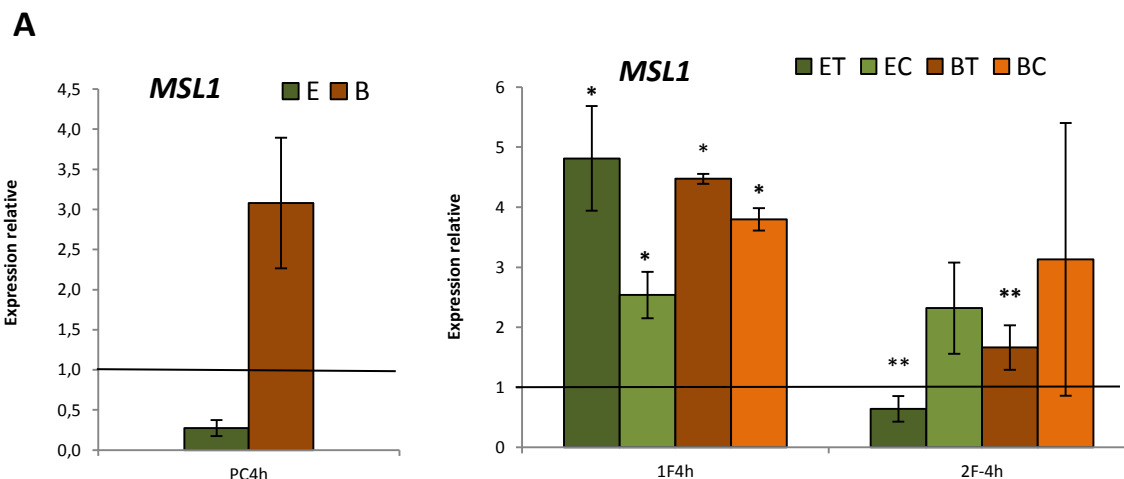


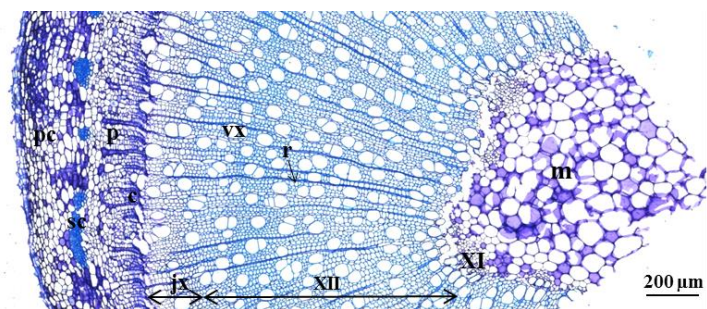
Figure 17 – Analyse d'expression du gène *MSL1* (A) et de la localisation de la protéine *MSL1* (B) sur des tiges de plantes contrôles non fléchies et fléchies une ou deux fois

(A) Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges non fléchies, fléchies une seule fois (1F) et fléchies deux fois (2F). Les prélèvements ont été effectués 0h (PC4h) et 4h (1F4h) après la première flexion. La seconde flexion est appliquée 3h30 après la première et la tige est prélevée 30' après la deuxième flexion (2F-4h). Les tissus de la tige sont séparés en différentes parties : écorce (E) tendue (ET) et comprimée (EC), bois (B) tendu (BT) et comprimé (BC). L'abondance relative de transcrits a été déterminée par Q-PCR. L'expression est rapportée à la moyenne des gènes de références *EF1-α* et *UBC* et normalisée par rapport à la moyenne de l'ensemble des valeurs (abscisse 1 ; graphique de gauche) et par rapport aux plantes témoins non fléchies de chaque condition (abscisse 1 ; graphique de droite). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la quantité relative des transcrits pour 3 répétitions techniques et biologiques indépendantes. Les valeurs notées par un astérisque sont significativement différentes du témoin non fléchi et celles notées par un double astérisque sont significativement différentes de la première flexion (test t Student, $P < 0.05$). (B) Immunolocalisation de la protéine *MSL1* sur des tiges de peupliers non fléchies avec ou sans anticorps, fléchies une seule fois (1F) et fléchies deux fois (2F). Les prélèvements ont été effectués 0h (PC4h) et 4h (1F4h) après la première flexion. La seconde flexion est appliquée 3h30 après la première et la tige est prélevée 30' après la deuxième flexion (2F-4h). Les tissus de la tige sont séparés en deux parties : face tendue et face comprimée. Deux grossissements de la partie xylémienne sont présentés par des encadrés noirs pour chaque condition. Les observations ont été répétées trois fois sur trois plantes indépendantes. Une coloration au bleu de toluidine permet de mettre en évidence les différents tissus de la tige.

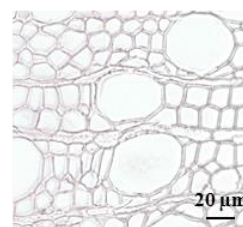
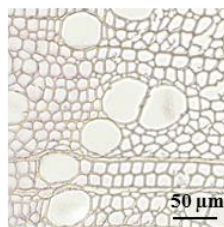
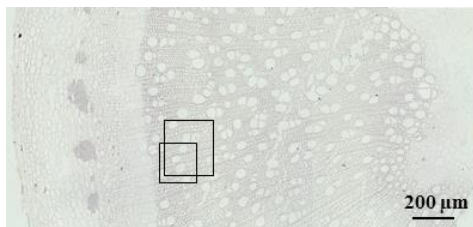
c : cambium, jx : jeune xylème, m : moëlle, p : phloème, pc : parenchyme cortical, r : rayon xylémien, sc : sclérenchyme, vx : vaisseaux de xylème, XI : xylème primaire, XII : xylème secondaire.

B

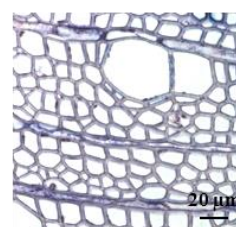
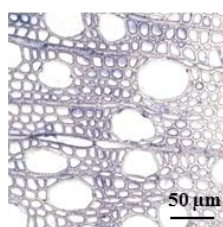
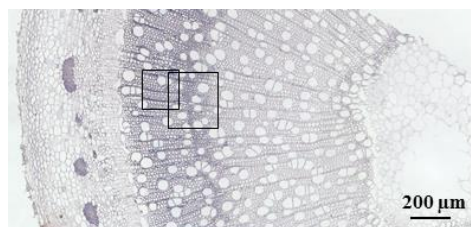
Tige non
fléchie
colorée au
bleu de
toluidine



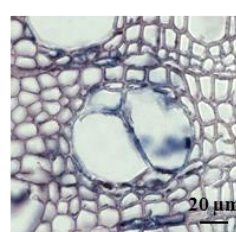
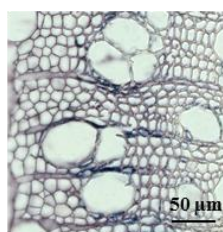
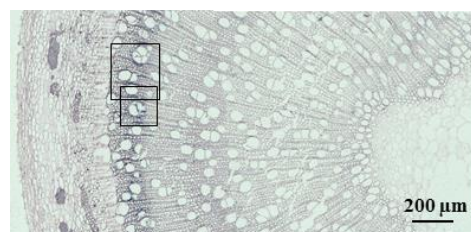
Témoin
sans
anticorps



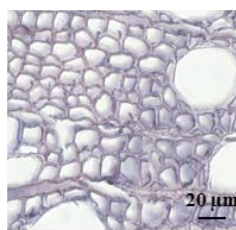
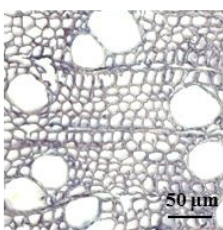
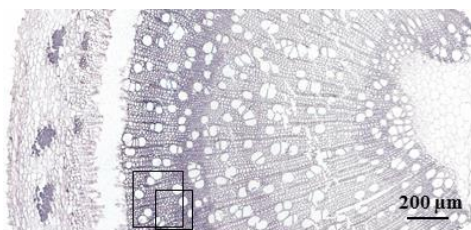
Tige non
fléchie



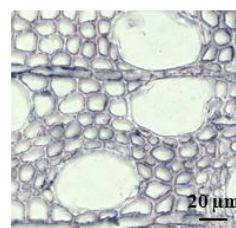
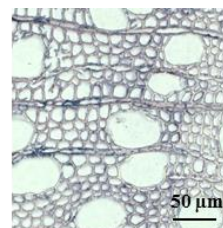
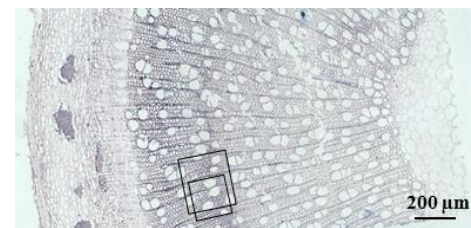
1F4h
Côté
Comprimé



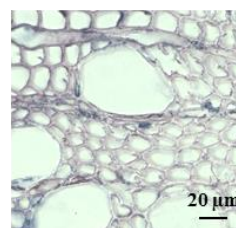
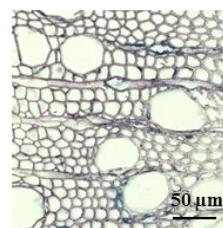
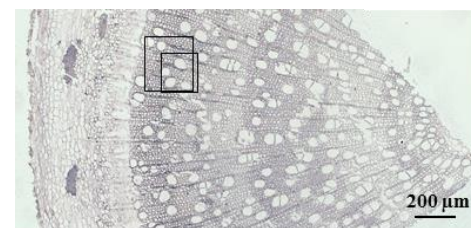
1F4h
Côté
Tendu



2F-4h
Côté
Comprimé



2F-4h
Côté
Tendu



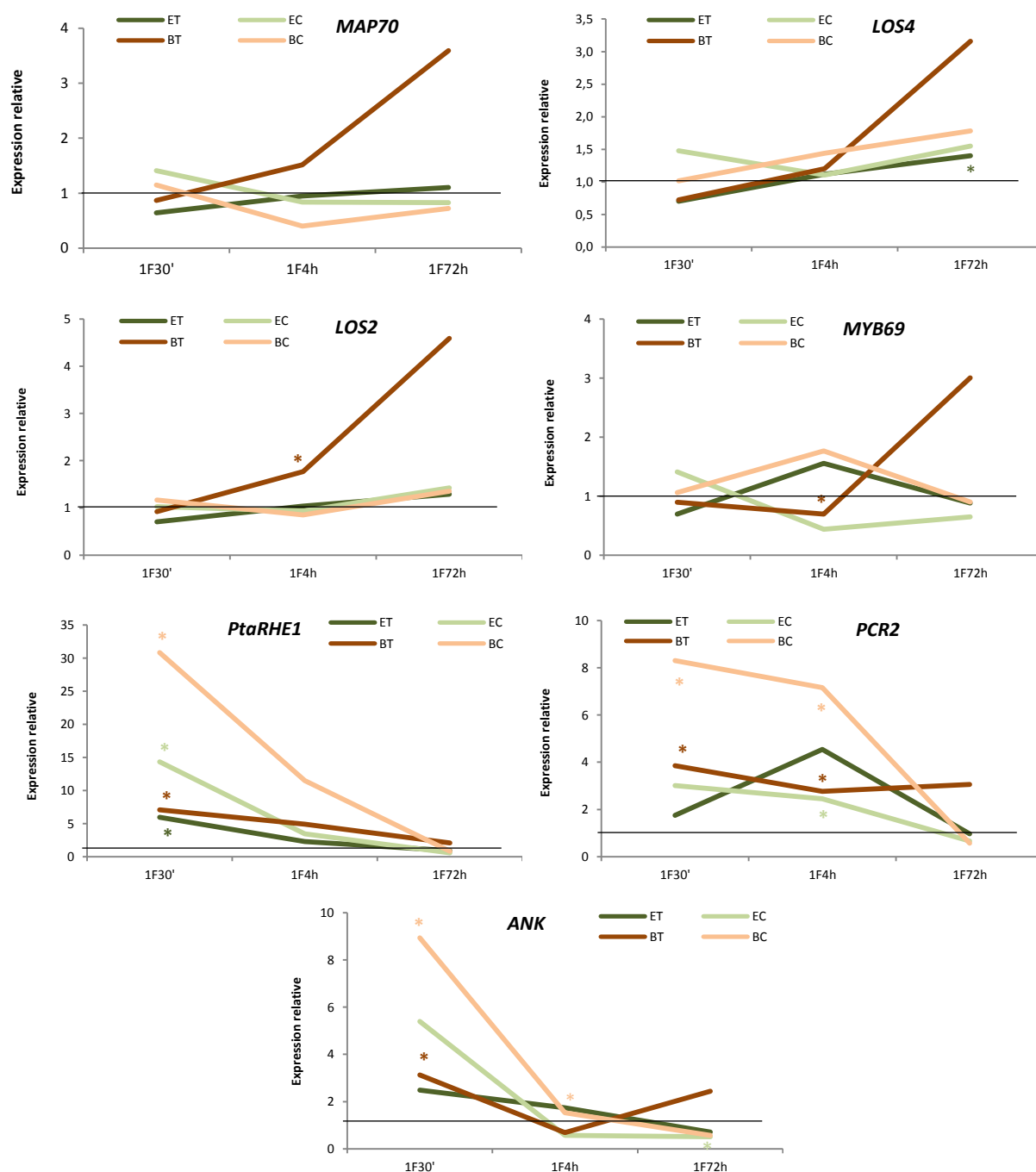


Figure 18 – Cinétique d'accumulation des transcrits de 7 gènes candidats sur différentes parties de la tige après une flexion de la tige de peupliers

Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges non fléchies (abscisse 1) et fléchies une seule fois (1F). Les prélèvements ont été effectués 30' (1F30'), 4h (1F4h) et 72h (1F72h) après la flexion. Les tissus de la tige sont séparés en quatre parties : écorce tendue (ET), écorce comprimée (EC), bois tendu (BT) et bois comprimé (BC). L'abondance relative de transcrits des gènes a été déterminée par Q-PCR. L'expression est rapportée à la moyenne des gènes de références *EF1-α* et *UBC* et normalisée par rapport à des plantes témoins non fléchies. Les valeurs notées par un astérisque sont significativement différentes du témoin non fléchi (test t Student, $P < 0.05$).

Régulation du gène *MSL1* et localisation de sa protéine

Afin d'étudier le rôle putatif des canaux mécanosensibles de type MSL dans la mécanoperception et la désensibilisation chez le peuplier, des analyses de Q-PCR et d'immunolocalisation *in situ* de MSL1 (pour lequel des anticorps étaient disponibles) sont comparées au sein des différentes parties de tiges témoins non fléchies et fléchies une à deux fois (**Figure 17**). La **Figure 17-A**, présentant le niveau de base de transcrits de *MSL1* au sein d'une tige contrôle, montre que l'expression de *MSL1* est plus élevée dans le bois que dans l'écorce. Cette différence est également observée au niveau de l'accumulation de la protéine (**Figure 17-B**). La zone de marquage est plus large et la coloration est plus intense dans le xylème alors qu'elle est faible, voire absente, dans le parenchyme cortical de la tige. Un grossissement de la zone du bois indique que la protéine MSL1 est localisée majoritairement dans les rayons ligneux et les cellules de parenchyme xylémien. Suite à une flexion, la **Figure 17-A** montre que le gène *MSL1* est induit dans toutes les parties la tige. Or, les analyses immunohistochimiques montrent que l'intensité du signal augmente dans les deux faces du bois mais la zone de marquage est plus forte dans le côté tendu. Lors de la deuxième flexion, une plus faible induction de l'expression de MSL1 est observée dans l'écorce et le bois de la face tendue de la tige. Au niveau protéique, l'intensité du signal ne semble pas avoir varié dans le bois de la face tendue après la deuxième flexion. Dans le bois de la face comprimée, la zone de marquage est plus large lors de la deuxième flexion. Malgré les différences observées entre les analyses Q-PCR et les analyses immunologiques, ces résultats montrent que MSL1 est régulée lors d'une flexion et est plus abondante dans le jeune bois.

Recherche de nouveaux candidats de la mécanoperception et de l'accommodation

Suite à une analyse transcriptomique effectuée sur des tiges de peupliers fléchies, des gènes ayant des profils intéressants ont été sélectionnés. L'expression de ces différents gènes a été analysée par Q-PCR sur des tiges de peupliers fléchies une seule fois et prélevées 30 minutes, 4h et 72h après la flexion et séparées en quatre parties (**Figure 18**). Dans cette expérience, seules deux répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque point de cinétique. Or, nous avons rencontré des problèmes avec un des deux points 1F72h (problème lié à la flexion des tiges). Les différences significatives entre les plantes fléchies et les plantes non fléchies ont été montrées par des astérisques et nous parlerons de tendance lorsque les résultats ne sont pas significatifs.

Si on considère les gènes *PtaRHE1*, *PCR2* et *ANK*, comme attendu suite aux résultats de la puce ADN, l'expression de ces gènes est induite précocement (30 min) suite à une flexion.

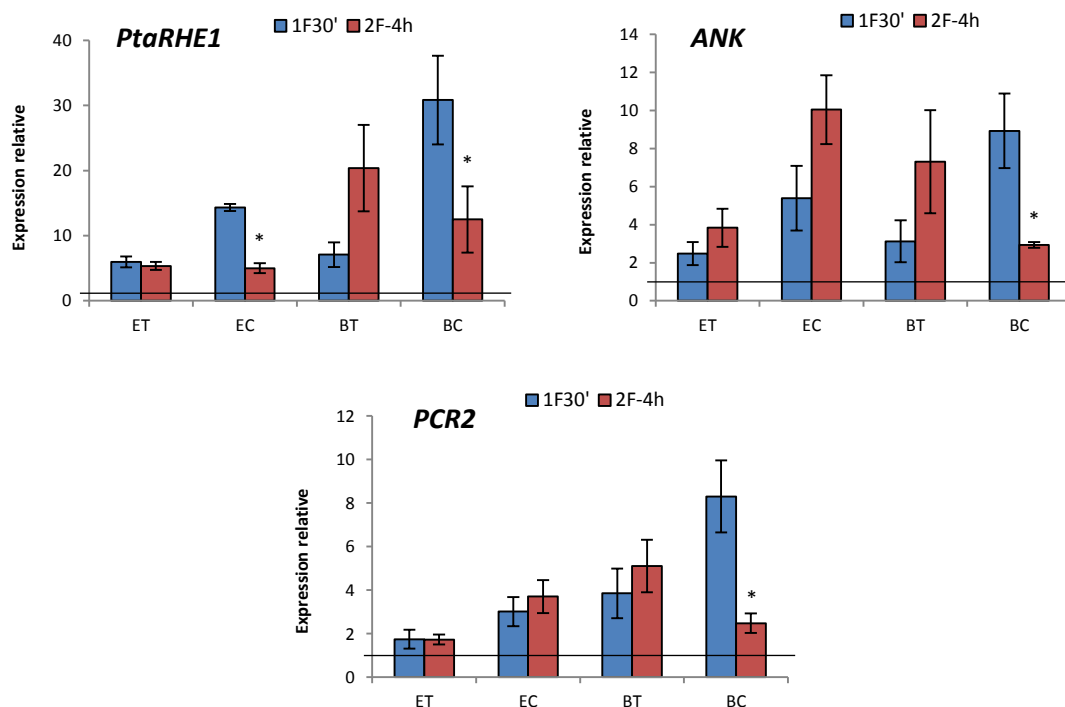


Figure 19 – Localisation de l'expression des gènes *PtaRHE1*, *ANK* et *PCR2* dans les différentes parties de la tige de peuplier après une ou deux flexions

Les ARN totaux ont été extraits à partir de tiges non fléchies (abscisse 1) fléchies une seule fois (1F) et fléchies deux fois (2F). Les prélèvements ont été effectués 30' (1F30') après la première flexion. La seconde flexion est appliquée 3h30 après la première et la tige est prélevée 30' après la deuxième flexion (2F-4h). Les tissus de la tige sont séparés en quatre parties : "écorce" tendue (ET), "écorce" comprimée (BC), bois tendu (BT) et bois comprimé (BC). L'abondance relative de transcrits des gènes a été déterminée par Q-PCR. L'expression est rapportée à la moyenne des gènes de références *EF1-α* et *UBC* et normalisée par rapport à des plantes témoins non fléchies. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de la quantité relative des transcrits pour chaque traitement pour 2 répétitions indépendantes de cette expérience. Les valeurs notées par un astérisque sont significativement différentes de la plante fléchie 1 seule fois (1F30') (test t Student, $P < 0.05$).

Comme pour les autres gènes testés précédemment, on observe une expression plus forte dans le bois côté comprimé. Mais l'induction de ces gènes est également statistiquement significative dans le bois tendu. A 72h après la flexion, l'accumulation de ces transcrits n'est pas différente de celle des plantes contrôles, montrant que le niveau d'expression retourne à un niveau de base, sans toutefois observer une répression comme dans l'analyse transcriptomique. En ce qui concerne les gènes *MAP70*, *LOS4*, *LOS2* et *MYB69*, leurs profils d'expression présentent la même tendance. L'accumulation des transcrits n'est pas différente des plantes contrôles 30 min après la flexion. Par contre, 72h après la flexion, l'expression de ces gènes semble être induite préférentiellement dans le bois tendu. Comme expliqué précédemment, cette tendance n'est pas vérifiée statistiquement du fait du problème lié à la flexion pour une des plantes 72h00. Cependant, l'induction de ces gènes à ce temps de cinétique est conforme aux résultats de l'analyse de la puce à ADN et réalisée sur 6 plantes différentes au cours de trois répétitions biologiques.

L'expression des gènes *LOS4*, *LOS2*, *MYB69* et *MAP70* dans une seule partie de la tige suggère qu'ils ne sont pas impliqués directement dans la sensibilité à la flexion mais dans d'autres mécanismes tissus-dépendant. Alors que les gènes *PtaRHE1*, *PCR2* et *ANK* s'expriment dans au moins 3 parties différentes de la tige, pourraient être des acteurs de la voie de signalisation du phénomène d'accommodation.

Pour répondre à cette question, une analyse d'expression de ces 3 gènes a été entreprise suite à une seconde flexion de la tige séparée de 4h de la première et prélevée 30 minutes après la deuxième flexion (**Figure 19**). Dans le bois comprimé, les 3 gènes présentent une expression 4 fois plus faible lors de la seconde flexion par rapport à la première. L'abondance relative de transcrits de *PtaRHE1* est 5 fois plus faible lors de la deuxième flexion que lors de la première dans la partie écorce comprimée. De manière surprenante, aucune différence du niveau d'induction de ces gènes entre 1 ou 2 flexions n'est observée dans l'écorce ou dans le bois de la partie tendue de la tige alors qu'une différence d'expression avait été montré pour les gènes *TCH4* et *PtaZFP2*. Ainsi, les gènes *PtaRHE1*, *ANK* et *PCR2* présentent un profil d'expression particulier lors de la deuxième flexion de la tige.

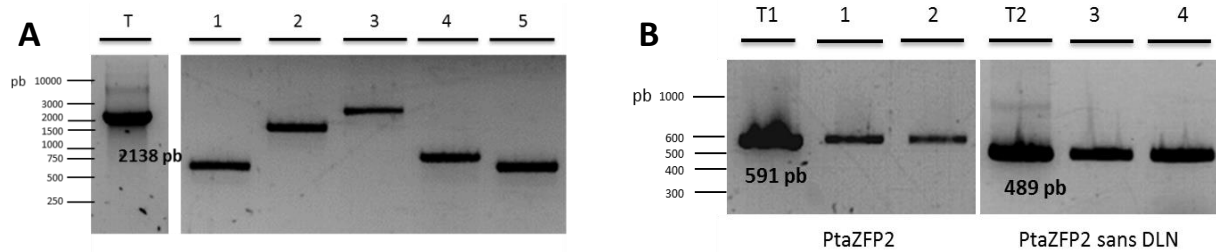


Figure 20 – Vérification de la transformation des constructions plasmidiques dans les souches de levures haploïdes correspondantes

(A) Amplification par PCR de 5 colonies de levures haploïdes (1 à 5) ayant poussé sur du milieu sélectif SD/-Leu et transformées avec le plasmide pGADT7-Rec contenant la banque ADNc. Les amorces utilisées reconnaissent des séquences spécifiques du plasmide situées entre les séquences SMART et CDSIII (voir Matériels et Méthodes 1.2.2.). Le témoin (T) correspond au vecteur pGADT7-Rec contenant un insert de taille connue. (B) Amplification par PCR de 4 colonies de levures haploïdes ayant poussé sur du milieu sélectif SD/-Trp et transformées avec le plasmide pGBKT7 contenant soit la séquence codante de ZFP2 entière (colonies 1 et 2) ou tronquée au niveau du domaine répresseur DLN (colonies 3 et 4). Les amorces utilisées sont celles décrites dans Matériels et Méthodes (voir 1.2.3.). Les témoins (T1 et T2) correspondent aux vecteurs purs pGBKT7-ZFP2 avec ou sans DLN. Les échantillons ont été analysés sur un gel agarose 1.2% (TAE 0.5X) et sont révélés grâce au SybrSafe.

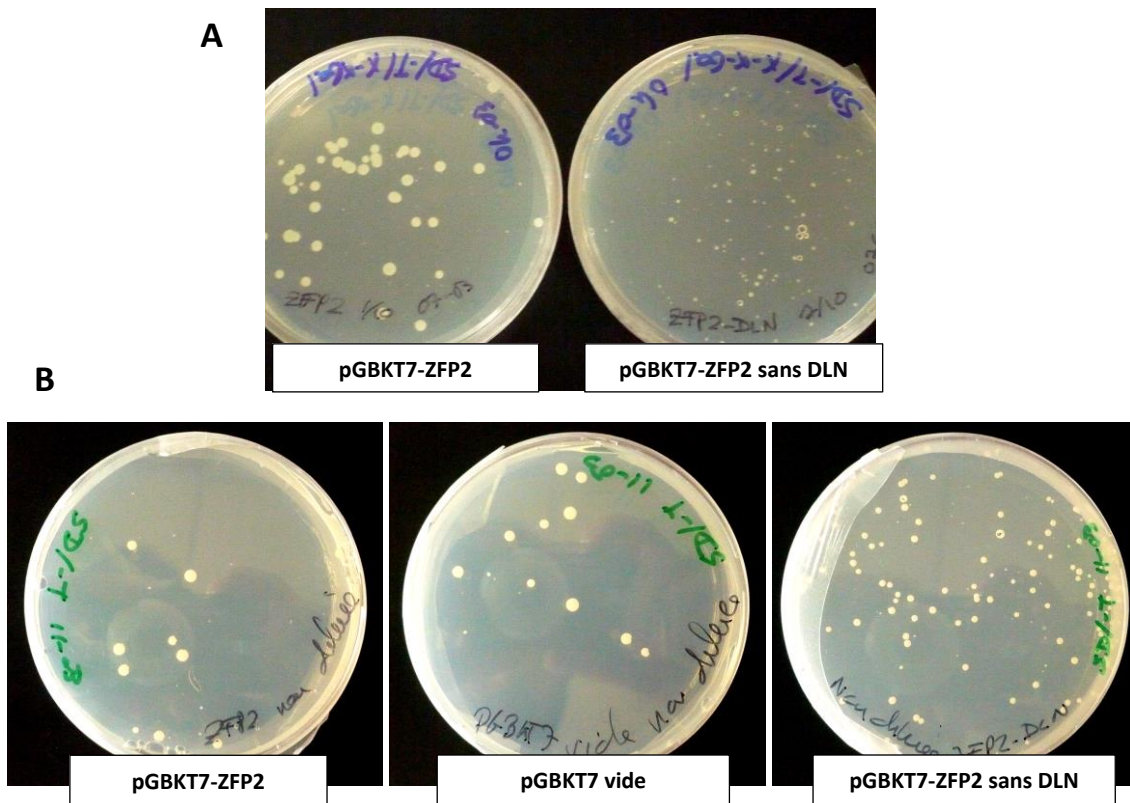


Figure 21 – Test d'autoactivation et de toxicité de l'expression des protéines ZFP2 avec ou sans DLN dans la souche de levure Y2HGold

Le test d'autoactivation (A) est réalisé en étalant des levures transformées avec le plasmide contenant la protéine appât (pGBKT7-ZFP2 avec ou sans DLN) sur du milieu sélectif contenant du X- α -Gal. Le test de toxicité (B) est réalisé en comparant la taille des levures transformées avec le vecteur contenant la protéine appât à celles transformées avec le vecteur vide, poussant sur du milieu sélectif SD/-Trp.

2.2. RECHERCHE DE PARTENAIRES PROTÉIQUES DE PtaZFP2 PAR DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES

Construction des plasmides recombinants pGADT7-Rec et pGBKT7 dans les souches de levures Y187 et Y2HGold

Pour tester une interaction entre la protéine proie et les protéines appâts dans la cadre du double hybride, la première étape a été d'intégrer la séquence codante de *PtaZFP2* dans le plasmide pGBKT7-Appât et une banque d'ADNc dans le plasmide pGADT7-REc-Proies. La banque ADNc a été construite dans la souche de levure Y187 à partir de transcrits présents 30 minutes et 2 heures suite à une flexion de la tige de peuplier. Une PCR est réalisée sur les souches de levure ayant été transformées pour vérifier ces constructions (**Figure 20**). En ce qui concerne la banque d'ADNc, la **Figure 20-A** montre que toutes les colonies testées ont intégré une copie du plasmide contenant chacun un ADNc différent. Le témoin (T) correspond à de l'ADN plasmidique pGADT7-Rec contenant un fragment ADN de taille connue. Il permet de confirmer que les amorces utilisées amplifient de manière spécifique le vecteur d'intérêt. De plus, on observe une grande hétérogénéité dans la taille des fragments ADNc amplifiés, allant de 500 à 3000 pb, témoin d'une bonne qualité des ADNc synthétisés. En ce qui concerne le clonage des séquences appâts ZFP2 et ZFP2 tronquée au niveau du domaine répresseur DLN dans le vecteur pGBKT7, la **Figure 20-B** montre des amplicons de la taille attendue (591 pb et 489 pb, respectivement) pour chaque colonie testée. Les deux souches de levure ont donc bien intégré les constructions plasmidiques et l'insert d'intérêt est présent à chaque fois.

Test d'auto-activation et test de toxicité des protéines appâts

La deuxième condition nécessaire pour tester une interaction est l'absence d'activation des gènes rapporteurs en levures par la production de la protéine appât seule (en absence de protéines proies). Pour cela, des levures de la souche Y2HGold contenant les deux types de protéines appâts ont été étalées sur du milieu sélectif contenant soit du X- α -Gal, soit de l'auréobasidine (Aba). Les colonies poussant sur milieu avec du X- α -Gal apparaissent blanches quelque soit la protéine appât (ZFP2 et ZFP2 sans DLN) (**Figure 21-A**). De plus, aucune colonie n'a poussé sur du milieu +Aba (non montré). Ces résultats montrent que les protéines appâts n'auto-activent pas de manière autonome les gènes rapporteurs *MEL1* et *AURI-C* (**Annexe 5**). Un autre test consiste à vérifier si la production de la protéine appât est toxique pour la croissance de la levure. Il suffit pour cela de comparer la taille des colonies Y2HGold contenant les protéines proies avec celle des colonies contenant le vecteur plasmidique pGBKT7 vide. La **Figure 21-B** montre que les colonies contenant la construction plasmidique

Tableau 5 – Efficacités de la rencontre entre les souches de levures Y187 et Y2HGold transformées

Le criblage des colonies et l'efficacité de "mating" sont calculés à l'aide des formules détaillées dans Matériels et Méthodes (voir 1.2.5.). Les résultats observés correspondent aux moyennes des différentes dilutions. Les résultats attendus sont donnés dans le protocole Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech).

Type de rencontre testée	Viabilité des appâts (en colonies/ml)	Viabilité des proies (en colonies/ml)	Viabilité des diploïdes (en colonies/ml)	Efficacité de "mating" (en %)
ZFP2 + banque ADNc	$4.68 \cdot 10^7$	$2.03 \cdot 10^7$	$1.95 \cdot 10^4$	0.1
ZFP sans DLN + banque ADNc	$3.55 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$2.8 \cdot 10^4$	0.08
Résultats attendus	$5 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	2 à 5

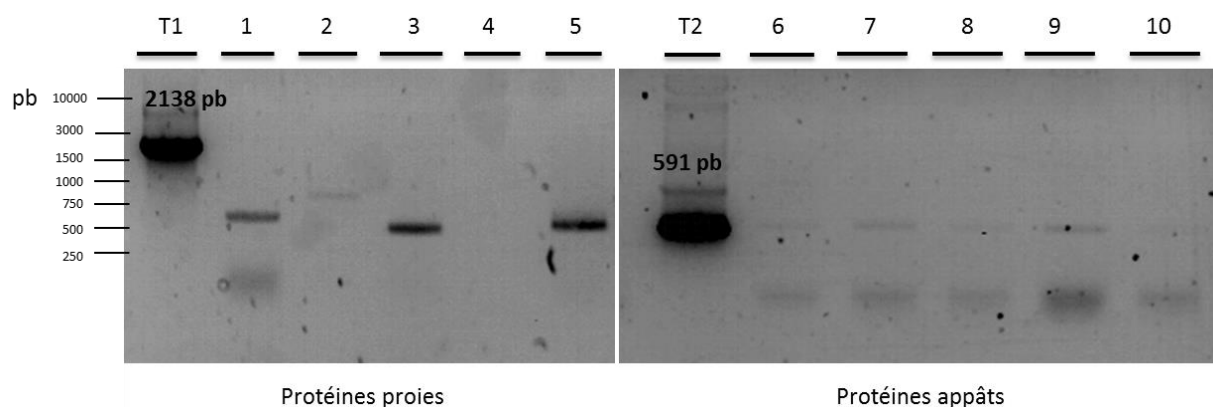


Figure 22 – Vérification de la transformation des constructions plasmidiques dans les souches de levures diploïdes

Amplification par PCR de 10 colonies de levures diploïdes ayant poussé sur du milieu sélectif SD/-Trp/-Leu. Les amorces utilisées encadrent soit les inserts ADNc du plasmide pGADT7-Rec (T1 et colonies 1 à 5), soit la séquence codante de ZFP2 insérée dans le plasmide pGBKT7 (T2 et colonies 6 à 10). L'amplification PCR des témoins correspondent à des fragments de taille attendue. T1 étant le contrôle positif du vecteur pGADT7-Rec et T2 celui du vecteur pGBKT7. Les échantillons ont été analysés sur un gel agarose 1.2% (TAE 0.5X) et sont révélés grâce au SybrSafe.

pGBKT7-ZFP2 sont de la même taille que les colonies contenant le plasmide vide alors que celles contenant la construction pGBKT7-ZFP2 sans DLN sont plus petites (mêmes observations lors du test d'autoactivation). Ainsi, la protéine ZFP2 entière n'est pas toxique pour les levures mais le devient lorsqu'elle ne contient plus son domaine répresseur DLN.

Rencontre entre la souche Y187 et la souche Y2HGold

Afin que les protéines proies et appâts interagissent, les deux souches de levures haploïdes Y187 et Y2HGold sont mises en co-culture pour permettre leur rencontre et la formation de cellules de levure diploïdes contenant les deux protéines. Pour s'assurer du bon déroulement de cette étape, l'efficacité de cette rencontre ou efficacité de "mating" est calculée en prenant en compte le nombre de colonies des levures haploïdes et diploïdes obtenues. Si la concentration en levures n'est pas atteinte pour l'une des souches, cela affectera l'efficacité de "mating". Le **Tableau 5** compare les résultats observés lors de la rencontre entre les souches contenant les deux types de protéines appâts et les souches contenant la banque ADNc, avec les résultats théoriques attendus. La concentration en cellules haploïdes contenant les protéines appâts est inférieure d'un facteur 10 par rapport à ce qui est attendu alors que celle contenant les protéines proies est légèrement supérieure. Le nombre de clones diploïdes obtenus après la rencontre atteint difficilement les 20 000 à 30 000 clones alors qu'il devrait être au minimum de 1 million. L'efficacité de la rencontre est alors très faible. Elle est de 0.1% dans le cas de la rencontre entre la protéine ZFP2 et la banque ADNc et de 0.08% dans le cas de la protéine ZFP2 sans DLN.

La rencontre ayant été testée plusieurs fois dans différentes conditions (changement des milieux sélectifs, mode de culture de la souche Y2HGold) et ayant toujours échoué, une PCR a été réalisée sur le peu de colonies diploïdes obtenues afin de vérifier la présence des constructions (**Figure 22**). Sur les 5 colonies testées avec les amorces spécifiques du plasmide pGADT7-Rec, une seule ne contient pas de fragment d'ADNc (pas d'amplicon pour la colonie 4). Le plasmide pGBKT7-ZFP2 est quant à lui présent dans les 5 colonies diploïdes analysées (colonies 6 à 10) mais en quantité presque indétectable. Les analyses avec la construction ZFP2 sans DLN donnent les mêmes résultats (non montrés). Les clones diploïdes possèdent donc les deux constructions plasmidiques dans 80% des cas mais la protéine appât pourrait bien être le facteur limitant de cette rencontre. Les problèmes rencontrés lors du "mating" n'ont pu être résolus dans le délai imparti et l'expérience de double hybride n'a donc pas pu être menée à terme pour la recherche de partenaires protéiques de PtaZFP2.

PARTIE III

DISCUSSION – PERSPECTIVES

CONCLUSION

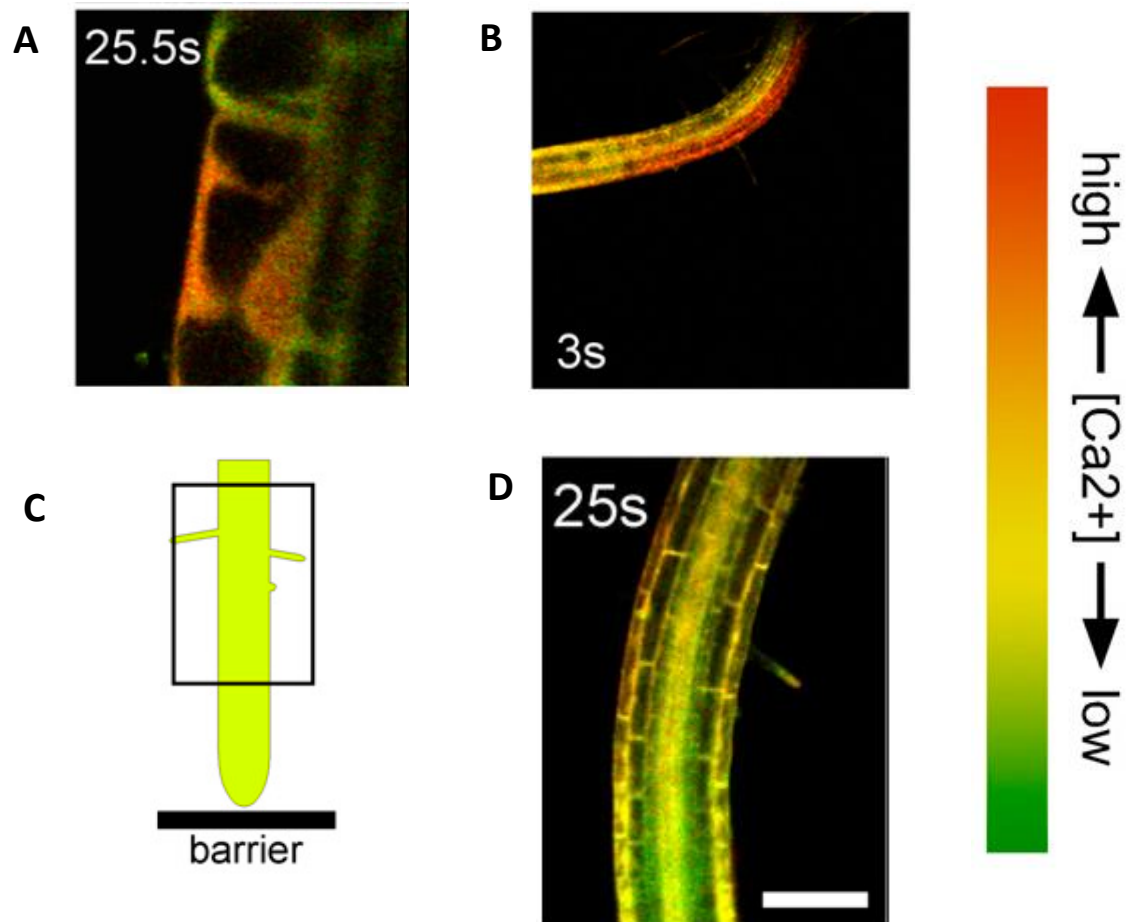


Figure 23 – Changement des niveaux de calcium intracellulaire en réponse à une sollicitation mécanique appliquée aux racines d'*A. thaliana* (Monshausen *et al.*, 2009)

Une augmentation transitoire de calcium cytosolique est provoquée par le toucher (A) ou par une flexion (B) appliquée à des racines d'*A. thaliana*. L'expérience est répétée 10 fois. Un obstacle est positionné dans la direction de croissance de ces racines, les obligeant à se courber toutes seules (C). L'augmentation transitoire de calcium cytosolique est alors mesurée en réponse à la flexion provoquée par le contact avec la barrière (D). L'expérience est répétée 4 fois. Les nombres représentent le temps en secondes après l'application des sollicitations mécaniques. La fluorescence rouge reflète une augmentation en calcium cytosolique. Bar = 10 μm .

1. LOCALISATION TISSULAIRE DES REPONSES MOLECULAIRES DU PEUPLIER SUITE A UNE FLEXION DE LA TIGE

Comme expliqué dans la bibliographie, lors d'une flexion de la tige, deux paramètres physiques sont modifiés. Les tissus subissent des déformations (allongement et raccourcissement) et des contraintes (tension et compression). Les travaux ayant été réalisés jusqu'à présent au niveau de la tige entière, nous avons cherché à cibler précisément au sein de la tige la localisation de l'expression de 3 gènes mécano-régulés (*TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2*). Les résultats montrent que l'expression de ces gènes est plus forte du côté comprimé de la tige que du côté tendu, dans le bois et dans l'écorce. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer nos résultats. Tout d'abord, pour fléchir les tiges de peupliers, il faut positionner un tube en plastique contre la partie interne de la zone de courbure, i.e. la zone en compression. Cette partie de la tige subit donc un contact de courte durée en plus d'une compression. Monshausen *et al.* (2009), en mesurant la variation de calcium cytosolique lors d'une flexion, puis lors d'un toucher des racines d'*A. thaliana* (**Figure 23**), ont montré que dans les deux cas le pic de calcium est plus fort du côté où a été appliqué le stress mécanique. De plus, en fléchissant les racines à l'aide d'une lamelle faisant office de barrière (sans les toucher), l'intensité de fluorescence est diminuée mais localisée du côté en tension de la courbure. Dans notre cas, du côté comprimé, la surexpression observée pourrait donc résulter de l'effet additif des deux types de sollicitations : la flexion et le toucher. Pour pallier à ce problème, il faudrait fléchir les tiges en limitant au maximum le contact direct avec la zone prélevée, à l'aide d'un tube en plastique creux au centre.

Cependant, si le toucher n'intervient pas, nos résultats suggèrent que le signal perçu par les plantes ne dépend pas uniquement des déformations. Dans le modèle proposé par Coutand et Moulia (2000), chaque cellule vivante de la zone fléchie de la tige perçoit sa propre déformation quelque soit son signe. Pour expliquer nos observations, il faudrait prendre en compte soit les déformations de signe opposé entre le côté comprimé et côté tendu de la tige, soit les contraintes générées. Nos résultats ne nous permettent pas de trancher entre ces deux théories. Il faut savoir que les contraintes dépendent de la rigidité de la tige qui est définie par deux paramètres : le diamètre de la tige et le module de Young (dépendant de la composition et de l'épaisseur de la paroi). Pour tester l'importance des contraintes, nous pourrions comparer l'expression des gènes mécano-régulés entre des plantes sauvages et des plantes transgéniques de diamètre égal mais dont la proportion phloème/bois est modifiée.

Nous avons également montré que lors d'une flexion, les gènes *TCH4*, *CML42* et *PtaZFP2* s'expriment plus fortement dans le bois que dans l'écorce. Or, les cellules de la tige subissant le

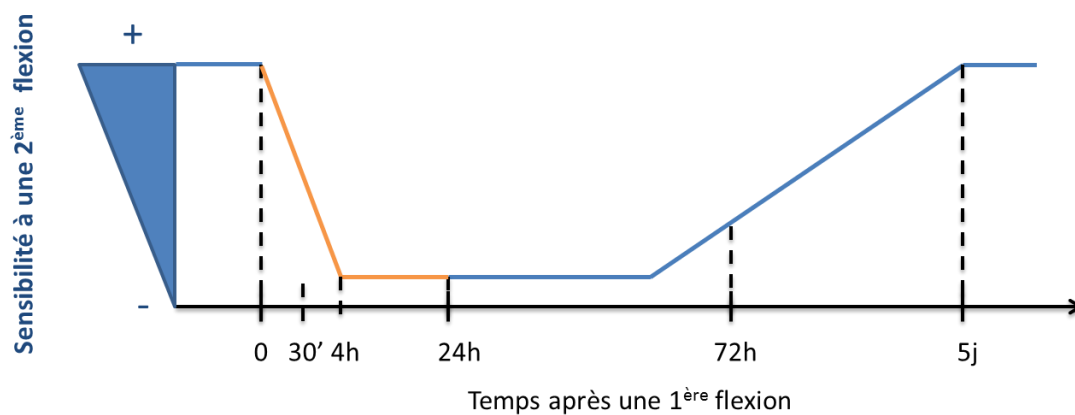


Figure 24 – Cinétique simplifiée de la sensibilité à la flexion du peuplier

Représentation schématique de la cinétique de la sensibilité de la tige du peuplier suite à l'application d'une seconde flexion séparée de 30 minutes (30'), 4 heures (4h), 24 heures (24h), 72 heures (72h) et 5 jours (5j) de la première. Cette cinétique est déduite à partir des profils d'expression de gènes mécano-régulés. Les éléments apportés par notre étude sont représentés en orange.

plus de déformations sont situées à sa périphérie (**Figure 4**). Une des hypothèses serait que les cellules vivantes du bois présentent une sensibilité plus importante aux sollicitations mécaniques. Cette différence de sensibilité au sein des tissus de la tige peut être expliquée par une localisation spécifique des mécanosenseurs. Plusieurs types de mécanosenseurs sont décrits dans la littérature (Monshausen et Gilroy, 2009 ; **Figure 6**). Dans l'équipe MECA de l'UMR PIAF, nous recherchons l'implication des récepteurs de type MSL dans la réponse aux flexions. En utilisant des anticorps anti-MSL1, nos résultats montrent une localisation plus importante de ces protéines dans les cellules vivantes du xylème secondaire jeune dont l'abondance est régulée par la flexion. Ces données sont en accord avec cette première hypothèse mais le rôle de la protéine MSL1 reste inconnu. Il serait intéressant d'étudier par hybridation *in situ* si les transcrits des gènes de réponses précoces co-localisent avec MSL1.

2. MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE D'ACCOMMODATION AU NIVEAU MOLECULAIRE

Les travaux de Martin *et al.* (2010) ont montré que l'expression de gènes mécano-induits était plus faible suite à l'application d'une seconde flexion de tiges de peupliers, 24h après la première. Nos résultats ont mis en évidence que ce phénomène est déjà mis en place lorsque l'on sépare les deux flexions de 4h (**Figure 24**). Dans un deuxième temps, nous avons regardé si cette accommodation est systémique au sein de la zone fléchie de la tige. Ainsi, nous avons analysé l'expression des gènes *TCH4*, *PtaZFP2* et *CML42*, auxquels nous avons ajouté 7 nouveaux gènes. Ces gènes candidats sont régulés différemment à 30 minutes et 72 heures, correspondant respectivement à la mise en place de l'accommodation et au retour à la sensibilité.

Ces résultats préliminaires nous ont permis d'écarter 4 gènes n'étant probablement pas impliqués dans l'accommodation. En effet, *MAP70* et *MYB69*, utilisés comme témoin de la différenciation cellulaire au moment où l'on observe une augmentation de la croissance radiale suite à la flexion (72h) ne s'expriment que dans le bois tendu, comme attendu. Plus surprenant, *LOS2* et *LOS4* présentent la même tendance d'expression que *MAP70* et *MYB69* alors que ce sont des gènes en lien avec le stress osmotique. Ils demeurent intéressants pour leur spécificité d'expression dans la zone en tension de la tige.

D'autre part, nos analyses montrent que tous les gènes ne sont pas soumis au phénomène d'accommodation de la même façon. Ainsi, *PtaZFP2* et *TCH4* sont soumis à l'accommodation dans toutes les parties de la tige sauf dans l'écorce tendue, *CML42* et *PtaRHE1* le sont dans la partie comprimée et *PCR2* et *ANK* uniquement dans le bois comprimé. De manière générale,

nous observons que plus l'expression des gènes est forte lors de la première flexion et plus le pourcentage d'induction lors de la deuxième flexion est faible. Dans le bois comprimé, tous les gènes étudiés sont fortement régulés et c'est la seule partie de la tige où tous ces gènes sont plus faiblement induits lors de la seconde flexion (à l'inverse dans l'écorce tendue). Nous suggérons l'existence d'un effet seuil de sollicitations perçues lors de la première flexion nécessaire pour observer la mise en place de l'accommodation.

Cependant, ces résultats sont préliminaires et nécessitent une confirmation par des répétitions biologiques et, si possible, par une localisation tissulaire des protéines (immunolocalisation *in situ*) et/ou des transcrits (hybridation *in situ*). Il est alors délicat d'émettre des hypothèses quant aux rôles des gènes candidats mécano-induits dans la voie de signalisation de l'accommodation.

3. DOUBLE HYBRIDE EN LEVURES

La protéine PtaZFP2 est un facteur de transcription susceptible d'être impliqué dans des interactions ADN-protéine mais aussi dans des interactions protéine-protéine *via* son domaine répresseur EAR. De plus, les peupliers surexprimant la protéine PtaZFP2 présentent une accommodation à la flexion. Dans le but de mieux comprendre le rôle de PtaZFP2, des partenaires protéiques ont été recherchés par une approche double hybride en levures. Le premier résultat de cette expérience est que la production de PtaZFP2 sans le motif DLN est toxique pour la croissance des levures, soulignant l'importance de ce motif pour la protéine.

La manipulation n'a pas pu être menée jusqu'au bout et plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les problèmes rencontrés lors du "mating". A la fin de chaque expérience, nous avons observé un déséquilibre dans les proportions proies-appâts qui pourraient expliquer la faible efficacité. Pour une rencontre optimale, les deux souches de levures de type sexuel différent se rencontrent spontanément en libérant des phéromones (facteurs α et a) détectées grâce à des récepteurs spécifiques, formant ainsi une cellule de levure diploïde. Or, il a été montré que des protéines ayant des homologies avec les récepteurs hormonaux des levures, bloqueraient la rencontre. Nous avons alors confronté la séquence de PtaZFP2 au génome de la levure *S. cerevisiae*. PtaZFP2 ne présente pas ce genre d'homologie. Cependant, nous avons trouvé une homologie avec deux protéines à doigts de zinc de type C2H2 : MIG1 et MIG2 (Lutfiyya *et al.*, 1998). Il s'agit de répresseurs transcriptionnels induits en réponse à une carence en glucose (Karunanithi et Cullen, 2012) et impliqués dans la croissance filamenteuse des levures. Les mêmes auteurs ont décrit que MIG1 diminue la sensibilité à la perception des phéromones lors du "mating". On peut se demander si la production de PtaZFP2 interfère avec ces mécanismes. Pourtant, des études d'interactions

protéine-protéine impliquant ZAT10 (homologue de PtaZFP2 chez *A. thaliana*, Nguyen *et al.*, 2012) et PtiZFP1 (un équivalent de PtaZFP2 chez *Populus trichocarpa* ; Hamel *et al.*, 2011), ont été réalisées chez la levure et les auteurs ne décrivent pas de problèmes particuliers. Dans leur cas, la protéine à doigts de zinc a été utilisée en tant que protéine proie (liée au domaine AD du facteur de transcription GAL4) alors que nous avons utilisé PtaZFP2 en tant que protéine appât (en fusion avec le domaine DBD). Pour déterminer si le problème de rencontre provient uniquement de la protéine PtaZFP2, une interaction entre la banque ADNc et une autre protéine appât pourrait être testée.

Un autre mécanisme, même s'il ne se produit que très rarement en laboratoire, consiste en un changement de type sexuel de l'une des souches qui pourrait empêcher les deux souches de se rencontrer. Ce changement de type sexuel est lié à un réarrangement chromosomique programmé, impliquant le locus MAT (Mating-type locus, Wu et Haber, 1996). Au cours de ce processus, une cellule haploïde se divise par bourgeonnement puis la cellule mère change de type sexuel. Deux cellules de type sexuel différent sont donc générées. Il pourrait être intéressant de vérifier par PCR, en utilisant des amorces spécifiques des deux types de loci MAT, que nos levures n'ont pas subi de telles modifications.

Pour mettre en évidence des partenaires protéiques de PtaZFP2 nous pouvons recommencer la manipulation de double hybride en levures, en testant au préalable toutes nos hypothèses concernant les problèmes rencontrés. Sinon, nous pouvons utiliser d'autres techniques d'interaction protéine-protéine telles que le double hybride bactérien ou la technique de pull down assay. La banque ADNc construite en levures constitue un outil qui pourra être utilisé pour tester d'autres types d'interaction.

En conclusion, cette approche visait à mieux localiser les étapes de la voie de signalisation suite à une ou deux flexions. Les résultats montrent des niveaux de réponse différents entre les faces tendue et opposée de la tige, pouvant être expliqués soit par le système de flexion utilisé actuellement, soit par la nécessité de prendre en compte d'autres paramètres physiques que la déformation dans la perception du signal. Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent également l'existence d'une différence de sensibilité entre les cellules de la tige. Confirmée plus finement, cette différence de sensibilité serait un atout pour faire le lien avec les mécanorécepteurs putatifs décrits dans la littérature.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D (2003). Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiology* **133**: 482-491.

Becerra C, Jahrman T, Puigdomenech P and Vicient CM (2004). Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis* : characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene*. **340**: 111-21.

Bopopi JM, Vandeputte OM, Himanen K, Mol A, Vaessen Q, El Jaziri M and Baucher M (2010). Ectopic expression of *PtaRHE1*, encoding a poplar RING-H2 protein with E3 ligase activity, alters plant development and induces defence-related responses. *Journal experimental botany*. **61**: 297-310

Boyer N (1967). Modification de la croissance de la tige de bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*. **267**: 2114-2117.

Braam J, Davis RW (1990). Rain-induced, wind-induced, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**: 357-364.

Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B (2012). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **158**: 423-38.

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

Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song LH, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R (2007). The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein ZAT7 plays a key role in the defense response of *Arabidopsis* to salinity stress. *Journal of Biological Chemistry*. **282**: 9260-9268.

Coutand C, Moulia B (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1825-1842.

Coutand C, Julien JL, Moulia B, Mauget JC, Guitard D (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1813-1824.

Coutand C, Dupraz C, Jaouen G, Ploquin S, Adam B (2008). Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: Demonstration with young *Prunus avium* trees. *Annals of Botany* **101**: 1421-1432.

- Coutand C, Martin L, Leblanc-Fournier N, Decourteix M, Julien JL, Moulia B** (2009). Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and *PtaZFP2* gene expression in poplar. *Plant Physiol.* **151**: 223-232
- Gong, Z, Lee, H, Xiong, L, Jagendorf, A, Stevenson, B, and Zhu JK.** (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **99**: 11507–11512.
- Goodman AM, Ennos AR** (1996). A comparative study of the response of the roots and shoots of sunflower and maize to mechanical stimulation. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1499-1507.
- Hamant O, Heisler MG, Jonsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J** (2008). Developmental Patterning by Mechanical Signals in Arabidopsis. *Science* **322**: 1650-1655.
- Hamel LP, Benchabane M, Nicole MC, Major IT, Morency MJ, Pelletier G, Beaudoin N, Sheen J, Séguin A.** (2011). Stress-responsive mitogen-activated protein kinases interact with the EAR motif of a poplar zinc finger protein and mediate its degradation through the 26S proteasome. *Plant Physiology.* **157**:1379-93.
- Haswell ES, Meyerowitz EM** (2006). MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**: 1-11.
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM** (2008). Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* **18**: 730-734.
- Hill K, Wang H, Perry SE** (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant Journal.* **53**: 172–185
- Jaffe MJ** (1973). Thigmomorphogenesis. The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114** : 143-157.
- Jaffe MJ, Leopold AC, Staples RC** (2002). Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany* **89**: 375-382.
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K** (2010). Genome-wide analysis of ethylene responsive element binding factor associated amphiphilic repression motif containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**: 1109-1134

Karunanithi S and Cullen PJ (2012). The filamentous growth MAPK pathway responds to glucose starvation through the MIG1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **192**:869-87.

Kazan K (2006). Negative regulation of defense and stress genes by EAR motif containing repressors. *Trends in Plant Science*. **11**: 109-112

Kern KA, Ewers FW, Telewski FW, Koehler L (2005). Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiology* **25**: 1243-1251.

Leblanc-Fournier N, Coutand C, Crouzet J, Brunel N, Lenne C, Moulia B, Julien JL (2008). Jr-ZFP2, encoding a Cys2/His2-type transcription factor, is involved in the early stages of the mechano-perception pathway and specifically expressed in mechanically stimulated tissues in woody plants. *Plant Cell and Environment* **31**: 715-726.

Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B and Zhu JK (2002). *LOS2*, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO Journal*. **21**:2692-702.

Lee D, Polisensky DH, Braam J (2005). Genome-wide identification of touch- and darkness regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and *XTH* genes. *New Phytologist* **165**: 429-444.

Legue V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D, Gilroy S (1997). Cytoplasmic free Ca^{2+} in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiology* **114**: 789-800.

Lutfiyya LL, Iyer VR, DeRisi J, DeVit MJ, Brown PO, Johnston M (1998). Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **150**:1377–1391

Martin L (2009) Etude des étapes précoces de la mécanoperception chez le peuplier : approches biomécaniques et moléculaire. Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Martin L, Leblanc-Fournier N, Azri W, Lenne C, Henry C, Coutand C, Julien JL (2009). Characterization and expression analysis under bending and other abiotic factors of PtaZFP2, a poplar gene encoding a Cys2/His2 zinc finger protein *Tree Physiology* **29**: 125-136.

Martin L, Leblanc-Fournier N, Julien JL, Moulia B, Coutand C (2010). Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *Journal of Experimental Botany*. **61**: 2403-2412

Meng SX, Lieffers VJ, Reid DEB, Rudnicki M, Silins U, Jin M (2006). Reducing stem bending increases the height growth of tall pines. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3175-3182.

Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009). Ca^{2+} regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **21**: 2341-2356.

Monshausen GB, Gilroy S (2009) Feeling green: mechanosensing in plants. **19**: 228-235.

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

Moulia B, Der Loughian C., Bastien R, Martin L, Rodríguez M, Gourcilleau D, Barbacci A, Badel E, Franchel J, Lenne C, Roedel-Drevet P, Allain J M, Frachisse JM, de Langre E, Coutand, Leblanc-Fournier N, Julien J L (2011). *Springer*. **9**:269-302.

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

Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H (2007) *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**: 3639-3644

Nguyen XC, Kim SH, Lee K, Kim KE, Liu XM, Han HJ, Thi Hoang MH, Lee SW, Hong JC, Moon YH and Chung WS (2012). Identification of a C2H2-type zinc finger transcription factor (ZAT10) from *Arabidopsis* as a substrate of MAP kinase. *Plant Cell Reports*. **31**:737-45.

Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme, Takagi M (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*. **13**: 1959-1968

Pesquet E, Korolev AV, Calder G, Lloyd CW (2010). The Microtubule-Associated Protein AtMAP70-5 regulate secondary wall patterning in *Arabidopsis* wood cells. *Current Biology*. **20**:744–749.

Pilate G, Chabbert B, Cathala B, Yoshinaga A, Leple JC, Laurans F, Lapierre C, Ruel K (2004). Lignification and tension wood. *Comptes Rendus Biologies* **327**: 889-901.

Porter BW, Zhu YJ, Webb DT, Christopher DA (2009). Novel thigmomorphogenetic responses in *Carica papaya*: touch decreases anthocyanin levels and stimulates petiole cork outgrowths. *Annals of Botany* **103**: 847-858.

Pruyn ML, Ewers BJ, Telewski FW (2000). Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiology* **20**: 535-540.

Sack FD (1991). Plant Gravity Sensing. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **127** : 193-252.

Sakamoto H, Araki T, Meshi T, Iwabuchi M (2000). Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys(2)/His(2)-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene* **248**:23-32.

Schopfer P (2006). Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany*. **93**: 1415-1425.

Sedgwick, SG, Smerdon, SJ (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochemistry Science*. **24**:311 –316.

Serrano M, Parra S, Alcaraz LD, Guzman P (2006). The ATL gene family from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* comprises a large number of putative ubiquitin ligases of the RING-H2 type. *Journal of Molecular Evolution*. **62**: 434–445.

Song,WY, Choi KS, Kim,DY, Geisler M, Park J, Vincenzetti V, Schellenberg,M, Kim,SH, Lim,YP, Noh EY, Lee Y and Martinoia E (2010). *Arabidopsis* PCR2 is a zinc exporter involved in both zinc extrusion and long-distance zinc transport. *Plant Cell*. **22**:2237-52.

Stull, RB (1988). An Introduction to Boundary Layer Meteorology. *Springer*. 670 pp.

Telewski FW, Pruyn M (1998). Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmusamericana* seedlings. *Tree Physiology* **18**: 65-68.

Telewski FW (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany* **93** : 1466-1476.

Wolfe S, Nekludova L, Pabo C (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29**: 183-212

Wright AJ, Knight H, Knight MR (2002). Mechanically stimulated *TCH3* gene expression in *Arabidopsis* involves protein phosphorylation and *EIN6* downstream of calcium. *Plant Physiology* **128**: 1402-1409.

Wu X and Haber JE (1996). A 700 bp cis-acting region controls mating-type dependent recombination along the entire left arm of yeast chromosome III. *Cell*. **87**:277-85.

Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC, Braam J (1995). *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a Xyloglucan Endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**: 1555-1567.

Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, Nakano M, Imamura T, Kataoka H, Terashima A, Iida K, Kojima I, Katagiri T, Shinozaki K, Iida H (2010). MCA1 and MCA2 that mediate Ca^{2+} uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 1284-1296.

Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL and Ye ZH (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **20**:2763-82.

ANNEXES

Annexe 1 – Solution nutritive de la culture hydroponique des plants de Peupliers

Solution mère de macro-éléments

Composés	Formule Brute	Poids Moléculaire (en g/mol⁻¹)	Concentration Molaire Finale (en mol/L⁻¹)
Chlorure de sodium	NaCl	58,44	0,17
Sulfate de magnésium	MgSO ₄ , 7H ₂ O	246,48	1,10
Sulfate d'ammonium	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,13	0,55
Nitrate de calcium	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	236,15	1,46
Nitrate de potassium	KNO ₃	101,1	2,00
Dihydrogénophosphate de potassium	K ₂ HPO ₄	174,18	1,10
Di-potassium hydrogéno-phosphate	KH ₂ PO ₄	136,09	1,10

Solution mère de micro-éléments

Composés	Formule Brute	Poids Moléculaire (en g/mol⁻¹)	Concentration Molaire Finale (en mol/L⁻¹)
Molybdate d'ammonium	(NH ₄) ₂ MoO ₄	196,01	0,51
Sulfate de manganèse	MnSO ₄ , H ₂ O	169,02	3,61
Sulfate de zinc	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	287,53	3,06
Acide borique	H ₃ BO ₃	61,83	9,06
Sulfate de cuivre	CuSO ₄	159,6	1,23
Masquolate de fer	Fe-EDDHA		2% final

Les solutions mères sont conservées à 4°C sauf le KNO₃ qui est conservé à température ambiante.

Préparation de la solution nutritive

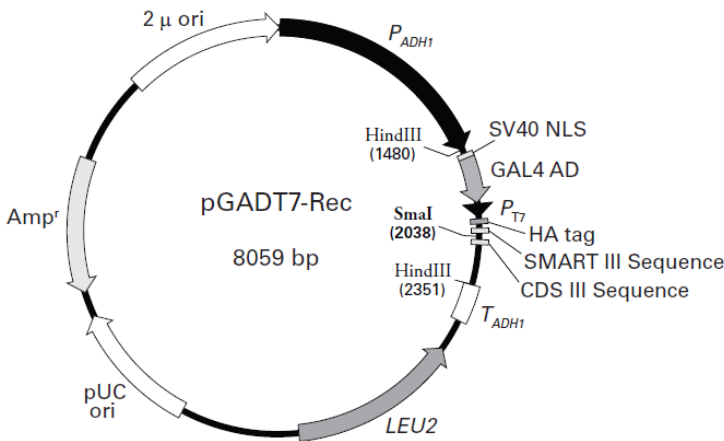
Pour 20 L de solution nutritive finale, on mélange :

- 10 mL de chaque macro-élément
- 4 mL du mélange de micro-éléments
- 2 mL de masquolate de fer
- Qsp eau 20 L

Annexe 2 – Génotypes des souches de levures utilisées dans le système double hybride

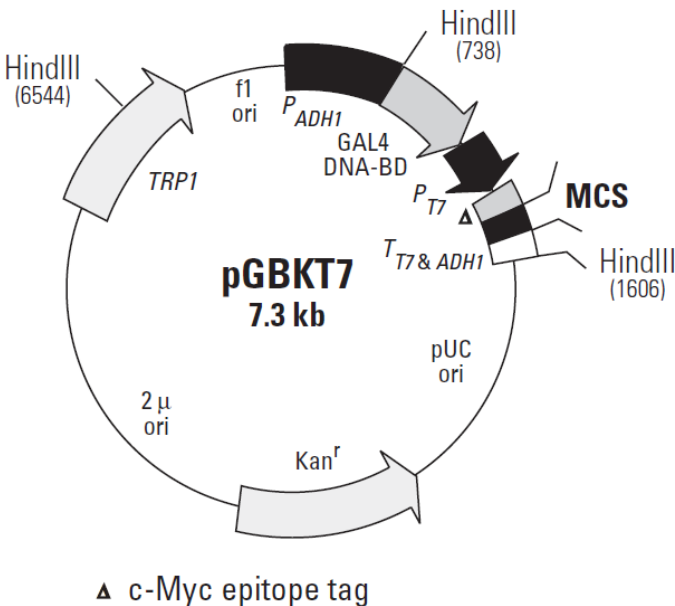
Souches de levures	Génotype
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, URA3 :: GAL1UAS-Gal1TATA-LacZ, MEL1</i>
Y2HGold	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1 UAS -Gal1 TATA -His3, GAL2 UAS -Gal2 TATA -Ade2, URA3 :: MEL1 UAS-Mel1 TATA, AUR1-C MEL1</i>

Annexe 3 – Cartes des plasmides pGADT7-Rec et pGBKT7



- *P_{ADH1}* (full-length *S. cerevisiae ADH1* promoter): 7–1479
- GAL4 AD (GAL4 activation domain with SV40 nuclear localization signal [NLS]): SV40 NLS: 1501–1557
GAL4 AD (amino acids 768–881): 1561–1899
- *P_{T7}* (T7 RNA polymerase promoter): 1905–1927
- HA tag (hemagglutinin epitope tag): 1942–1968
- SMART III Oligonucleotide sequence: 2001–2036
- CDS III Primer sequence: 2047–2071
- *T_{ADH1}* (*S. cerevisiae ADH1* Terminator): 2351–2676
- *LEU2* coding sequences: 2794–3885 (complementary)
- pUC ori (pUC replication origin): 4652–5489
- Amp_r (ampicillin resistance gene): 5646–6503 (complementary)
- 2 μ ori (yeast 2 μ replication origin): 7069–8059

- Truncated *S. cerevisiae ADH1* promoter (*P_{ADH1}*): 30–736
- GAL4 DNA binding domain (DNA-BD) polypeptide amino acids 1–147: 762–1202
- T7 RNA polymerase promoter: 1212–1235
- c-Myc epitope tag: 1248–1280
- Multiple Cloning Site: 1281–1334
- Transcription termination signals
T7 terminator: 1335–1381
ADH1 terminator: 1414–1610
- pUC plasmid replication origin: 1838–2636
- Kanamycin resistance gene: 4144–3222
- Yeast 2 μ replication origin: 4148–5493
- *TRP1* coding sequences
promoter: 5559–6755
gene: 6031–6705
- f1 bacteriophage origin of replication: 6756–29



Annexe 4 – Composition et rôle des milieux de culture de levures

Nom du milieu	Composants	Souches sélectionnées
Milieux de culture de maintien, non sélectif		
0.5X YPDA	YPD Broth 25 g/l, Adénine Hemisulfate 40 mg/l, pH6	Y187 et Y2HGold
1X YPDA	YPD Broth 50 g/l, Adénine Hemisulfate 80 mg/l ; pH6	
2X YPDA	YPD Broth 100 g/l, Adénine Hemisulfate 160 mg/l, pH6	
Milieux de culture de maintien, sélectifs		
SD/-Trp	YBN 1,7g/l, Amonium sulfate 5g/l, Drop out without Tryptophane 1,55g/l, pH=5,9 ; glucose 40% (40ml/l)	Y2HGold
SD/-Leu	YBN 1,7g/l, Amonium sulfate 5g/L, Drop out without leucine 1,6g/L ; pH=5,9; glucose 40% (40 ml/L)	Y187
Milieux de culture sélectifs		
SD/-Trp/-Leu	YBN 1,7g/L, Amonium sulfate 5g/L, Drop out without Leucine and Tryptophane 1,55g/L ; pH=5,9 ; glucose 40% (40 ml/L)	Cellules de levures diploïdes
SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/Aba	YBN 1,7g/L, Amonium sulfate 5g/L, Drop out without Leucine and Tryptophane 1,55g/L ; pH=5,9 ; glucose 40% (40 ml/L) ; X- α -Gal 40 μ g/mL ; Auréobasidine (Aba) 125 μ g/mL	Cellules de levures diploïdes présentant une interaction physique entre les protéines recombinantes proies et appâts
SD/-Trp/-Leu/-Adé/-His/X- α -Gal/Aba	YBN 1,7g/L, Amonium sulfate 5g/L, Drop out without Leucine, Tryptophane, Histidine et Adenine 0,6g/L (Clontech) ; pH=5,9 ; glucose 40% (40 ml/L) ; X- α -Gal 40 μ g/mL ; Auréobasidine (Aba) 125 μ g/mL	

Annexe 5 – Gènes rapporteurs de la souche de levure Y2HGold du système de double hybride Matchmaker™ (Clontech)

Nom du gène rapporteur	Description
<i>AUR1-C</i>	Version mutée du gène AURI codant pour l'enzyme inositol phosphoryl ceramide synthase. Son expression confère une forte résistance à l'antibiotique Auréobasidine (Aba).
<i>HIS3</i>	YH2Gold est incapable de synthétiser de l'histidine et ne peut donc pas pousser sur du milieu qui ne possède pas cet acide aminé essentiel. L'expression du gène HIS3 permet donc à la souche de levure de se développer sur un milieu dépourvu d'histidine.
<i>ADE2</i>	YH2Gold est incapable de synthétiser de l'adénine et ne peut donc pas pousser sur du milieu qui ne possède pas cet acide aminé essentiel. L'expression du gène <i>ADE2</i> permet donc à la souche de levure de se développer sur un milieu dépourvu d'adénine.
<i>MEL1</i>	Code pour l' α -galactosidase, une enzyme naturellement présente dans de nombreuses souches de levures. Lorsque ce gène rapporteur est activé, l'enzyme est produite et les levures prennent une teinte bleutée si le substrat chromogénique X- α -Gal est ajouté au milieu nutritif.

Annexe 6 – Séquences des amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR de ZFP2 avec ou sans DLN

Les amorces sens et anti-sens utilisées pour amplifier le gène *ZFP2* par PCR doivent contenir 24 pb homologues avec l'appât (*ZFP2*) (séquence en bleu) et 15 pb homologues avec la partie 5' de pGBKT7 linéarisé (séquence en noire). Le but est de conserver les sites BamH1 et EcoR1 intacts. Les T_m sont de 62°C pour les trois amorces.

Amorces	Séquences (5' vers 3')
Sens <i>ZFP2</i> avec ou sans DLN	5'-CATGGAGGCCGAATTCATGAAGAGAGATAGAGAACAGGTA-3'
Anti-Sens <i>ZFP2</i> avec DLN	5'-GCAGGTCGACGGATCCTTAGATAAAACATCTCAACATGGG-3'
Anti-Sens <i>ZFP2</i> sans DLN	5'-GCAGGTCGACGGATCCTTATCTCTTGCTGCTATTGGATCT -3'

