Université catholique de Louvain

Faculté d'Ingénierie biologique, agronomique et environnementale

Earth and Life Institute (ELI) – *Agronomy*
Crop physiology and plant breeding

Analyse phénologique et caractérisation de mécanismes cellulaires impliqués dans la formation des racines latérales chez l'orge.

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique par

Aurélie Babé

Composition du Jury:
Prof. H. BATOKO, lecteur
Prof. T. BEECKMAN, lecteur
Prof. F. CHAUMONT, lecteur
Prof. L. LAPLAZE, lecteur

Président : Prof. J. MAHILLON
Promoteur : Prof. X. DRAYE

Mars 2011

Une thèse est rarement le fruit d'un parcours en solo, mais bel et bien le résultat d'une multitude de rencontres, de volontés encouragées et encourageantes, d'efforts communs, de réflexions, de soutiens, d'interrogations, de réponses partagées. Quatre belles années viennent de s'écouler, et je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens avant toute chose à remercier Xavier Draye, Promoteur de ce travail, pour sa confiance, sa supervision, son dynamisme, la qualité de ses explications, et les efforts qu'il a déployés afin de me permettre de réaliser cette thèse. Tout au long de ces quatre années, il a su orienter mes recherches aux bons moments en me faisant découvrir combien le système racinaire des plantes peut être à la fois complexe et passionnant. Il est difficile de faire passer toute ma gratitude en quelques lignes, que tout soit condensé dans un grand MERCI !

Je remercie également Laurent Laplaze, Tom Beeckman, François Chaumont et Henri Batoko, d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Leurs remarques et commentaires ont jeté un courant d'air frais qui m'a permis de clarifier certains points de ce manuscrit.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des membres de l'unité ECAV, à tous les thésards du labo qui contribuent à faire perdurer une ambiance de travail très agréable et à qui je souhaite bonne chance pour la suite. Viviane, Isabelle, merci pour votre soutien, votre aide, vos encouragements dans mes moments de doute... nos petites séances de papotage vont réellement me manquer !!!

A grand merci à Anne-so, Valérie, Aline, Myriam, Elsy pour votre soutien et vos encouragements tout au long de cette aventure ainsi que pour nos fabuleuses soirées entre filles....

Je remercie enfin mes parents, mon frère, Sébastien et ma sœur Céline, qui malgré la distance ont toujours été là pour moi !! Merci également à ma belle-famille pour leur soutien.

Le mot de la fin, mais sans nul doute le plus important pour moi, va évidemment à Jean-Martin, qui fut d'abord un coloc, puis fiancé et futur mari... Merci de m'avoir soutenue ces derniers mois, malgré mon caractère difficile voir insupportable dans les périodes de stress (c'est-à-dire plus ou moins ces 6 derniers mois). Toujours patient et attentif.... Merci d'être là tous les jours. Et pour nous, l'aventure ne fait que commencer...

Merci à toutes et à tous,

Aurélie

Summary

The plasticity of branching patterns of plants plays a crucial role in the capture of resources from unpredictable, heterogeneous and dynamic soil environments. This plasticity relies on the plant ability to regulate the site and time of lateral root initiation. It may involve various steps of their developmental program.

In this thesis, we first described the scheme of lateral root formation in barley and compared it with the reference model available for Arabidopsis thaliana. We could reveal several important differences which make the cereal case unique: the contribution of the endodermis, the division of cortex cells and the circumferential position of lateral root initiation sites.

We then developed a novel method to analyse early steps of the regulation of lateral root formation. This method is based on the time-lapse analysis of growth and branching events following the application of a transient treatment that blocks the formation of lateral roots.

We first showed, in Hordeum vulgare and Zea mays seedlings grown in aeroponics that the distal segment of the seminal root formed during a transient water shortage is devoid of lateral roots. Using a detailed microscopic analysis, we showed that this treatment blocks lateral root formation within a small window of developmental stages. This was confirmed by the time-lapse analysis which pointed to a region of the seminal root that matches the occurrence of these stages. We showed further that abscissic acid produces the same response as the water shortage and that auxin is able to prevent this response.

While those data are insufficient to set the basis of a mechanistic model of transduction of the drought signal into an inhibition of lateral root formation, several observation lead us to propose that ABA could act upstream of the establishment of auxin maxima that precede the formation of lateral roots. ABA could be involved in the modulation of auxin transport as suggested by other studies, but further experiments are needed to test this hypothesis.

Table des matières

Préambule *1*

Introduction *1*

La genèse du système racinaire **1**

La formation des racines latérales: d'une cellule à un organe **2**

Deux séquences de formation: acropète et non acropète 2

Activation des cellules fondatrices 4

Développement: d'un primordium à un organe indépendant. 6

L'émergence de la racine mère 7

Régulation de la formation des racines latérales **8**

L'auxine, un régulateur positif du développement de la plante 9

La signalisation induite par l'auxine 9

Transport 11

L'auxine et la formation des racines latérales. 13

Les cytokinines, des régulateurs endogènes de la formation des racines latérales 15

L'acide abscissique bloque l'émergence des primordia 16

Influence des facteurs environnementaux sur la formation des racines latérales 17

Influence des nutriments sur la formation des racines latérales 18

L'eau et le développement des racines latérales 20

Effet de la lumière sur l'architecture racinaire 20

Objectifs et stratégie scientifique *23*

Chapitre 1…… Etude histologique et dynamique de la formation des racines latérales chez Hordeum vulgare *28*

Introduction **28**

Résultats et discussion **29**

L'initiation du primordium a lieu en face d'un pôle de protophloème 29

Développement du primordium, un processus multi-phasique 31

L'initiation des racines latérales 31

Développement du primordium 34

Emergence du primordium 38

Les conséquences de l'initiation des racines latérales pour la racine mère 39

Etablissement d'une connexion vasculaire entre la racine mère et la RL 40

La division des cellules du cortex : un passage pour le primordium au travers de la racine mère 40

Caractère acropète de la formation des racines latérales chez l'orge 43

Conclusion **46**

Chapitre 2... Inhibition de l'initiation des racines latérales chez l'orge et le maïs en réponse à un déficit hydrique transitoire 49

Introduction **49**

Résultats **50**

Inhibition de la formation des racines latérales en réponse à un déficit hydrique transitoire 50

L'inhibition de la formation des racines latérales est provoquée par un déficit hydrique (résultats de T. Lavigne) 51

L'inhibition de la formation des racines latérales est un phénomène irréversible (résultats de T. lavigne) 52

Cette inhibition intervient à un stade précoce de l'initiation 53

L'inhibition progresse de manière acropète 55

Discussion **57**

Conclusions **59**

Chapitre 3..... Localisation du site d'interférence entre le déficit hydrique et la formation des racines latérales..... 60

Introduction **60**

Résultats **61**

Modélisation de la composante spatiale 61

Les cellules fondatrices occupent leur position définitive au moment où elles subissent le stress 62

La zone interférence entre la formation des racines latérales et le déficit hydrique est à une distance fixe de l'apex 66

Le déficit hydrique appliqué influence la vitesse de croissance 69

Expression de la position de la zone d'inhibition en une durée fonction de la vitesse de croissance de la racine primaire 74

Discussion **75**

Mise au point d'une méthode indirecte de positionnement permettant de délimiter la région d'un organe en croissance dans laquelle est initiée la transduction d'un signal de l'environnement ayant des effets localisée 75

Oscillation circadienne de la vitesse de croissance racinaire 76

Influence du déficit hydrique sur le développement des racines latérales : une interférence au niveau d'un stade donné 77

Chapitre 4.. Intervention de l'auxine et de l'acide abscissique dans la réponse morphologique au déficit hydrique 79

Introduction **79**

Résultats 80
Interférence entre le déficit hydrique et l'auxine.....80
L'auxine exogène stimule la formation des racines latérales en présence d'un déficit hydrique 80
L'auxine lève l'inhibition de la formation des racines latérales 82
Un nouveau rôle pour l'ABA dans la formation des RL.....84
Une application exogène d'ABA bloque la formation des racines latérales 84
L'ABA provoque un arrêt de la formation des racines latérales dès leur initiation 87
Influence d'une application exogène d'ABA sur la vitesse de croissance des plantes.....87
L'interférence entre l'initiation des racines latérales et l'ABA a lieu à une distance fixe de l'apex 90
L'acide abscissique pourrait jouer un rôle dans la régulation de la formation des racines latérales en réponse au déficit hydrique.....90
L'acide abscissique bloque l'initiation des racines latérales chez Arabidopsis 93

Discussion 97
Le déficit hydrique appliqué interfère avec le transport basipète de l'auxine 97
Une application exogène d'ABA mime l'effet du déficit hydrique 100
L'inhibition de l'initiation des racines latérales, une nouvelle fonction pour l'ABA 101
L'ABA induit un ralentissement de la croissance.....102
Existe-t-il un lien entre les effets de l'ABA sur la croissance et sur l'initiation des racines latérales?.....103

Chapitre 5.....Cartographie longitudinale de l'expression des gènes 104

Introduction 104
Cartographie de l'expression du gène ALF4 105
Effet du déficit hydrique sur l'expression du gène ALF4 106
Evolution de l'expression du Contig-10961 (homologue bZip) dans les échantillons racinaires lors de l'application d'un déficit hydrique 111

Discussion 113
Le gène ALF4 ne paraît pas être impliqué dans l'inhibition de la formation des racines latérales en réponse au déficit hydrique.....113
Le déficit hydrique appliqué modifie l'expression du contig_10961. 114

Chapitre 6..... Conclusions et perspectives 118

Conclusions 118

Perspectives 123

Chapitre 7. Matériels et Méthodes 126

Conditions de culture des plantes 126
Germination et mise en culture des semences d'Orge 126
Germination et mise en culture des semences de Maïs 126

Application du déficit hydrique 127

Détermination de la vitesse de croissance des axes racinaires : méthode du time-lapse 127

Positionnement de la zone inhibée par rapport à la base de la racine 128
Détermination des vitesses de croissance et de la position de l'apex au différents temps (avant et après) la période de déficit hydrique. 128
Détermination de la distance séparant l'apex de la limite proximale et distale de la zone dépourvue de RL par modélisation inverse 129
Calcul des écarts d1 et d2 en une distance exprimée en mm : 129
Calcul des écarts d1 et d2 sur une échelle temporelle : 131

Analyse cinématique de la croissance 131
Acquisition des séquences d'images 131
Analyse des séquences d'images 133
Principe de la détermination de la vélocité 133
Principe de la détermination du taux de croissance relatif local. 134

Application exogène de la solution d'auxine 134

Analyse de l'effet de l'ABA 135
Application d'une solution exogène d'acide abscissique sur des racines d'orge 135
Conditions de croissance et application de l'acide abscissique sur des plantules d'Arabidopsis 136
Dosage de l'ABA dans les échantillons racinaires des plantules d'orge 136

Analyse histologie 137

Technique de biologie moléculaire 138
Récolte des échantillons racinaire 138
Extraction de l'ARN total et synthèse du cDNA 139
Amplification des gènes par qPCR 139
Choix des couples d'amorces. 139
Réaction d'amplification par qPCR 140
Analyse statistique de l'expression du gène ALF4 141
Analyse statistique de l'expression du contig_10961 142

Liste des abréviations :

ABA : Acide Abscissique
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ALF : Aberant Lateral root formation
ANOVA: Analyse de la variance
ARF : Auxin Response Factor
ARN : Acide Ribonucléique
Aux/IAA : Auxin/indol-3-acid
Bp : paire de base
°C: degré celsius
CCD : Charge Coupled Device
CMR : Carré Moyen Résiduel
CK: Cytokinines
COL3: CONSTANS-LIKE3
CWR: Cell Wall Remodeling
CYC: Cycline
DEPC : pyrocarbonate d'éthyle
dNTP: désoxyribonucléotides tri-phosphate
dpi: dots per inch.
DTT: dithiothréitol
e.g : exempli gratia
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EST: expressed sequence tag
FAA: Formaldéhyde, acide acétique, éthanol
GFP: green fluorescent protein
IBA: acide indole-3-butyrique
IAA: acide indole-3-acétique ou Auxine
IC : intervalle de confiance
KRP: Kip Related Protein
LAX3 : Like Aux1
LR : Racine latérale
LRIS: lateral root induction system
µmole.m^{-2}.s^{-1} : micromoles par mètres et par secondes
NAA: acide 1-Naphthaleneacetic
ng: nanogramme
NPA : acide 1-naphthyphthalamique
NIR : proche infrarouge
PCR : réaction de polymérisation en chaine
PVC : polychlorure de vinyle ou chlorure de polyvinyle
qPCR : réaction de polymérisation en chaine semi-quantitative

REGR : Relative Elementary Growth Rate ou taux de croissance relatif

RT : reverse transcriptase

RT-qPCR : Reverse transcriptase semi-quantitative Polymerase Chain Reaction

SLR: SOLITARY ROOT

TIR1: TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1

Tm: température de fusion

v/v: volume par volume

VP: viviparous

ZI : Zone inhibée

ZR : Zone ramifiée

ZNR : Zone non ramifiée

PRÉAMBULE

Du fait de la distribution hétérogène des ressources du sol, l'évolution a favorisé la mise en place de mécanismes de plasticité permettant aux plantes d'adapter leur architecture racinaire et de maximiser les chances d'assurer leur ancrage et leur alimentation hydrique et minérale[11-12].

Un volet important de cette plasticité concerne les racines latérales, dont la formation et la croissance peuvent être stimulées ou réprimées en fonction de l'environnement racinaire[13-14] ou par diverses voies de signalisation internes manifestant le statut hydrique et nutritif de la plante[15]. Ces racines, qui se forment tout au long du développement de la plante sur les axes primaires du système racinaire ou sur d'autres latérales, représentent l'essentiel de la longueur d'un système racinaire et développent l'interface avec la plus grande partie du volume de sol exploré par la plante[16]. Elles sont donc d'une importance majeure pour l'acquisition de l'eau et des éléments minéraux[17]. C'est d'ailleurs à leur niveau qu'a lieu l'essentiel de l'absorption de l'eau et des éléments minéraux nécessaires à la croissance de la plante[18-19]. La formation de ces racines est donc un processus clé dans la croissance et le développement des plantes.

L'architecture du système racinaire (RSA) résulte de l'action dynamique des différents processus relatifs à la croissance et au développement des axes racinaires (primaires, séminaux ou adventifs), incluant l'initiation, l'émergence et le développement des racines latérales[20]. Sa plasticité implique que les plantes disposent de mécanismes leur permettant de percevoir les informations provenant de l'environnement et de les incorporer dans leur programme de développement afin de modifier leur architecture racinaire, par exemple en favorisant le développement racinaire dans les régions du sol ou ces ressources sont les plus présentes.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes de régulation, en particulier ceux dont dépendent les patrons de ramification, devrait nous aider à manipuler l'architecture racinaire et créer des génotypes mieux

adaptés aux conditions climatiques et édaphiques contemporaines. A cette motivation s'ajoute celle de fournir à la communauté scientifique des lignées quasi-isogéniques qui diffèrent par leur architecture et qui permettent d'étudier le rôle de l'architecture dans le fonctionnement du système sol-plante-atmosphère.

A ce jour, la plupart des études concernant la formation des racines latérales et la régulation de cette formation ont été réalisées chez l'espèce modèle Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). Pour ce qui est des espèces d'intérêt agronomique, les informations disponibles sont beaucoup plus limitées. Le projet proposé s'inscrit dans la recherche des voies de régulation de la position et de la fréquence de formation des racines latérales chez l'orge (*Hordeum vulgare*) avec, par endroit, référence à une autre céréale, le maïs (*Zea mays*).

INTRODUCTION

LA GENÈSE DU SYSTÈME RACINAIRE

Le système racinaire mature des plantes est formé de deux types de racines : les racines embryonnaires, formées au cours de l'embryogénèse (racine(s) séminale(s), parfois qualifiée de primaire) et les racines post-embryonnaires qui se forment plus tard, au départ de tissus plus ou moins différenciés (racines latérales et adventives). Par extension, de nombreux auteurs décrivent un système racinaire embryonnaire comme un système constitué de la racine séminale et de ses ramifications, bien que celles-ci soient post-embryonnaires, et le système post-embryonnaire comme un système comportant les racines adventives et leurs ramifications.

L'importance de ces deux types de racines varie au cours de la vie de la plante et en fonction de l'espèce. Chez de nombreuses dicotylées, telles qu'Arabidopsis, le système racinaire est construit autour de la racine primaire, laquelle reste active tout au long du développement de la plante. Au contraire, chez les monocotylées telles que le riz, le maïs et l'orge, le système racinaire embryonnaire disparaît le plus souvent au cours du développement et est remplacé par un grand nombre de racines adventives[21] (figure 1).

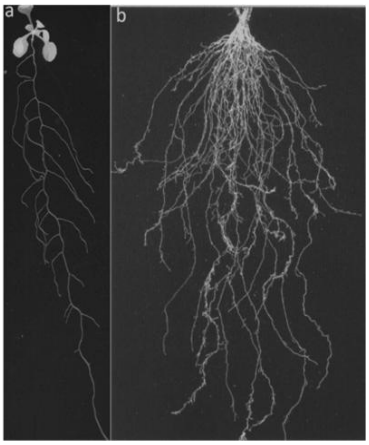


Figure 1. Architecture racinaire d'une plantule d'Arabidopsis (a) et d'une plantule d'orge (b)

LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES: D'UNE CELLULE À UN ORGANE

Les RL, qui se forment sur des racines séminales, adventives ou sur d'autres latérales, constituent une partie importante du système racinaire. Elles présentent par ailleurs une grande plasticité de développement qui traduit vraisemblablement un potentiel d'adaptation à l'environnement.

La formation d'une RL signifie la création post-embryonnaire d'un nouvel organe à partir de la racine mère[22]. Elle implique le recrutement de cellules dites "fondatrices", la construction *de novo* d'un primordium, l'évolution de ce dernier en une structure apicale mature (coiffe, méristème et zone d'élongation) et, parfois simultanément, l'émergence de la RL.

DEUX SÉQUENCES DE FORMATION: ACROPÈTE ET NON ACROPÈTE

Toutes les régions de la racine mère n'ont pas la compétence pour former des RL. En règle générale, les jeunes primordia sont formés dans la région apicale de la racine mère à une distance relativement constante de l'apex pour une espèce donnée[23-24]. Il s'en suit que les nouveaux primordia apparaissent entre l'apex de la racine mère et les derniers primordia formés. La séquence de formation des RL initiées de cette manière est dite "acropète". Les RL les plus longues et âgées sont donc situées près de la base de la racine mère et les plus jeunes et courtes près de son apex[3].

Chez de nombreuses espèces, en particulier chez les dicotylées, les différentes régions de la racine mère gardent leur compétence pour former des RL, si bien que des nouvelles latérales apparaissent entre des RL établies. Ces racines, parfois qualifiées de "néo-formées", constituent une seconde séquence de formation, distincte de la séquence acropète.

La présence de latérales courtes entre des latérales plus longues est en principe un indicateur de néo-formation. Cette situation se rencontre notamment chez *Zea mays*[24] (figure 2). L'initiation des primordia chez le maïs aurait ainsi lieu dans la région sub-apicale de la racine mère[25] et se poursuivrait à une distance allant de 5 à 8 cm de l'apex. Sur ces bases, il été proposé que la formation des racines latérales chez le maïs ne se limite pas à une séquence strictement acropète[26]. Néanmoins, la présence de RL

courtes entre des RL longues peut également être la conséquence d'une différence de vitesse de croissance entre RL de la séquence acropète.

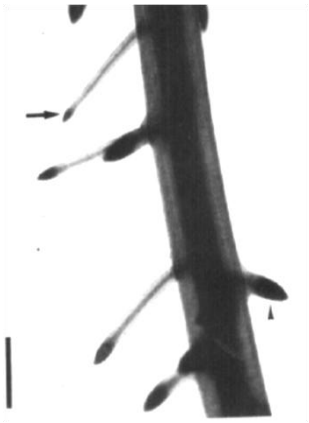


Figure 2. Illustration du caractère non acropète de la formation des racines latérales chez le maïs d'après Lloret et *al*.[3] Cette image met en évidence la présence de RL courtes entre des plus longues. (Barre d'échelle 1 mm).

Le caractère continu et asynchrone de la formation des RL est une des difficultés majeures dans leur étude, car il implique que le lieu et le moment où le processus est enclenché sont difficiles à prédire. La situation la plus favorable est celle des racines de la séquence acropète, pour lesquelles la région d'initiation est de taille réduite, si bien qu'à un endroit précis le long de la racine mère, on peut s'attendre à trouver des ébauches de RL à des stades morphologiques similaires.

Le caractère acropète n'est cependant pas toujours strict, notamment parce que les RL sont formées en parallèle dans plusieurs files longitudinales de manière partiellement indépendante. Charlton[27] avance trois critères nécessaires qui définissent la séquence acropète: (1) les RL doivent être initiées strictement dans les files adjacentes aux pôles de protoxylème ou de protophloème (selon l'espèce), (2) l'espacement entre les RL initiées dans une file donnée doit être régulier et (3) il doit y avoir une certaine corrélation au niveau de l'espacement des RL entre les différentes files. Lorsque ces conditions sont rencontrées, la corrélation entre le stade de développement d'une ébauche de RL et sa position le long de la racine mère est maximale. La démonstration de ces conditions chez une espèce est cependant difficile[28].

ACTIVATION DES CELLULES FONDATRICES

L'initiation des racines latérales se produit, chez les gymnospermes et les angiospermes, au départ des cellules de l'assise du péricycle présentant des caractéristiques particulières. En coupe radiale, le site d'initiation des racines latérales est corrélé avec l'architecture interne du cylindre central. Les racines latérales sont initiées au départ des cellules du péricycle adjacentes aux pôles de protoxylème (Arabidopsis[29]) ou, en fonction de l'espèce, adjacentes aux pôles de phloème primaire (*Daucus carota, Oryza sativa,* l'orge, et le maïs)[23,30-31].

L'utilisation de marqueurs du cycle cellulaire a permis de montrer que le péricycle, au niveau du méristème basal, est en effet constitué de deux populations de cellules se distinguant par leur capacité ou non à se diviser. La majeure partie des cellules sont bloquées en phase G1 du cycle cellulaire[8], alors que les cellules compétentes, situées en phase des pôles de protoxylème progressent vers la phase S puis G2[32], et conservent leur capacité à se diviser après leur sortie du méristème (figure 3). Ces cellules compétentes expriment une protéine nucléaire particulière, la protéine ALF4 (Aberrant Lateral root formation), dont l'expression contribuerait à les maintenir dans un état mitotique compétent[33-34]. D'une part, la mutation du gène codant la protéine ALF4 bloque l'induction du facteur mitotique CycB1;1, spécifiquement exprimé au niveau des sites d'initiations des RL. D'autre part, l'expression de CDKB1;1 qui est associé à la transition G2 to M est augmentée chez le mutant alf4-1. ALF4 pourrait prévenir la dédifférenciation des cellules du péricycle nécessaire pour que les cellules du péricycle puissent initier la formation d'un primordium.

Parmi ces cellules compétentes, certaines deviendront des cellules fondatrices[29]. Ces cellules acquièrent un destin développemental différent sous l'induction d'un signal spécifique. Ces cellules constituent le point de départ de la formation des primordia de racines latérales[35].

Cette localisation spatiale de l'initiation ne semble pas être indispensable pour la formation des racines latérales car chez quelques espèces, l'initiation se produit dans des régions de la racine mère où aucun tissu vasculaire n'est encore différencié[31]. Cependant, même si les vaisseaux

vasculaires ne sont pas différenciés, il se peut que les primordia soient initiés dans une zone destinée à devenir un pôle de xylème ou de phloème[36].

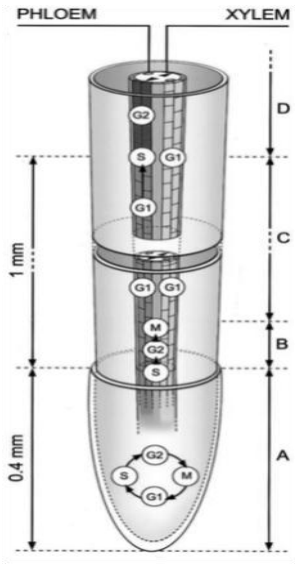


Figure 3. Modèle de la régulation du cycle cellulaire dans le péricycle, chez Arabidopsis. (A) Au niveau du méristème racinaire, les divisions sont très actives. (B) Les cellules des assises externes quittent le cycle cellulaire alors que les cellules des assises du cylindre central et du péricycle, continuent de se diviser. (C) Les cellules du péricycle stoppent leurs divisions et sont bloquées en phase G1. (D) Les cellules du péricycle en phase du pôle de protophloème se différencient, tandis que les cellules compétentes, adjacentes au pôle de protoxylème poursuivent leur cycle cellulaire jusqu'en phase G2. D'après Beeckman et *al*[8]

Dans les deux cas de figure (xylème / phloème), le premier événement morphologique visible de la formation d'une RL est similaire chez la plupart des espèces. Il consiste en la migration des noyaux de deux cellules longitudinalement adjacentes du péricycle (appelées cellules fondatrices) vers la paroi qui sépare ces deux cellules[37] (figure 4).

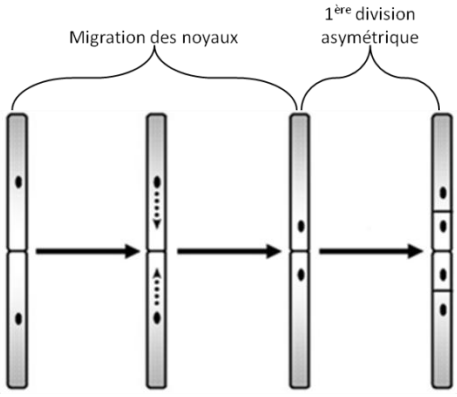


Figure 4. Représentation schématique de la migration des noyaux se produisant avant la première division asymétrique. D'après De Smet et *al*, 2007[6].

Certains réarrangements intra-cellulaires marquent également ces deux cellules, comme une augmentation radiale de la taille, du volume et du

contenu basophile du cytoplasme et un épaississement du noyau[25,38]. Cette migration est suivie de la division asymétrique des deux cellules[32,38] (figure 4), entraînant la formation de deux petites cellules flanquées de deux plus grandes. Ce type de formation est dite « bicellulaire longitudinale ». Il existe des cas où une seule cellule est impliquée dans le processus de formation du primordium, on parle alors de formation « unicellulaire longitudinale »[29].

DÉVELOPPEMENT: D'UN PRIMORDIUM À UN ORGANE INDÉPENDANT.

Suite aux premières divisions asymétriques, une succession de divisions orientées et organisées se produisent, menant à la formation du primordium dans lequel on peut trouver les ébauches des assises cellulaires qui constitueront le futur méristème. Les divisions se produisant au sein du primordium se succèdent à un rythme plus rapide que celle ayant lieu dans le méristème de la racine mère. Chez Arabidopsis, le temps de doublement du nombre de cellules est de 2,7 à 4,9 heures au sein du primordium contre 13,6 heures dans le méristème[29].

Les étapes morphologiques de ce développement ont été très bien décrites chez Arabidopsis[39] (figure 5), partant de l'analyse des caractéristiques anatomiques systématiquement observées et des divisions cellulaires qui leur sont associées. Ce programme se déroule en cinq étapes.

La première étape correspond à la migration des noyaux et à la division asymétrique transverse des deux cellules voisines du péricycle décrite ci-dessus. Les étapes suivantes mènent progressivement à la formation d'un dôme à l'origine du cylindre central et des assises externes de la future RL. Les divisions à la base de ce dôme permettent notamment sa croissance au travers des assises de la racine mère.

Chez Arabidopsis*, Pontederia cordata* ou encore *Daucus*, les tissus qui forment le méristème de la RL sont exclusivement dérivés des cellules du péricycle de la racine mère[3]. Par contre, chez *Hellianthus annuus, Allium cepa* ou chez le maïs, les cellules de l'endoderme de la racine mère sont également recrutées dans le processus et contribuent à la formation des assises externes du primordium[24,40]. Chez maïs, ces assises mènent à la formation de la coiffe et de l'épiderme de la RL[3,25]. Chez le pois *(Pisum sativum),* l'endoderme est également à l'origine du cortex[41]. Dans certains

cas, les cellules du cortex peuvent également se diviser pour former une assise du primordium[3].

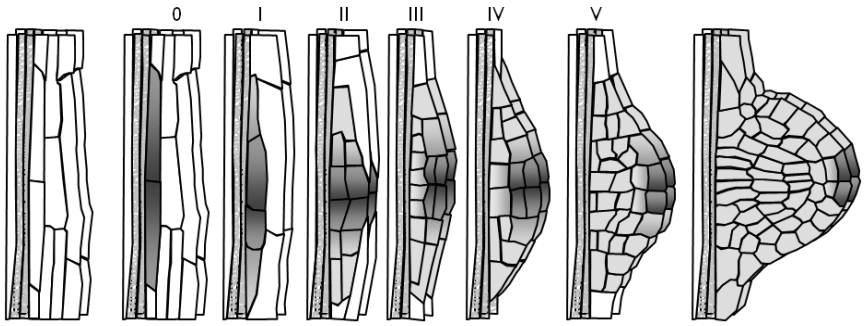


Figure 5. Schéma du développement des racines latérales chez Arabidopsis d'après Yvon Jallais[42] . La figure représente les différentes étapes du processus de formation des RL établies et décrites par Malamy et Benfey (1997)[39]. Le gris foncé symbolise l'évolution de la concentration en auxine dans le primordium.

L'ÉMERGENCE DE LA RACINE MÈRE

Le développement et l'expansion du primordium forcent celui-ci à traverser les différentes assises de tissus situées à l'extérieur du péricycle. Ce processus aboutit à l'émergence de la nouvelle RL à la surface de la racine mère[39-40]. Chez l'orge et le maïs, le primordium traverse entre 8 et 10 assises de cellules avant d'émerger de la racine mère. Chez Arabidopsis, où l'anatomie de la racine est relativement simple, ce ne sont que trois assises de cellules (endoderme, cortex et épiderme) que le primordium doit traverser[1]. De prime abord, la pression mécanique exercée par le primordium sur ces assises cellulaires devrait provoquer des déchirures tissulaires susceptibles de fragiliser les structures de la racine mère (e.g. entrée de microorganismes).

Cependant, il est généralement admis que le passage du primordium est facilité par l'intervention d'enzymes secrétées par les cellules de l'assise externe de ce dernier (*Cell Wall Remodelling enzymes*)[24-25]. Ces enzymes modifieraient la structure des parois des cellules du cortex adjacentes au primordium, de manière telle que la pression exercée par le primordium entraîne la séparation des cellules situées face à lui et pas leur déchirure. Ce pool enzymatique serait constitué notamment de pectate lyase et de poly-glucuronidase qui exercent un rôle important dans la séparation des

cellules[37]. De plus, un transporteur d'auxine impliqué dans la canalisation et la concentration de cette dernière dans les cellules situées face au primordium a été récemment identifié (LAX3)[43]. Cette concentration induirait l'expression des gènes de ce complexe CWR.

En règle générale, les cellules du cortex de la racine mère situées face à un primordium se divisent aussi en cellules de taille plus petites. Vraisemblablement, cette réorganisation contribue également à faciliter l'émergence du primordium et à limiter les dommages causés par cette intrusion[3].

RÉGULATION DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES

Les différentes étapes du programme développemental présenté ci dessus impliquent une série d'hormones telles que l'auxine, les cytokinines et l'acide abscissique (figure 6). Par ailleurs, divers signaux de l'environnement peuvent modifier le patron de ramification racinaire et doivent donc intervenir au cours de ce programme.

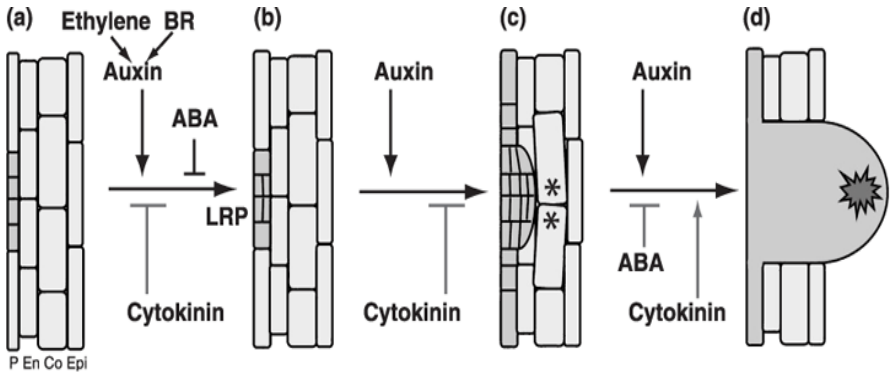


Figure 6. La régulation de la formation des racines latérales nécessite l'action isolée ou concertée d'un grand nombre de phytohormones. L'auxine agit comme un régulateur positif des différentes étapes de la formation des racines latérales, en stimulant tant l'initiation du primordium que son développement et son émergence. Au contraire, l'ABA est un antagoniste de l'auxine. L'ABA est capable d'inhiber la formation des racines latérales soit dès leur initiation ou alors au moment de leur émergence. Finalement, les cytokinines peuvent agir comme des régulateurs négatifs et positifs. Elles inhibent leur initiation et leur développement mais stimulent leur émergence. (P, péricycle; En, endoderme; Co, cortex; Epi, épiderme, ABA, acide abscissique; BR, brassinosteroidess) d'après Nibau et *al*, 2008[44].

L'AUXINE, UN RÉGULATEUR POSITIF DU DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE

Les rôles de l'auxine dans la plante sont multiples[45], mais la spécificité de sa régulation semble bien liée i) à son mode de transport et ii) à la voie de signalisation nucléaire induite par sa présence[2,46-48]. Le transport de l'auxine permet l'établissement d'une polarité à différentes échelles et contribue à la formation de gradients qui interviennent dans le positionnement de nouveaux organes et dans la régulation du domaine d'expression de nombreuses protéines. La voie de signalisation, quant à elle, fait intervenir une famille de protéines (Aux/IAA) qui établissent la spécificité du lien entre la molécule signal (auxine) et les multiples cascades de gènes exprimés en aval.

Au niveau racinaire, deux effets importants de l'auxine concernent la réponse au gravitropisme et la régulation de l'initiation, de la formation et de l'émergence des RL[37,49-51].

La signalisation induite par l'auxine

Les gènes dont l'expression est induite par l'auxine contiennent au niveau de leur promoteur des éléments de réponse à l'auxine (AuxRE) permettant la liaison de facteurs de transcription de type ARF (Auxin Responsive Factor). La régulation de l'activité des protéines ARF semble être la dernière étape de la voie de signalisation des auxines[46,52] (figure 7).

Lorsque la teneur en auxine est réduite, les protéines Aux/IAAs forment des hétérodimères avec des facteurs de transcription de type ARFs (Auxin Response Factor) et empêchent ces derniers de se lier à leurs promoteurs cibles. A l'inverse, une concentration élevée en auxines stabilise l'interaction entre les protéines Aux/IAAs et TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1) et entraîne la poly-ubiquitination et la dégradation des protéines Aux/IAA par le protéasome 26S. Les protéines ARFs sont alors libérées et peuvent se lier à leurs promoteurs cibles, entraînant la transcription des gènes sous leur contrôle. Parmi ces gènes auxine-dépendants, on retrouve des gènes codant pour des protéines du cycle cellulaire ou encore pour les transporteurs de l'auxine de la famille des PIN[47,50,52-54]. Les protéines Aux/IAAs sont donc des régulateurs négatifs.

La spécificité de la réponse induite par l'auxine dépend de l'identité de la cellule et est largement liée à la nature des protéines ARFs et des Aux/IAAs qui s'expriment en son sein[48,52,55]. Par exemple, au cours du développement embryonnaire, l'établissement du pôle racinaire dépend de l'interaction entre la protéine IAA12/BDL et de la protéine ARF5/MP[55]. Ultérieurement, les divisions asymétriques qui précèdent la formation d'un primordium de RL se produisent dans des cellules où interagissent les protéines SLR/IAA14 et ARF7 ou ARF19[51,56-57].

Il est vraisemblable que le même type d'interaction se déroule à d'autres niveaux pour lesquels les facteurs Aux/IAA et ARFs n'ont pas encore été identifiés. Dans les cellules de l'endoderme et du cortex adjacentes au primordium en formation, l'accumulation d'auxine va induire la transcription de gènes codant pour des protéines CWR (Cell Wall Remodelling)[43]. L'auxine régule également l'expression de gènes codant pour des protéines du cycle cellulaire telles CYCB1;1 et KRP2, qui marquent le passage des transitions G2-M et G1-S, respectivement. Cette régulation du cycle cellulaire joue un rôle important dans la formation du primordium[8,29,44,52,58].

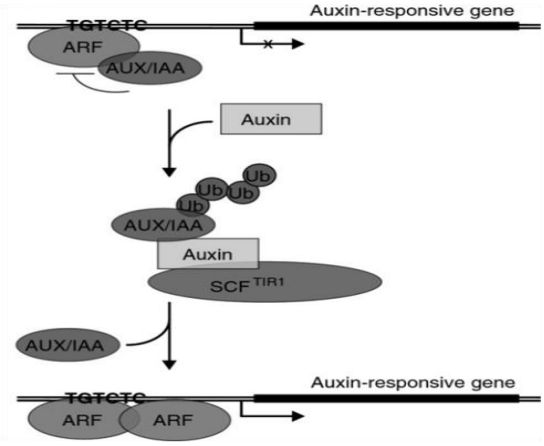


Figure 7. Modèle de la voie de signalisation par l'auxine d'après Chapman et *al*[59]. L'auxine régule l'expression des gènes en stimulant la dégradation des protéines Aux/IAA. En présence d'auxine, la protéine TIR1 se lie à la protéine Aux/IAA. La formation du complexe TIR1/Aux/IAA, entraine l'ubiquitination et la dégradation de Aux/IAA par le protéasome. Le facteur de transcription ARF ainsi libéré peut alors se fixer sur son(ses) promoteur(s) cible(s) et stimuler la transcription de gènes auxine-dépendant.

Transport

L'établissement de gradients d'auxine au niveau d'un organe, d'un tissu ou encore d'une cellule est un des éléments clés dans la croissance et le développement de la plante. De tels gradients sont en effet porteurs d'une information de position et d'orientation (polarité) essentielle à la construction de structures organisées[2,60]. Ces gradients sont établis par des processus de transport actif, de cellule en cellule et au sein des cellules. Ce transport polarisé est notamment régi par l'action concertée de deux familles de transporteurs principales, une famille qui assure l'importation d'auxine dans la cellule (e.g. AUX1/Like AUX1 et AUX1/LAX)[61] et une famille qui exporte l'auxine vers l'extérieur des cellules (PINs)[7,62]. Une autre famille, plus récement mis en évidence, les transporteurs ABC joueraient également un rôle dans le transport de l'auxine [63]

L'organisation spatiale de l'expression de ces transporteurs (domaines d'expression) est un autre élément clé de la formation de gradients. Chaque transporteur s'exprime dans un nombre limité de cellules, voire de manière asymétrique dans une cellule donnée[64] (figure 8). Le contrôle de l'expression, de l'activité et de la localisation de ces transporteurs est assez mal connu, mais il dépend en partie des gradients d'auxines qu'ils contribuent à former. On peut donc s'attendre à ce que ce système de signalisation par les auxines soit complexe et générateur de propriétés émergentes. Nous illustrons la diversité des rôles du transport de l'auxine avec les transporteurs LAX3 et PIN2.

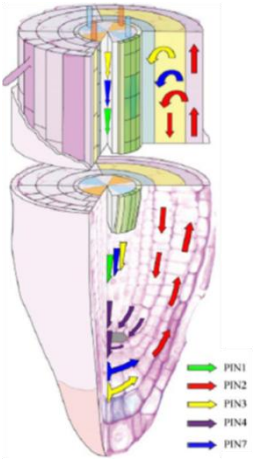


Figure 8. Représentation du transport polaire de l'auxine dans le méristème racinaire. L'auxine provenant du système foliaire est transportée dans les racines via le système vasculaire. Une fois dans le méristème racinaire, l'auxine est transportée dans l'apex racinaire par l'action combinée des protéines PIN1, PIN3 et PIN7. PIN4 assure le transport de l'auxine jusque dans les cellules de la columelle, où l'auxine sera redistribuée latéralement par les protéines PIN3, PIN4 et PIN7. Le transport de l'auxine jusque dans la zone d'élongation, via les cellules de la coiffe, est assuré par la protéine PIN2. D'après Grunewald et *al*,(2007)[9]

Chez Arabidopsis, la protéine LAX3 est un transporteur membranaire d'auxine (importation) qui s'exprime spécifiquement dans les cellules de l'endoderme et du cortex adjacentes au primordium en formation[49]. Elle assure donc l'importation vers ces cellules de l'auxine issue du primordium. Une de ses particularités est que son expression est stimulée par l'auxine. Il s'en suit une boucle de régulation positive qui au final, assure le confinement de l'auxine dans les cellules voisines du primordium et évite sa propagation à plus grande distance[43]. Le gradient formé dans ce cas est établi sur de très courtes distances. L'accumulation de l'auxine dans ces cellules enclenche, via les protéines IAA14 et ARF7/19, un complexe enzymatique menant à la modification des parois cellulaires et à la séparation des cellules qui facilitera le passage du méristème en croissance (figure 9).

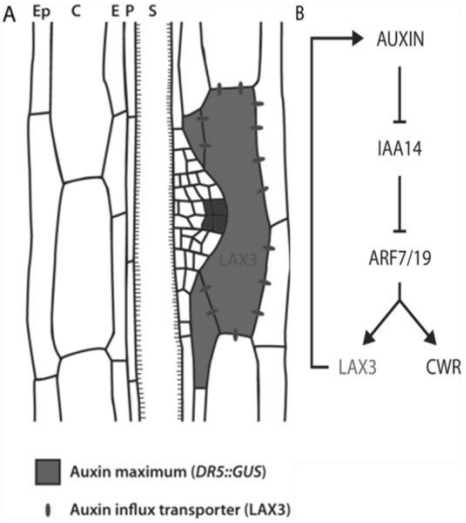


Figure 9. Expression du transporteur LAX3 d'après Péret et *al*[1]. La protéine LAX3 s'exprime dans les cellules du cortex adjacentes au primordium en formation, et permet le transport de l'auxine provenant du primordium vers les cellules du cortex. B. L'expression de LAX3 est régulée par l'auxine, ainsi l'auxine importée dans les cellules du cortex stimule l'expression de LAX3 en induisant la dégradation de l'inhibiteur de la transcription IAA14/SLR1. Ce *positive feedback* mène au confinement et à l'accumulation de l'auxine dans les cellules en contact direct avec le primordium

Le second exemple est celui des transporteurs AUX1 (importation) et PIN2 (exportation) qui sont exprimés au niveau des cellules de l'épiderme et de la coiffe (lateral root cap). Ces protéines contribuent, si pas à l'établissement d'un gradient, au moins au transport de l'auxine depuis la coiffe racinaire vers la base du méristème. Ce transport périphérique et basipète d'auxine est tout d'abord impliqué dans la réponse au gravitropisme[62,65-66]. Cette dernière repose en effet sur une distribution asymétrique de ce transport menant à une élongation différentielle des tissus et à la formation d'une courbure[2]. Par ailleurs, l'auxine acheminée

par AUX1/PIN2 au niveau du méristème basal est redirigée vers l'assise interne du péricycle où elle semble intervenir dans la formation des racines latérales. Il s'en suit d'ailleurs un certain degré de co-régulation entre l'initiation des racines latérales et le gravitropisme[67].

Il faut enfin noter que la complexité du transport de l'auxine ne se limite pas à la formation de gradients spatiaux mais implique également une dimension temporelle. Ainsi, dans les cellules du péricycle du méristème basal, la concentration en auxine oscille régulièrement entre un minimum et un maximum, et l'initiation d'une RL coïncide avec le moment où la concentration est à son maximum[6].

L'auxine et la formation des racines latérales.

La formation d'une RL implique le recrutement des cellules fondatrices au niveau du péricycle, la construction *de novo* d'un primordium, le développement de ce dernier en un méristème, la formation d'une zone d'élongation et l'émergence de la nouvelle racine.

Ces différentes étapes sont dépendantes d'un apport d'auxine: une suppression de cet apport inhibe la formation des RL et cette inhibition peut être levée par l'application exogène d'auxines[68-69].

L'auxine est tout d'abord acheminée de manière basipète depuis le méristème apical (y compris la coiffe) jusqu'aux cellules du péricycle situées à hauteur du méristème basal[6]. Par un mécanisme encore non élucidé, la concentration en auxine dans cette région affiche un comportement oscillatoire[6]. Tout indique que ce sont les cellules du péricycle qui se trouvent au niveau du méristème basal au moment où la concentration en auxine y atteint son maximum qui acquièrent l'identité de cellules fondatrices[67,70]. L'auxine présente dans ces cellules active une voie de signalisation impliquant notamment la protéine IAA28 et le facteur de transcription GATA23. Elle induit la dégradation d'IAA28, qui active plusieurs facteurs de transcription (ARF5,6,7,8 et 19) et, en aval, l'expression de GATA23[71] (figure 10). Chez Arabidopsis, l'expression de ce dernier est limitée aux cellules du péricycle adjacentes au pôle de proto-xylème dans la région du méristème basal, lieu d'acquisition de l'identité

fondatrices des cellules du péricycle. Son expression apparaît corrélée avec l'acquisition de l'identité fondatrice des cellules du péricycle[71].

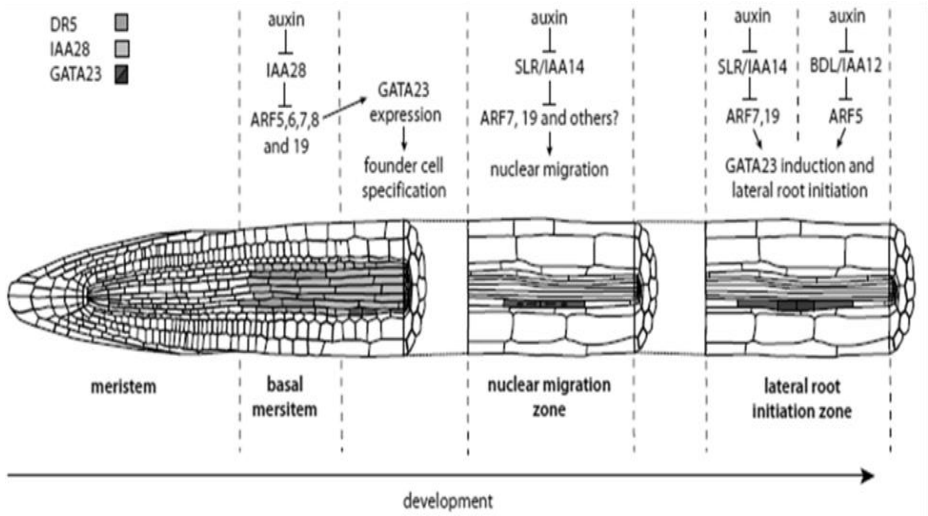


Figure 10. Schéma de la régulation de la formation des RL par différentes voies de signalisation impliquant l'auxine. D'après De Rybel et *al*[71].

Une seconde voie de signalisation impliquant les protéines SLR1/IAA14 et ARF7/ARF19 est ensuite active dans ces cellules fondatrices. Celle-ci stimule la transcription de gènes codant notamment pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire, menant à la division asymétrique des cellules fondatrices[37,72]. Lorsque le primordium atteint le stade 8 à 10 cellules[39], le plan de division est modifié et les cellules se divisent de manière péricline pour former les différentes assises cellulaires du primordium. En parallèle, les transporteurs PIN1 subissent une relocalisation qui oriente le flux d'auxine dans l'axe longitudinal de la future RL. Ce transport acropète de l'auxine au sein du primordium a été décrit par Benkovà et al. comme le modèle de la fontaine et de la fontaine inverse[2,73] (figure 11).

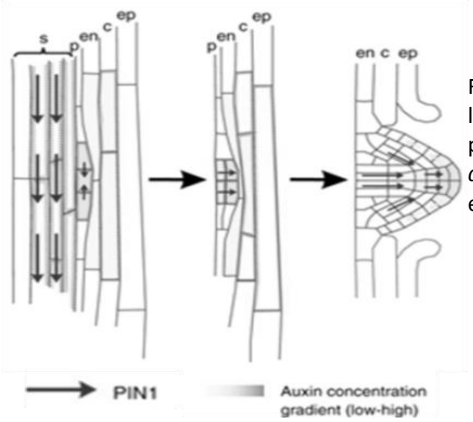


Figure 11. Transport de l'auxine lors de l'initiation et du développement du primordium. Schéma adapté de Petrášek et *al.*[2]. (en : endoderme, p : péricycle, c : cortex, ep : épiderme, s : stèle).

LES CYTOKININES, DES RÉGULATEURS ENDOGÈNES DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES

D'autres hormones interviennent également dans la formation des RL. Elles agissent soit indépendamment de l'auxine ou au contraire interagissent avec elle[74].

Les cytokinines (CK) sont des régulateurs négatifs de l'initiation des RL. Chez Arabidospsis, le riz et le tabac, un accroissement de la concentration endogène en CK, obtenue suite à une application exogène ou à une surproduction endogène, entraîne un arrêt de la formation des racines latérales[75-76].

Cette inhibition affecte les toutes premières étapes de la formation et empêche l'acquisition de l'identité fondatrice des cellules du péricycle[77]. Alors que les cellules fondatrices progressent normalement vers la phase G1-S du cycle cellulaire, un excès de CK maintient ces cellules en phase G2-M[8,76]. Il en résulte une absence des divisions asymétriques des cellules fondatrices[78]. Cette inhibition semble être indépendante de l'auxine car une application exogène d'auxine ne permet pas de restaurer la division des cellules[72].

Les CK ont peu d'effet sur la biosynthèse de l'auxine, mais agissent au niveau de son transport[72]. En particulier, elles modifient la transcription de gènes codant notamment pour des protéines de la famille des PINs et provoquent une perturbation du transport polaire de l'auxine au niveau de l'apex racinaire et dans les cellules fondatrices du péricycle[78]. Dans la

mesure où ce transport polaire de l'auxine permet l'établissement des gradients de concentration nécessaire à l'initiation des RL, l'inhibition de la formation des RL par les CK apparaît comme une conséquence logique de cette perturbation[77].

L'ACIDE ABSCISSIQUE BLOQUE L'ÉMERGENCE DES PRIMORDIA

Au-delà de son rôle de régulateur de la croissance et du développement de la plante en réponse au divers stress biotiques et abiotiques[79-80], l'acide abscissique (ABA) est également importante pour la régulation de fonctions développementales comme la maturation et la dormance des graines et la croissance racinaire. Récemment, il a été montré que l'ABA interviendrait également comme régulateur négatif de l'initiation et de l'émergence des RL[81].

Chez Arabidopsis et l'arachide, une application exogène d'ABA bloque le développement du primordium au moment de, ou juste après l'émergence, avant l'activation du méristème[82-83]. Cette régulation de l'émergence par l'ABA semble impliquer une voie de signalisation spécifique et indépendante de l'auxine. En effet, chez les mutants *abscisic acid insensitive* (abi), l'application d'ABA induit un arrêt de l'émergence du primordium, qui ne peut être restauré par une application d'auxine. Néanmoins, l'ABA entraîne une diminution de la quantité d'auxine normalement présente dans les primordia émergeants, ce qui suggère qu'il interfère avec l'approvisionnement de l'auxine vers les primordia[72,82].

Une telle interaction entre l'ABA et l'auxine est également supportée par le phénotype de plantes d'Arabidopsis *ABI3*[84], qui répondent moins à l'induction des RL par l'auxine. Ce gène code pour un facteur de transcription de type B3, impliqué dans la signalisation par ABA. Il semble donc que la signalisation induite par ABA via *ABI3* soit nécessaire pour l'induction de l'initiation des RL par l'auxine[72]. Cette interaction entre l'ABA et l'auxine a également été montrée chez le maïs, où elle implique le gène *VP1*[83], orthologue à *ABI3*[81]. Récemment, Shkolnik et *al* ont également mis en évidence le rôle du facteur de transcription ABI4 dans la régulation de l'inhibition du développement du primordium induite par l'ABA ou les cytokinines. Les auteurs suggèrent que l'inhibition de la formation des

racines latérales observées en présence d'ABA ou de CK résulterait d'une réduction du transport polaire de l'auxine induite par une diminution de l'expression des protéines PIN. Selon cette hypothèse, ABI4 serait un régulateur négatif de l'expression des protéines PIN[85].

Plusieurs informations récentes indiquent, sans toutefois le démontrer, que l'ABA pourrait également intervenir comme un régulateur négatif de l'initiation des racines latérales. Il agirait comme un antagoniste de l'auxine, en inhibant l'activation du cycle cellulaire des cellules du péricycle, empêchant ainsi l'activation des cellules fondatrices. Une activité de surproduction d'ABA a été observée dans les cellules du péricycle entourant le primordium en formation, cellules qui ne se divisent pas. De plus, l'auxine et l'ABA ont des effets antagonistes sur les protéines inhibitrices du cycle cellulaire (KRPs)[58,86]. Il est donc possible que l'ABA est l'auxine coopèrent pour réguler l'initiation des RL au niveau de l'activation du cycle cellulaire.

INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES

Les plantes sont capables de modifier leur architecture racinaire en fonction de l'environnement dans lequel elles se développent. Ces modifications peuvent suivre la perception de stimuli de l'environnement (e.g. concentration en nutriments) comme elles peuvent être une réponse au statut interne (e.g. nutritionnel) de la plante résultant de l'environnement dans lequel elle se développe[15]. Il est vraisemblable que cette plasticité permet à la plante d'optimiser son investissement dans la formation des organes de capture[87] tout en maximisant le prélèvement des ressources du sol[11].

La régulation de la formation et de la croissance des RL est l'une des voies permettant de moduler l'architecture racinaire en réponse aux stimuli de l'environnement[13-14]. Divers facteurs environnementaux, de nature physique (température, résistance mécanique du sol, la lumière) et chimique (salinité, déficit hydrique, nutriments), affectent le développement des RL, au niveau de l'initiation, du développement ou de l'émergence du primordium[11]. Nous nous limitons à évoquer ci-dessous les facteurs en lien avec le reste de la thèse.

Influence des nutriments sur la formation des racines latérales

Les expériences de Drew (1975) chez l'orge offrent une description classique de la réponse architecturale du système racinaire de l'orge en présente de concentrations élevées et localisées en nitrate, phosphate, potassium ou encore en ammonium[88] (figure 12). Les effets observés varient en fonction de l'espèce, des nutriments, de leur concentration et de leur distribution[15]. Ainsi, chez Arabidopsis une concentration élevée et homogène de nitrate réduit l'élongation des RL, alors qu'une même concentration localisée favorise leur initiation[89]. Les réponses au phosphate sont différentes[90], avec une diminution de la densité des RL en réponse à une concentration élevée[91], et une augmentation de la densité pour de plus faibles concentrations[14].

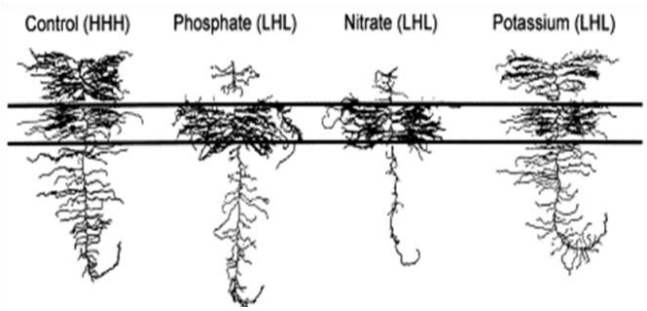


Figure 12. Réponse des racines d'orge suite à une modification locale de la concentration en phosphate, nitrate, et potassium. D'après Drew et *al*[88] .

Cependant, si ces réponses architecturales ont bien été décrites, les mécanismes permettant aux plantes d'adapter leur architecture de cette manière sont encore peu connus.

Le cas du nitrate est sans nul doute celui qui a été le plus étudié. Le nitrate est un des éléments minéraux les plus importants pour le développement de la plante. Sa disponibilité est cependant très variable et a des conséquences importantes sur la formation des RL tant au niveau de leur initiation que de leur émergence[44]. Outre les effets, décrits ci-dessus, d'une application systémique ou localisée de nitrates[14,92], un rapport carbone/azote élevé dans la plante entraîne une inhibition de l'initiation des RL[93]. Il a pu être montré que ces différentes réponses impliquent les voies de signalisation de l'auxine et de l'ABA.

Comme indiqué plus haut, une application exogène d'ABA copie l'effet d'une forte concentration en nitrate: elle inhibe la formation des RL à un stade spécifique du développement du primordium, juste après l'émergence et avant l'activation du méristème[94]. De plus, les mutants insensibles à l'ABA (abi4-1, abi4-2 et abi5-1) sont moins sensibles à l'inhibition de l'émergence par le nitrate[95]. L'ABA serait donc impliqué dans l'inhibition de la formation des RL en réponse à une forte concentration homogène en nitrate[32].

L'auxine, quant à elle, interviendrait dans la réponse à des teneurs élevées et localisées en nitrate, via une voie de signalisation spécifique impliquant un transporteur du nitrate, la protéine NRT1.1[94]. Cette protéine a été initialement décrite comme transporteur spécifique et inductible du nitrate, nécessaire pour la réponse architecturale à un environnement hétérogène ("*patchy*")[44]. Dernièrement, Krouk et *al*. ont toutefois montré que la protéine NRT1.1 permet également le transport de l'auxine depuis l'extrémité du méristème de la future RL vers la base de celle-ci, comme les protéines PIN[10]. En fonction de la concentration en nitrate dans la solution du sol, le transporteur NRT1.1 agit préférentiellement comme transporteur d'auxine ou de nitrate, et régule de ce fait l'accumulation de l'auxine dans le méristème de la RL et la croissance de cette dernière[10] (figure 13).

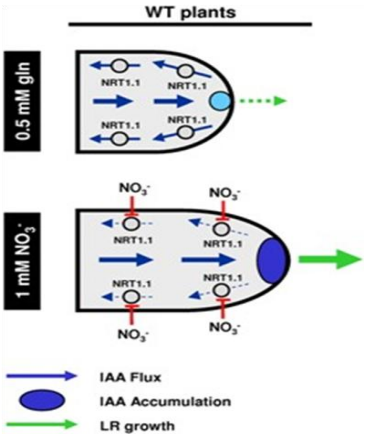


Figure 13. Contrôle des flux d'auxine dans une ébauche de racine latérale en fonction de la teneur locale en nitrate d'après Krouk et al.[10]. En absence de nitrate, NRT1.1 transporte l'auxine, maintient à un niveau réduit la teneur en auxine dans l'apex de la RL et réduit sa croissance. Au contraire, une teneur plus élevée en nitrate réduit le transport de l'auxine par NRT1.1, et provoque à l'extrémité apicale du primordium une augmentation de la teneur en auxine capable de stimuler la croissance de la RL.

Il faut toutefois garder à l'esprit que de tels mécanismes concernent des réponses à un stress isolé. Les plantes en conditions réelles sont généralement soumises à des combinaisons de stress abiotiques pour

lesquelles les réponses, telles qu'elles nous apparaissent dans une situation de stress isolé, ne sont pas nécessairement compatibles.

L'eau et le développement des racines latérales

La disponibilité en eau est également un facteur important qui influence le développement du système racinaire, bien qu'étudié d'une manière moins avancée. D'une manière générale, la formation des RL est inhibée lorsque le sol est saturé en eau. Dans certains cas, et notamment chez le riz, les RL sont cependant plus longues[96]. Chez Arabidopsis, une diminution du potentiel osmotique provoquée par un déficit hydrique bloque également la formation des RL, en inhibant l'émergence des primordia[97]. Chez le maïs, par contre, une baisse de la disponibilité en eau tend à réduire la longueur des RL sans affecter leur émergence[98]. Au final, l'influence d'une perturbation hydrique est manifeste, mais les conditions qui précisent son effet ne sont pas clairement établies.

L'auxine et l'ABA semblent également être des acteurs de cette régulation. En effet, un déficit hydrique peut induire une augmentation de la concentration en ABA entraînant une inhibition de l'émergence. Par contre, lorsque la biosynthèse de l'ABA est perturbée, comme c'est le cas chez les mutants ABA-déficient, le pourcentage de primordia émergeants est plus important.

Par ailleurs, l'auxine semble être capable de stimuler l'émergence des primordia bloqués par un défit hydrique. Il semble dès lors que l'inhibition de l'émergence des primordia en réponse à un déficit hydrique soit la conséquence d'une modification de l'équilibre entre la signalisation induite par l'auxine et la signalisation induite par l'ABA[99].

Effet de la lumière sur l'architecture racinaire

La lumière affecte également le développement des RL, et cet effet semble être lié à l'auxine et à la signalisation induite par la lumière.

La protéine CONSTANS-LIKE3 (COL3), un régulateur positif de la photo-morphogénèse semble agir comme promoteur du développement des RL, comme l'indique la réduction du nombre de RL chez les mutants cop3[100].

La lumière peut également affecter indirectement la formation des RL via un facteur clé de la voie de signalisation induite par la lumière, le facteur de transcription de la famille des *bZIP*, *LONG HYPOCOTYL 5* (*HY5*), intervenant dans la régulation positive de la photo-morphogénèse. En effet, chez les plantes mutées pour ce gène, le nombre de RL suite à l'induction par la lumière est plus important que chez les plantes de type sauvage. Cette stimulation serait la conséquence d'une diminution de l'expression de *AXR2/IAA7* et *SLR/IAA14* qui interviennent dans la régulation de la formation des RL par les auxines[44,101]. De plus, *HY5*, une composante de la signalisation induite par la lumière, intervient également dans la régulation de l'émergence des RL. Elle contribue notamment à la localisation cellulaire des protéines PIN2, agissant ainsi sur le transport polaire de l'auxine. Les phytochromes de type A,B, D et E jouent également un rôle dans la régulation de la formation des racines latérales en affectant le transport de l'auxine des tiges vers les racines[102]. La lumière interfère donc avec la formation des RL au niveau de la signalisation et du transport des auxines[103].

OBJECTIFS ET STRATÉGIE SCIENTIFIQUE

Il a été observé précédemment que l'arrêt nocturne de la brumisation dans une culture aéroponique induit chez l'orge une réponse architecturale caractéristique marquée par l'alternance de zones ramifiées et non ramifiées (ZNR) (figure 14).

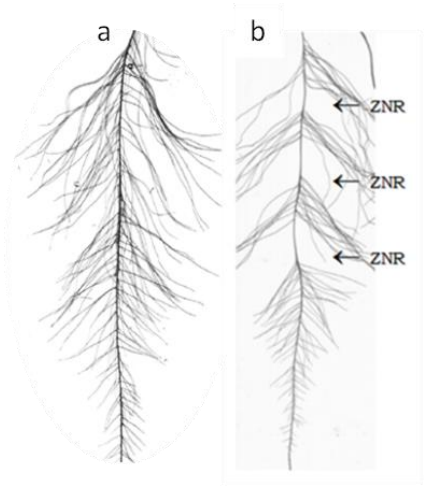


Figure 14. a. En absence de déficit hydrique, les racines latérales se développent tout au long de l'axe séminal. b. Alternance de zones ramifiées et de zones non ramifiées (ZNR) en réponse à des cycles d'arrêt et de reprise de la brumisation, au niveau d'une racine primaire d'une plantule d'orge (b).

Cette réponse a été décrite par T. Lavigne qui a également élaboré un protocole permettant de la reproduire de manière fiable. A l'issue de sa thèse, T. Lavigne a émis l'hypothèse d'un point de contrôle dans le développement des racines latérales au niveau duquel la perception du déficit hydrique inhibe le développement des RL de manière irréversible.

Partant de ces résultats et hypothèses, notre objectif est de contribuer à la compréhension des mécanismes cellulaires intervenant dans l'inhibition de la formation des RL en réponse au déficit hydrique. Le projet proposé s'articule autour de quatre questions :

1. Quelles sont les conditions qui provoquent l'inhibition de la formation des racines latérales ?
2. En se basant sur le programme de développement des RL, à quels stades de la formation des RL a lieu cette inhibition.

3. La réponse au déficit hydrique implique-t-elle les hormones qui régulent les patrons de formation des racines latérales ?
4. Quel est le degré de conservation de ces mécanismes chez deux céréales ?

Ces questions ont toutes été abordées chez l'orge. Certaines ont également fait l'objet d'une analyse comparative avec le maïs ou complémentaire avec Arabidopsis. Le choix de ces espèces s'inscrit dans la politique du groupe de recherche et dans la suite du projet de T. Lavigne (FRIA 2003-2007). De plus, le rôle important de l'auxine dans la régulation des patrons de ramification racinaire et l'existence chez le maïs de lignées transgéniques exprimant le marqueur de perception de l'auxine DR5, a motivé un travail de transposition des résultats obtenus chez l'orge, au maïs.

La thèse s'articule sous forme de cinq chapitres expérimentaux (figure 15).

Le caractère acropète de la formation des RL a pour particularité que des processus qui se succèdent dans le temps se déroulent dans des segments différents de la racine. Ainsi, les différents stades de formation des RL, depuis les premières divisions formatrices jusqu'à son émergence, se succèdent le long de la racine mère depuis le site d'initiation jusqu'au site d'émergence. Nous avons dès lors entrepris de décrire les différents stades de formation des RL et de cartographier les événements morphologiques se produisant lors de l'établissement d'un primordium (**chapitre 1**)**.**

La description de ces différents stades nous a permis de déterminer le stade de développement au niveau duquel l'inhibition se produit suit à un déficit hydrique (**chapitre 2**).

Nous avons ensuite exploité les principes de l'imagerie *time lapse* et de l'analyse cinématique de la croissance afin de préciser la localisation et le timing des évènements liés à l'arrêt de la formation des RL lors d'un déficit hydrique (**chapitre 3**).

Dans le **chapitre 4**, nous avons étudié le rôle de deux phytohormones (auxine et l'acide abscissique) impliquées dans le développement et dans la signalisation du déficit hydrique.

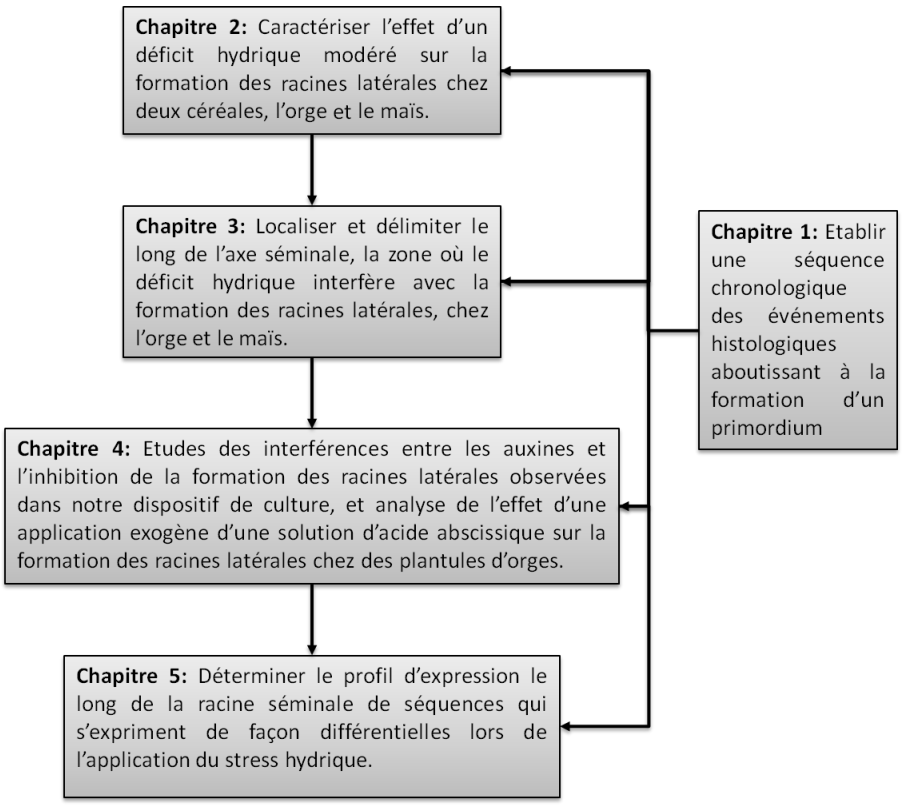


Figure 15. Stratégie scientifique mise en place pour la réalisation de cette étude.

Dans le **chapitre 5,** nous avons amorcé un travail de biologie moléculaire qui a pour objectif de valider les résultats d'une analyse transcriptomique réalisée par Lavigne et al (non publié) et d'établir une cartographie longitudinale de l'expression de gènes dont l'expression est modifiée lors de l'application d'un déficit hydrique.

La discussion des résultats est réalisée à la fin de chaque chapitre. Le document se clôture avec une conclusion générale qui rassemble les réponses apportées aux quatre questions énoncées ci-dessus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1. ETUDE HISTOLOGIQUE ET DYNAMIQUE DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES CHEZ *HORDEUM VULGARE*

INTRODUCTION

La morphogenèse racinaire, y compris la formation des RL, a pour particularité que les étapes successives se déroulent dans des segments différents de la racine. Ainsi, les différents stades de formation des RL de la séquence acropète, depuis les premières divisions formatrices jusqu'à l'émergence, se succèdent le long de la racine mère depuis le site d'initiation jusqu'au site d'émergence.

Chez Arabidopsis, l'observation précise et chronologique des événements morphologiques aboutissant à la formation des primordia a permis de construire un modèle descriptif cohérent[39]. L'établissement de ce modèle a établit un cadre de référence facilitant l'étude des mécanismes de régulation intervenant dans le processus de formation des RL.

Cependant, un tel modèle n'est disponible que pour l'espèce modèle Arabidopsis. Bien que la formation des RL présente de grandes similitudes entre espèces (succession des étapes, lieu d'initiation), des différences importantes existent. Par exemple, chez le maïs, l'initiation a lieu dans les cellules du péricycle adjacentes au phloème[23] et l'établissement des assises du primordium[25,104] impliquent également les cellules endodermiques.

Nous avons donc entrepris une étude histologique des événements morphologiques se déroulant lors de la formation des RL chez orge, afin de

disposer d'un référentiel du développement de ces racines chez une céréale. Ce travail nous a permis de mieux analyser, dans les chapitres

suivants, les mécanismes intervenant dans l'établissement de ces structures, en ayant une vue globale des processus impliqués. En parallèle, nous avons également voulu établir le caractère acropète de la séquence de d'initiation des RL chez l'orge, par le biais d'une analyse microscopique détaillée de la formation des primordia le long de l'axe séminale.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'INITIATION DU PRIMORDIUM A LIEU EN FACE D'UN PÔLE DE PROTOPHLOÈME

Les racines séminales se composent, de l'intérieur vers l'extérieur, d'un épiderme, d'un cortex constitué de 6 à 7 assises, d'un endoderme et d'un péricycle délimitant le cylindre central de la racine. Ce dernier comporte 7 à 8 pôles de protophloème, formé de deux cellules compagnes et d'un tube criblé[105], alternant avec autant de pôles de protoxylème (figure 16)

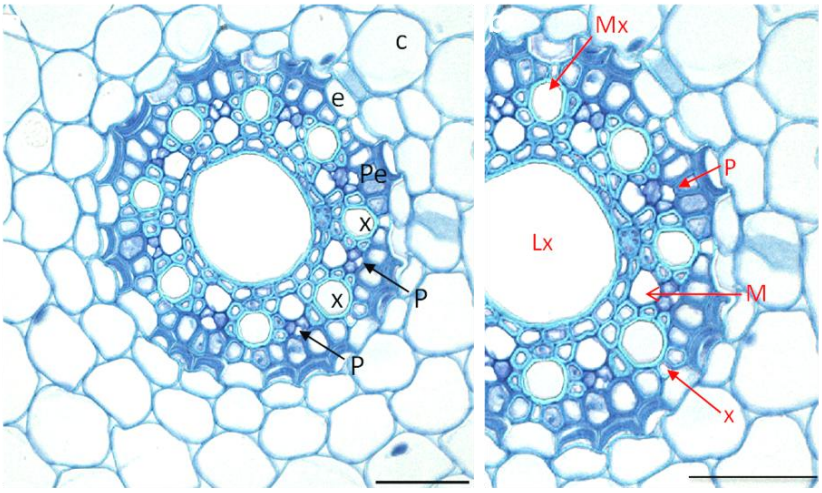


Figure 16. Coupe transversale d'une racine d'orge colorée au bleu de toluidine mettant en évidence les différents tissus composants la racine séminale à savoir le cortex (c), l'endoderme (e), le péricycle (p) et les éléments composant le système vasculaire dont la composition est détaillée sur l'image de droite (Mx : métaxylème), P : protophloème, M :Métaphloème, X : Xylème, Lx : late xylème) (barre d'échelle 0.01mm).

La réalisation de coupes radiales de la racine séminale permet de localiser avec précision le site d'initiation des RL. Chez l'orge, tout comme chez le maïs[23], l'initiation des RL se produit dans les cellules du péricycle situées en face des pôles de protophloème (figure 17 b-d). La localisation de ce site d'initiation par rapport aux faisceaux conducteurs est une différence

majeure par rapport à Arabidopsis et d'autres espèces, où l'initiation se produit dans les cellules du péricycle adjacentes au pôle de protoxylème[3,32].

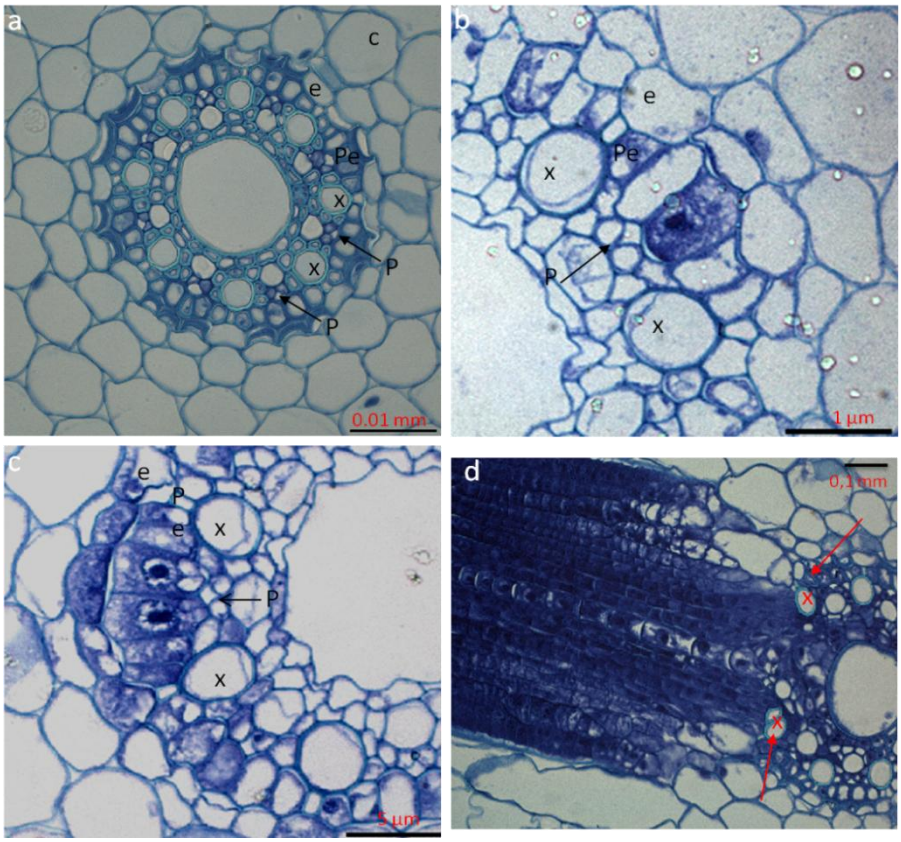


Figure 17. Coupe radiale d'une racine d'orge colorée au bleu de toluidine. Lorsqu'aucune racine latérale ne se développe, on voit parfaitement les différentes assises cellulaires composant la racine avec une alternance des pôles de xylème et de phloème (a). (b) Modification du contenu cytoplasmique d'une cellule du péricycle situé en face d'un pôle de xylème (étape initiale de l'initiation) se traduisant par une coloration bleu intense au bleu de tolluidine. (c) gonflement radial des cellules du péricycle et implication de l'endoderme. Le primordium est toujours centré au niveau du pôle de phloème (cercle rouge). (d) Emergence de la RL, et augmentation de la distance entre les deux pôles de xylème situé de part et d'autre du pole de xylème (flèche rouge) où s'est produit l'initiation. (X : xylème ; Pe : péricycle, P et flèche : phloème, e : endoderme, c : cortex).

Au niveau du cylindre central, on observe une modification importante de la structure de la stèle avec notamment, une augmentation de la distance séparant les deux pôles de xylèmes entourant le primordium, alors que le diamètre de la racine mère ne semble pas être modifié. En effet, lors des premières étapes de formation du primordium (figure 17 b et c), la distance

séparant les deux pôles de xylème est d'environ 0.05 mm alors que plus tard, lorsque la RL émerge, cette distance est de 0.1 mm (figure 17d). Cette différence de distance implique vraisemblablement une division des cellules situées entre les deux pôles.

DÉVELOPPEMENT DU PRIMORDIUM, UN PROCESSUS MULTI-PHASIQUE

L'analyse des événements morphologiques observés de manière systématique sur vingt racines nous a permis d'établir un modèle du développement des RL. En partant de l'initiation jusqu'à l'émergence du méristème de la RL, le processus de développement chez l'orge peut être divisé en six étapes.

L'initiation des racines latérales

Etape I. Le premier événement morphologique visible que nous avons pu mettre en évidence consiste en une modification du contenu cytoplasmique de deux cellules du péricycle, voisines longitudinalement et adjacentes à un pôle de protophloème (figure 18 a). Cet événement est observé dans la région apicale de la racine mère entre 10 et 20 mm de l'apex et se traduit par une coloration bleue foncée au bleu de toluidine, alors que les autres cellules de la même file possèdent une large vacuole qui n'est pas colorée au bleu de toluidine. Chez le maïs , Bell et al[25], parle de modification du contenu cytoplasmique basophile de la cellule. Cette étape pourrait coïncider avec la migration des noyaux mise en évidence chez Arabidopsis[6]. En effet, en coupe longitudinale, on observe que les noyaux des deux cellules plus foncées sont décentrés vers leur paroi commune (figure 18 b), ce qui les distingue des autres cellules du péricycle dont le noyau est situé en position médiane.

Le même processus est observé en coupe radiale. On y remarque qu'une file de cellule du péricycle montre un changement de coloration et trois autres adjacentes présentent un gonflement radial sans coloration (figure 17 c). Il est fort probable que le processus de formation des primordia implique plus d'une file de cellules et que la file centrale soit la plus avancée. Chez Arabidopsis, la formation d'un primordium implique au minimum trois files.[32,106]

Bien que cet événement soit le premier que l'on puisse détecter en microscopie, l'identité fondatrice est sans doute acquise plus tôt, donc plus près de l'extrémité de la racine mère. Chez Arabidopsis, cette acquisition semble avoir lieu dans le méristème basal, situé entre le méristème apical et la zone d'élongation[6,29,107].

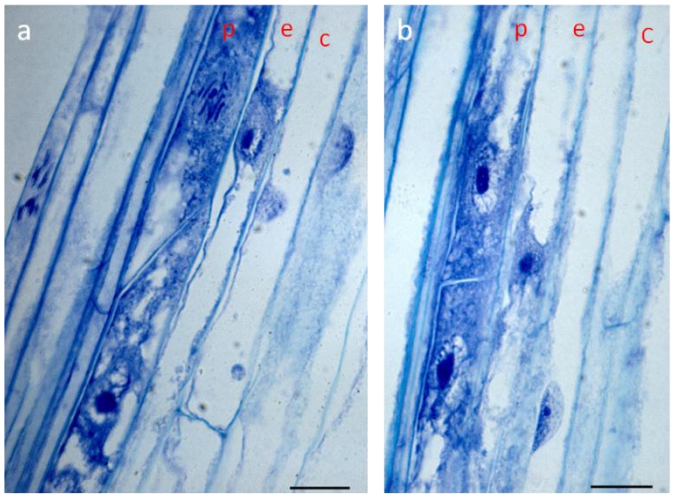


Figure 18. Coupe longitudinale de racines d'orges colorées au bleu de toluidine. (a) La coloration bleue intense se produisant au niveau de l'assise du péricycle (deux cellules du péricycle) traduit une modification du contenu du cytoplasme, et l'entrée en activité mitotique de ces cellules. (b) Les noyaux de deux cellules voisines du péricycle migrent vers l'extrémité des cellules et se positionnent de part et d'autre de la paroi commune. (p :péricycle, e :endoderme , c : cortex) (Barre d'échelle 0.01 mm).

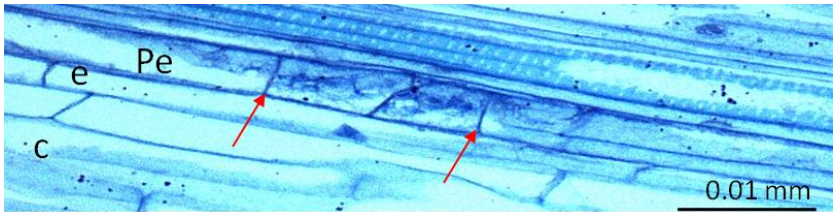


Figure 19. Coupe longitudinale d'une racine d'orge colorée au bleu de toluidine. Les cellules du péricycle se divisent de manière asymétrique entraînant la formation de deux petites cellules flanquées de deux plus grandes. Les flèches indiquent la position des nouvelles parois formées après la division asymétrique transverse dans le péricycle. (p : péricycle, e : endoderme).

Etape II : La première division des deux cellules fondatrices est une division asymétrique transverse, qui produit deux petites cellules cubiques entourées de deux cellules plus longues[76] (figure 19). Chez l'orge, il semble

que cette division ne se produise pas exactement de manière synchrone, car une des deux cellules est légèrement plus avancée que l'autre. En effet, on remarque sur la figure 16 b, que le cytoplasme d'une des deux cellules est colorée au bleu de toluidine, signe de l'entrée dans le processus de division. Ce léger décalage dans la division pourrait être annonciateur d'une asymétrie dans le processus de formation du primordium.

Etape III : Rapidement après la première division asymétrique transverse, les nouvelles cellules cubiques formées s'élargissent radialement (

figure 20 a). En coupe radiale, où les différentes files de cellules sont visibles, il apparaît clairement, que d'autres files du péricycle sont également impliquées. La

figure 20 c, montre bien que les cellules du péricycle présentes dans les 2 files de cellules adjacentes au primordium entrent également dans un processus de division (se traduisant sur la coupe par coloration bleu intense localisée par les étoiles rouges). Chez Allium cepa, Casero et *al*[38]. montrent que toutes les cellules du péricycle situées dans les files de cellules adjacentes au primordium ne se divisent pas de manière asymétrique et de ce fait, ne permettent pas la formation d'un primordium.

Dans le même intervalle, on observe une modification de la coloration (bleu intense) des cellules de l'endoderme adjacentes aux deux petites cellules du péricycle. L'endoderme participe donc très tôt au processus de formation des RL (

figure 20). L'implication de l'endoderme dans la formation des RL a déjà été observée chez d'autres espèces telles que le maïs[25], *Pisum sativum*[41], *Alium cepa*[38] ou encore *Helinathus annuus*[3].

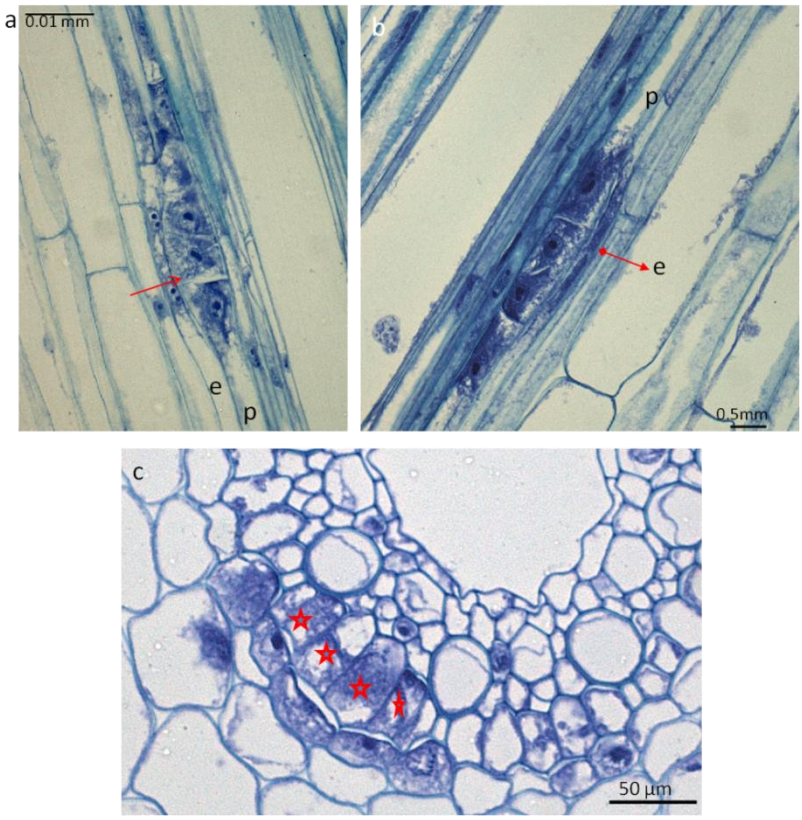


Figure 20. a. Gonflement radial des deux cellules du péricycle impliquées dans l'initiation des RL. b. Illustration des divisions précoces au niveau de l'endoderme. On observe la présence de deux noyaux ainsi que la formation d'une paroi. c. Coupe radiale d'une racine d'orge montrant une modification de la coloration de 4 cellules voisines du péricycle adjacentes au pôle de phloème. (c: cortex, p : péricycle, e : endoderme).

Développement du primordium

Etape IV : Une fois que la première division asymétrique s'est produite, les divisions des cellules recrutées (péricycle et endoderme) vont se succéder de manière organisée.

Dans un premier temps, les deux cellules cubiques subissent une division péricline créant, dans le plan d'une coupe longitudinale, une nouvelle assise formée de quatre cellules (deux courtes centrales entourées de deux triangulaires). Le primordium se compose à ce stade de trois assises, une assise interne dérivant de la première division transverse (PI – Péricycle Interne), une assise externe formée par la division péricline (PE – Péricycle

Externe) et l'assise formée par les cellules de l'endoderme (figure 21). Chez le maïs, suite à cette première division péricline, quatre cellules filles différant par leur taille sont formées[25]. Il s'avère que les deux cellules les plus proches de la stèle sont plus petites que celles adjacentes à l'endoderme. Bell et al.[25] suggèrent que cette différence de taille reflète l'activité de division des cellules, les cellules situées à proximité de la stèle se divisant de manière plus intense que les autres cellules.

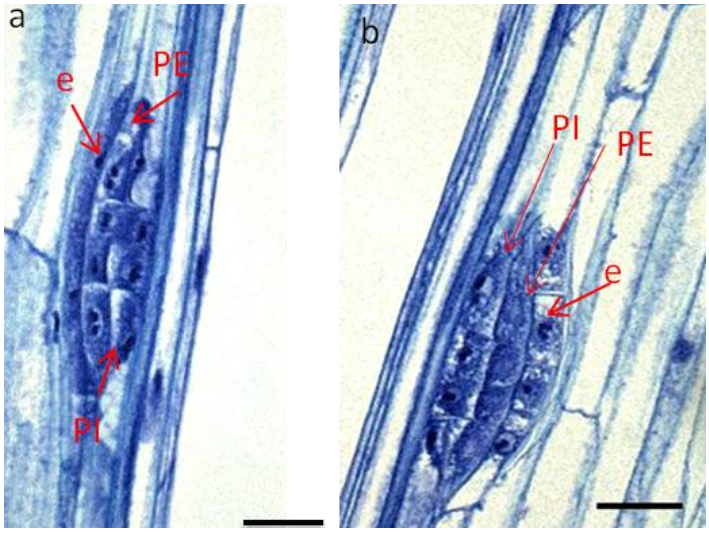


Figure 21. Illustration du stade IV. (a) On observe les trois assises: une assise interne dérivant de la première division transverse (PI Péricycle Interne), une assise externe formée par la division péricline (PE : Péricycle Externe) et l'assise formée par les cellules de l'endoderme (e). Plusieurs files de cellules issues du péricycle sont impliquées dans le processus de formation des racines latérales, de même pour l'endoderme, où l'on observe une coloration plus intense. (b) Au niveau de l'endoderme, les cellules subissent une division anticline entraînant la formation de quatre petites cellules, formant une nouvelle assise au primordium. (barre d'échelle 0.01 mm)

A partir d'ici, la description (y compris le dénombrement des cellules) se fera essentiellement dans le plan longitudinal (et axial) de la future RL.

En même temps, les cellules de l'endoderme subissent une division anticline asymétrique, entraînant la formation de quatre petites cellules cubiques dont les deux centrales sont plus courtes (figure 21 b). Le mécanisme assurant la localisation des plans de division en vis à vis des cellules du péricycle (et le centrage des deux assises) n'est pour le moment pas connu.

Etape V et VI: Une série de divisions anticlines et périclines se produisent au niveau de l'assise du péricycle (PI) (figure 22). Mais, du fait du nombre croissant de cellules impliquées, l'ordre de déroulement de ces divisions est difficile à mettre en évidence. Les premières étapes semblent se dérouler comme présenté à la figure 24.

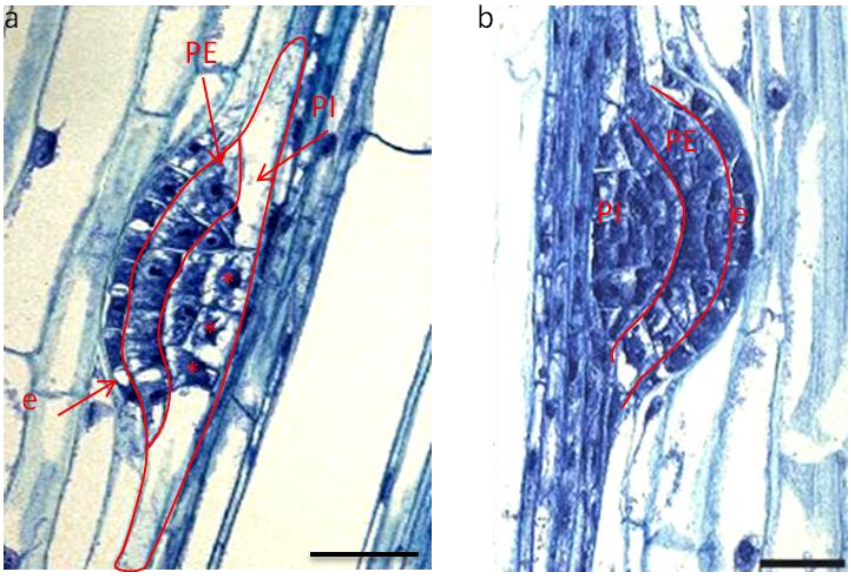


Figure 22. (a) Illustration du stade V. Division anticline des cellules de l'assise externe du péricycle (PE) et de l'endoderme (e). Les deux cellules centrales de l'assise interne du péricycle (PI) se divisent périclinement créant une nouvelle assise. A ce stade, PI semble être constitué de deux assises et de trois files de cellules (croix rouge). (b) Illustration du stade VI. Les cellules de PI se divisent de manière péricline et réorientent leur plan de division afin de former les différentes files du cylindre central. Au niveau de PE, les cellules situées à la périphérie se divisent parallèlement à la surface du primordium, générant de nouvelles assises à l'origine du cortex, de l'endoderme et du péricycle de la future RL. Barre d'échelle 8 µm

Dans un premier temps, les deux cellules centrales de PI subissent une division anticline, et une des deux plus longues cellules se divise de manière pericline. En même temps, les deux cellules situées de chaque coté du primordium se divisent de manière pericline, créant ainsi une nouvelle assise. A ce stade, PI semble être constitué de deux assises et de trois files de cellules (figure 22 b). Le caractère impair du nombre de files, qui préfigure la configuration finale du cylindre central de la RL, est donc déjà établi.

Deux nouvelles files de cellules apparaissent alors de chaque coté du primordium, pour former les sept files présentes dans le cylindre central de la RL. Les événements qui ont permis la formation de ces assises ne sont pas très clairs sur les coupes, et différents schémas peuvent être envisagés. L'un deux pourrait correspondre au schéma VI proposé sur la figure 24. Lors des divisions précédentes, deux cellules triangulaires ont été formées. Ces cellules pourraient se diviser de manière anticline puis pericline, créant ainsi deux nouvelles cellules de part et d'autre du primordium, à l'origine des files de cellules entrant dans la formation du cylindre central.

La formation d'un nombre impair de files de cellules implique une forme d'asymétrie dans le processus de division. Une asymétrie apparaît également entre les deux cotés du primordium dans le même plan des coupes longitudinales, au niveau des divisions anticlines qui se produisent dans les assises de l'endoderme et de PE. Ces deux assises subissent une série de divisions anticlines qui vont permettre la formation d'une enveloppe de 8 à 10 petites cellules cubiques de même taille. L'intervalle entre les divisions ne semble pas être identique de part et d'autre du primordium, comme l'indique la taille des cellules de PE. On peut imaginer que cette multiplication asymétrique contribue à déterminer l'angle d'insertion des RL, qui n'est généralement pas un angle droit.

A ce stade, le primordium commence à traverser la première assise du cortex de la racine mère.

Par la suite, les cellules de PI ne réalisent plus que des divisions anticlines qui allongent les différentes files du cylindre central et contribuent à la progression du primordium au travers des assises de la racine mère. Au niveau de la base, on retrouve les sept cellules à l'origine des sept files du cylindre central. On notera que ces divisions anticlines (dans le référentiel de la racine mère) sont des divisions transverses dans le référentiel de la RL en formation.

Au niveau de PE, certaines cellules situées en périphérie se divisent parallèlement à la surface du primordium, créant ainsi de nouvelles assises qui seront à l'origine du cortex, de l'endoderme et du péricycle de la future RL. Ces divisions déplacent l'assise externe du primordium (ex-endoderme)

et provoquent une rupture dans la continuité de l'assise endodermique de la racine séminale (figure 23).

A ce stade, les deux assises PE et PI semblent progresser de manière indépendante. Cette autonomie des assises joue un rôle important dans la construction du primordium et, comme chez le maïs[25], ce sont les cellules du péricycle accolées au cylindre central de la racine mère qui se divisent activement et donnent naissance au cœur du primordium.

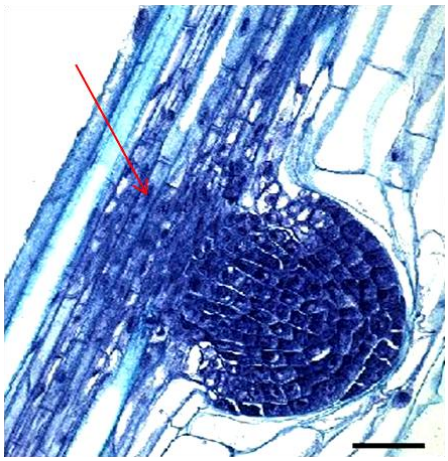


Figure 23. Au niveau de PE, les cellules situées à la périphérie se divisent parallèlement à la surface du primordium, générant de nouvelles assises à l'origine du cortex, de l'endoderme et du péricycle de la future RL. La flèche met en avant la formation du plexus vasculaire. (Barre d'échelle 8 µm).

Emergence du primordium

Etape Emergence : A un stade ultérieur, les quatre cellules de l'endoderme situées au sommet du primordium subissent une division péricline entraînant la formation d'une nouvelle assise cellulaire d'étendue limitée et localisée sur la partie apicale du primordium. Cette petite assise de cellule est à l'origine de la coiffe. A ce stade le primordium possède l'ensemble des assises cellulaires de la RL. On peut donc considérer que le méristème apical de celle-ci est entièrement formé.

L'émergence de la RL coïncide avec le moment où la nouvelle racine adopte une vitesse de croissance considérablement plus importante. Il s'écoule approximativement une centaine d'heures (cf chapitre 3) entre les premières divisions asymétriques et l'émergence, durant lesquelles la future RL aura cru de 0.2 mm. Passée l'émergence, la RL croît à une vitesse proche de 0.5 mm par heure. Ce phénomène est parfois interprété comme une forme de dominance apicale. Il pourrait cependant simplement refléter

l'apparition de la zone d'élongation, responsable en grande partie de la croissance racinaire. En effet, une fois que le méristème de la RL est complètement formé, les cellules situées entre sa base et le cylindre central de la racine mère cessent leur activité de division et adoptent le comportement des cellules qui traversent la zone d'élongation. L'expansion rapide de ces cellules auxquelles se joignent les nouvelles cellules produites par le nouveau méristème, forcent le déplacement de celui-ci. Ce déplacement s'accélère jusqu'au moment où la zone d'élongation est complètement établie.

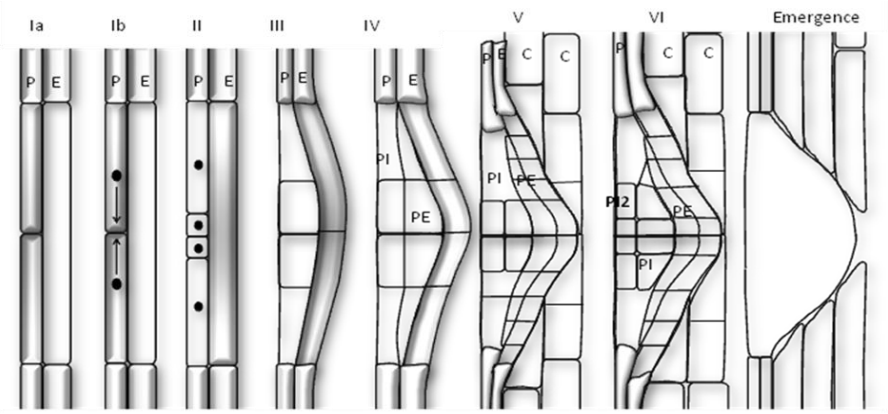


Figure 24. Modèle du développement du primordium à l'origine des RL chez l'orge. Ce modèle a été établi en se basant sur l'analyse des structures colorées au bleu de toluidine, et observées en microscopie optique. L'analyse a été réalisée sur 20 racines. Le processus est divisible en sept étapes dont chacune d'elle est représenté ci-dessus et identifié par un numéro associées. (P: péricycle, E: endoderme, C:cortex, PI : assise interne du péricycle, PE: assisse externe du péricycle)

LES CONSÉQUENCES DE L'INITIATION DES RACINES LATÉRALES POUR LA RACINE MÈRE

Outre le péricycle et l'endoderme de la racine mère, desquels dérivent toutes les assises de la RL, d'autres tissus de la racine mère sont également impliqués dans l'établissement de la RL. Chez l'orge, les cellules du parenchyme du cylindre central et les cellules corticales se divisent activement et participent indirectement au développement de la future RL.

Etablissement d'une connexion vasculaire entre la racine mère et la RL

Dès les premières étapes de la formation du primordium et jusqu'à l'émergence des RL, les cellules du parenchyme de la stèle se divisent transversalement, entraînant la formation de différentes assises de cellules, qui *in fine* formeront le "plexus vasculaire"[13,108](figure 22 b, figure 23). Chez l'orge, ce plexus serait formé d'éléments de phloème (*connecting phloem*) et de xylème (*connecting xylem*) et permettrait l'établissement de connexions entre la racine mère et la RL [109].

L'établissement de cette connexion permet d'assurer le transport de l'eau et des éléments minéraux entre les vaisseaux de la racine mère et la RL, ce qui semble être logique lorsque l'on considère le rôle des RL dans l'acquisition des ces éléments et la nécessité de leur approvisionnement en assimilas carbonés[17-19]. Une seconde fonction de ce plexus vasculaire serait de créer une barrière au passage de bulles d'air et de microbes qui pénètrent dans les espaces intercellulaires du cortex de la racine mère créés par le passage de la RL[108].

Un rôle de soutien et de rigidification pourrait également être attribué à ce plexus vasculaire. En effet, les RL rencontrent rapidement un substrat plus rigide que la racine mère, et la force de pression exercée par la croissance du primordium doit exercer une contrainte mécanique importante sur le cylindre central de la racine mère sur lequel s'appuie la base de la RL.

La division des cellules du cortex : un passage pour le primordium au travers de la racine mère

Dès les premières étapes de formation d'un primordium, les cellules du cortex de la racine mère situées dans son voisinage montrent des signes de division. En effet, dès l'étape III dans le programme de formation du primordium, on peut observer dans les cellules du cortex adjacentes au primordium, soit directement le noyau en cours de division comme c'est le cas sur la figure 25 soit des cellules de taille plus petite que celles situées en amont et aval.

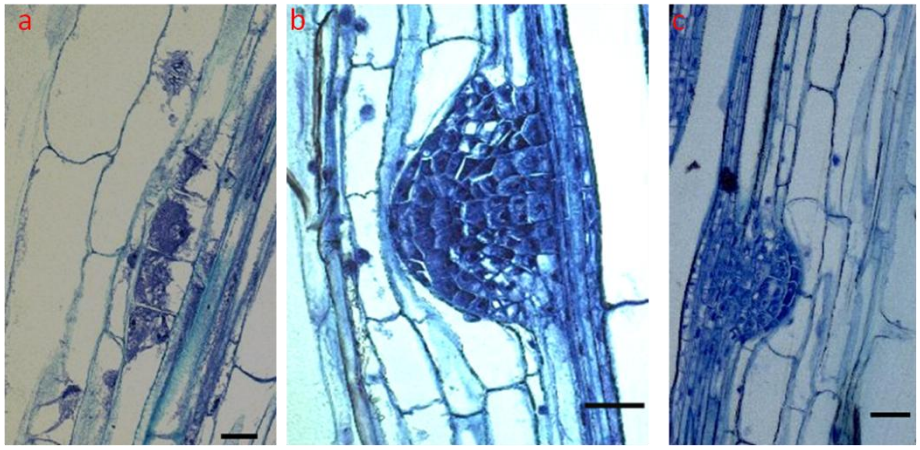


Figure 25. (a) Présence d'une activité mitotique au niveau des cellules du cortex alignées sur le site de formation du primordium (a). (b et c) Les cellules du cortex accolées au primordium sont déjà divisées. Barre d'échelle 0.01 mm.

Cette différence de taille est relativement bien marquée, et les mesures réalisées montrent que les cellules adjacentes au primordium sont environ deux fois plus petites que les autres (figure 26), ce qui laisse penser que ces cellules se sont formées par division des cellules déjà présentes. Ces divisions se produisent non seulement dans les cellules du cortex en contact direct avec les primordium mais également dans les assises externes du cortex.

Cette participation du cortex a été observée chez d'autres espèces telles que *chez* le maïs[25] et *Allium cepa*[30], mais pas chez Arabidopsis. Chez l'orge, le cortex est constitué de 8 à 10 assises de cellules, ce qui veut dire que pour émerger le primordium doit traverser ces différentes assises. Les cellules du cortex et de l'épiderme de la racine mère situées face à un primordium doivent donc «se séparer», et créer une sorte de chemin préférentiel par lequel le primordium pourra émerger. Cette réorganisation cellulaire pourrait faciliter l'émergence du primordium et limiter les dommages causés par cette intrusion[3].

Chez Arabidopsis, il a été montré que le passage du primordium est facilité par l'intervention d'enzymes secrétées par les cellules de l'assise externe de ce dernier (*Cell Wall Remodelling Enzymes, CWRE*)[43] dans les cellules adjacentes du cortex. Ces enzymes modifieraient la structure des parois des

cellules du cortex adjacentes au primordium, de manière telle que la pression exercée par le primordium entraîne la séparation des cellules situées face à lui et pas leur déchirure (figure 27). Chez Arabidopsis, cependant, ce ne sont que trois assises de cellules (endoderme, cortex et épiderme) que le primordium doit traverser[1]. Ceci pourrait sans doute expliquer l'absence de divisions réorganisatrices chez cette espèce.

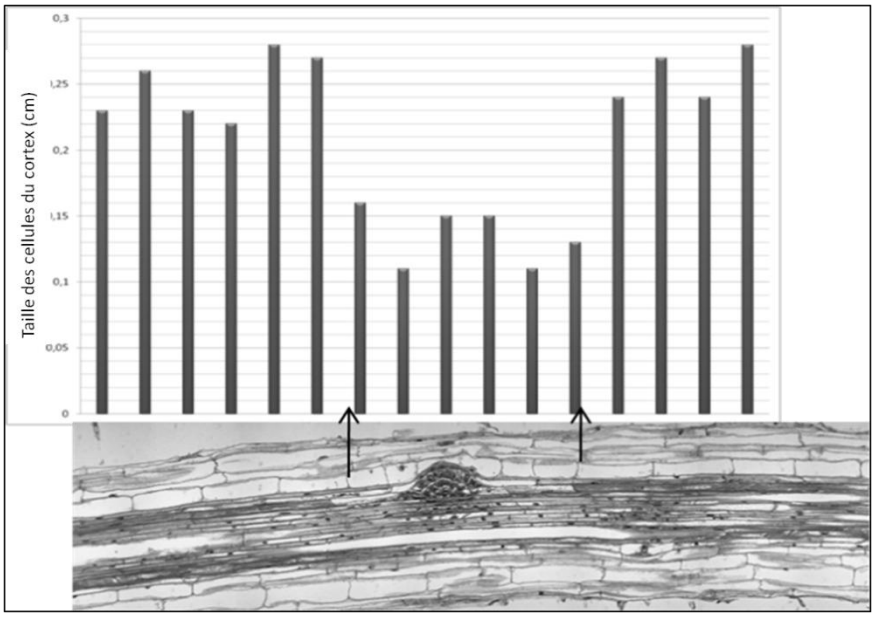


Figure 26. Evolution de la taille des cellules du cortex le long de l'axe racinaire d'une racine séminale d'orge au niveau de laquelle se forment des primordia. Les cellules situées en face du primordium en formation sont plus petites que les cellules situées de part et d'autre du primordium.

Il est donc probable que les divisions observées au niveau des cellules du cortex, combinées avec l'action des CWRE, permettent de faciliter un passage pour l'émergence du primordium.

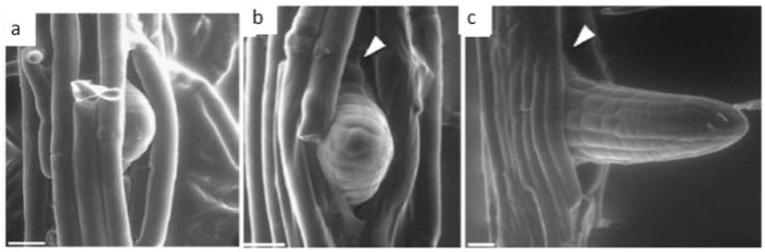


Figure 27. Image montrant l'émergence d'un primordia chez Arabidopsis d'après Péret (2009)[37]. Cette image met clairement en évidence le fait que les cellules corticales se séparent pour permettre le passage du primordium, et il n'y a pas de déchirements des tissus suite à l'émergence.

Par ailleurs, lorsque la RL a émergé de la racine mère, au niveau de la jonction entre la latérale et la racine séminale, les cellules du cortex semblent être accolées à la RL, créant ainsi une sorte de protection au niveau de la zone d'émergence (figure 28). La croissance en diamètre du primordium pourrait être responsable de cet effet. Dans ce contexte, le maintien de l'intégrité des cellules corticales de la racine mère pourrait être important et indiquer que la traversée du cortex s'accompagne d'une phase de reconstruction plutôt que d'un processus facilitant cette traversée.

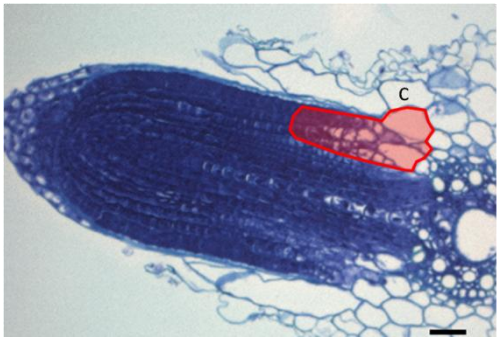


Figure 28. Emergence d'une RL d'orge. Les cellules du cortex de la racine mère semblent former un prolongement continu avec le cortex de la RL émergente (contournement rouge), barre d'échelle 0.01 cm.

CARACTÈRE ACROPÈTE DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES CHEZ L'ORGE

Le volume occupé par les RL le long de la racine séminale, en conditions normales de croissance peut être assimilé à un cône ayant la racine séminale pour axe de symétrie (figure 29). Les RL les plus longues sont situées dans la région basale, alors que les plus courtes se situent au niveau de la région apicale. Leur longueur est donc décroissante de la base vers l'apex. Considérant que la longueur d'une RL est proportionnelle au temps qui s'est écoulé depuis son émergence, cette configuration est typique

d'une séquence acropète. Cependant, une observation de plus prés révèle la présence de racines plus courtes entre des racines plus longues, ce qui pourrait refléter soit un écart à la règle acropète, soit des différences de vitesse de croissance entre les RL.

Nous avons dès lors entrepris de séparer ces deux hypothèses et de vérifier le caractère acropète de la séquence d'initiation des RL chez l'orge. Ainsi, la réalisation d'une étude microscopique détaillée de la formation des primordia le long de la racine séminale, nous a permis de caractériser, au niveau de segments racinaires successifs de 10 mm de long, le nombre de primordia présents ainsi que leur stade de développement. L'ensemble des résultats obtenus pour les six racines étudiées sont présentés dans le tableau 1.

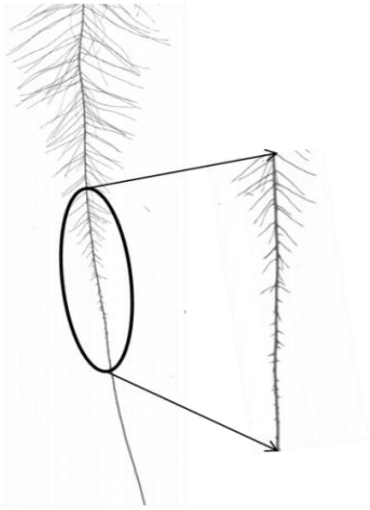


Figure 29. Racine séminale d'orge cultivée en aéroponie. Les racines latérales apparaissent le long de la racine séminale, et forment un profil conique caractéristique de la séquence acropète. L'agrandissement d'une région de la racine séminale montre cependant la présence de racines plus courtes entre des racines plus longues.

Nous n'avons observé aucun primordium, même à des stades très précoces, dans les dix premiers millimètres du côté apical. Ce résultat est surprenant car c'est dans cette région que nous avions observé les stades I dans les expériences précédentes. Ce résultat est sans doute lié à la grande difficulté d'observer ces stades précoces dans des coupes longitudinales. Dans la portion racinaire située entre 10 et 20 mm de l'apex, des primordia dont la morphologie correspond au stade II du développement établi plus haut, ont été observés.

Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'apex et que l'on se rapproche de la région basale, les primordia présentent des stades de développement de plus en plus avancés. Bien qu'il soit difficile de faire la distinction entre certains stades de développement tels que II et III, ou encore III et IV, aucune nouvelle structure n'a été mise en évidence entre des primordia de stades plus avancés. Pour une région donnée, nous retrouvons uniquement des primordia à un stade de développement identique. Il semble donc que l'apparition des primordia le long de la racine séminale se fasse bien selon une séquence acropète.

Tableau 1. Nombre et stade de développement des primordia le long de racines séminales d'orge. L'ensemble des primordia des six racines observées n'ont pas pu être détectés et certains ne sont dès lors pas repris dans le décompte ici.

Stade de développement Distance de l'apex	I	II	III	IV	V	VII	VII	Émergence
0-10 mm	0							
10-20 mm		6	2					
20-30 mm			14	4				
30-40 mm			6	9				
40-50 mm				2	10			
50-60 mm						37		
60-70 mm							13	
70-80 mm							9	
80-90 mm								40

La mise en évidence et l'identification des jeunes structures est nettement facilitée lorsque les coupes longitudinales sont rigoureusement parallèles à l'axe longitudinal de la racine séminale. Ces coupes sont cependant difficiles à obtenir et, du fait du nombre élevé de coupes à réaliser pour traverser le cylindre central et du nombre de segments par racines, nous avons dû analyser des coupes moins bien orientées. On peut donc supposer qu'un certain nombre de primordia n'ont pu être détectés. Les nombres repris dans le tableau 1 ne constituent dès lors pas un relevé exhaustif des primordia présents dans les racines étudiées, et ne peuvent être utilisés pour estimer les fréquences des différents stades dans les différents fragments étudiés.

Les structures les plus jeunes (stades I et II, qui correspondent à la première division asymétrique) n'ont été retrouvées que dans la région apicale entre 10 et 20 mm. Partant d'observations similaires, Dubrovsky et *al*. concluent que l'initiation des RL chez Arabidopsis suit une séquence acropète[28].

Nos observations suggèrent donc que l'initiation des RL chez l'orge se fait bien selon une séquence acropète. Il apparaît également au vu de ces résultats, que l'initiation des RL se fait dans une région de la racine mère située à moins de 10 mm de l'apex, puisqu'à cette distance sont observées les premières divisions asymétriques. Ces conclusions s'appuient non seulement sur la position des stades I et II, mais également sur la consistance du positionnement des stades successifs.

CONCLUSION

Chez l'orge, la formation d'une RL commence par la division quasi simultanée de cellules du péricycle et de l'endoderme, comme chez le maïs, le riz, *Helianthus annuus* ou encore *Cucurbita maxima*[3]. Ces espèces se comportent donc différemment d'Arabidopsis, chez qui l'ensemble des tissus formant les RL dérivent du péricycle. L'orge et le maïs se distingue également d'Arabidopsis par le fait que l'initiation a lieu en face des pôles de protophloème.

De plus, nous avons montré que les cellules du cortex adjacentes au primordium et leurs voisines des assises externes du cortex, se divisent pour former des cellules de plus petite taille. Ces divisions ont lieu très tôt dans le processus de formation du primordium (dès l'étape III). Elles pourraient faciliter la déformation des assises corticales induite par l'augmentation du volume du primordium et, plus tard, la séparation des cellules du cortex lors de son émergence. Considérant le nombre d'assises corticales impliquées dans l'émergence, la présence de petites cellules permet plus facilement la formation d'un passage par séparation des cellules que la présence de grandes cellules

Au vu des similitudes entre l'orge, le maïs et le riz, on peut envisager que la formation des RL chez les céréales suit un schéma similaire. Si tel est le cas,

le modèle de la formation des RL établi lors de notre étude pourrait être un point de référence pour d'autres espèces que l'orge.

Le modèle établi ici se base sur une étude histologique de la racine séminale en coupe longitudinale, c'est-à-dire qu'un seul plan du primordium est étudié. Or, le primordium est une structure tridimensionnelle. Sa formation implique donc d'autres files de cellules que celles visibles dans une coupe longitudinale médiane. Les quelques coupes radiales montrées dans ce rapport montrent bien qu'au moins quatre files de cellules du péricycle sont impliquées dans l'établissement du primordium. Nous ne connaissons toutefois pas les événements se produisant dans ces cellules. Pour disposer d'un modèle complet, il faudrait réaliser une étude combinant projections radiales et longitudinales, qui permettrait de mettre en évidence les étapes morphologiques successives.

Malgré les différences avec Arabidopsis, le programme de développement chez l'orge peut, comme chez Arabidopsis, être découpé en trois grandes étapes principales :

i. l'initiation qui implique une stimulation des cellules du péricycle,
ii. l'établissement du primordium via une série de divisions organisées,
iii. l'émergence du méristème qui, comme nous le suggérons ici, coïncide vraisemblablement avec le stade où la nouvelle racine se dote d'une zone d'élongation active.

Le caractère organisé des divisons implique des mécanismes étroits de contrôle. En particulier, chaque cellule doit disposer, à tout moment, de l'information lui permettant de progresser dans son programme de développement. Cette information est vraisemblablement communiquée par le biais de signaux que les cellules s'échangent et par les gradients intercellulaires à la formation desquels elles contribuent par l'activité de leurs transporteurs.

La formation d'une nouvelle RL ressemble ainsi fortement à un système auto-organisé, dont la polarité pourrait être assurée par les quelques cellules du centre quiescent qui maintiennent leur identité et leur position.

La question de savoir à partir de quel stade la structure du primordium peut être considérée comme autonome reste ouverte, mais la ressemblance importante entre un jeune primordium et la partie apicale du méristème d'une RL mature suggère que cette autonomie soit établie rapidement.

Une fois le développement du méristème achevé, celui-ci poursuit son activité en déposant derrière lui des cellules qui ne se divisent plus. La zone de transition et la zone d'élongation vont ainsi successivement se former. L'expansion cellulaire rapide des cellules, progressivement plus nombreuses dans la zone d'élongation, va induire une accélération considérable du déplacement du méristème qui coïncide, chez l'orge, avec l'émergence de la RL. L'étape d'activation du méristème, à laquelle il est fait référence chez Arabidopsis, mais pour laquelle nous n'avons pas trouvé de définition claire, pourrait être le moment où la zone d'élongation commence à se former. En fonction de l'épaisseur des tissus de la racine mère à traverser et de la longueur de la zone de division de la RL, l'activation pourrait avoir lieu avant, pendant ou après l'émergence.

CHAPITRE 2. INHIBITION DE L'INITIATION DES RACINES LATÉRALES CHEZ L'ORGE ET LE MAÏS EN RÉPONSE À UN DÉFICIT HYDRIQUE TRANSITOIRE

INTRODUCTION

Les plantes ont développé des mécanismes de plasticité qui leur permettent d'adapter leur architecture racinaire, sans doute afin de maximiser les chances d'assurer leur ancrage et leur alimentation hydrique et minérale[11-12]. Un exemple classique réside dans la capacité des plantes à former de nouvelles racines à proximité des sites où certains éléments minéraux sont disponibles[22,88,93].

Un volet important de cette plasticité concerne les RL, dont la formation et la croissance peuvent être stimulées ou réprimées en fonction de l'environnement racinaire[13-14,91]. Le déficit hydrique, qui est l'un des stress abiotiques les plus répandus et qui limitent fortement la productivité des cultures, est un des facteurs environnementaux affectant le développement des RL. Cependant, son effet est très varié et dépend fortement de l'espèce considérée ainsi que de la nature du déficit (durée et intensité). Une diminution de la disponibilité en eau entraîne une inhibition de l'émergence des primordia sans affecter l'initiation des RL chez Arabidopsis[110-111], alors qu'elle entraîne une inhibition de l'élongation des RL chez le maïs[98], voir même stimule la formation des RL chez *Glycine max* [112].

Une série d'expériences réalisées sur des plantules d'orges (*Hordeum vulgare)* cultivées en aéroponie et en conditions contrôlées ont permis de montrer que l'arrêt transitoire de la brumisation de la solution nutritive

durant la période nocturne inhibe de manière caractéristique la formation des RL (figure 30, Lavigne et *al*., non publié)

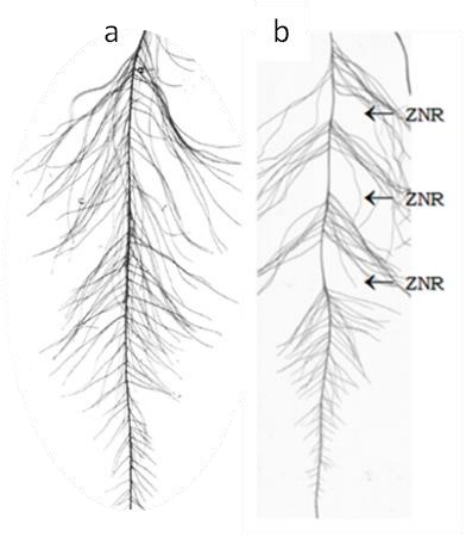


Figure 30. a. En absence de déficit hydrique, les racines latérales se développent tout au long de l'axe séminal. b. Alternance de zones ramifiées et de zones non ramifiées (ZNR) en réponse à des cycles d'arrêt et de reprise de la brumisation, au niveau d'une racine primaire d'une plantule d'orge (b).

Dans le cadre de notre étude, nous avons entrepris (i) de caractériser plus finement l'effet de l'application d'un déficit hydrique modéré sur la formation des RL chez l'orge et (ii) de le comparer avec la réponse du maïs aux mêmes conditions.

RÉSULTATS

INHIBITION DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES EN RÉPONSE À UN DÉFICIT HYDRIQUE TRANSITOIRE

Les RL de l'orge et du maïs se forment tout le long de l'axe séminal principal selon une séquence acropète qui se manifeste par la présence des RL les plus longues au niveau de la base et les plus courtes au niveau de l'apex (figure 31 a et c). Si l'on soumet les plantules âgées de 6 jours après germination, à un déficit hydrique modéré de 8 heures (phase nocturne), on observe chez les deux espèces une absence de RL dans une zone bien délimitée de la racine séminale (figure 31 b et d). Cette réponse est très marquée sur des plantules, dont les racines présentes justes après la germination, ont été excisées de manière à ne garder qu'une seule racine séminale (la racine primaire chez le maïs). En absence d'excision, des zones dépourvues de RL sont également observables, mais de manière moins

prononcée et inégale entre racines (Lavigne et al, résultats non publiés). Dans les expériences suivantes, nous n'avons dès lors conservé qu'une seule racine séminale/primaire, généralement la plus grande.

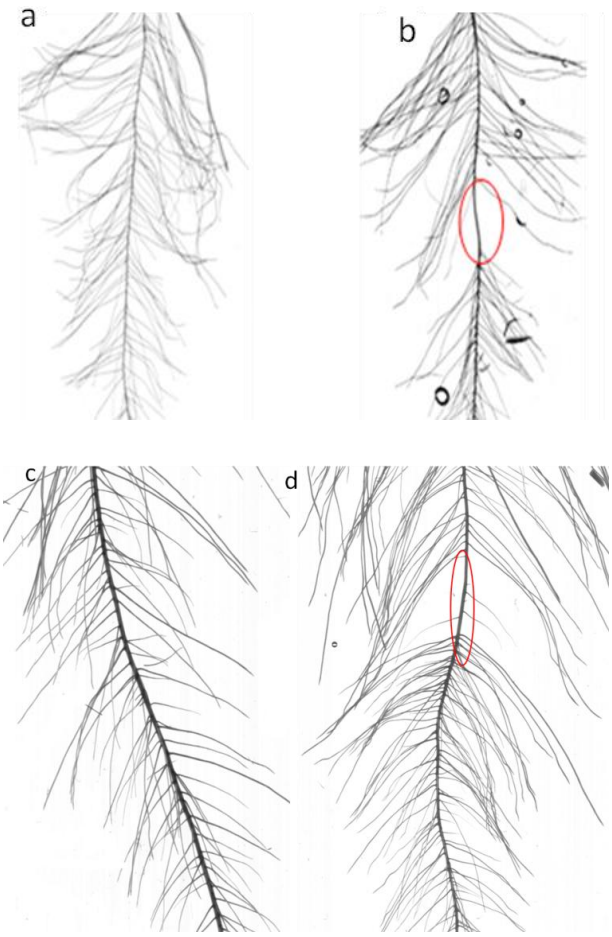


Figure 31. Patrons de ramification racinaire chez l'orge (a) et le maïs (c) cultivés en aéroponie (témoin). L'application d'un déficit hydrique de huit heures induit l'arrêt de la ramification sur une zone clairement délimitée (au niveau du cercle noir) chez les deux espèces (b et d).

L'inhibition de la formation des racines latérales est provoquée par un déficit hydrique (résultats de T. Lavigne)

Le traitement coïncide avec la phase nocturne pendant laquelle la transpiration est faible ou nulle. Pendant cette période, un film de solution nutritive est maintenu à la surface de la racine, film dont les teneurs sont

susceptibles d'évoluer du fait des processus de diffusion et de transport vers et/ou depuis la racine.

Afin de séparer les effets du déficit hydrique de ceux d'une modification de la composition de la solution nutritive, des plantes d'orges cultivées uniquement en présence d'eau déminéralisée ont été soumises à un déficit hydrique. L'apparition d'une zone inhibée dépourvue de RL est également observée (figure 32). L'inhibition de la formation des RL semble donc bien être la conséquence d'un déficit hydrique et n'est pas liée aux éléments minéraux présents dans la solution nutritive.

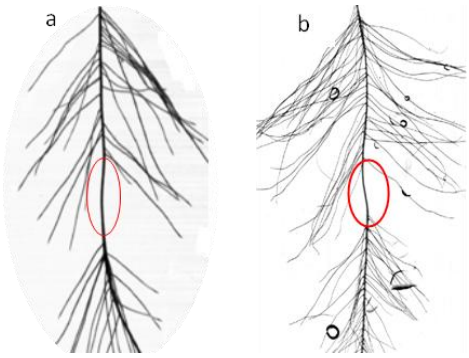


Figure 32. Patrons de ramification de plantules d'orge cultivées en aéroponie avec de l'eau déminéralisée (a) et en présence d'une solution nutritive (b). L'application d'un déficit hydrique transitoire induit, comme plus haut, l'arrêt de la ramification dans une zone bien délimitée.

L'INHIBITION DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES EST UN PHÉNOMÈNE IRRÉVERSIBLE (RÉSULTATS DE T. LAVIGNE)

Certaines espèces manifestent une inhibition temporaire de la formation des RL en réponse à un déficit hydrique, en ce sens qu'une fois les conditions hydriques rétablies, les RL reprennent leur développement[13]. Nous avons dès lors tenté de stimuler la formation de RL dans les zones inhibées de différentes manières.

La zone inhibée étant visible sept jours après l'application du traitement, la culture est normalement arrêtée à ce moment. Dans un premier temps, la culture des plantes a été réalisée pendant une période plus longue, et les plantes ont été gardées en culture 12 jours de plus. Aucune RL n'est apparue dans la zone inhibée. A ce moment, la racine séminale a atteint le fond du bac et s'est donc retrouvée dans des conditions de culture hydroponique. Cette modification subite de l'environnement n'a pas induit la formation de RL dans la zone inhibée.

Par ailleurs, une expérience d'excision de l'apex a été réalisée. Cette opération est connue pour stimuler la formation des RL au voisinage de la zone excisée[113-114]. Comme attendu, l'excision de l'apex de racines séminales cultivées en conditions témoins induit la formation « d'un balai de sorcière» dans la partie apicale de la racine. Par contre, lorsque l'excision est réalisée après un épisode de déficit hydrique, le balai de sorcière ne se développe que partiellement et n'atteint pas la zone inhibée. La stimulation du développement des RL suite à l'excision de l'apex ne semble donc pas rétablir la formation des latérales dans la zone inhibée (figure 33). Ainsi, l'inhibition de la formation des RL suite à l'application d'un stress hydrique modéré chez l'orge et le maïs, semble être un phénomène irréversible.

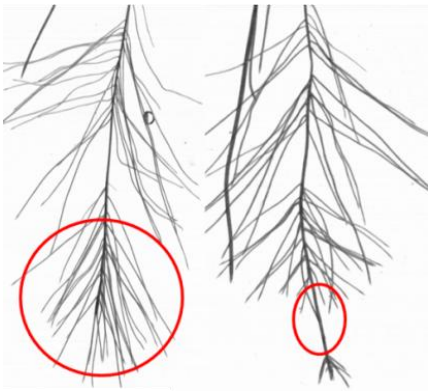


Figure 33. Effet de l'excision de l'apex sur la formation des racines latérales sur une racine témoin (a, "balai de sorcière") et après un épisode de déficit hydrique (b). La zone inhibée formée suite au déficit hydrique n'est pas comblée par le développement de racines latérales induite par l'excision.

CETTE INHIBITION INTERVIENT À UN STADE PRÉCOCE DE L'INITIATION

Afin de déterminer à quelle étape du développement des RL l'inhibition à lieu, nous avons entrepris une analyse microscopique des zones inhibées chez l'orge et le maïs. Cette analyse a été réalisée sur 20 zones inhibées (orge) et 15 zones (maïs) d'environ 1 cm de long provenant de différentes expériences.

Le stade de développement des primordia observés dans les zones inhibées provenant des racines d'orges, a été réalisé par comparaison au modèle de développement proposé dans le chapitre 1. Pour le maïs, nous nous sommes basés sur l'étude réalisée par Bell et *al*[25].

Sur l'ensemble des zones analysées provenant des racines d'orges (observation de 20 zones inhibées), aucun primordium ayant un stade de

développement supérieur au stade I n'a été observé. Ponctuellement, 2 ou 3 primordia au stade II ont pu être mis en évidence, contre une dizaine de primordia attendus sur base de la densité moyenne de RL en absence de traitement. Il est possible que des primordia au stade I ou II n'aient pas été observés. Par contre, les primordia au stade III sont facilement observables et n'auraient pu être manqués. Il semble donc que le déficit hydrique appliqué dans nos expériences bloque le développement avant ou au moment de la première division asymétrique (figure 34 a et b).

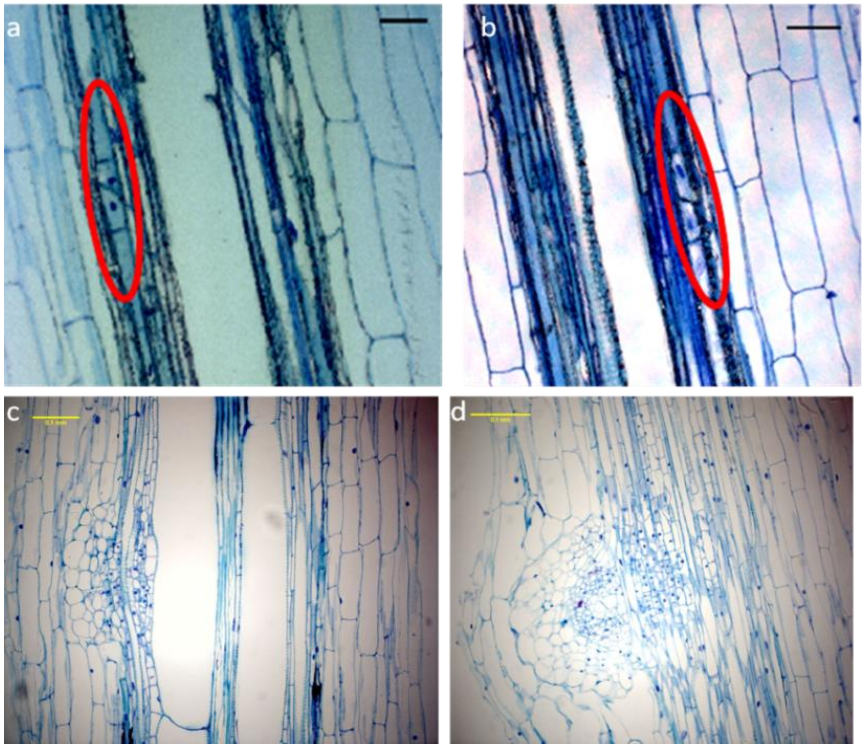


Figure 34. Coupe longitudinale de racines d'orge (n=20) (a et b) et de maïs (n=16) (c et d) au niveau de la zone inhibée suite à l'application d'un déficit hydrique transitoire. Le stade de développement le plus avancé qui est observé chez l'orge, est celui de la première division asymétrique (stade II). On observe deux petites cellules au centre de deux plus larges. (Barre d'échelle 50 µm). Chez le maïs (c et d), les primordia retrouvé dans la zone inhibée sont beaucoup plus développés et différents stades de pré-émergence ont pu être mis en évidence (barre d'échelle 0.1 mm)

Chez le maïs, l'inhibition de ces zones n'est pas aussi prononcée que chez l'orge. L'analyse des zones inhibées (observation de 15 zones inhibées) a révélé la présence de quelques primordia (entre 1 et 4) à des stades de

développement plus avancés, voire même proches de l'émergence. Comme chez l'orge, le nombre de primordia observés est inférieur au nombre de primordia attendu sur base de la densité moyenne de RL en absence de traitement (figure 34 c et d). Le déficit hydrique semble bloquer le développement du primordium a un stade précoce de sa formation. Les primordia à des stades de développement plus avancés observés dans la zone inhibée pourraient être des jeunes primordia actifs, formés hors de la séquence acropète, un peu avant l'observation au microscope [26]. On peut en tous cas exclure qu'il s'agisse de primordia de la séquence acropète bloqués par le déficit hydrique car de tels stades ne s'observent qu'à 8 à 10 cm de l'apex, soit bien en dehors de la zone inhibée au moment de l'application du traitement.

L'INHIBITION PROGRESSE DE MANIÈRE ACROPÈTE

Si l'on considère la séquence acropète de l'initiation des RL le long de la racine mère (chapitre 1), et le fait que l'inhibition soit confinée aux stades I ou II, alors on s'attend à ce qu'un traitement plus court mène à une zone inhibée plus courte et vice-versa.

Ceci a été vérifié en appliquant de manière successive sur une même racine d'orge et de maïs, un premier arrêt de la brumisation de 8 heures suivi, la nuit suivante, d'un second arrêt de 4 heures. L'application de ces deux traitements entraîne la formation de deux zones inhibées et, comme attendu, la zone observée après un épisode de 8 heures de déficit hydrique est deux fois plus longue que celle observée après un épisode 4 heures (F-test, $P<0.06$, $P<0.48$) (tableau 2, figure 35).

Tableau 2. Longueur moyennes des zones inhibées suite à l'application de deux épisodes de déficit hydrique successifs de 4h et 8h de stress (cm).

	Durée du déficit hydrique	*n*	*Moyenne*	*Ecart type*
Orge	4 heures	15	0.78	0.24
	8 heures	15	1.44	0.41
Maïs	4 heures	15	0.57	0.14
	8 heures	15	0.97	0.13

Afin de s'assurer que l'application du premier traitement n'a pas modifié la réponse au second, deux périodes de stress successives de 8 heures ont été appliquées. Les deux zones inhibées qui ont été formées sont de longueurs très similaires (F-test for longitudinal data, P<0.85) (tableau 3, figure 35).

Tableau 3. Longueur moyennes des zones inhibées formées suite à l'application de deux épisodes successifs de déficit hydrique transitoire de 8h chez l'orge.

Durée de l'application du déficit hydrique	*Nombre d'observations*	*Moyenne*	*Ecart type*
8 heures	15	1.56	0.49
8 heures	15	1.44	0.41

Il peut donc être considéré que l'application d'un stress hydrique modéré entraîne chez l'orge et le maïs, la formation d'une zone inhibée dont la longueur varie en fonction de la durée de l'épisode de stress.

Etant donné le caractère acropète de l'initiation des RL (chapitre 1) et le fait que l'inhibition soit confinée à un (ou deux) stades du processus d'initiation, on peut en conclure que cette dernière intervient dans une fenêtre chronologique étroite de développement des RL chez l'orge.

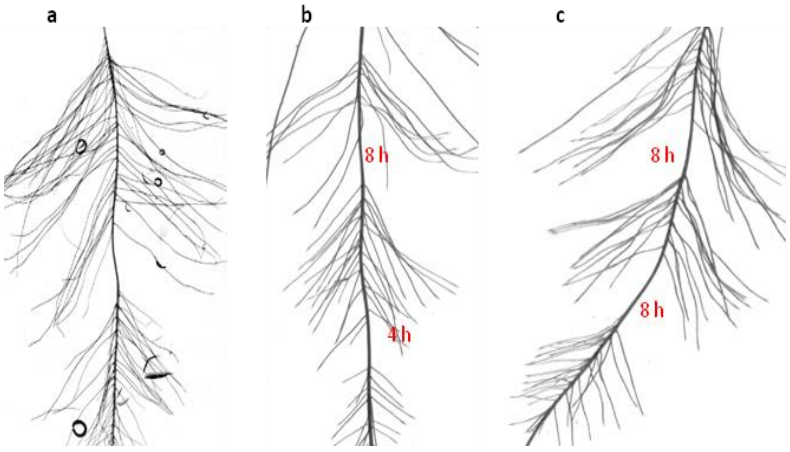


Figure 35. Alternance de zones ramifiées et inhibées suite à l'application d'épisodes de déficit hydrique successifs (a. un épisode de 8h; b. un épisode de 8h suivi d'un épisode de 4h; c. deux épisodes successifs de 8h).

DISCUSSION

Nous avons montré qu'un déficit hydrique transitoire chez l'orge et le maïs inhibe la formation des RL, à un stade de développement plus précoce que chez Arabidopsis. En effet, chez cette dernière, le déficit hydrique induit une réduction de la ramification par arrêt de l'élongation des RL, agissant au niveau de l'émergence/activation du méristème[13,111].

Chez l'orge et le maïs, le déficit hydrique appliqué serait donc capable de prévenir les étapes qui mènent à la division asymétrique des cellules du péricycle et peut être même en amont, avant que cette division n'ait eu lieu. En effet, bien que chez ces deux céréales, l'analyse microscopique montre la présence au niveau des zones inhibées de primordia à des stades de développement différents entre les deux espèces, dans les deux cas le nombre de primodia observés s'est révélé être inférieur au nombre de primordia attendu sur base du nombre de RL normalement observé. La présence de ces quelques primordia pourrait avoir une explication propre à chacune des espèces étudiées.

Pour ce qui est de l'orge, la présence des primordia au stade II de leur développement dans la zone inhibée pourrait s'expliquer par le fait que ces primordia étaient déjà initié au moment de l'application du déficit hydrique, et que leur développement a donc été stoppé.

Chez le maïs, la présence de primordia plus avancés dans la zone inhibée nécessite une analyse plus approfondie. Selon Macleod et *al*, l'initiation des primordia chez le maïs n'est pas confinée à la région subapicale et peut avoir lieu jusqu'à des distances de 5 à 8 cm de l'apex[26]. Les structures observées pourraient donc être des jeunes primordia actifs, formés tardivement et n'ayant pas subi l'épisode de déficit hydrique. Une seconde hypothèse peut également être avancée. L'analyse des zones inhibées chez le maïs a été réalisée sur des plantes ayant subi trois épisodes de déficit hydriques successifs. Il est donc possible que les structures observées correspondent à des primordia émis et non arrêtés lors du premier épisode, mais arrêtés lors d'un épisode ultérieur, lorsqu'ils ont atteint un stade proche de l'émergence. Leur situation pourrait alors être comparée à celle décrite chez Arabidopsis [82].

Il est envisageable que cette réponse soit la manifestation d'une interférence entre le déficit hydrique et un mécanisme transversal de la régulation de la formation des RL, duquel dépendent plusieurs stades de développement. On pourrait par exemple songer à l'alimentation en carbohydrates[115-119] ou en auxines[1] qui sont deux éléments essentiels pour le développement des RL.

L'auxine intervient dans la plupart des étapes du développement des primordia. Chez Arabidopsis, une inhibition du transport acropète de l'auxine vers la région apicale de la racine primaire mène à une absence d'initiation, alors qu'une inhibition de l'importation d'auxine par les cellules du cortex situées face au primordium en développement mène à une réduction de l'émergence[43,99].

Le dispositif expérimental utilisé ici est intéressant car il est induit par une modification de l'environnement, au contraire des mutations constitutives utilisées chez Arabidopsis. Le fait que la limite proximale de la zone inhibée, qui correspond au début de l'application du traitement, soit franche et non progressive chez l'orge signifie que les ébauches situées en position proximale de cette limite ne sont pas affectées par le traitement. Elle pourrait indiquer que la réponse au traitement se manifeste à un endroit précis le long de la racine. Ce point sera développé dans le chapitre suivant.

Un autre mécanisme, lié à la taille des cellules, pourrait également être invoqué pour expliquer le phénomène d'inhibition observé. Chez le maïs, le déficit hydrique mène à une diminution de l'étendue de la zone d'élongation (7,5 mm contre 12 mm en conditions témoins)[120-121]. Il s'en suit une modification de la taille finale des cellules qui peut être mise en relation avec l'hypothèse récemment proposée que la taille cellulaire interfère avec l'établissement des gradients d'auxine et les premières étapes du développement des RL[122].

L'apport de carbohydrates pourrait également intervenir dans la régulation de la formation des RL soit directement[123], soit en interférant avec le transport de l'auxine[99,102,117] comme cela a été récemment démontré[119].

Le caractère transitoire et nocturne du traitement doit certainement être mis en question avant d'interpréter les réponses que nous observons en

termes fonctionnels. Si le caractère transitoire reproduit en quelque sorte le fait qu'une plante, en conditions naturelles, expérimente le stress hydrique d'abord durant une période limitée de la journée, le caractère nocturne est quant à lui opposé au fait que la période de stress, en conditions naturelles, coïncide avec la période de transpiration intense, c'est-à-dire, le jour.

L'arrêt pur et simple de la formation des RL pourrait donc être la conséquence d'une combinaison (irréaliste) de deux conditions auxquelles les plantes n'ont en principe pas été soumises au cours de l'évolution. Il serait donc prématuré d'interpréter cet arrêt comme une réponse logique et fonctionnelle au déficit hydrique. Dans d'autres études, l'application d'un déficit hydrique sur des plantules de maïs au cours des 20 jours qui suivent la germination provoque un ralentissement de l'élongation des RL, voire une accélération pour certaines latérales plus proches de la base de la racine mère, mais pas de modification de leur fréquence[98,124].

CONCLUSIONS

Les mécanismes de régulation de l'architecture racinaire en réponse au stress hydrique sont loin d'être élucidés. En particulier, leur analyse est compliquée par la diversité des réponses qui sont observées. Dans le cas de l'orge et du maïs, nous disposons d'un nouveau dispositif expérimental qui permet de faire basculer l'état du système d'une manière binaire (on/off) et sur une échelle temporelle courte (quelques heures), et dès lors avec un minimum d'interférence avec des mécanismes à plus long terme.

La suite du travail consistera donc à analyser cette réponse de manière plus précise. Nous garderons en particulier à l'esprit l'hypothèse d'une interférence avec l'apport d'auxine au niveau d'une zone établie le long de la racine mère.

CHAPITRE 3. LOCALISATION DU SITE D'INTERFÉRENCE ENTRE LE DÉFICIT HYDRIQUE ET LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES

INTRODUCTION

Chez l'orge, nous avons montré que la formation des RL est un processus acropète et séquentiel dont les différentes étapes se produisent chacune à une position caractéristique le long de l'axe racinaire (chapitre 1). Les voies de régulation intrinsèques et extrinsèques (fonction de l'environnement dans lequel la racine se développe) dont dépendent ces étapes[13,40,99] comportent dès lors, au moins en partie, une composante spatiale (ou temporelle selon le point de vue). Dans la mesure où le déficit hydrique est susceptible d'interférer avec de nombreux processus autres que la formation des RL, il est important de caractériser cette composante afin d'isoler les éléments de la réponse au déficit hydrique qui interfèrent spécifiquement avec la formation des RL.

L'observation de délimitations nettes entre les zones ramifiées et non ramifiées de la racine, soumise à un déficit hydrique transitoire, suggère que ce traitement interfère avec des processus développementaux qui se déroulent à une distance donnée de l'apex. Cette hypothèse paraît également compatible avec le caractère acropète de la séquence de formation des RL, qui fixe la position longitudinale des stades de formation. Cette hypothèse n'implique toutefois pas que cette distance soit constante.

On pourrait en effet envisager qu'elle évolue en fonction de la vitesse de croissance de la racine[125].

La localisation précise de cette zone peut être réalisée en utilisant des méthodes indirectes, basées sur le positionnement et le timing d'une perturbation. Il est par exemple bien documenté qu'une racine qui opère une courbure de sa trajectoire forme une RL dans la partie convexe de cette courbure. En utilisant les courbures comme lieu de référence et le temps écoulé entre deux courbures successives comme échelle de temps, il a été possible, chez Arabidopsis, de mettre en évidence des étapes qui précèdent les premières divisions asymétriques[6,107].

Dans cette étude, nous avons entrepris de localiser, chez l'orge et le maïs, la zone où le déficit hydrique interfère avec la formation des RL. Comme la zone dépourvue de RL n'est visible qu'une fois que les RL sont formées, soit environ 7 jours après l'application du déficit hydrique, nous avons dû élaborer une technique permettant de mettre en relation la position de la zone inhibée formée et la position de l'apex au moment de l'application du traitement.

RÉSULTATS

MODÉLISATION DE LA COMPOSANTE SPATIALE

Pour permettre cette analyse, nous avons reconstruit la trajectoire de l'apex de la racine séminale durant l'expérience par un suivi en imagerie time-lapse (deux fois par jour à heures précises). Ensuite, après émergence des RL situées en amont et en aval de la zone, nous avons localisé le début et la fin de la zone dépourvue de RL par rapport à la base de la racine.

Connaissant la trajectoire de l'apex, nous avons donc pu calculer (1) au moment de l'arrêt de la brumisation, la distance entre l'apex et les premiers sites d'initiation inhibés par le déficit hydrique (d1) et (2) au moment de la reprise de la brumisation, la distance entre l'apex et les derniers sites d'initiation inhibés par le déficit hydrique (d2) (figure 36). Notre modèle spatial comporte donc deux paramètres qui peuvent être convertis si nécessaire en paramètres temporels.

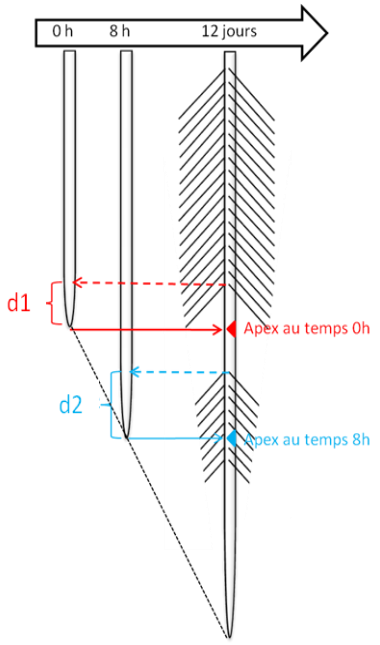


Figure 36. Représentation schématique de la trajectoire de l'apex de l'axe séminal au différents temps de l'expérience. d1 représente la distance entre l'apex et les premiers sites d'initiation inhibés par le déficit hydrique, d2 : la distance entre l'apex et les derniers sites d'initiation inhibés par le déficit hydrique. La flèche rouge représente la position de l'apex au début du déficit hydrique (temps 0h) et la flèche bleu, la position de l'apex en fin de traitement (temps 8h).

Les cellules fondatrices occupent leur position définitive au moment où elles subissent le stress

La méthode envisagée pour localiser la position du site d'inhibition des RL, met en vis-à-vis des informations de position collectées à des moments différents (position des apex à différents temps de l'expérience, et position des RL). Il est donc important de s'assurer que les échelles de positionnement sont les mêmes.

En effet, la croissance d'un axe racinaire est un processus dynamique résultant de la production de nouvelles cellules et de l'expansion de ces cellules[28,126], deux processus qui se déroulent dans des zones distinctes de la région apicale de la racine[5]. Les cellules apparaissent au sein de la zone de division, en position distale. Du fait de l'activité de division de l'ensemble des cellules du méristème, chaque cellule se retrouve de plus en plus éloignée de l'extrémité apicale. Cette migration se poursuit lorsque les cellules quittent la zone de division et entrent dans la zone d'élongation, étant donnée l'expansion des cellules qui les suivent[28] (figure 37). L'existence de cette migration fait que, durant leur séjour dans la zone de division et d'élongation, les cellules n'occupent pas une position définitive.

Ce n'est en effet qu'une fois qu'elles ont quitté la zone d'élongation que les cellules occupent leur place définitive[5,126-127]. A ce moment, leur distance par rapport à la base de la racine est fixée et celle par rapport à l'apex n'évolue plus qu'en fonction de la vitesse de croissance de la racine (figure 37). De ce fait, si au moment de l'arrêt de la brumisation, les premières cellules (début de la zone inhibée) qui perçoivent le signal induisant l'inhibition de leur développement, se trouvent dans la zone d'élongation cellulaire, alors l'estimation correcte de leur position devrait tenir compte de leur déplacement ultérieur.

Dans le cadre de notre étude, nous avons localisé l'étendue de la zone de croissance (division et élongation) afin de voir si les cellules situées en début et fin de zone inhibée occupent leur position définitive, respectivement au moment de l'application et de l'arrêt du déficit hydrique. Pour ce faire, un suivi de la trajectoire des cellules dans la zone de division et dans la zone d'élongation a été réalisé, suivi d'une analyse cinématique de la croissance[4]. Le dispositif expérimental mis au point permet de prendre des images de la racine à des pas de temps réguliers tout en assurant son hydratation. Il est inspiré du dispositif décrit par Walter et *al*[126] (cf chapitre 7).

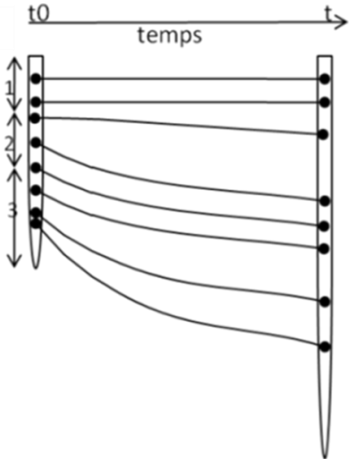


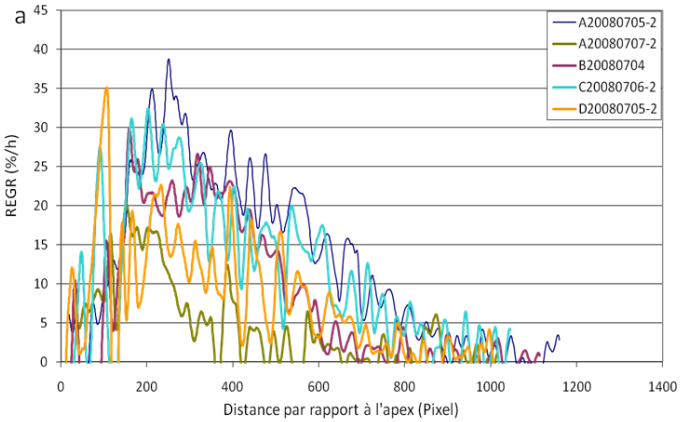
Figure 37. Schéma montrant la trajectoire spatio-temporelle de points situés à la surface de la racine. Au niveau de la zone mature (1), les cellules ont atteint leur position définitive, donc la position d'un point dans cette zone au temps t0 coïncide avec sa position au temps t>t0. Par contre, une marque placée à t0 dans la zone d'élongation ou de division (2 et 3) subit un déplacement provoqué par la division et/ou l'expansion ultérieure des cellules situées entre la marque et la zone 1. D'après Gandar et al[5]

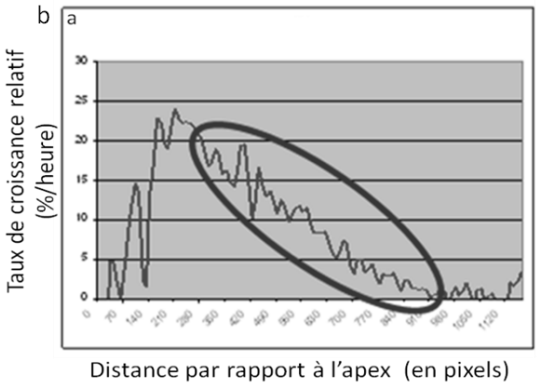
Des séquences *time lapse* de 675 images (90 minutes, 1 image toute les 8 sec) de la région apicale de la racine séminale ont été acquises et analysées selon la méthode «*structure tensor*»[128-129]. Cette méthode permet

notamment de calculer le *relative elementary growth rate* (REGR), fonction décrivant l'accélération du mouvement des cellules, ou la vitesse à laquelle deux cellules voisines s'éloignent l'une de l'autre en fonction de la distance à l'apex. L'analyse a été réalisée par Nagel Kerstin (Juelich Research Center) (figure 38 a). Cette analyse consiste en un suivi du déplacement des irrégularités présentes à la surface de la racine au cours du temps. La mesure de la distance séparant ces irrégularités au cours du temps permet d'établir un profil de déplacement (velocité) et d'en déduire le REGR. Chaque courbe de REGR (figure 38) a donc été obtenue en suivant le déplacement d'un ensemble de marques présent sur la racine.

La fin de la zone de croissance correspond à la position au delà de laquelle le REGR peut être considéré comme nul. Nous avons dès lors réalisé une régression linéaire sur la partie descendante de la courbe de REGR et estimé la position à laquelle la droite de régression intercepte l'axe des abscisses (figure 38 b). La fin de la zone d'élongation a pu ainsi être estimée à 8 mm (IC à 95%: [6,4;9,2]) de l'extrémité apicale pour une racine moyenne en absence de déficit hydrique. On peut dès lors considérer que les cellules situées à plus de 8 mm de l'apex occupent leur position définitive.

La figure 38 a révèle une importante variabilité entre racines, à laquelle correspondent logiquement des vitesses de croissance différentes. Cette observation a dès lors été prise en considération dans les expériences ultérieures, pour lesquelles un lot de racines à vitesse de croissance homogène a chaque fois été considéré. En outre, ces analyses n'ont pu être réalisée sur des racines d'orges ayant subi un épisode de déficit hydrique. Comme l'application d'un déficit hydrique est susceptible de modifier l'expansion cellulaires, la valeur de 8 mm ne pourra être utilisée pour valider le positionnement de la fin de la zone inhibée[111,121].





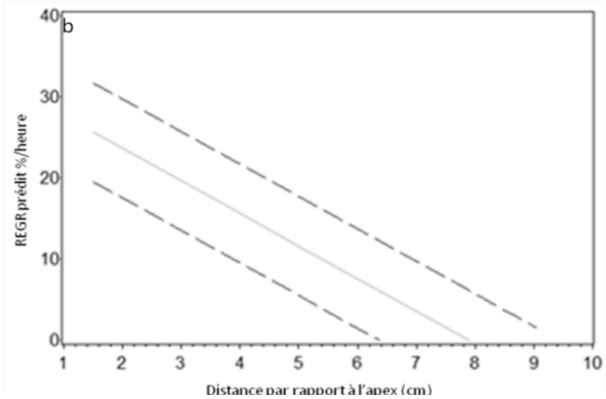


Figure 38.(a) Représentation graphique du taux relatif de croissance mesuré sur 5 racines différentes. Observations effectuées durant 90 minutes pour chaque racine. Chaque courbe représente le déplacement des irrégularités de surface de la racine observées directement avec une caméra à haute résolution. (b) a. Graphique du taux relatif de croissance (REGR) moyen (n =5) au niveau de la partie apicale de l'axe racinaire. b. Régression linéaire sur la partie descendante de la courbe de REGR (cercle) permettant d'obtenir une droite représentant le REGR en fonction de la distance par rapport à l'apex en cm, ainsi qu'un intervalle de confiance à 95% ([6.4, 9.2]).

LA ZONE INTERFÉRENCE ENTRE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES ET LE DÉFICIT HYDRIQUE EST À UNE DISTANCE FIXE DE L'APEX

Dans le cas de l'orge, nous avons montré au chapitre 2 que l'inhibition de la formation des RL se produit dès l'initiation des primordia à l'origine des RL, au niveau des stades I ou II de leur développement. Sur base du modèle proposé au chapitre 1, ces stades s'observent dans une zone située entre 10 et 20 mm de l'apex. C'est donc dans cette région que le déficit hydrique interfère avec le développement des primordia chez l'orge. Nous avons réalisé une analyse plus approfondie afin de préciser cette position chez l'orge et de l'estimer chez le maïs, pour lequel nous ne disposons pas d'information équivalente a priori.

Chez les deux espèces, le positionnement de la zone inhibée a été réalisé manuellement à l'aide du logiciel Smartroot. L'analyse de la longueur de la zone dépourvue de RL formées suite au déficit hydrique, démontre que son étendue est relativement constante entre les différentes racines d'une même espèce mais est fonction de l'espèce considérée (tableau 4). Cependant, chez le maïs la délimitation manuelle de la zone est assez subjective étant donné que l'arrêt de la formation des racines latérales suite au déficit hydrique n'est pas aussi net que celui observé chez l'orge.

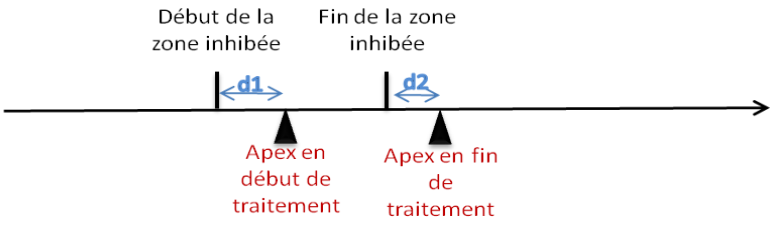
Tableau 4. Longueur moyenne des zones inhibées suite à l'application d'un épisode de déficit hydrique de 8h. Moyenne +/- écart-type

Espèce	*n*	*Moyenne (mm)*
Orge	58	16,1±0.21
Maïs	58	13±0.41

Le fait que la longueur des zones chez le maïs soit inférieure à celle de l'orge est interpellant car, comme nous le verrons plus loin, la vitesse de croissance des racines de maïs est nettement supérieure (et donc la progression acropète durant un épisode de 8 h devrait être plus longue).

Le paramètre d1 (figure 39), correspondant à la position (par rapport à l'apex) des premiers sites d'initiation inhibés au début de l'épisode de déficit hydrique peut être visuellement estimé chez l'orge. Cette distance

est en moyenne de 13,8 mm. Elle se situe donc hors de la zone d'élongation cellulaire, se terminant à 8 mm de l'apex (cf paragraphe précédent) et peut donc être considérée comme une estimation valide de la position à laquelle le développement d'une RL est bloqué par le déficit hydrique. Le paramètre d2 est quant à lui estimé en moyenne à 9.07 mm.



	Paramètres de la modélisation inverse
Estimation de d1 (distance entre l'apex et la limite proximale de la zone inhibée, au moment de l'arrêt de la brumisation) et d2 (distance entre l'apex et la limite proximale de la zone inhibée, au moment de la reprise de la brumisation)	d1 et d2 : couple de valeurs prédéfinie, exprimée en mm

Figure 39. Schéma représentant la position de l'apex (triangle) avant et après l'application du déficit hydrique sur une racine en fin d'expérience (12 jours après le traitement). Le modèle 1 formalise l'écart d séparant l'apex de la zone inhibée sur une échelle spatiale. Ce modèle ne fait aucune hypothèse sur l'origine de ce décalage et fournit en principe le meilleur ajustement par rapport aux observations.

Chez le maïs, la transition entre la zone ramifiée et la zone non ramifiée survenant suite à l'arrêt de la brumisation est moins brutale que chez l'orge, si bien que la zone inhibée est moins clairement délimitée et qu'un positionnement manuel de ses limites est entaché de subjectivité. Pour contourner cette difficulté, nous avons estimé la fréquence de ramification (nombre de RL) dans une région de 20 mm centrée sur la zone inhibée. Considérant que cette région est une succession de trois zones (ramifiée, inhibée, ramifiée) au sein desquelles la fréquence de ramification est uniforme (figure 40), nous avons pu déterminer les limites de ces trois zones par une méthode d'ajustement statistique (modélisation inverse, figure 41).

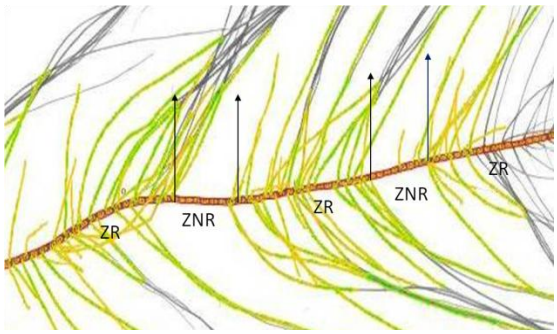


Figure 40. Scan d'un système racinaire de maïs (J12), ayant subit 2 périodes de déficit hydrique. Ce système présent deux zones inhibées (ZNR).

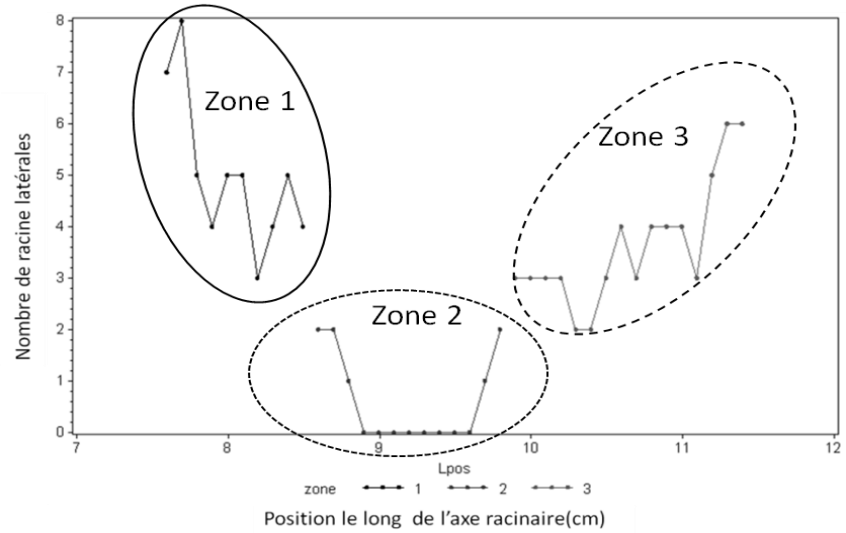


Figure 41. Evolution de la densité de ramification au voisinage d'une zone inhibée. La variable Evolution de la densité de ramification au voisinage d'une zone inhibée. La variable en ordonnée est le nombre moyen de racines latérales estimé dans une fenêtre de 5 mm centrée sur la position correspondante en abscisse (méthode des moyennes mobiles). Le trait rouge correspond à la zone inhibée. Les traits noir et verts correspondent aux zones situées en position proximale et distale par rapport à la zone inhibée. Le découpage en 3 zones est obtenu par modélisation inverse. L'écart entre la position de ces limites et celle de l'apex au début et à la fin du traitement fournit les valeurs d1 et d2.

Chez le maïs la limite proximale de la zone inhibée estimée de cette manière se situe en moyenne à 15,1 mm de l'apex au moment de l'application du stress et la limite distale à 10,8 mm de l'apex au moment de la reprise de la brumisation (analyse de 12 racines). Chez l'orge, par la même méthode, ces limites ont été estimées à 14,2 et 8,8 mm de l'apex en

début et fin de stress, soit des distances similaires aux estimations visuelles de 13,8 mm et 9,07 mm (tableau 5).

Tableau 5. Estimation des écarts entre la position de l'apex en début et en fin de traitement et la position, respectivement, proximale et distale de la zone inhibée (modélisation inverse). Chez l'orge, comme la zone inhibée est bien délimitée, il est possible de positionner les limites distale et proximale de la zone inhibée manuellement.

	Modélisation inverse			***Manuel***	
	d1 (mm)	d2 (mm)	CMR	d1 (mm)	d2 (mm)
Orge (n=17)	14,2± 0,37	8,8± 0,22	2,08±1,5	13,8±0.32	9,07±0.19
Maïs (n=12)	15,1±0,40	10,8±0,31	7,36± 3,7		

Les valeurs estimées de d1 et de d2 sont donc différentes pour l'orge et le maïs. Dans les deux cas, cependant, d1 est supérieur à d2. Il existe donc un décalage entre la distance séparant l'apex de la limite proximale de la zone inhibée (d1) et la distance séparant l'apex de la limite distale de la zone inhibée (d2).

LE DÉFICIT HYDRIQUE APPLIQUÉ INFLUENCE LA VITESSE DE CROISSANCE

Une des hypothèses au décalage entre d1 et d2 est que la vitesse de croissance de la racine soit réduite durant l'épisode de déficit hydrique. Une analyse comparée de l'évolution des vitesses de croissance des plantes contrôle et des plantes ayant subit un déficit hydrique transitoire de huit heures a donc été réalisée afin de voir si l'arrêt de brumisation affecte la vitesse de croissance des plantes.

Chez l'orge, on observe chez les plantes contrôles une alternance jour/nuit régulière avec une diminution significative de la vitesse de croissance racinaire pendant la nuit (méthode des contrastes, F-test, $p<0.0001$).

Cette différence de vitesse de croissance jour/nuit est également observée chez les plantes qui subissent un déficit hydrique (figure 42), avec toutefois une diminution plus importante de la vitesse de croissance durant la nuit du déficit hydrique (70 % chez les plantes traitées contre 30% chez les plantes contrôles au cours de la même nuit).

Des effets similaires ont été mis en évidence chez le maïs, avec une diminution significative de la vitesse de croissance moyenne pendant la nuit et une augmentation au cours de la journée (F-test, p<0,0192). De même, un ralentissement significatif de la vitesse de croissance (F-test, p<0,0475), se produit lors de l'application d'une période de déficit hydrique (figure 43).

L'observation que, la vitesse de croissance des plantes traitées reste inférieure à celle des plantes témoins pendant les 48 heures (orge) (méthode des contrastes, F-test, p<0.0014), et les 16 heures (maïs) qui suivent l'application du traitement suggère une forme de mémorisation des conditions de déficit hydrique. Cette forme de persistance a également été mise en évidence dans le cas d'un stress mécanique transitoire[130].

Afin de voir si la durée du traitement influence la vitesse de croissance des racines, deux périodes successives de déficit hydrique, d'une durée de 8 et 4 heures, ont été appliquées à des racines de maïs. Comme le montre la figure 44, la vitesse de croissance diminue de manière similaire pour les deux durées de traitements (F-test, méthode des contrastes, p = 0.6632).

Dans le cadre de cette dernière expérience, une mesure de longueur supplémentaire a dû être réalisée au milieu de la nuit (après 4 heures). Cette mesure supplémentaire a mis en évidence de fortes différences entre les vitesses de croissance de la première et de la seconde moitié de la nuit. Ces différences sont davantage prononcées chez les plantes témoins, qui récupèrent en fin de nuit une vitesse de croissance proche de la vitesse diurne, que chez les plantes stressées. Une comparaison deux à deux des vitesses de croissance après 8 heures et 4 heures de déficit hydrique, montre que la diminution après 4 heures de stress est beaucoup plus importante (P < 0.04) qu'après 8 heures (P < 0.47).

L'application d'un déficit hydrique durant la phase nocturne entraîne donc une diminution de la vitesse de croissance racinaire qui s'additionne à un effet marqué de la photopériode. Comme le déficit hydrique ne peut être appliqué que pendant la nuit (afin de garantir la viabilité des plantes), les deux effets ne sont pas dissociables.

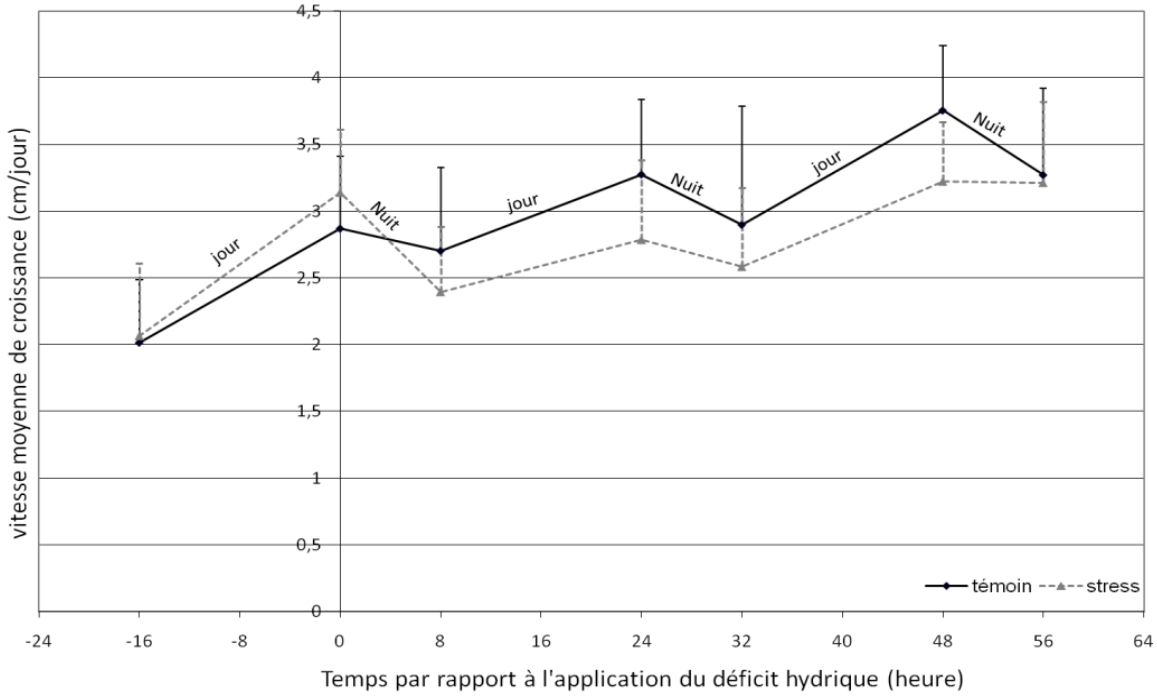


Figure 42. Evolution de la vitesse de croissance racinaire moyenne des plantes d'orge en fonction du temps. La vitesse de croissance est mesurée pendant le jour (16 heures) et pendant la nuit (8 heures). La vitesse de croissance des racines contrôle, et des racines ayant subit une période de déficit hydrique est influencée par l'effet jour/nuit. Le déficit hydrique est appliqué entre 0 et 8 heures. L'analyse a été réalisée sur 25 plantes témoins et 30 plantes traitées.

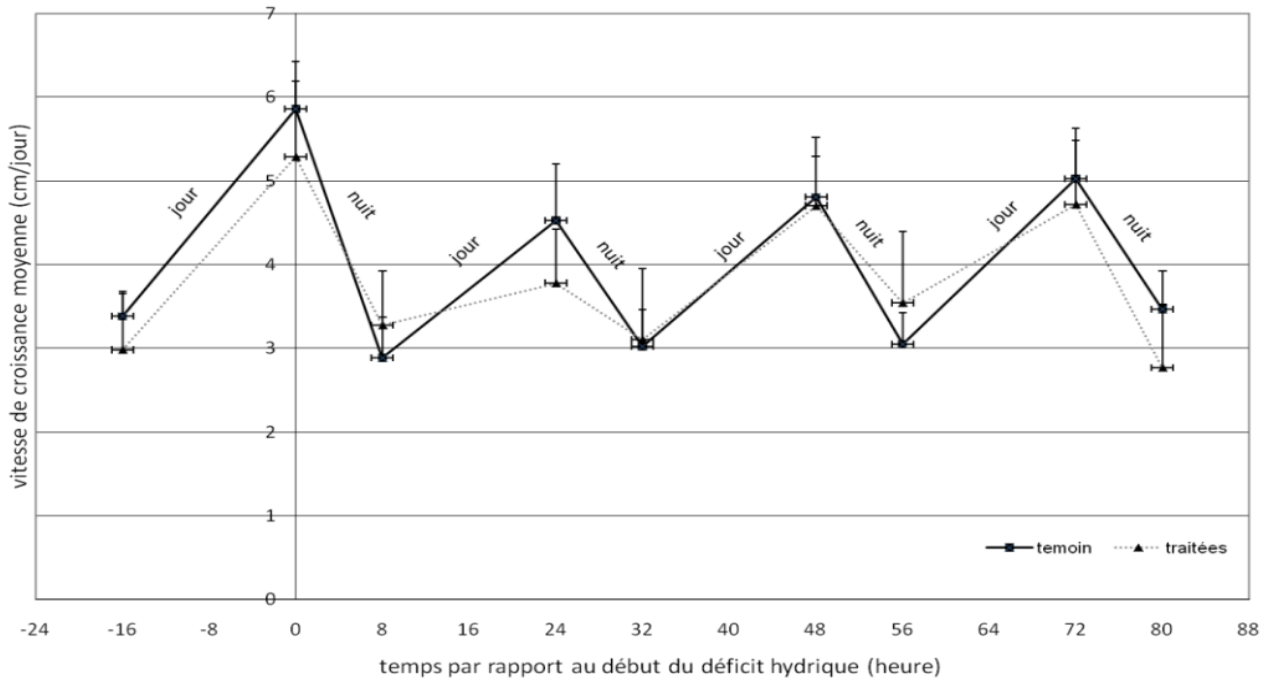


Figure 43. Evolution de la vitesse de croissance racinaire moyenne des plantes de maïs en fonction du temps. La vitesse de croissance des racines contrôle, et des racines ayant subit une période de déficit hydrique est influencée par l'effet jour/nuit. Le déficit hydrique est appliqué de 0 à 8 heures. L'analyse a été réalisée sur 16 plantes traitées et 8 plantes témoins. L'analyse a été réalisée sur 10 plantes témoins et 8 plantes traitées.

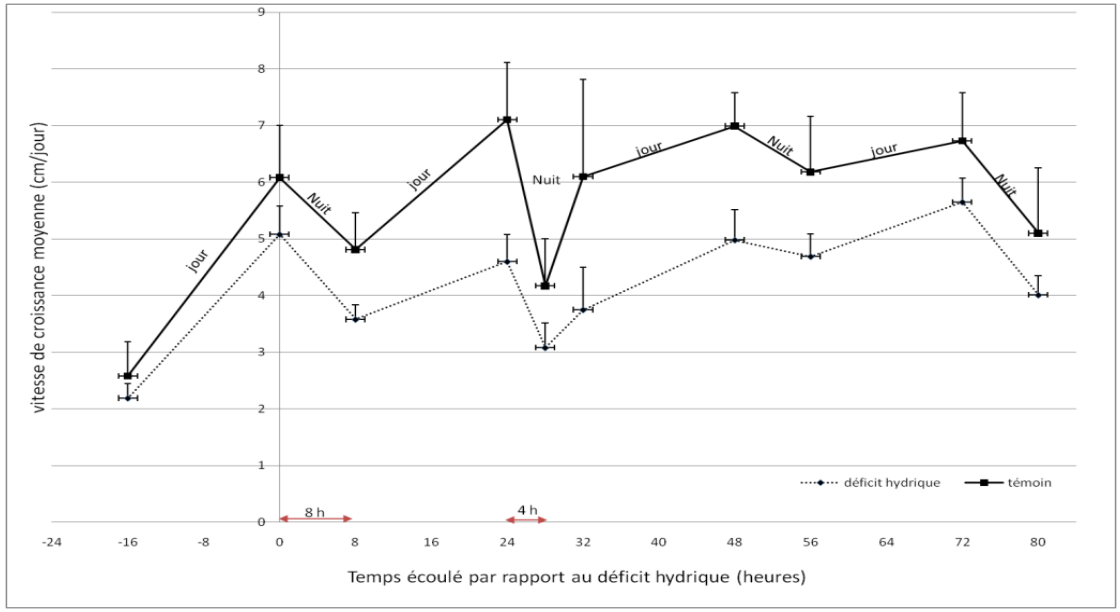


Figure 44. Evolution de la vitesse de croissance racinaire moyenne des plantes de maïs en fonction du temps après deux périodes de déficit hydrique successives de 8 heures (entre 0 et 8 heures) puis de 4 heures (entre 24 et 28 heures). La vitesse de croissance des racines contrôle, et des racines ayant subit une période de déficit hydrique est influencée par l'effet jour/nuit. Entre 24 et 32 heures, on observe que la vitesse de croissance diminue de manière drastique pendant les 4 premières heures de déficit hydrique et est quasi rétablie à 32 heures (fin de la nuit). L'analyse a été réalisée sur 10 plantes témoins et 22 plantes traitées.

EXPRESSION DE LA POSITION DE LA ZONE D'INHIBITION EN UNE DURÉE FONCTION DE LA VITESSE DE CROISSANCE DE LA RACINE PRIMAIRE

Nous avons jusqu'à présent exprimé les positions des différents stades ou évènements en termes de distance par rapport à l'apex, c'est-à-dire sur une dimension spatiale. Une méthode alternative consisterait à exprimer ces positions sur une dimension temporelle, en utilisant le laps de temps écoulé entre le moment où un stade ou événement est observé et un moment de référence situé dans l'historique des cellules observées. Il existe en effet des situations où la référence temporelle permet d'expliquer l'essentiel de la variabilité spatiale d'un phénomène. Par exemple, la distance séparant l'apex du site de formation des poils absorbants, ou de l'émergence des RL est une fonction linéaire de la vitesse de croissance de la racine[125], ce qui indique qu'entre l'extrémité apicale et un stade morphologique déterminé s'écoule une durée constante peu affectée par les conditions de croissance. Connaissant les vitesses de croissance des racines observées plus haut, il a été possible d'exprimer les distances d1 et d2 (figure 39) en une durée écoulée depuis le moment où l'apex était situé à la position correspondante, égal au temps nécessaire pour construire un fragment racinaire de longueur d1 et d2 à la vitesse de croissance réalisée (observée pour chaque racine en fonction du temps). Dans ce nouveau référentiel, les paramètres d1 et d2 de notre modèle ne sont plus exprimés en mm mais en heure (notés t1 et t2). Si les valeurs de t1 et t2 sont similaires, on pourra conclure que les différences entre d1 et d2 peuvent s'expliquer par un simple effet de variation de vitesse de croissance.

Comme montré dans le tableau 6, les valeurs de t1 et t2 chez le maïs sont identiques, alors que chez l'orge, une légère différence de 1.8 heure, correspondant à une élongation de 2.3 mm, subsiste toujours.

Tableau 6. Durée séparant l'apex de la zone inhibée en début (t1) et en fin de traitement (t2) chez l'orge et le maïs.

	Intervalle de temps	
	t1 (h)	t2 (h)
Orge	10,85	8,83
Maïs	7,27	7,92

Une explication alternative à l'observation que d1>d2 serait que l'interférence entre la formation des RL et le déficit hydrique pourrait se produire au niveau d'une fenêtre développementale comprenant différents stades de développement. Sur base du chapitre 1, une distance de 10 mm sépare les stades I, II et III, soit bien plus que l'écart de 2.3 mm qui reste non expliqué chez l'orge. L'écart de 1.8 heure est également bien inférieur à la durée d'un cycle cellulaire, qui est de 2.7 heures chez *Cucumis sativum* et de 4.5 heures chez le maïs[29].

La différence entre t1 et t2 chez l'orge pourrait être due au fait que nous avons utilisé une vitesse de croissance moyenne (durant la phase nocturne ou diurne) pour réaliser les déterminations et que nous n'avons pas tenu compte des variations temporelles rapides de la vitesse de croissance.

Ces différents résultats soutiennent donc l'hypothèse que l'interférence entre le déficit hydrique et la formation des RL se produise au niveau d'un site localisé dont la position par rapport à l'apex reflète un intervalle de temps conservé plutôt qu'une distance.

Dans la mesure où l'ajustement de d1 et d2 par l'effet des variations des vitesses de croissance attenue la différence entre les deux écarts, il semble logique de proposer que la position à laquelle on observe l'interférence reflète davantage l'âge du segment racinaire concerné que la distance qui le sépare de l'apex (principe de parcimonie en modélisation).

DISCUSSION

Mise au point d'une méthode indirecte de positionnement permettant de délimiter la région d'un organe en croissance dans laquelle est initiée la transduction d'un signal de l'environnement ayant des effets localisée

Différentes méthodes ont été développées afin d'étudier et de comprendre les mécanismes de plasticité du développement racinaire. La méthode de culture dite en « patch » est communément utilisée pour étudier la réponse des plantes à l'hétérogénéité spatiale de la concentration en minéraux dans le substrat[88,91]. Avec ce système, cependant, aucune région ne perçoit de changement de conditions. Chaque région se développe en fonction de

l'environnement local qu'elle expérimente depuis sa construction. Les limites des régions morphologiques de la racine coïncident donc à celles des patchs nutritifs, aux effets systémiques près.

Notre système expérimental, basé sur une hétérogénéité temporelle de l'environnement, permet de tirer davantage d'information d'une expérience. Le traitement est appliqué à l'ensemble de la racine et donc pendant les huit heures de traitement, toute la racine est soumise à ces changements de conditions. Dès lors que l'on s'intéresse à des processus organisés selon un gradient longitudinal de développement, les observations le long de la racine permettent donc, en une fois, de caractériser la réponse morphologique propre à chaque stade. On peut alors identifier les étapes clé de la réponse au cours du processus de développement, et mieux interpréter les effets confondants liés à d'autres réponses de la racine au même traitement (e.g. effet sur la vitesse de croissance).

La technique développée ici permet donc de positionner des événements qui sont indétectables au moment du traitement. Il est envisageable qu'elle puisse être utilisée pour l'analyse de l'effet d'autres traitements qui interfèrent avec les étapes précoces du développement des RL, voire avec tout autre processus relié à un gradient de développement.

OSCILLATION CIRCADIENNE DE LA VITESSE DE CROISSANCE RACINAIRE

Les expériences ont mis en évidence d'une oscillation circadienne de la vitesse de croissance racinaire des plantes d'orge et de maïs. Chez les deux espèces, la vitesse de croissance oscille entre un minimum et un maximum. Cette évolution n'est pas surprenante et a déjà été démontrée chez de nombreuses espèces[129].

Le résultat le plus marquant de cette étude de la vitesse de croissance est la mise en évidence d'une diminution importante de la vitesse de croissance dès les premières heures de la nuit, suivie d'une hausse dans la seconde moitié de la nuit. Il est possible que cette variation transitoire de la vitesse de croissance dès les premières heures de la nuit soit la conséquence de la modification brutale lié à l'arrêt de l'éclairage du phytotron en début de

nuit, laquelle ne correspond en rien aux transitions progressives entre le jour et la nuit dans un environnement naturel.

D'une part, l'élongation racinaire est affectée par la disponibilité en hydrates de carbone au sein la plante[116,129,131]. Lors du passage du jour à la nuit, un rééquilibrage des relations sources-puits doit avoir lieu suite à l'arrêt de l'activité photosynthétique. La cinétique de ce rééquilibrage observée lorsque la plante est soumise à des variations brutales d'éclairement, pourrait être fort différente de celle qui a été façonnée par l'évolution avec des transitions jour-nuit progressives.

Par ailleurs, l'activité-puits des organes en croissance peut être contrainte par des facteurs indépendants de l'activité des sources et notamment le potentiel hydrique, via ses effets sur la turgescence.

INFLUENCE DU DÉFICIT HYDRIQUE SUR LE DÉVELOPPEMENT DES RACINES LATÉRALES : UNE INTERFÉRENCE AU NIVEAU D'UN STADE DONNÉ

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent clairement l'influence du déficit hydrique sur la formation des RL et appuient l'hypothèse de l'existence d'une zone critique au niveau de laquelle se produit l'inhibition. Nos résultats indiquent également l'existence d'une dimension temporelle dans la régulation de la réponse, puisque cette zone critique est située plus près de l'apex lorsque la racine s'allonge moins vite, conformément aux résultats de Pagès et *al*[125], selon lesquels la distance séparant l'apex de la formation d'un organe (poils absorbant, émergence des RL) est une fonction linéaire de la vitesse de croissance de la racine.

Les observations réalisées au cours des trois premiers chapitres sont résumées sur la figure 45. Dans le cas de l'orge, les observations microscopiques du chapitre 2 indiquent que le blocage a lieu au plus tard au moment de la première division asymétrique. L'analyse du chapitre 3 indique quand à elle que le blocage a lieu dans une zone située entre 8.8 (fin du traitement) et 14.2 mm (début du traitement) de l'apex. Ces observations convergent donc vers une région similaire.

Pour ce qui est du maïs, Casero et *al*[23], ont montré que l'initiation des RL se produit dans une zone située entre 12 et 15 mm de l'apex, et les résultats

obtenus dans ce chapitre démontre que le déficit hydrique interfère avec la formation des RL au niveau d'un site localisé entre 10 et 15 mm. Il semble donc que le déficit hydrique appliqué interfère avec les étapes précoces de la formation des RL tant chez le maïs que chez l'orge.

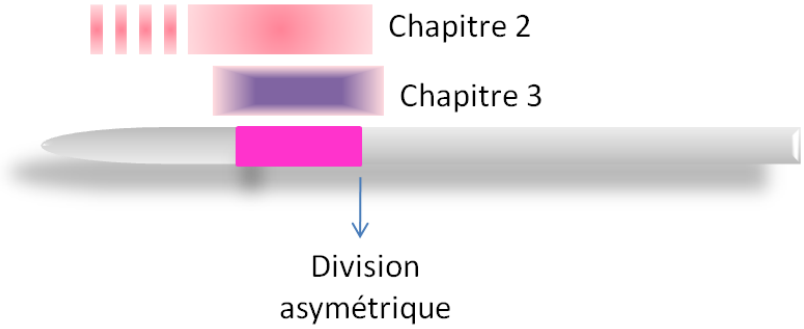


Figure 45. Représentation schématique des différentes zones et des différents événements se produisant lors de l'application du déficit hydrique au niveau d'une racine séminale d'orge.

CHAPITRE 4. INTERVENTION DE L'AUXINE ET DE L'ACIDE ABSCISSIQUE DANS LA RÉPONSE MORPHOLOGIQUE AU DÉFICIT HYDRIQUE

INTRODUCTION

Nous avons montré dans les chapitres précédents que l'inhibition de la formation des RL suite à l'application d'un déficit hydrique modéré chez l'orge et le maïs résulte d'un arrêt du développement du primordium à un stade précoce proche de, ou précédant, les premières divisions asymétriques. Ce résultat pose la question des mécanismes de développement avec lesquels le déficit hydrique interfère.

Etant donnée son implication dans de multiples stades de développement et son rôle dans le positionnement des cellules vis-à-vis de leurs voisines à courte et longue distance, la signalisation par l'auxine apparaît comme une cible potentielle du déficit hydrique. En particulier l'approvisionnement en auxine dérivée de la tige vers les parties racinaires est une condition nécessaire à la formation de RL[68-69].

La signalisation par l'acide abcissique (ABA) est un second mécanisme à considérer en priorité étant donné les rôles de l'ABA dans la réponse au déficit hydrique et ses diverses interventions dans la plasticité de l'architecture racinaire. Ainsi, une application exogène d'ABA bloque l'émergence des racines latérales au moment de l'activation du méristème chez Arabidopsis[82], bloque la formation des racines latérales (stades non préciser) chez *Arachis hypogaea*[83], mais stimule la formation des racines latérales chez le riz[132]. Au niveau de l'initiation des racines latérales, l'ABA

semble intervenir comme un antagoniste de l'auxine[31]. Il agirait comme un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire en stimulant l'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire, les Kip Related-Protein (KRP)[86,133], dont le niveau d'expression est important dans l'initiation des racines latérales. Par exemple, une surproduction de KRP2 induit une inhibition des divisions formatrices en bloquant le cycle cellulaire en phase G1, alors qu'en présence d'auxine, son expression est réduite, et les divisions formatrices ont lieu[8].

Ces deux hormones pourraient donc jouer un rôle dans la réponse morphologique observée suite à l'application d'un déficit hydrique.

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord analysé l'effet d'une application exogène d'auxine sur la réponse au déficit hydrique. L'hypothèse de départ est que le déficit hydrique pourrait inhiber la formation des RL en bloquant le transport et/où l'accumulation de l'auxine au niveau des cellules du péricycle. Dans un second temps, nous avons voulu tester si l'ABA pourrait être impliqué dans la régulation de la formation des racines latérales en réponse au déficit hydrique. Nous avons pour cela analysé la morphologie racinaire de l'orge suite à l'application exogène d'une solution d'ABA, et validé la pénétration de l'ABA dans la racine. Cette étude a été complétée par des observations d'effets précoces de l'ABA sur des lignées d'Arabidopsis portant des gènes marqueurs de plusieurs étapes précoces de l'initiation des RL et de la signalisation par l'auxine.

RÉSULTATS

INTERFÉRENCE ENTRE LE DÉFICIT HYDRIQUE ET L'AUXINE

L'auxine exogène stimule la formation des racines latérales en présence d'un déficit hydrique

Il est établi chez Arabidopsis que l'importation d'auxine dans les cellules du péricycle est nécessaire pour l'initiation de primordia de RL[134]. Nous avons voulu vérifier si le déficit hydrique inhibe l'initiation des RL chez l'orge en interférant au niveau du transport de l'auxine.

Pour ce faire, nous avons saturé les tissus racinaires en auxine par une application exogène d'auxines (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} ou 10^{-6} M) en hydroponie

pendant une heure avant l'épisode de déficit hydrique et observé si cet apport supplémentaire prévient l'inhibition par le déficit hydrique. Les racines n'ont pas été rincées après l'application d'auxines, de manière à prolonger le contact avec les auxines durant le déficit hydrique. En parallèle, les racines contrôles ont été placées pendant une heure en hydroponie dans un bac contenant de l'eau déminéralisée avant l'épisode de déficit hydrique. Les plantes ont également subi un second épisode de déficit hydrique la nuit suivante.

Au niveau des racines témoins le profil observé correspond bien au profil attendu, c'est-à-dire une alternance de zones ramifiées et de zones non ramifiées (figure 46 a). L'immersion dans l'eau déminéralisée n'a donc pas interféré avec le développement.

Les figure 46 b et c illustrent l'effet de l'application exogène d'auxine. Il apparaît que le supplément d'auxine fourni aux racines permet de prévenir l'inhibition par le déficit hydrique. Cependant L'effet observé dépend de la concentration de la solution d'auxine. A des concentrations de 10^{-3} et 10^{-4} M, on observe la formation de RL au niveau du fragment racinaire qui aurait dû être inhibé et donc l'absence de zone inhibée. Par contre, si on soumet les racines à une nouvelle période de déficit hydrique, la production de RL est de nouveau arrêtée, et donc la zone inhibée se forme. A des concentrations plus faibles (10^{-5} et 10^{-6} M), cette levée de l'inhibition disparaît, et on observe la formation d'une zone dépourvue de RL.

Ces observations supportent l'idée que l'alimentation en auxine soit un facteur limitant la formation des RL durant l'épisode de déficit hydrique. Le fait que la formation des RL soit possible avec un apport généralisé d'auxines suggère que les gradients locaux qui conditionnent les étapes d'initiation puissent malgré tout être établis. L'hypothèse la plus plausible serait que le déficit hydrique appliqué interfère avec le transport basipète de l'auxine vers les sites d'initiation.

Aux concentrations de 10^{-3} et 10^{-4} M, on observe également une densité de RL plus élevée que chez les plantes contrôle sur toute la longueur de l'axe. Il semble donc que ce supplément d'auxine permette aussi d'induire la formation de nouvelles RL dans des régions où l'initiation de la séquence

acropète a eu lieu depuis longtemps. Ce résultat suggère que les cellules du péricycle gardent longtemps la capacité de former de nouvelles ramifications et que l'auxine pourrait être le facteur limitant à ce niveau. Le système d'induction de la formation des RL (LRIS) mis au point par Himanen et *al.*[58] exploite cette propriété

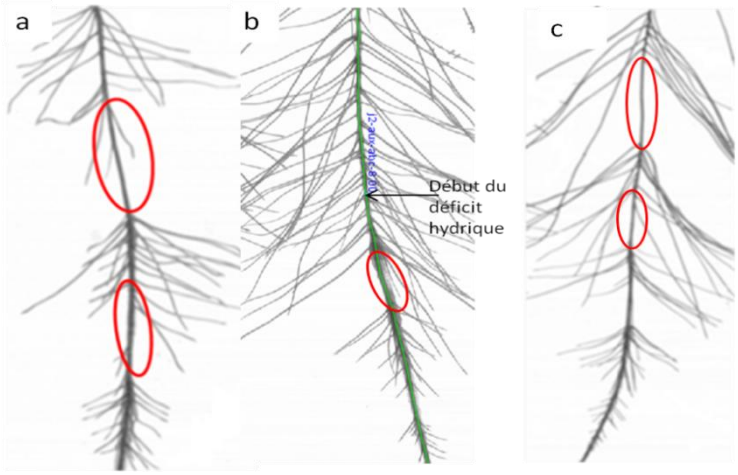


Figure 46. (a) racine d'orge ayant subi deux épisodes de déficit hydrique de 8 heures. (b) L'application d'une solution exogène d'auxine à 10^{-4} M entraine une levée de l'inhibition. Si on soumet les racines à un second épisode de déficit hydrique, la seconde zone inhibée se forme (cercle). (c) A une concentration 10^{-5} M (c), l'auxine n'interfère pas avec la formation des racines latérales.

L'auxine lève l'inhibition de la formation des racines latérales

Dans une seconde série d'expériences, un traitement prolongé (16 heures) à l'auxine a été appliqué directement après l'épisode de déficit hydrique. Le but de cette expérience était d'observer l'effet de l'auxine sur la formation de racines latérales de la séquence acropète (d'où le traitement prolongé) et sur sa capacité à restaurer la formation de racines latérales dans la zone inhibée.

Les traitements avec une solution d'auxine de 10^{-3} et 10^{-4} M se sont montrés trop intenses pour les racines d'orge qui ont cessé leur croissance et n'ont formé aucune RL. Les concentrations de 10^{-5} et 10^{-6} M ont quant à elles provoqué une certaine stimulation de la formation des RL au sein de la zone inhibée qui apparaît plus courte à son extrémité distale (figure 47). Un certain nombre de racines latérales ont donc été formées du côté distal de

la zone. Il est difficile, sur base de ces observations, de déterminer si ces racines sont issues de sites inhibés par le déficit hydrique et qui ont repris leur développement en présence d'auxine ou s'il s'agit de racines néoformées comme celles qui ont été observées dans les manipulations du point précédent.

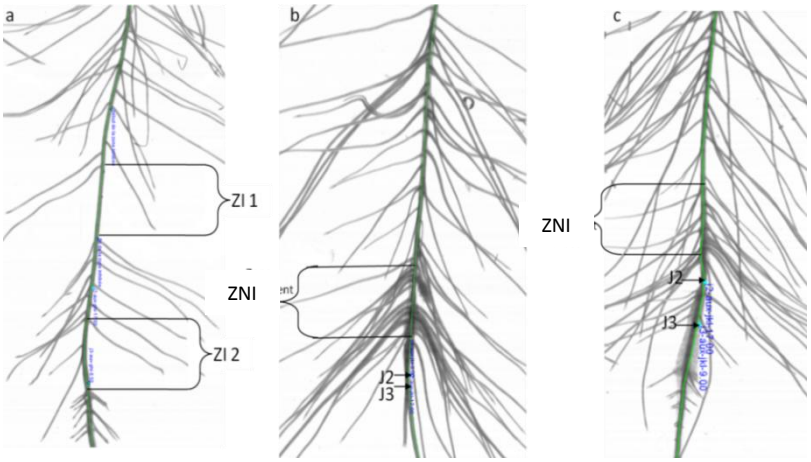


Figure 47. (a) racine d'orge ayant subi deux épisodes de déficit hydrique. (b-c) L'application d'une solution exogène d'auxine à 10^{-5} M (a) et 10^{-6} M (b) après un épisode de déficit hydrique entraine une levée partielle de l'inhibition de la formation de racines latérales au niveau de la zone qui aurait du être inhibée par le déficit hydrique. L'application a été réalisée pendant une période de 16 heures suivant le déficit hydrique. (ZI : zone inhibée, ZNI :Zone qui aurai du être inhibée)

En position distale de la zone inhibée, on observe une région plus densément ramifiée (14 racines latérales sur 5 mm contre 5 chez le témoin) qui indique que le traitement en auxine a augmenté la fréquence de ramification au sein de la séquence acropète. Ceci suggère que la densité de ramification soit liée à la concentration en auxines et serait compatible avec une compétition entre les cellules du péricycle pour l'auxine, combinée aux mécanismes de canalisation propres à l'auxine.

Il faut également noter que dans les deux expériences l'application d'auxine semble avoir un effet stimulant sur la croissance des racines latérales déjà initiées lors de l'application du traitement étant donné que les RL paraissent plus longues que les RL chez le témoin.

Il semble clair que l'auxine stimule la formation des primordia dans les cellules du péricycle, mais est-ce que l'auxine seule suffit pour restaurer le développement des primordia arrêtés suite au déficit hydrique?

UN NOUVEAU RÔLE POUR L'ABA DANS LA FORMATION DES RL

Une application exogène d'ABA bloque la formation des racines latérales

Une série d'expériences ont été réalisées dans un système expérimental similaire à celui des chapitres précédents, dans lequel le déficit hydrique est remplacé par la brumisation d'une solution nutritive (Hewitt ½) contenant 10 ou 50 µM d'ABA ((+/-)-2-cis-4-trans-Abscisic acid, 99% (Alpha Cesar)).

La figure 48 montre que le traitement ABA à 50 µM entraîne la même modification caractéristique de l'architecture racinaire que le déficit hydrique, avec l'apparition d'une zone dépourvue de racines latérales. Pour ce qui est du traitement à 10 µM, l'inhibition est moins bien marquée, mais on observe tout de même une diminution de la densité des RL au niveau de la zone dont la position correspond à celle de la zone inhibée (figure 48 d).

L'application de la solution ABA 50 µM au cours de la phase diurne induit la même réponse que l'application pendant la nuit (figure 49). Ce résultat est intéressant car il permettra de dissocier la réponse au traitement de la réponse à l'éclairement, ce qui s'est avéré pratiquement impossible à réaliser avec les expériences de déficit hydrique (dessèchement des plantes). Le traitement avec une solution à 10 µM provoque une diminution de la densité de racines latérales qui suggère un effet dose-dépendant de l'ABA.

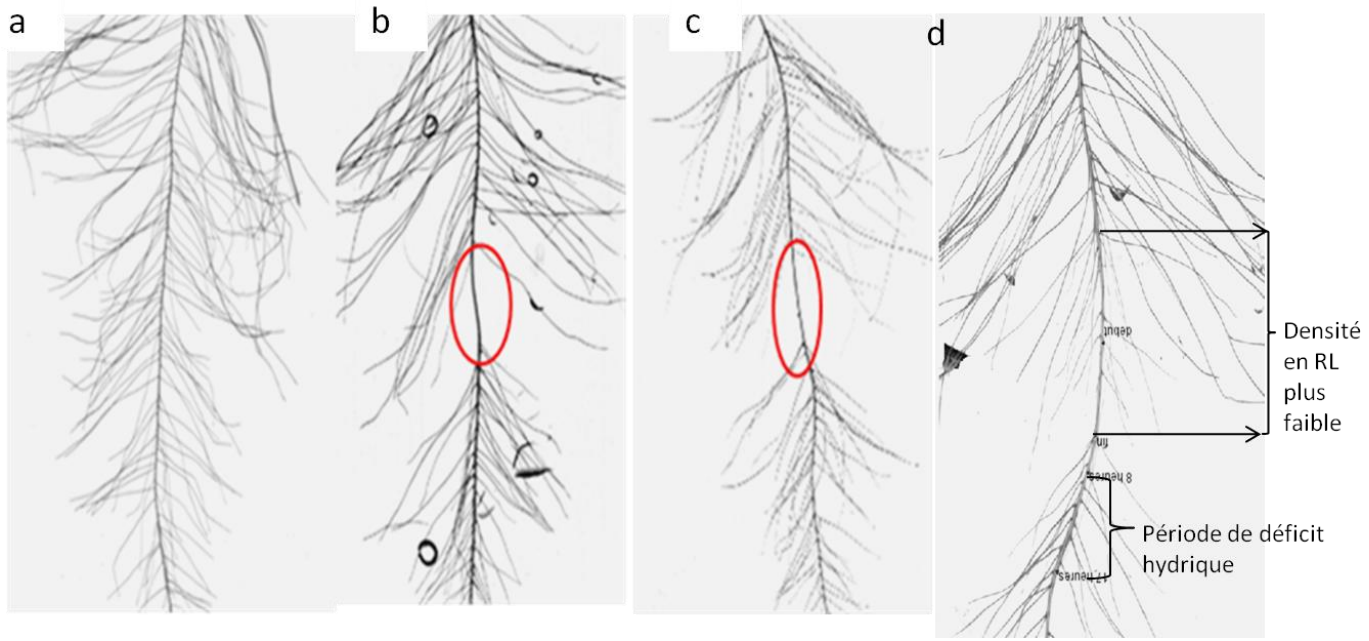


Figure 48. Patrons de ramification racinaire chez l'orge cultivés en aéroponie. (a) Témoin. (b) Application d'un déficit hydrique de huit heures. (c) Application d'une solution nutritive contenant 50 µM d'ABA pendant huit heures. (d) L'application de 10 µM d'ABA n'induit pas une inhibition totale de la formation des RL mais néanmoins une diminution de la densité des RL au niveau d'une zone dont la position correspond à l'emplacement de la zone inhibée.

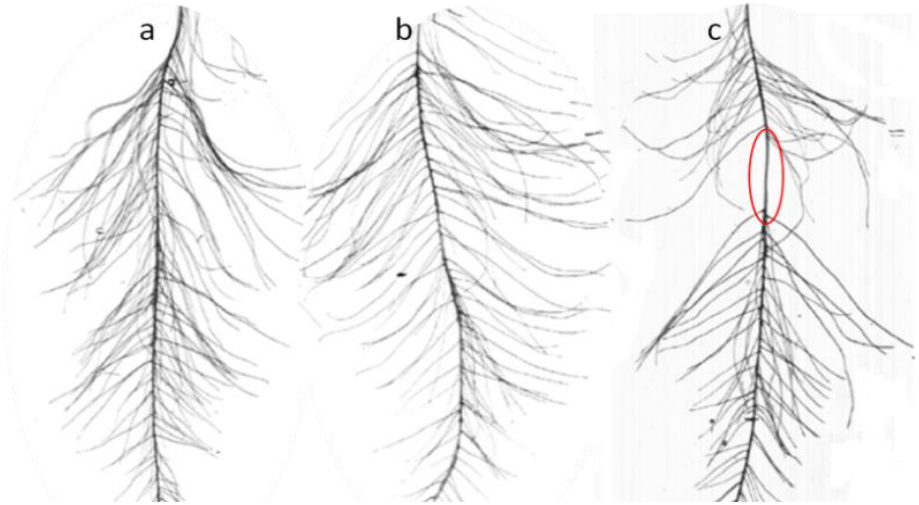


Figure 49. Effet d'une application d'ABA au cours de la phase diurne. (a) Témoin. (b) Application d'une solution d'ABA à 10 µM pendant huit heures. (c) Application d'une solution d'ABA à 50 µM. On observe la formation d'une zone dépourvue de racines latérales clairement délimitée (cercle), marquant l'inhibition de la formation des racines latérales.

L'ABA provoque un arrêt de la formation des racines latérales dès leur initiation

Une analyse microscopique des zones dépourvues de racines latérales formées en réponse à l'application d'ABA (50 µM) a été réalisée afin de voir à quel stade de leur développement les primordia sont arrêtés. Sur l'ensemble des zones inhibées analysées (20 fragments de ± 10mm de long), seuls des primordia au stade II de leur développement ont pu être mis en évidence (figure 50). Le nombre d'évènements observés sur 1 cm est cependant inférieur au nombre attendu sur base de la densité moyenne de racines latérales chez le témoin (2 ou 3 évènements contre une dizaine attendus). Ce résultat suggère que le traitement appliqué inhibe le développement des primordia avant même que la première division asymétrique ne se produise. Nous ne pouvons toutefois exclure la possibilité que le nombre de primordia observées soit sous-évalué étant donnée la difficulté de les observer, déjà mentionnée au chapitre 1.

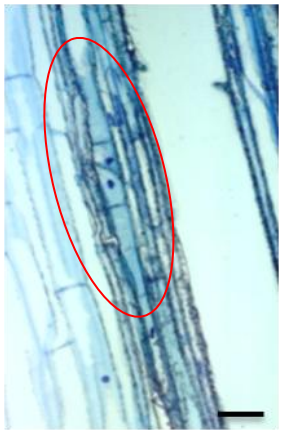


Figure 50. Coupe longitudinale de racines d'orge au niveau de la zone inhibée suite à l'application d'un déficit hydrique transitoire. Le stade de développement le plus avancé qui est observé est celui de la première division asymétrique (stade II). (Barre d'échelle 0,05 mm)

Influence d'une application exogène d'ABA sur la vitesse de croissance des plantes

La figure 51 représente l'évolution de la vitesse de croissance des plantes contrôles et traitées. Les oscillations journalières des plantes contrôles sont conformes aux observations du chapitre 3, avec des vitesses diurnes significativement supérieures aux vitesses nocturnes (méthode des contrastes, F-test, $p<0.0001$). Cette périodicité est également observée chez les plantes ayant subi une application d'ABA à 50 µM (F-test,

p<0.0001) mais n'apparaît pas chez les plantes traitées avec une solution d'ABA à 10 µM.

L'application d'une solution d'ABA à 50 µM a un effet dépressif immédiat sur la vitesse de croissance, qui est réduite de 61% au cours de la nuit du traitement (méthode des contrastes, F-test, p=0.0110) contre 20% chez les plantes contrôle au cours de la même nuit. Cet effet est progressivement résorbé au cours des 48 heures suivantes. Lorsque les vitesses sont exprimées en valeurs relatives par rapport à la phase diurne précédant le traitement, les vitesses de croissance des plantes traitées restent significativement différentes de celles des contrôles durant 32 heures après le traitement (méthode des contrastes, F-test, p=0.041).

L'effet de l'application d'une solution d'ABA à 10µM est similaire mais se développe différemment dans le temps, la vitesse de croissance n'étant réduite qu'au cours de la phase diurne qui suit le traitement (méthode des contrastes, F-test, p<0.0001,).

Les deux concentrations appliquées entraînent donc une diminution de la vitesse de croissance, qui perdure pendant un temps variable en fonction du traitement.

Tableau 7. Comparaison de la modification de la vitesse de croissance des racines traitées à l'ABA par rapport à celle des racines témoins par la méthode des contrastes (NS : non significatif, témoin n=35 ; ABA 10 µm, n= 36 ; ABA 50 µm, n=34).

Intervalle de temps (par rapport au début du traitement)	*Traitement 10 µM par rapport au témoin*	*Traitement 50 µM par rapport au témoin*
De -16h à 0h	NS	NS
De 0h à 8h	NS	p = 0.0110
De 8h à 24h	p < 0.0001	NS
De 24h à 32h	p < 0.0001	NS
De 32h à 48h	NS	p = 0.0441
De 48h à 56h	NS	NS

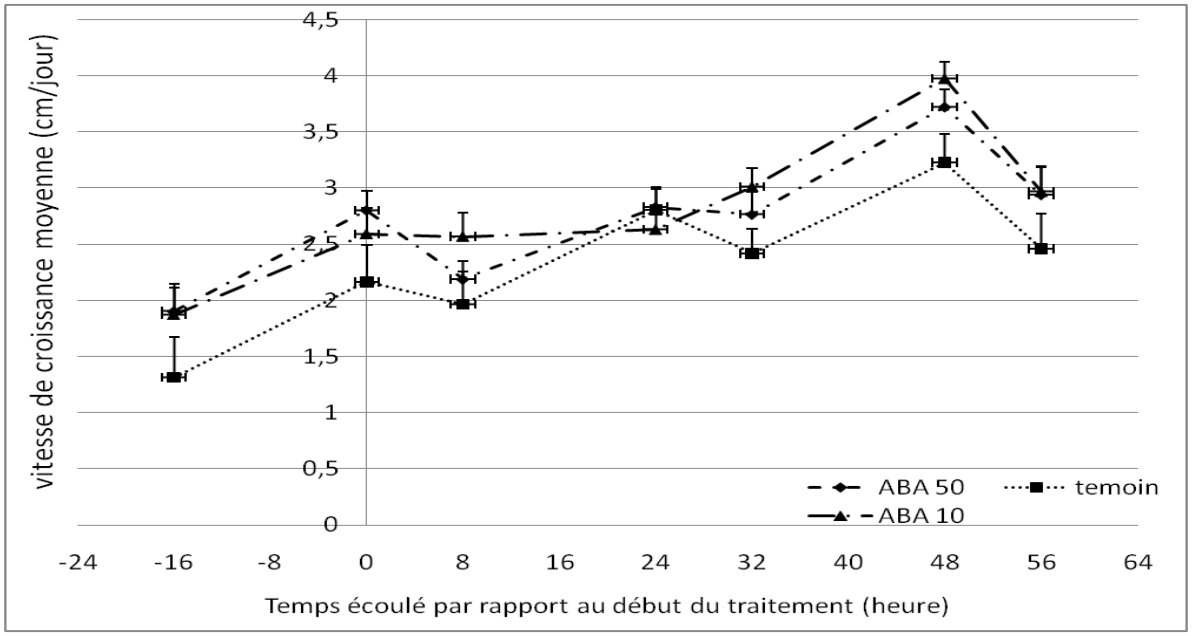


Figure 51. Evolution des vitesses de croissances moyennes des racines témoins et traitées (10 et 50 µM) au cours du temps. L'échelle de temps est définie par rapport au moment de l'application du traitement (0h). Le traitement est appliqué pendant 8 heures. Les vitesses sont estimées sur base des longueurs observées à l'issue des phases nocturnes (8 heures) et diurnes (16 heures), (témoin n=35 ; ABA 10 µm, n= 36 ; ABA 50 µm, n=34)).

L'interférence entre l'initiation des racines latérales et l'ABA a lieu à une distance fixe de l'apex

Le positionnement de la zone inhibée, de 20 racines traitées à l'ABA 50 µM a été réalisée comme précédemment (chapitre 3). La limite proximale de la zone inhibée se situe à 14.4 mm de l'apex au moment de l'application du stress et la limite distale à 12 mm de l'apex au moment de la reprise de la brumisation (tableau 8), soit un écart de 2.4 mm. Dans le cas du déficit hydrique (chapitre 3), ces distantes étaient respectivement de 14.2 et 8.8 mm, soit un écart de 5.4 mm. Sur une échelle temporelle, le début de zone est positionné à 12.5 heures de l'apex et la fin de zone à 13.8 heures, soit un écart de 1.3 heures. Ces intervalles étaient respectivement de 10.7 et 8.9 heures, soit un écart de -1.8 heures dans le cas du déficit hydrique. Ces écarts semblent donc plus réduits sur l'échelle temporelle, ce qui suggère que les variations de vitesse de croissance induites par le traitement ABA influencent au moins partiellement le positionnement du site d'interférence.

Tableau 8. Valeur des distances séparant l'apex de la zone inhibée en début et en fin de traitement pour lesquels l'écart moyen résiduel (CMR) est le plus faible (modélisation inverse). Les intervalles de temps ont été calculés en divisant les longueurs par la vitesse de croissance moyenne au cours de l'intervalle de temps précédent (n=20, moyenne +/- ecart type).

	Modélisation inverse			*Intervalle de temps*	
	d1 (mm)	d2 (mm)	CMR	t1	t2
Orge (n=20)	14.4±0.11	12± 0.32	2.11±0.17	12.54 h	13.80 h

L'acide abscissique pourrait jouer un rôle dans la régulation de la formation des racines latérales en réponse au déficit hydrique

La concentration endogène de l'ABA semble être un facteur important de son action dans la régulation de la croissance des plantes en réponse au stress hydrique[135-136]. Une analyse de la concentration d'ABA dans les racines d'orge suite à l'application d'un déficit hydrique transitoire de 8 heures a donc été réalisée, en collaboration avec l'équipe du Prof. I. Dodd (ULancaster).

Il apparaît que l'ABA s'accumule dans les racines et ceci dès les premières heures du traitement (figure 52). En effet, bien que l'ABA soit présent dans

les racines témoins et que sa concentration augmente au cours de la nuit (figure 52), sa concentration est beaucoup plus élevée dans les racines ayant subit un déficit hydrique. Après 4 heures, cette concentration est de 841 ng/g MS chez le témoin et de 1462 ng/g MS chez les traités.

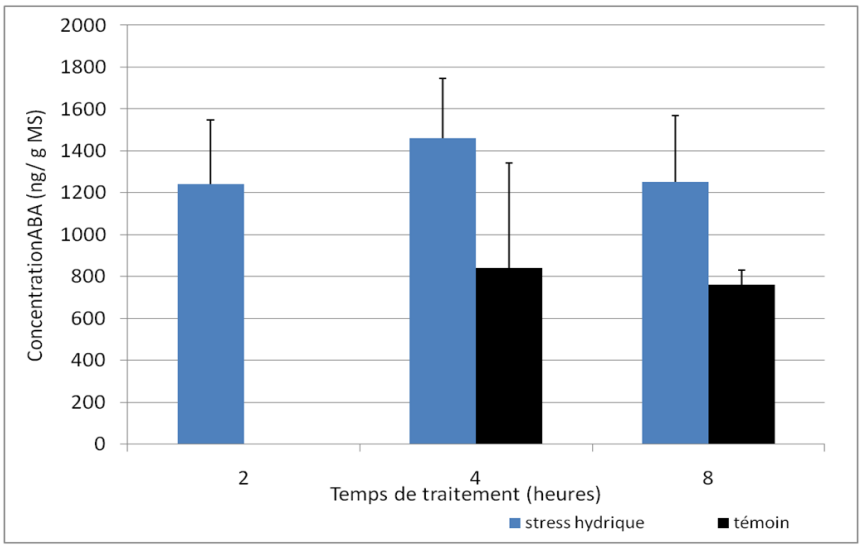


Figure 52. Evolution au cours du temps de la concentration en ABA dans l'ensemble des tissus racinaires (racine primaire et racines latérales), âgés de 12 jours après germination suite à l'application ou non (témoin) d'un déficit hydrique de 2h, 4h et 8h. Pour chaque temps et traitement, le dosage a été réalisé sur cinq systèmes racinaires. Le dosage a été réalisé par immunolocalisation (Test ELISA) par l'équipe du professeur Ian Dodd (Lancaster).

En parallèle, un dosage de l'ABA dans les racines ayant subit une application exogène d'ABA à une concentration de 50 µM a également été réalisé. Comme le montre la figure 53, la concentration en ABA est près de 10 fois plus importante dans le cas du traitement ABA que dans le cas du déficit hydrique. Au vu de l'importance de la concentration en ABA mentionnée dans la littérature, la similarité de la réponse racinaire de l'orge à des concentrations si différentes est donc surprenante.

De plus, afin de voir si l'ABA ne s'accumule pas de manière plus importante dans la partie apicale de la racine, la même analyse a été réalisée en dosant l'ABA à 4 heures dans un segment apical de 20 mm de long (figure 54). Les concentrations en ABA dans l'apex chez le témoin et les plantes soumises au déficit hydrique sont similaires à celles mesurées au niveau du système racinaire complet. Par contre, chez les plantes traitées à l'ABA, la

concentration dans l'apex est près de deux fois supérieure à celle du système racinaire complet. Il est vraisemblable que l'eau prélevée pour l'expansion cellulaire dans la zone apicale entraîne avec elle une quantité plus importante d'ABA dans la région apicale des plantes traitées à l'ABA. L'absence de barrière apoplastiques dans les parois des jeunes cellules de l'apex pourrait également permettre une diffusion plus rapide de l'ABA.

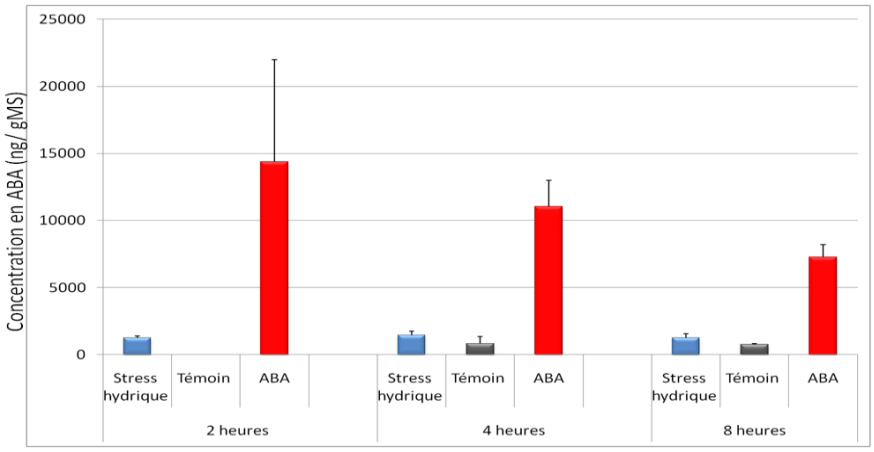


Figure 53. Comparaison de l'évolution de la concentration en ABA au cours du temps suite à l'application d'un déficit hydrique ou d'une application exogène d'une solution d'ABA à 50 µM par rapport à la concentration en ABA dans les racines témoins. Le dosage a été réalisé sur cinq systèmes racinaires complets (racine primaire et racines latérales) après que ce dernier est subit un traitement de 2h, 4h ou 8h.

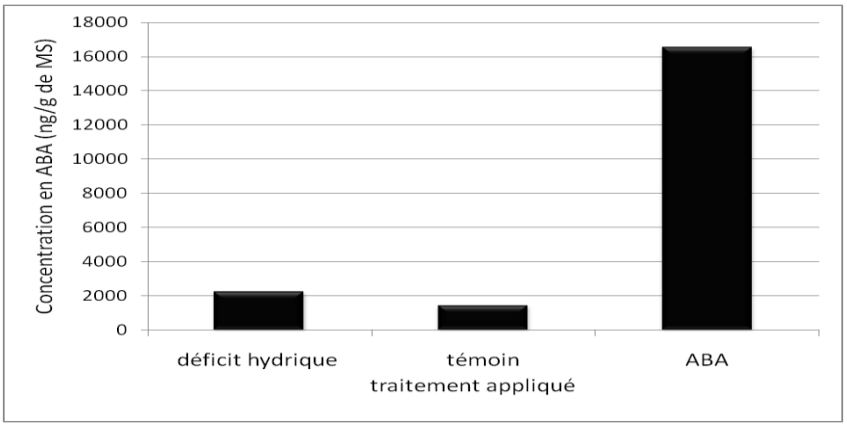


Figure 54. Evolution de la concentration en ABA dans les 20 mm apicaux de 20 racines ayant subit un déficit hydrique ou une application exogène d'une solution d'ABA à 50 µM et dans les racines témoin. (pas d'écart type car le dosage a été réalisé sur un pool de 20 racines)

L'acide abscissique bloque l'initiation des racines latérales chez Arabidopsis

Etant donnée l'absence de mutants d'orge permettant de mieux comprendre l'implication possible de l'ABA dans la régulation de l'initiation des racines latérale, une étude complémentaire a été réalisée sur Arabidopsis par Maria Njo, membre de l'équipe du Prof. T. Beeckman (UGent).

Trois lignées exprimant les marqueurs CYB1;1[137], GATA23[71] et DR5[138] ont été utilisées dans un dispositif expérimental (LRIS, Lateral Root Inducible System) qui permet d'induire et de synchroniser la formation des racines latérales tout au long de l'axe racinaire[58]. Les plantules sont mises en culture durant 72 heures en présence d'un inhibiteur du transport de l'auxine (NPA, acide 1-N-naphthylphthalamique) qui bloque la formation de racines latérales. Elles sont ensuite transférées pendant 24 heures sur un milieu contenant du NPA et de l'ABA avant d'être finalement transférées sur un milieu contenant une auxine (Acide Naphtalène Acétique, NAA) qui induit l'activation des cellules du péricycle adjacentes au pôles de xylème et la formation de racines latérales tout le long de la racine[74].

En présence d'ABA, l'induction des racines latérales par l'auxine est inhibée ou au moins fortement retardée (figure 55).

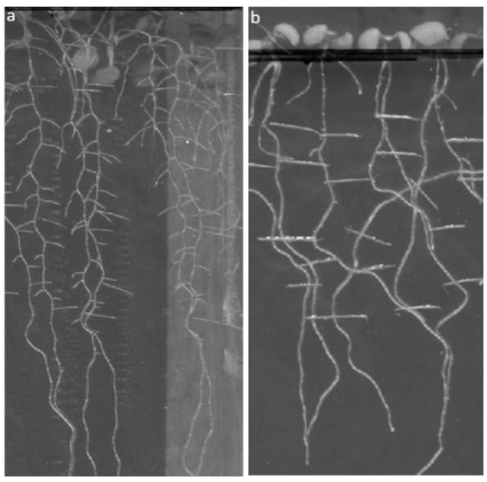


Figure 55. Plantules d'*Arabidopsis thaliana* (DR5:GUS) âgées de 7 jours après germination. (a) Plantes témoins. (b) Plantes ayant subi un prétraitement avec de l'ABA.

L'utilisation des lignées CYB1;1, GATA23 et DR5 a permis de préciser à quel niveau l'ABA interfère dans la formation des racines latérales.

DR5::GUS est un marqueur de perception de l'auxine[138]. On observe sur la figure 56 que son expression est globalement atténuée et différente dans les racines ayant subi un prétraitement avec de l'ABA, que chez les plantes contrôles. Comme DR5 répond de manière précoce aux teneurs en auxine, les modifications d'expression observées dans le LRIS reflètent probablement des variations de teneur en auxine dans les cellules suite à l'application d'ABA.

On observe également que l'expression de GUS est absente dans les parties plus âgées de la racine ainsi que dans une courte zone proche de l'apex. Si l'on suppose que l'ABA appliqué a eu la possibilité de pénétrer tout le long de la racine, l'absence d'auxines dans certaines régions pourrait indiquer les endroits où l'ABA interfère avec la présence d'auxine dans la racine soit au niveau de son transport soit au niveau de son accumulation. La région sans expression proche de l'apex est évidemment intéressante dans la mesure où elle pourrait témoigner d'une incapacité, en présence d'ABA, de transporter l'auxine vers la région où se déroulent sans doute des étapes précoces de la formation des racines latérales. Cependant, une compréhension des flux d'auxines entre les différents compartiments racinaires serait utile pour bien interpréter ces réponses.

Le marqueur CYCB1;1::GUS[137] s'exprime spécifiquement dans les cellules en division, et notamment dans les cellules adjacentes au xylème. La protéine CYCB1;1 intervient lors de première division asymétrique, spécifiquement lors du passage au travers du point de contrôle G1-S du cycle cellulaire[8,58,137]. Le marqueur CYCB1;1::GUS permet donc de signaler le début de la division formatrice[6]. Chez les plantes contrôles, l'expression de CYCB1;1::GUS a été mise en évidence tout au long de l'axe racinaire avec un maximum au niveau de la région apicale. Par contre, chez les plantes traitées, son expression est beaucoup moins marquée aussi bien dans la partie apicale que dans les parties racinaires plus âgées (figure 57). L'effet de l'ABA se marque donc déjà au moment de la première division asymétrique. L'expression du marqueur CYCB1;1::GUS dans la région

apicale dont l'expression de DR5::GUS était absente est surprenante dans la mesure où l'auxine intervient en amont de la première division.

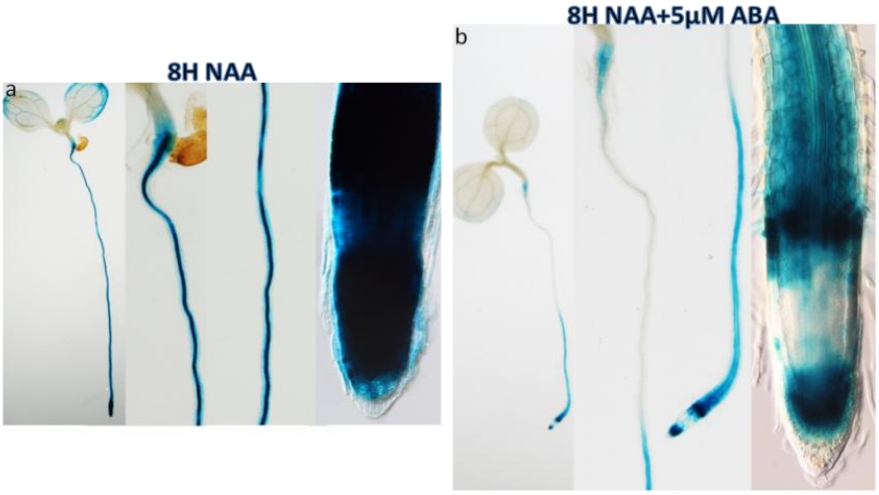


Figure 56. Niveau d'expression de l'auxine dans les lignées DR5::GUS[138] contrôle (a) et traitées à l'ABA 5 µM (b). Chez les plantes contrôles, l'expression de DR5 est importante tout le long de l'axe racinaire. Par contre, au niveau des racines ayant subi un prétraitement par de l'ABA à 5 µM pendant 24 h, l'expression de DR5 est atténuée et absente dans les parties racinaires les plus âgées et dans une courte région proche de l'apex.

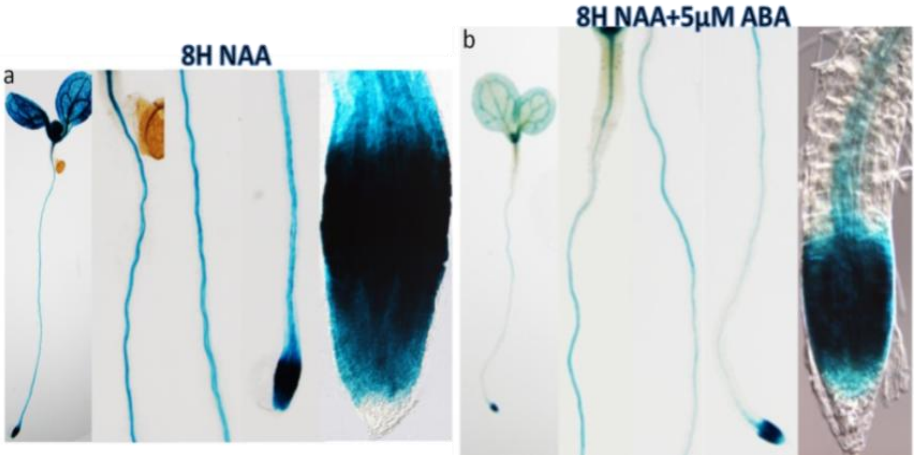


Figure 57. Expression de la protéine CYCB1;1::GUS suite à une induction de l'initiation des racines latérales dans le LRIS. (a) Les plantes contrôles n'ayant pas subi de prétraitement par culture en présence d'ABA (24 heures) montrent une expression importante de la protéine CYCB1;1 tout le long de la racine. (b) Suite au prétraitement l'expression de la protéine CYCB1;1 est atténuée et reste localisée au niveau de la zone méristématique.

L'expression du marqueur GATA23::GUS a également été analysée. GATA23 agit en amont de CYCB1 au niveau de l'acquisition de l'identité fondatrice des cellules du péricycle dans le méristème basal[71]. L'expression du marqueur suite au traitement ABA montre une évolution similaire à celle du marqueur DR5::GUS, à savoir une réduction de l'induction par le NAA dans les régions plus âgées.

L'ABA semble donc agir au niveau de la première division asymétrique, inhibant ainsi l'initiation des racines latérales. D'une manière plus générale, l'ABA agirait comme un inhibiteur de la division cellulaire au niveau de l'initiation des racines latérales mais également au niveau du méristème apical racinaire. En effet, suite à l'application d'ABA, les racines séminales sont plus courtes (figure 59), ce qui indique une croissance apicale réduite. Cette réduction est en accord avec l'observation que la zone méristématique et les cellules du méristème apical sont plus courtes chez les plantes traitées à l'ABA (figure 60).

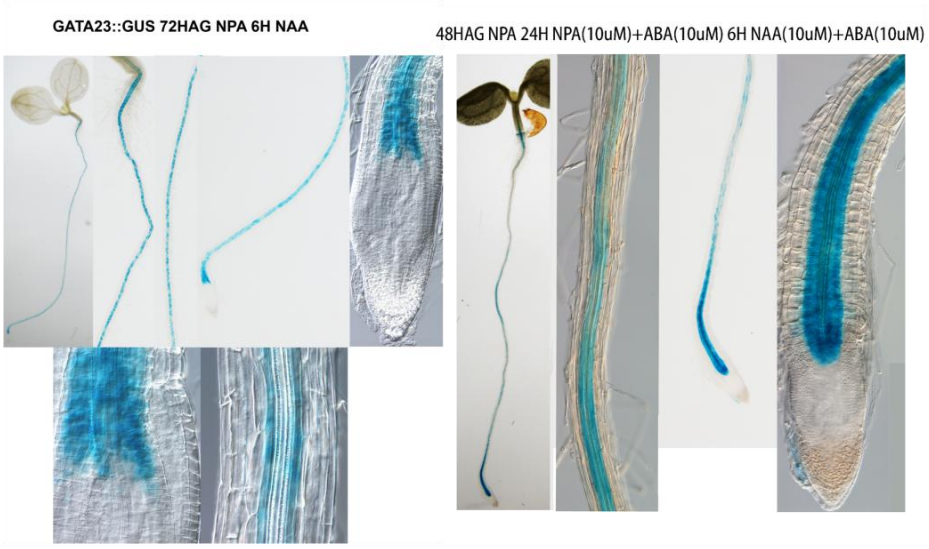


Figure 58. Expression de la protéine GATA23::GUS suite à une induction de l'initiation des racines latérales dans le LRIS. (a) Les plantes contrôles n'ayant pas subi de prétraitement par culture en présence d'ABA (24 heures) montrent une expression de la protéine GATA23 tout le long de la racine. (b) Suite au prétraitement l'expression de la protéine GATA 23 est atténuée et absente dans les parties racinaires les plus âgées.

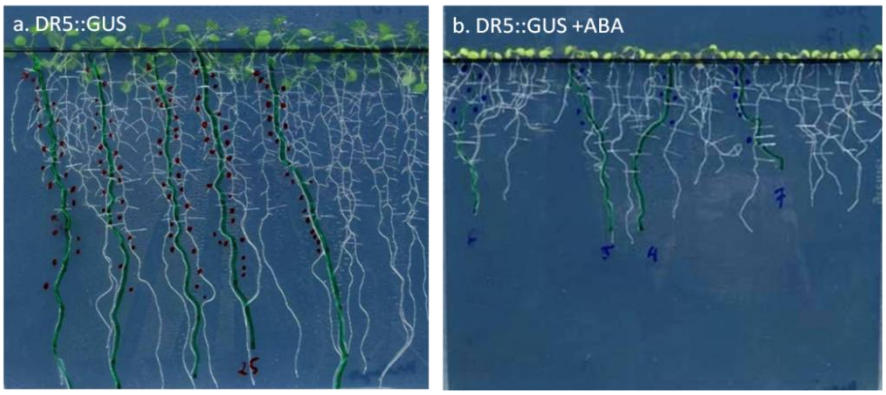


Figure 59. Effet du traitement ABA sur la croissance et la morphologie racinaires. (a) Plantules n'ayant pas subi de traitement ABA. (b) Plantules ayant subi un prétraitement à l'ABA.

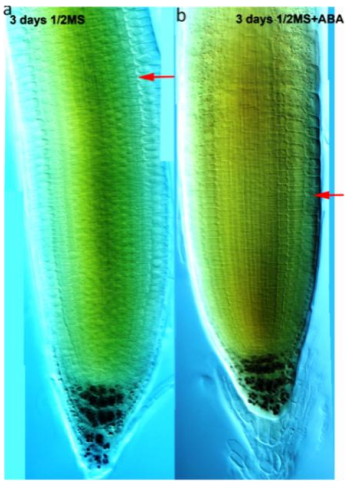


Figure 60. Effet de l'ABA sur la croissance racinaire. (a) Racine d'arabidopsis mise en culture pendant 48 heures sur un milieu ½ MS et transférée sur un milieu ½ MS sans ABA. (b). Racine mise en culture pendant 48 heures sur un milieu ½ MS et transférée sur un milieu contenant de l'ABA pendant 3 jours. La flèche représente l'endroit où les grains d'amidon commencent à se différencier. La présence de grains d'amidon dans les cellules du cortex met en évidence la fin de la zone méristèmatique. Les grains d'amidon sont mis en évidence par une coloration des tissus racinaires au lugol.

DISCUSSION

Le déficit hydrique appliqué interfère avec le transport basipète de l'auxine

Les résultats obtenus suggèrent qu'en conditions de déficit hydrique, la concentration en auxine dans la région racinaire où a lieu l'initiation soit limitante pour l'initiation des racines latérales[134].

Cette interprétation s'appuye sur le fait que, chez Arabidopsis, une accumulation d'auxine se produit dans les cellules du péricycle avant que la

première division asymétrique ne se produise et qu'en absence de cette accumulation, l'initiation des primordia n'a pas lieu[68] (figure 61).

Une analyse plus approfondie des zones inhibées montre qu'à la reprise de la brumisation, en position proximale à la zone inhibée, la densité de racines latérales est plus importante. Ceci suggère que, durant l'épisode de déficit hydrique, le transport basipète d'auxine (depuis l'apex racinaire) soit réduit par rapport au transport acropète (depuis les parties aérienne). Il s'en suivrait une accumulation d'auxine dans la pointe racinaire (figure 62). Lorsque le transport basipète est rétabli, le flux d'auxine vers les cellules du péricycle serait plus élevé que normal jusqu'à ce que cette accumulation soit résorbée et pourrait accroître de manière transitoire la densité de ramification (figure 62 et figure 63).

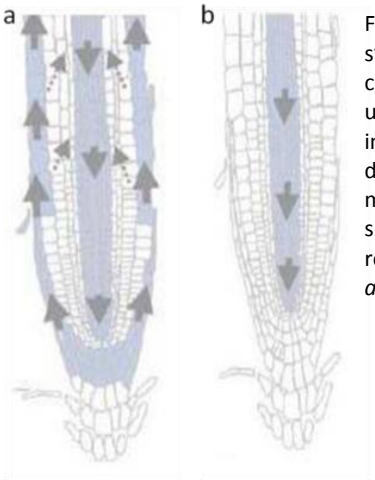


Figure 61. (a) En conditions normales, l'auxine s'accumule dans l'apex puis est redistribuée dans les cellules du péricycle. Lorsque la concentration atteint une valeur seuil dans une des cellules alors il y a initiation d'une RL. (b) Hypothèse: en condition de déficit hydrique, l'auxine s'accumulerait dans le méristème racinaire. Le flux réduit d'auxines vers des sites d'initiation ne permettrait par l'accumulation requise pour l'initiation. Modifié d'après Kramer et *al*.[7]

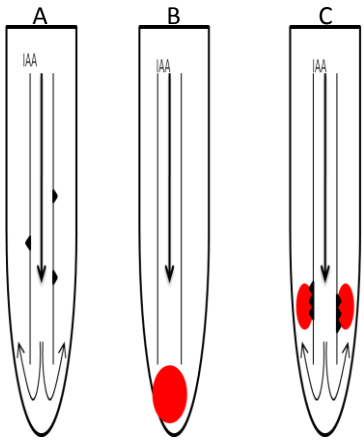


Figure 62. Modèle proposé de perturbation du transport de l'auxine par le déficit hydrique A. Circulation de l'auxine en conditions normales. B. Pendant un déficit hydrique, le transport basipète est réduit, et provoque une accumulation de l'auxine au niveau de l'extrémité racinaire. C. La reprise du transport libère l'auxine accumulée et mène à un pic transitoire dans le flux basipète.

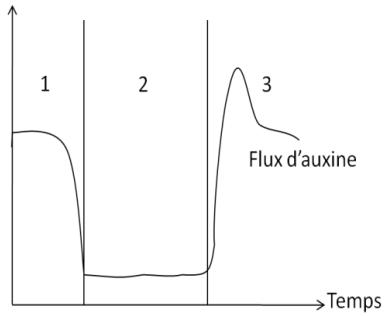


Figure 63. Evolution de la concentration en auxine au niveau des sites d'initiation avant (1) pendant (2) et après (3) l'application d'un déficit hydrique, selon l'hypothèse d'une atténuation du trabnsport basipète de l'auxine. Une densité supérieure de RL est formée dans les premières heures qui suivent la fin du traitement.L'application d'auxine exogène stimule la formation des racines latérale

Suite à l'application d'une solution exogène d'auxine, de nombreuses cellules du péricycle entament la formation de racines latérales hors de la séquence acropète[37,134]. Chez l'orge, l'application d'une solution exogène d'auxine avant ou après une période de déficit hydrique, permet d'augmenter la densité des racines latérales sur l'ensemble de l'axe racinaire déjà formé au moment de l'application du traitement.

Chez Arabidopsis, il a été démontré que l'application exogène d'auxine permet de stimuler l'initiation des racines latérales dans toutes les cellules du péricycle, alors qu'en conditions normales, une faible proportion des cellules du péricycle s'engagent dans le processus[58]. Si, dans les zones matures de la racine, l'auxine stimule la néoformation de racines latérales supplémentaires entre des latérales établies, il n'est pas certain que le même phénomène se produise dans la région d'initiation de la séquence acropète. Le développement d'un plus grand nombre de racines latérales dans cette séquence pourrait être le résultat d'un ajout de nouveaux sites entre des sites établis auparavant, mais pourrait également résulter d'une modification de la fréquence d'initiation induite par une présence d'auxines en concentration plus importante. Ceci suppose un mécanisme d'initiation dont la fréquence est dépendante de la concentration en auxine. A notre connaissance, cette hypothèse n'a pas encore été formulée à ce jour.

Sur base de nos résultats, il serait prématuré de conclure que les auxines permettent de lever l'inhibition induite par le déficit hydrique. En effet, il faudrait pour cela montrer que les structures qui ont arrêté leur développement lors du déficit hydrique, peuvent le reprendre suite à une application d'auxines, ce qui serait pratiquement difficile à vérifier. On

pourrait tout au moins vérifier si des primordia dormants sont toujours présents dans la zone inhibée après réactivation par l'auxine.

Comme nous l'avons montré dans le chapitre 2 lors de l'application d'une période de déficit hydrique, tous les primordia ne sont pas arrêtés au même stade de l'initiation. Certains semblent passer la première division asymétrique alors que d'autres semblent être stoppés en amont de cette première division. Au vu des résultats obtenus ici, il est possible que la réduction de l'apport en auxine résultant de l'application du déficit hydrique accroisse la compétition pour l'auxine entre les cellules du péricycle. De ce fait, les primordia arrivant à se diviser (première division asymétrique) pourraient être les primordia qui ont emporté la compétition, au moins durant les premiers stades de développement. Le fait qu'ils soient malgré tout arrêtés suggère qu'ils sont dépendants d'un apport continu d'auxine durant un certain temps, par exemple jusqu'à ce que des connexions entre le primordium et le phloème de la racine mère soient établies.

UNE APPLICATION EXOGÈNE D'ABA MIME L'EFFET DU DÉFICIT HYDRIQUE

Un des objectifs de cette étude était de voir si l'application exogène d'une solution d'ABA permettait de reproduire la réponse des plantes à un déficit hydrique de huit heures. Les différents résultats obtenus vont dans ce sens. Les deux traitements provoquent les mêmes perturbations du développement qui consiste en une inhibition de la formation des racines latérales et une réduction de la croissance de la racine primaire.

En réponse à ces deux traitements, la concentration en ABA s'accroît de manière significative dans les racines. La présence de cette accumulation lors du déficit hydrique suggère que l'ABA serve de médiateur dans la réponse observée, ce qui est consistent avec les fonctions qui lui sont attribuées dans la littérature[139-140].

Il est généralement admis que l'ABA contribue au statut hydrique de la plante, notamment en régulant l'absorption de l'eau par les racines et la perte d'eau par les feuilles[79]. Une hypothèse parfois avancée est qu'en conditions d'eau limitante, une modification de l'architecture racinaire

favorisant la croissance en longueur des axes primaires permet d'atteindre plus rapidement les horizons profonds et d'accéder ainsi à un stock d'eau supplémentaire[141]. Comme le déficit hydrique s'accompagne normalement d'une réduction de l'assimilation de carbone, il semblerait logique que la modulation de l'architecture favorisant la croissance en longueur se fasse au détriment de la ramification. Sous cet angle, l'arrêt de la formation des racines latérales observé ici pourrait être un mécanisme réduisant la consommation d'assimilats pour la ramification et permettant de maintenir au mieux la croissance en longueur des axes primaires.

L'INHIBITION DE L'INITIATION DES RACINES LATÉRALES, UNE NOUVELLE FONCTION POUR L'ABA

Au niveau du développement racinaire, l'ABA apparaît comme régulateur négatif de l'émergence des racines latérales chez Arabidopsis[72,82,142], et activateur de la formation des racines latérales chez le riz[132].

L'étude présentée ici suggère que, chez l'orge et Arabidopsis, l'ABA affecte les étapes précoces de la formation des racines latérales. Les résultats obtenus avec différents gènes marqueurs chez Arabidopsis précisent que les conséquences de la présence d'ABA se manifestent à un stade précédant l'activation des cellules fondatrices et les premières divisions asymétriques.

Il a déjà été proposé que l'ABA régule l'initiation des racines latérales en interagissant avec le transport ou la signalisation de l'auxine[13,143]. Nous avons montré qu'en absence de stress, l'ABA est présent dans les racines à un niveau de base qui est, dès lors, compatible avec la formation de racines latérales. L'arrêt de cette formation, en condition de déficit hydrique ou suite à une application exogène d'ABA, s'accompagne d'une augmentation importante de la concentration en ABA. Chez Arabidopsis, cette augmentation se marque par une modification de l'expression du marqueur de perception de l'auxine (DR5) le long de la racine mère. Nos résultats appuient donc l'hypothèse que l'ABA pourrait agir sur le transport de l'auxine en amont des divisions asymétriques.

Chez Arabidopsis, il a été montré que l'ABA et l'auxine exercent des rôles antagonistes dans la régulation de la formation des racines latérales[110,144],

ce qui suggère qu'un équilibre entre les teneurs ABA/auxine soit nécessaire pour le bon déroulement du développement des primordia[142]. Une concentration accrue en ABA, pourrait perturber le transport ou l'accumulation de l'auxine, générant ainsi un déséquilibre ABA/auxine d'autant plus grand. Cet antagonisme entre les deux hormones pourrait se manifester notamment au niveau de l'expression de la protéine CYCB1, impliquée dans les premières divisions asymétriques, dont l'expression est stimulée par l'auxine et réprimée par l'ABA. Cependant, comme l'indiquent les modifications de l'expression de GATA23 suite à l'application d'ABA, cet antagonisme pourrait se manifester en amont de CYCB1 et des divisions formatrices.

L'ABA INDUIT UN RALENTISSEMENT DE LA CROISSANCE

La croissance d'un axe racinaire est un processus dynamique résultant de la production de nouvelles cellules et de leur expansion. Dans nos conditions de culture, l'application d'une solution exogène d'ABA à 10 et 50 µM réduit la croissance racinaire durant une période qui excède la durée d'application du traitement et qui est d'autant plus longue que la concentration est élevée.

Au niveau de la racine primaire, l'ABA agit chez Arabidopsis également comme un inhibiteur de l'activité méristématique, avec une réduction de la taille du méristème des racines traitées à l'ABA. Cette inhibition est corrélée à la réduction de l'expression du marqueur CYCB1::GUS, indiquant que l'ABA agit comme un régulateur négatif de la progression du cycle cellulaire[145]. Nous n'avons pas vérifié que la réduction de croissance observée chez l'orge sous traitement ABA soit liée à une réduction de la taille du méristème.

Le fait que l'effet de l'ABA perdure après la fin du traitement suggère que l'ABA a modifié la structure de la population de cellules de la zone méristématique et qu'il faut attendre le rétablissement de la structure originale pour récupérer une activité de production cellulaire normale. Un résultat similaire a été observé dans le cas de l'application d'un stress mécanique transitoire[146].

Chez le maïs, cependant, il semble que l'effet inverse se produit et que l'ABA permet le maintien de la croissance racinaire. L'accumulation d'ABA limiterait la production d'éthylène et minimiserait l'effet inhibiteur de ce dernier sur la vitesse de croissance[147-149]. Chez les racines de maïs et de soja, l'ABA régule également d'autres processus qui assurent le maintien de la croissance racinaire, tels que l'augmentation du dépôt de proline, qui permet de réguler l'ajustement osmotique, l'augmentation de l'extensibilité des parois par la synthèse de XTH (Xyloglucan endotransglygosylase/hydrolase)[150] et l'augmentation de la perméabilité hydraulique membranaire via l'activité des aquaporines[151].

Ces réponses ne sont pas nécessairement contradictoires et correspondent aux deux contraintes que pose le déficit hydrique. Tout d'abord, une réduction de la disponibilité en assimilats, qui implique une réduction globale de la croissance. Ensuite, une difficulté accrue de maintenir la turgescence qui implique une stimulation des processus visant à rétablir la turgescence ou à faciliter l'expansion cellulaire lorsque la turgescence est réduite.

Existe-t-il un lien entre les effets de l'ABA sur la croissance et sur l'initiation des racines latérales?

La corrélation entre les effets de l'ABA sur la croissance chez les deux espèces n'implique pas nécessairement que les deux effets soient liés par un mécanisme commun.

L'effet atténuateur de l'ABA sur la progression du cycle cellulaire pourrait être en accord avec, d'une part, l'effet sur l'activité de division et la croissance et, d'autre part, l'inhibition des divisions formatrices.

Dans les expériences réalisées, les effets du traitement ABA 10 µM sur la vitesse de croissance et sur la ramification se sont montrés similaires à ceux du traitement 50 µM mais moins prononcés. Cette observation est très intéressante car elle suggère que l'ABA pourrait agit d'une manière dose-dépendante sur les deux processus. S'il se confirme que l'ABA peut influencer le transport de l'auxine, cela pourrait signifier que le flux basipète d'auxine influence, lui aussi, d'une manière quantitative la croissance et la densité de formation des racines latérales.

CHAPITRE 5. CARTOGRAPHIE LONGITUDINALE DE L'EXPRESSION DES GÈNES

INTRODUCTION

Lavigne et al (non publiée) ont réalisé une analyse transcriptomique dont le but était d'identifier des gènes pouvant intervenir dans le processus de détermination du patron de ramification et notamment des gènes impliqués dans l'initiation des RL. Cette analyse a mis en évidence 54 séquences (EST contigs) dont l'expression est modifiée dans les 6 heures qui suivent l'application du déficit hydrique. Ces séquences ayant été isolées dans une région située à 12 mm de l'apex. elles pourraient être impliquées dans le processus d'initiation des RL. Nous avons voulu confirmer ici par RT-PCR les résultats de l'analyse transcriptomique et déterminer le profil d'expression le long de la racine séminale de séquences choisies parmi ces 54.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression du gène ALF4, lequel code pour une protéine nucléaire nécessaire pour les premières étapes de l'initiation, qui permettrait de maintenir les cellules du péricycle dans un état dit mitotique compétent[33], ce qui en fait un bon candidat pour notre étude. Nous avons utilisé une séquence homologue d'ALF4 présente sur la puce *barley1* d'Affymetrix et nous avons quantifié son expression sur des racines soumises à un stress hydrique.

Dans un second temps une discussion avec le professeur M. Bennett (University of Nottingham), nous a incités à ajouter un facteur de transcription de la famille des bZip (Contig_10961), également présent sur cette puce,. Selon l'analyse transcriptomique, son expression est diminuée lors de l'application d'un stress hydrique dans nos conditions de culture. Ce gène pourrait être impliqué dans les mécanismes de signalisation par l'acide abscissique.

CARTOGRAPHIE DE L'EXPRESSION DU GÈNE ALF4

Nous avons réalisé une cartographie longitudinale de l'expression d'une séquence EST de l'orge homologue à At*ALF4*, afin d'établir la correspondance avec les étapes de formation du primordium chez l'orge (chapitre 1).

L'expression de cette séquence a été quantifiée par RT-qPCR sur des fragments racinaires de 2 mm de long obtenus par segmentation d'un fragment racinaire apical de 20 mm (figure 64) comprenant le site d'action de l'inhibition, situé à environ 12 mm de l'apex (chapitre 3). L'expérience a été réalisée sur des échantillons prélevés à 2, 4 et 8 heures au cours de la période nocturne (figure 65, échantillons témoins).

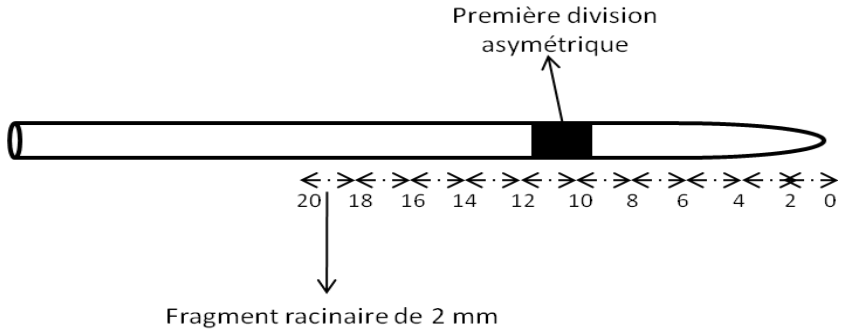


Figure 64. Schéma représentant la fragmentation d'une racine d'orge réalisée pour établir la cartographie de l'expression du gène *ALF4* le long d'un fragment de l'axe apical de 20 mm de long. L'ARN total a été extrait dans des pools d'échantillons constitués de 10 fragments racinaires de 2 mm provenant de 10 racines différentes issues de la même culture.

Il faut noter que pour chaque analyse nous avons réalisé 2 réplicas biologiques, et que la valeur du Ct obtenue pour chacune des positions (0-2, 2-4…) ne provient pas d'un fragment de 2 mm, mais de 10 fragments de 2 mm.

A 2 heures, l'expression du gène est faible dans la région apicale, et affiche un maximum dans la zone de 10 à 12 mm (où ont lieu les premières divisions asymétriques) et reste importante entre 12 et 20 mm. L'expression est globalement plus faible et variable dans les échantillons prélevés après 4 heures d'obscurité. Le maximum semble s'être déplacé vers le fragment situé entre 8 et 10 mm. L'expression est la plus importante

à l'issue de la phase nocturne (8 heures), avec des valeurs faibles près de l'apex et maximales vers 14-18 mm.

Par rapport au modèle de développement proposé au chapitre 1, la zone d'expression maximale du gène semble consistante avec la localisation des stades I et II. Le déplacement de ce maximum de 8-10 mm (4h) vers 14-18 mm (8h) au cours de la nuit est par ailleurs consistante avec l'accélération de la croissance observée dans le chapitre 3. Enfin, du fait que l'expression d'*ALF4* est présente sur toute la longueur des échantillons et qu'elle varie en fonction du temps, l'utilisation du gène *ALF4* comme un marqueur précoce de l'initiation des racines latérales chez l'orge semble compromis.

EFFET DU DÉFICIT HYDRIQUE SUR L'EXPRESSION DU GÈNE ALF4

L'analyse précédente a été répétée avec des échantillons subissant un épisode de déficit hydrique afin de comparer l'expression d'*ALF4* dans les échantillons racinaires traités et témoins (figure 66-figure 68). Globalement, le niveau d'expression des échantillons traités est supérieur à celui des échantillons témoins à 2 et 4 heures, et inférieur à 8 heures (tableau 9).

De 2 à 4 heures, l'expression diminue chez les témoins et chez les traités. De 4 à 8 heures, elle remonte chez les témoins et reste faible chez les traités.

Tableau 9. Analyse comparative de l'expression du gène ALF4 entre les échantillons racinaires ayant subi un déficit hydrique (S2, S4 et S8) et les échantillons n'ayant pas subi de déficit hydrique (T2, T4 et T8). Les traitements sont comparés deux à deux selon la méthode des contrastes, n=2 réplicas biologiques.

	T2	T4	T8
S2	<0.0001		
S4		<0.0001	
S8			0.0009

		0-2 mm	2-4 mm	4-6 mm	6-8 mm	8-10 mm	10-12 mm	12-14 mm	14-16 mm	16-18 mm	18-20 mm
0 heures	témoin	5,79	4,76	5,00	3,26	4,41	2,09	3,95	3,14	3,36	2,29
2 heures	stress	5,98	5,18	6,30	4,70	4,05	5,90	3,65	5,55	4,53	4,13
	témoin	1,00	1,03	1,33	2,20	3,63	4,23	4,05	3,40	2,93	3,03
4 heures	stress	0,68	2,15	3,70	4,25	4,65	5,75	5,65	4,65	4,60	4,55
	témoin	0,73	1,95	0,55	1,23	2,70	0,45	0,92	1,63	1,73	1,43
8 heures	stress	2,83	3,13	4,15	3,85	3,03	3,45	3,38	2,98	3,18	3,45
	témoin	2,67	3,93	4,47	4,81	4,62	4,70	4,49	5,65	6,04	4,43

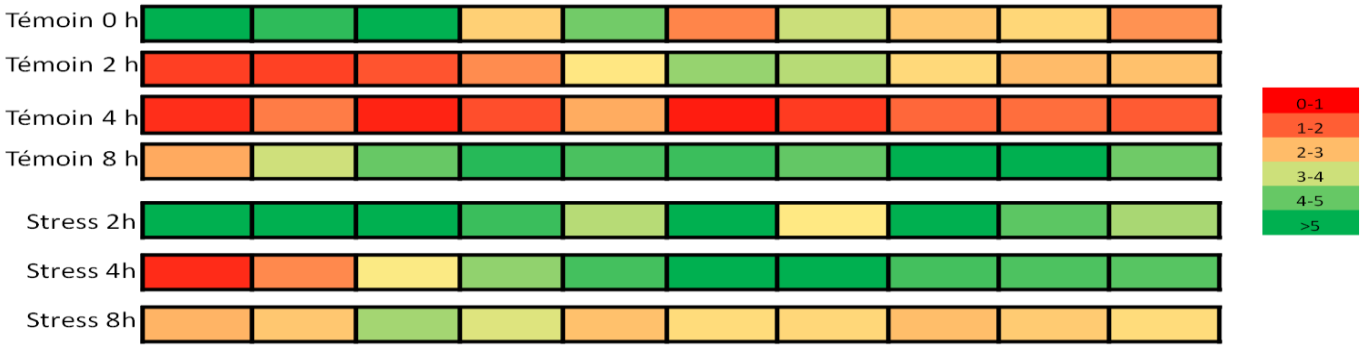


Figure 65. Variation de l'expression du gène ALF4 dans les fragments racinaires provenant de racines ayant subit (stress) ou non (témoin) une période de déficit hydrique de 2, 4 ou 8 heures. L'expression du gène représentée dans ce graphique correspond à l'expression du gène ALF4 (valeur du ct) normalisée en fonction de l'expression du gène de référence EF1α (ALF4-EF1α). Les valeurs représentent donc les variations d'expression du gène exprimée en ct. L'analyse a été réalisée sur 2 réplicas biologiques, chaque valeur est donc une moyenne de 2 valeurs de Ct, ppds=1,324.

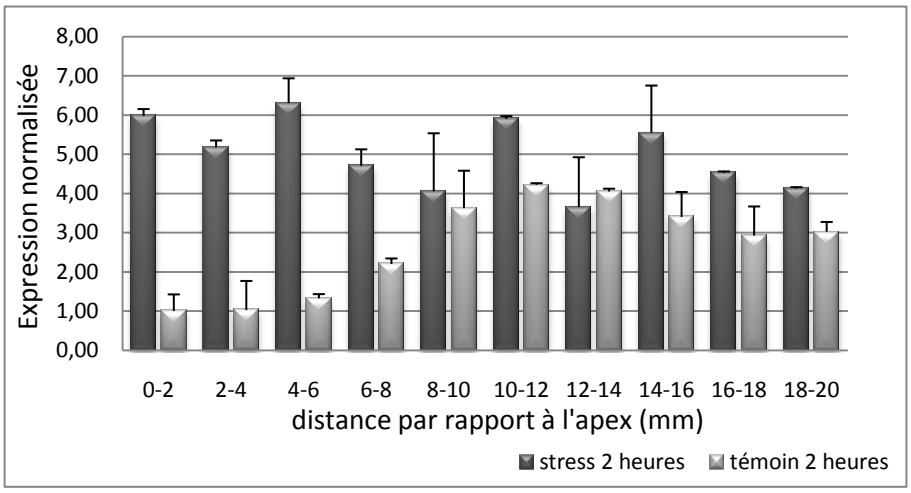


Figure 66. Expression du gène *ALF4* dans les échantillons racinaires ayant subi ou non un déficit hydrique d'une durée de 2 heures. Pour chaque fragment, l'expression du gène *ALF4* a été normalisée par différence avec l'expression du gène de référence EF1α. (n=2)

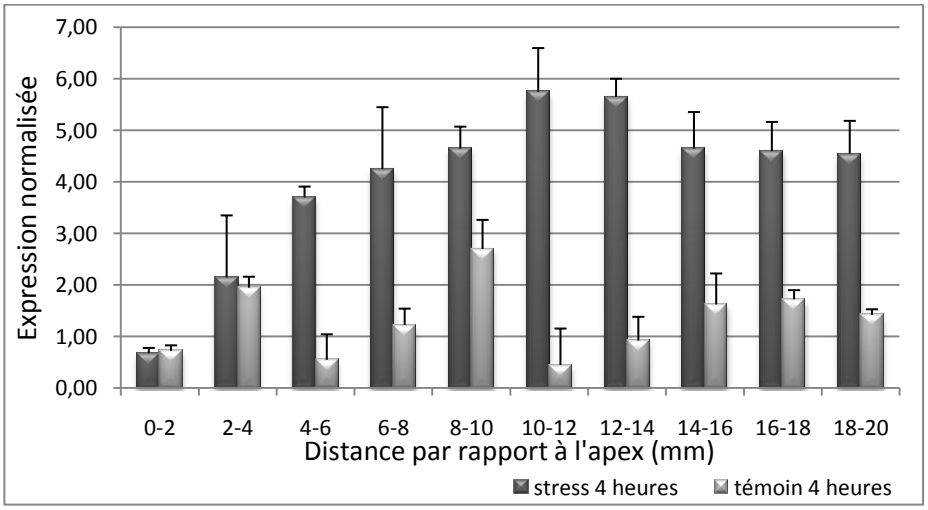


Figure 67. Expression du gène ALF4 dans les échantillons racinaires ayant subi ou non un déficit hydrique d'une durée de 4 heures. Pour chaque fragment, l'expression du gène ALF4 a été normalisée par différence avec l'expression du gène de référence EF1α. (n=2)

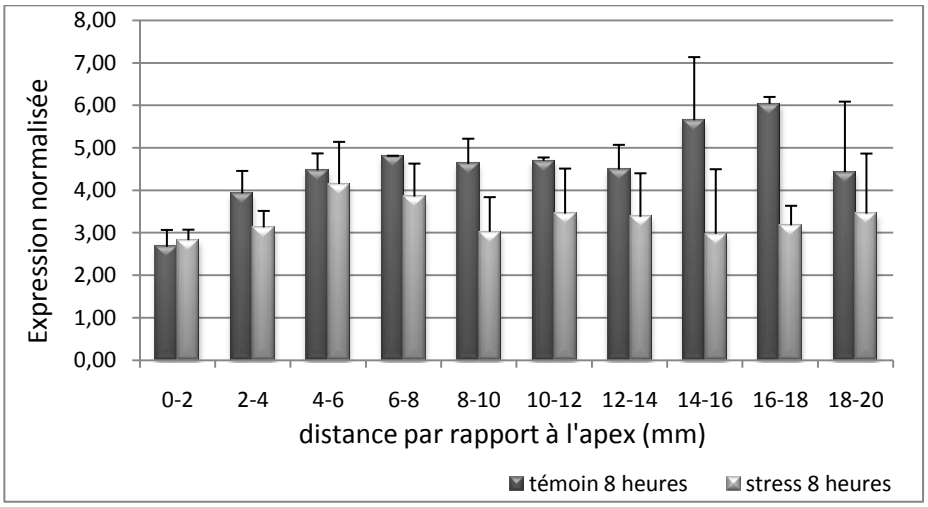


Figure 68. Expression du gène *ALF4* dans les échantillons racinaires ayant subi ou non un déficit hydrique d'une durée de 8 heures. Pour chaque fragment, l'expression du gène *ALF4* a été normalisée par différence avec l'expression du gène de référence EF1α. (n=2)

L'analyse par segments de 2 mm révèle des interactions importantes entre l'effet du temps, du traitement et de la position le long de la racine (figure 69). Après deux heures d'obscurité, l'expression d'*ALF4* chez les échantillons traités est globalement stable le long de la racine, suite à une expression plus importante du côté de l'apex (< 6 mm) par rapport aux témoins. Au milieu de la nuit, les plantes traitées affichent un profil d'expression similaire à celui des plantes témoins en début de nuit, résultant d'une expression plus importante à plus de 6 mm de l'apex. A 8 heures, le profil d'expression des échantillons traités est redevenu quasi uniforme.

Le déficit hydrique induit donc une modification importante de l'évolution temporelle du domaine d'expression d'*ALF4* au cours de la nuit.

temps/ distance (mm)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20
2 heures	4,98	4,15	4,98	2,50	0,43	1,68	-0,40	2,15	1,60	1,10
4 heures	-0,05	0,20	3,15	3,03	1,95	5,30	4,73	3,03	2,88	3,13
8 heures	0,15	-0,80	-0,32	-0,96	-1,60	-1,25	-1,12	-2,68	-2,86	-0,98



Figure 69. Analyse comparée de l'expression du gène *ALF4* dans les échantillons témoins et ayant subit un déficit hydrique de 2 heures, 4 heures ou 8 heures. Les valeurs d'expression reprises dans le tableau correspondent à l'expression du gène *ALF4* en ct, obtenu par (1) normalisation en fonction de l'expression de *EF1α* puis (2) soustrait à l'expression de *ALF4* dans l'échantillon témoin (dont l'expression a également été normalisée avec l'expression de *EF1α*). PPDS=1,918

EVOLUTION DE L'EXPRESSION DU CONTIG-10961 (HOMOLOGUE BZIP) DANS LES ÉCHANTILLONS RACINAIRES LORS DE L'APPLICATION D'UN DÉFICIT HYDRIQUE

Parmi les EST présents sur la puce Affymetrix Barley22K qui montrent une expression différentielle en réponse au déficit hydrique, nous avons épinglé une séquence (Contig_10961) homologue à un facteur de transcription de la famille des *bZIP*. L'expression de ce contig est diminuée dès les deux premières heures de traitement qui suivent l'application d'un déficit hydrique.

Or, cette famille de facteurs de transcription, joue un rôle important dans la plupart des aspects de la vie de la plante tels que la croissance, le développement et la réponse au stress aussi bien abiotique que biotique et notamment dans la régulation de la réponse des plantes au stress, et la transduction des signaux induits par les hormones[152]. En effet, chez Arabidopsis, il a été montré que les facteurs de transcription de type *bZIP*, appartenant à la sous-famille *ABI5* joue un rôle dans la réponse des plantes au déficit hydrique et confère une sensibilité à l'ABA[153-154]. Chez le riz, le facteur de transcription *obsZIP23* appartenant à la famille des *bZIP* et homologue à *ABI5*, est également impliqué dans la réponse des plantes au déficit hydrique ainsi que dans la signalisation induite par l'ABA[152].

Il est donc possible que ce contig d'EST (Contig_10961) représente un facteur de transcription qui intervient dans la réponse de l'orge au déficit hydrique et/ou dans la réponse induite par l'ABA.

Nous avons voulu ici valider les observations de l'étude microarray et cartographier de manière relativement précise (sur des fragments de 2 mm) l'expression de ce contig dans la région apicale de la racine. Cette expression à été quantifiée par RT-qPCR sur de l'ARN extrait de fragments racinaires ayant subi ou non un déficit hydrique d'une durée de 2 heures. L'analyse a été réalisée sur des fragments racinaires de 20 mm de long subdivisés en 10 fragments successifs de 2 mm.

La figure 70 représente l'expression différentielle du gène dans les échantillons ayant subi un déficit hydrique de 2 heures par rapport aux échantillons témoins. L'application d'un déficit hydrique de 2 heures induit une diminution significative ($p = 0.0079$) de l'expression du contig.

Pour les fragments racinaires situés entre 2 et 10 mm, l'expression relative est inférieure à 1, ce qui signifie que le gène n'est pas induit dans ces échantillons. Au-delà de 10 mm, l'expression est légèrement supérieure à 1, mais reste d'une manière générale inférieure au niveau d'expression du gène dans les échantillons témoins.

On remarque, sur la figure 71 , qui représente la différence d'expression du gène entre les échantillons témoins et les échantillons ayant subi un déficit hydrique, que le gène est d'une manière générale plus exprimé dans les échantillons témoins.

Il semble donc que le déficit hydrique appliqué induise une modification de l'expression du contig_10961. Le gène semble être sous-exprimé entre 2 et 12 mm. Ces résultats permettent donc de confirmer ceux obtenus lors de l'analyse microarray réalisée par Lavigne et *al* (non publié).

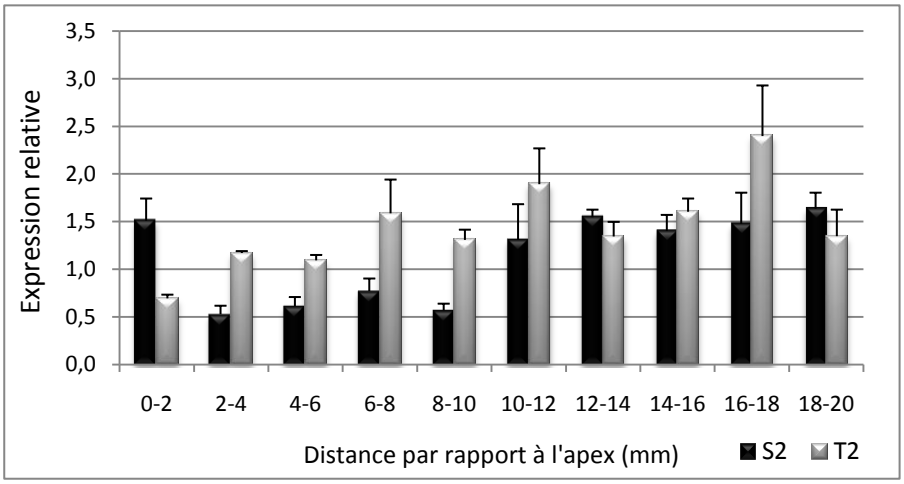


Figure 70. Expression relative du contig_10961 dans les échantillons racinaires ayant subi (noir, S2) ou pas (gris, T2) une période de déficit hydrique de 2 heures. L'expression relative du gène dans les échantillons est déterminée via la méthode du ΔΔCT par rapport à un échantillon de référence qui correspond à un échantillon racinaire au début du traitement. (n= 2 réplicas biologiques)

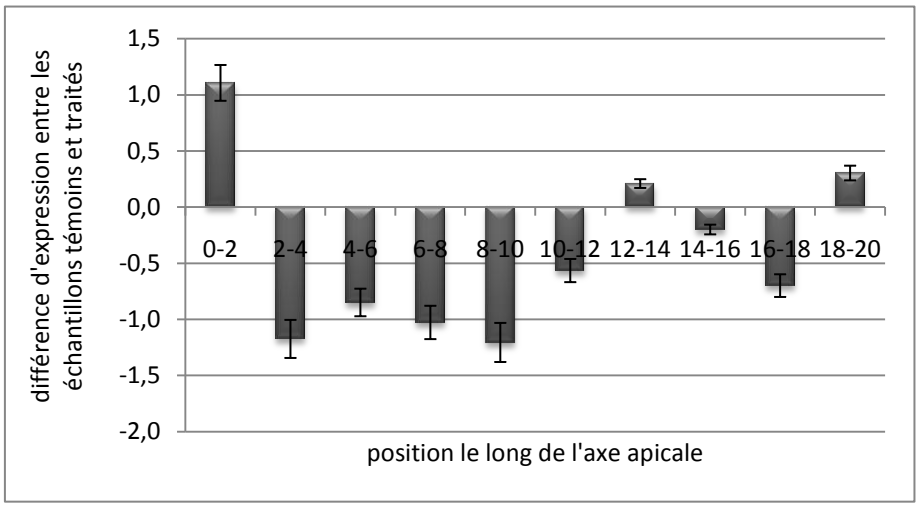


Figure 71. Différence d'expression du gène *bZIP* entre les échantillons racinaires ayant subi un déficit hydrique de 2 heures et les échantillons contrôles. (n= 2 réplicas biologiques)

DISCUSSION

LE GÈNE ALF4 NE PARAÎT PAS ÊTRE IMPLIQUÉ DANS L'INHIBITION DE LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES EN RÉPONSE AU DÉFICIT HYDRIQUE

Nous avons montré que chez l'orge, le gène *ALF4* s'exprime sur toute la longueur du segment dans lequel se mettent en place les premiers événements de l'initiation des RL qui aboutissent aux divisions formatrices. L'expression d'*ALF4* dans ces 20mm apicaux est cohérente avec la situation observée chez Arabidopsis[33], ce qui laisse supposer que la séquence dont nous avons analysé l'expression soit fonctionnellement équivalente à *AtALF4*. Cependant, aucune des expériences réalisées ne nous permet de l'affirmer. De ce fait, les résultats obtenus sont sous réserve que les deux gènes/protéines exercent la même fonction.

De plus, nous avons mis en évidence une variation importante de l'expression du gène au cours de la phase nocturne, qui n'avait pas été rapportée chez Arabidopsis. Nous proposons deux hypothèses qui pourraient expliquer ces variations :

D'une part, elles pourraient refléter les variations de la vitesse de croissance de la racine primaire au cours de la nuit. En effet, nous avons montré que la vitesse de croissance diminue rapidement lors des premières

heures de la nuit puis ré-augmente progressivement en fin de période nocturne (chapitre 3). Il est donc possible que les variations de la position du maximum d'expression d'*ALF4* soient la conséquence de cette variation de la vitesse de croissance de la racine. Cette hypothèse pourrait être testée en traçant des profils de vélocité au cours de la nuit.

La seconde hypothèse serait que, pour une raison dont nous n'avons a priori aucune explication, l'expression du gène soit soumise à une évolution temporelle intrinsèque, c'est-à-dire une variation à la fois fonction de la distance par rapport à l'apex et du temps.

Les résultats concernant l'expression du gène en réponse au déficit hydrique sont relativement difficiles à interpréter. La réponse est en effet de nature quantitative, alors que les informations que l'on a sur l'expression de *ALF4* chez Arabidopsis proviennent de lignées Knock Out, avec une réponse binaire. Néanmoins, le fait que l'expression obtenue après 4 heures chez le traité (ne formant pas de RL) soit très similaire à celle observé après 2 et 8 heures chez le témoin (formant des RL) suggère que le patron d'expression d'*ALF4* induit par le déficit hydrique n'est pas à lui seul responsable de l'inhibition. Rien ne nous permet donc d'affirmer que le déficit hydrique interfère au niveau de la compétence à la division des cellules du péricycle.

LE DÉFICIT HYDRIQUE APPLIQUÉ MODIFIE L'EXPRESSION DU CONTIG_10961.

L'analyse transcriptomique réalisée par T.Lavigne avait montré que l'expression de ce contig était diminuée dès les deux premières heures d'application du déficit hydrique. Cette analyse avait été réalisée sur un fragment racinaire apical de 8 mm (situé entre 12 et 20 mm de l'apex). Dans le cadre de notre analyse, nous avons d'une part montré que le déficit hydrique appliqué induit une modification de l'expression du contig_10961, ce qui permet de valider les résultats obtenus par miccroarray. De plus, comme nous avons réalisé un découpage plus précis du fragment apical, nous avons mis en évidence les portions de la racine où l'expression du gène est modifiée en réponse au déficit hydrique. Il semble donc que le gène soit sous exprimé entre 2 et 10 mm (figure 72).

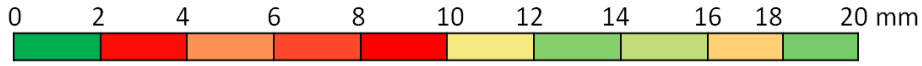


Figure 72. Evolution de l'expression du Contig_10961 le long de l'axe racinaire. L'analyse a été réalisée sur des fragments de 2 mm de long entre l'apex et les 20 mm apicaux. La variation de l'expression est indiquée par l'évolution de la gamme de couleur, ci-dessous.



L'extrémité proximale de cette zone de sous-expression coïncide avec le site d'initiation des racines latérales mis en évidence dans le chapitre 1, et également avec les sites d'interférence entre le déficit hydrique et l'initiation des RL. Il est donc possible que cette modification de l'expression du gène concerne les stades précoces de la formation des RL, mais cela reste une simple supposition.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

Une modification de l'architecture racinaire en réponse à un déficit hydrique peut être interprétée comme une adaptation de la croissance dans le but d'optimiser les fonctions essentielles du système racinaire. S'il est généralement admis que la croissance en profondeur des axes racinaires principaux est synonyme d'un accès à l'eau stockée dans les horizons profonds, les études de modélisation récentes indiquent qu'une architecture optimale en conditions de déficit hydrique ne peut se résumer à une croissance verticale et gravitropique des racines[155]. La disponibilité spatiale et temporelle de l'eau du sol, la dynamique temporelle des apports et des besoins de la plante, tout comme les propriétés hydrauliques du substrat et des différents organes de la plante sont autant de facteurs qui doivent être pris en compte. Il n'est donc pas surprenant qu'en fonction de l'environnement dans lequel elles ont évolué, les espèces aient acquis des stratégies différentes de réponse au déficit hydrique. Cette situation est vraisemblablement à la base des réponses contrastées qui peuvent être observées au niveau de la croissance et du développement des racines latérales. Comprendre les mécanismes développementaux qui soutendent ces réponses est une chose, les interpréter en termes fonctionnels en est une autre. Notre travail se limite aux mécanismes.

Ainsi, durant ces quatre années de thèse, le travail réalisé a été consacré à l'étude des mécanismes cellulaires de régulation des patrons de ramification racinaire chez l'orge, avec une approche souvent indirecte étant donné le peu d'outils génétiques disponibles chez cette espèce.

La première phase du projet a consisté à établir un modèle de développement décrivant les stades morphologiques successifs rencontrés depuis la première division asymétrique jusqu'à l'émergence de la nouvelle racine. Ce modèle révèle de nombreuses similitudes avec les données

disponibles chez le maïs (*Zea mays*) ainsi qu'avec le modèle établi pour la plante de référence Arabidopsis[39]. Il existe cependant des différences importantes entre les deux céréales, d'une part, et Arabidopsis de l'autre.

La première grande différence se situe au niveau de la position des sites d'initiation. Chez l'orge et le maïs, les primordia sont initiés face aux pôles de protophloème alors que chez Arabidospsis, l'initiation a lieu face au protoxylème.

Chez l'orge et le maïs, la formation du primordium implique non seulement le péricycle comme c'est le cas chez Arabidopsis, mais également l'assise de l'endoderme qui mène à la formation de la coiffe, de l'épiderme, du cortex et du péricycle de la RL[23].

Nous avons également montré que les cellules du cortex de la racine séminale situées face à un primordium de RL subissent des divisions transversales qui préparent vraisemblablement la réorganisation du cortex nécessaire au développement de la RL.

Au vu des similitudes entre l'orge et le maïs, on peut envisager que la formation des RL chez ces céréales suit un schéma similaire. Si tel est le cas, le modèle de la formation des RL établi lors de notre étude pourrait être un point de référence pour les autres céréales, voire d'autres monocotylées.

Partant de ce modèle, nous avons pu répondre aux différentes questions énoncées au début de la thèse :

1. Quelles sont les conditions qui provoquent l'inhibition de la formation des racines latérales ?

Cette inhibition de la formation des racines latérales chez l'orge et le maïs est obtenue spécifiquement en réponse à l'application d'un déficit hydrique transitoire obtenu par un arrêt de la brumisation de la solution nutritive (chapitre 2). Elle n'est pas liée au déficit en éléments minéraux qui pourrait résulter de l'arrêt de la brumisation de la solution nutritive. L'inhibition est vraisemblablement liée à l'accumulation d'ABA se produisant lors d'un déficit hydrique étant donné que la teneur en ABA augmente lors du traitement et qu'une inhibition semblable est obtenue par l'application d'une solution exogène d'ABA (chapitre 4)

La question de l'interaction entre le déficit hydrique et la phase du jour n'a pas été étudiée, mais l'observation que les traitements ABA diurnes et nocturnes génèrent des réponses similaires suggère que la réponse au déficit hydrique n'est pas conditionnée à la phase nocturne.

La capacité de copier la réponse au déficit hydrique par un traitement ABA offre de nouvelles possibilités pour analyser cette réponse. Elle permet (i) de travailler avec Arabidopsis, pour laquelle nous n'avons pas de système aéroponique permettant de reproduire le déficit hydrique et (ii) de nous affranchir de la contrainte de traitements nocturnes.

2. En se basant sur le programme de développement des racines latérales, à quels stades de la formation des racines latérales a lieu cette inhibition ?

En nous basant sur la description des stades de développement et leur position le long de l'axe séminal (chapitre 1), nous avons montré que l'inhibition de la formation des RL qui se produit en réponse au déficit hydrique (chapitre 2) et à l'application d'une solution exogène d'ABA (chapitre 4) résulte de l'arrêt du développement des primordia au moment de la première division asymétrique (stade II). Cette étape se produit dans la région apicale de la racine mère au niveau d'un fragment compris entre 10 et 20 mm de l'apex (chapitre 1). Il est possible que l'inhibition se produise avant cette division asymétrique et que les primordia observés au stade de la première division asymétrique, correspondent à des structures plus avancées au moment de l'application du traitement (chapitre 4).

Le positionnement plus précis de la zone dépourvue de racines latérales (chapitre 3) confirme que le site de l'interférence entre le déficit hydrique et la formation des RL se situe dans cette région et en fournit une estimation plus étroite (entre 8 et 14 mm de l'apex). Il semble donc que les primordia soient stoppés juste au moment de, ou juste avant la première division asymétrique. Ce résultat est appuyé par des observations chez Arabidopsis, où l'expression des marqueurs précoces de l'initiation, DR5::GUS, CYCB1;1::GUS et GATA23::GUS, est affectée par l'application d'ABA (chapitre 4).

La figure 73 résume les conclusions des différentes approches visant à délimiter la région dans laquelle le déficit hydrique interfère avec le développement des racines latérales. Les trois méthodes convergent vers les étapes précédant ou coïncidant avec les divisions formatrices. Nous ne pouvons dès lors exclure que les mécanismes ciblés soient ceux qui définissent les sites de formation potentiels et non ceux qui définissent le devenir de ces sites.

Il est intéressant de noter que la zone la plus étroite est celle qui est obtenue par analyse time-lapse et modélisation inverse. C'est par ailleurs la seule méthode qui fournit les limites proximale et distale de la zone.

Cette méthode originale pourrait d'ailleurs être utilisée pour l'analyse de l'effet d'autres traitements qui interfèrent avec les étapes précoces du développement des racines latérales ou de tout autre processus développemental qui se déroule de manière acropète.

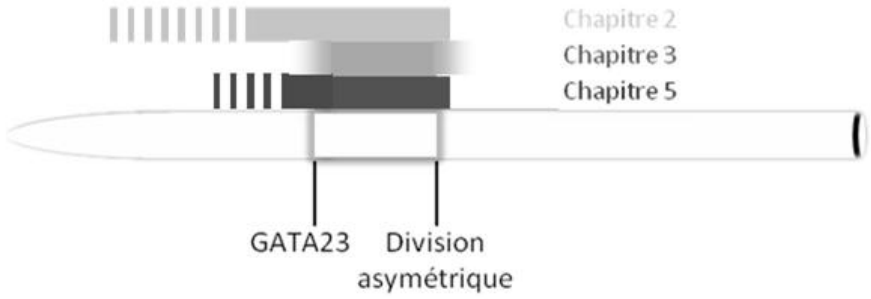


Figure 73. Synthèse des résultats obtenus par les différentes méthodes d'estimation de la position du site d'inhibition. L'observation des stades dans la zone inhibée (Chapitre 2) indique que ce site se situe en amont des premières divisions asymétriques. L'analyse time-lapse suggère une zone située entre 10 et 15 mm (Chapitre 3), dans laquelle on retrouve les premières divisions asymétriques (Chapitre 1). Les observations chez Arabidopsis montrent que la réponse précède les premières divisions asymétriques (chapitre 4). L'intersection de ces résultats est représentée en rouge.

3. La réponse au déficit hydrique implique-t-elle les hormones qui régulent les patrons de formation des racines latérales?

Nous avons montré d'une part, que l'apport d'auxine empêche le déficit hydrique de bloquer la formation des racines latérales et, d'autre part, que l'application d'une solution d'ABA produit la même réponse que le déficit

hydrique. Il semble donc que les voies de signalisation de ces deux hormones soient directement impliquées dans la réponse observée.

Nos résultats suggèrent que le déficit hydrique perturbe le transport basipète de l'auxine et limite la quantité d'auxine disponible au niveau des sites présumés d'initiation (Chapitre 4). Cette perturbation pourrait être induite par la présence accrue d'ABA durant le déficit hydrique (chapitre 4). La modification de l'équilibre des concentrations de ces deux hormones pourrait être le facteur responsable de l'inhibition des divisions formatrices (chapitre 2). En effet, il est probable que le modèle de la régulation de l'émergence des racines latérales établi par Deak et Malamy en 2005[97] soit transposable à l'initiation des primordia.

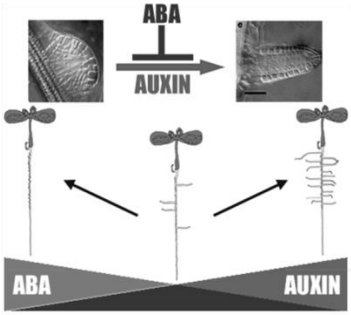


Figure 74. Modèle de la régulation de l'émergence des racines latérales proposé par Deak et Malamy[97]. Ce modèle postule que le nombre de primordia formé est fonction de l'équilibre entre un signal activateur induit par l'auxine et un signal inhibiteur induit par l'ABA. Ainsi, une perturbation de l'équilibre des concentrations de ces deux hormones modifient le nombre de racines latérales formées.

4. <u>Quel est le degré de conservation de ces mécanismes chez les deux céréales étudiées ?</u>

La formation des racines latérales chez l'orge (chapitre 1) suit un schéma très semblable à la description réalisée par Bell et *al*[25], ce qui laisse supposer que le processus de formation des racines latérales est relativement bien conservé au niveau des céréales.

Si l'on ajoute que les plantules d'orges et de maïs réagissent de la même manière au déficit hydrique (chapitre 2 et chapitre 3), il semble que l'on puisse construire un modèle similaire de l'inhibition de la formation des racines chez ces deux espèces.

Cette conclusion est importante car plusieurs ressources sont disponibles au niveau du maïs (notamment des lignées possédant un marqueur GFP sous le contrôle d'un promoteur DR5 inductible par l'auxine).

PERSPECTIVES

Bien que les mécanismes de régulation impliqués dans cette inhibition n'aient pas encore été élucidés, il semble que l'auxine et l'ABA jouent un rôle dans la réponse au déficit hydrique étudié dans notre travail. De nombreux points restent encore à éclaircir de ce côté.

LE DEFICIT HYDRIQUE INTERFERE-T-IL AVEC LE TRANSPORT BASIPETE DE L'AUXINE ?

Une de nos hypothèses invoque une perturbation du transport basipète de l'auxine entre l'apex et le site d'initiation sous l'effet de l'ABA. Pour vérifier cette hypothèse, différentes expériences sont envisageables :

Une première idée serait de mettre en évidence les sites où l'auxine s'accumule lors de l'application d'un déficit hydrique ou lors de l'application de l'ABA. Les lignées de maïs DR5::GFP seraient instrumentales à ce niveau. L'expression de la GFP permettrait de localiser par microscopie à fluorescence ou confocale les sites d'accumulation de l'auxine. Selon notre hypothèse, on devrait observer une accumulation au niveau de l'apex et pas au niveau du site d'initiation, alors qu'en condition contrôle l'auxine devrait s'accumuler au niveau des sites d'initiation. Cette hypothèse pourrait également être testée chez Arabidopsis à l'aide du traitement ABA.

Une seconde idée serait de tester si une inhibition du transport de l'auxine induit bien chez l'orge et le maïs une inhibition de l'initiation des racines latérales, par exemple en appliquant un inhibiteur spécifique du transport de l'auxine tel que l'acide N-naphthylphthalamique (NPA) ou l'acide 2,3,5-triiodobenzoique (TIBA)[156]. L'application de cet inhibiteur à une lignée DR5::GFP permettrait de voir où l'auxine s'accumule suite à ce traitement et donc de mettre en évidence les lieux où le transport est bloqué.

1. L'ABA induit-il l'inhibition de la formation des racines latérales ?

Nous avons montré que la concentration endogène en ABA au niveau des racines augmente suite au déficit hydrique et qu'il est possible de mimer la réponse des plantes au déficit hydrique par application d'une solution exogène d'ABA. Ceci suggère que l'ABA intervient directement dans la régulation de l'inhibition de l'initiation en réponse au déficit hydrique. Deux expériences peuvent être envisagées pour tester cette hypothèse.

La première consisterait à appliquer une période de déficit hydrique à des plantules de maïs et/ou d'orge déficientes pour la synthèse ou la perception de l'ABA. Il existe pour cela des lignées de maïs chez lesquelles l'expression du gène *NCED/VP14* est modifiée. Ce gène code pour une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'ABA, mise en évidence chez le mutant *VP14*[157].La modification de l'expression de ce gène affecte la biosynthèse de l'ABA[151].

Une seconde voie à explorer serait de traiter les plantules d'orge et de maïs avec une solution exogène de fluridone. Le fluridone étant un inhibiteur de la biosynthèse de l'ABA, la zone inhibée ne devrait pas se former en conditions de déficit hydrique et en présence de fluridone[158].

2. L'inhibition de l'initiation de la formation des racines latérales est-elle bien la conséquence d'une inhibition de la division asymétrique ?

L'utilisation de marqueurs moléculaires chez Arabidopsis nous a permis de préciser les stades altérés par l'application du déficit hydrique et du traitement ABA. Il serait envisageable d'analyser l'expression de ces marqueurs (CYCB1;1, et GATA23) chez l'orge via la technique de l'hybridation *in situ*, pour autant que l'on dispose de séquences orthologues chez l'orge.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

CHAPITRE 7. MATÉRIELS ET MÉTHODES

CONDITIONS DE CULTURE DES PLANTES

GERMINATION ET MISE EN CULTURE DES SEMENCES D'ORGE

Des semences d'*Hordeum vulgare* de la variété derkado sont désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium à 0,5% pendant 15 minutes, puis rincées trois fois à l'eau déminéralisée avant d'être déposées sur une feuille de papier filtre (Wattman) recouvrant une plaque de verre. Les semences sont fixées sur la feuille par une goutte d'agarose à 2% (poids/volume). Les plaques de verre sont placées verticalement dans des bacs en plastique noir (Alibert) contenant de l'eau déminéralisée de manière telle que le bord inférieur du papier filtre soit en contact avec la nappe d'eau. De cette manière, les graines peuvent s'imbiber d'eau sans être noyées. La germination est réalisée en phytotron (Conviron) pendant 72 heures à l'obscurité, avec une température constante de 18°C et une humidité relative de 75%. Une fois que les coléoptiles sont apparus, on réalise l'excision des racines séminales afin de ne conserver qu'une racine séminale (généralement la plus longue).

Chaque plantule est alors placée dans un manchon de polyuréthane et fixée à la partie supérieure d'un bac de culture aéroponique[159] contenant 5 litres de solution nutritive Hewitt (half strenght) pour 70 plantes, à pH 5.8[160] (annexe 1). La solution nutritive est brumisée au rythme de 15 secondes toutes les 5 minutes. Les expériences sont réalisées dans une chambre de croissance (Conviron) sous un régime 18°C/16°C, une photopériode 16h/8h, une humidité relative de 70% et une intensité lumineuse au niveau des feuilles de 350 µmoles.m^{-2}.s^{-1}.

GERMINATION ET MISE EN CULTURE DES SEMENCES DE MAÏS

Les semences de maïs (B73) sont désinfectées par immersion dans de l'hypochlorite de sodium à 0,5% (v/v) pendant 15 minutes puis rincées 3 fois à l'eau déminéralisée. Les graines de maïs sont ensuite déposées sur

une feuille de papier filtre puis enroulées autour d'un tube de plastique (diamètre: 32mm) selon la méthode dite du *Paper-roll* [161].

La germination est réalisée en phytotron (Conviron) pendant quatre jours, à l'obscurité, à température constante de 22°C, et une humidité relative de 75%. Une fois que les coléoptiles sont apparus, on réalise l'excision des racines séminales afin de ne conserver que la racine primaire[162]. Les plantules sont mises en culture dans des bacs aéroponiques contenant une solution nutritive de Hoagland[163] (KNO_3 2 M; $Ca(NO_3)^2$, $7H_2O$ 2M ; $MgSO_4$, $7H_2O$ 2M ; NH_4NO^3 1M ; KH_2PO_4 1M ; MnCl2, $4H_2O$ (1,81 g/L); $CuSO_4$ (9,051 g/L); $ZnSO_4$,$7H_20$ (0,22 g/L); H_3Mo_4 (0,09 g/L)), à pH 5.

Les expériences sont réalisées dans une chambre de croissance (Conviron) sous un régime 22°C/20°C, une photopériode 16h/8h, une humidité relative de 70% et une intensité lumineuse de 350 µmoles.m^{-2}.s^{-1}.

APPLICATION DU DÉFICIT HYDRIQUE

Les plantules d'orge et de maïs sont soumises au cours de l'expérience à une période de déficit hydrique transitoire, obtenu par un arrêt transitoire de 8 heures de la brumisation de la solution nutritive. L'arrêt de la brumisation coïncide avec la période nocturne, c'est-à-dire entre 9h et 17h. Après application du traitement, les plantes sont maintenues en brumisation continue pendant 7 jours, délai nécessaire à l'émergence des RL formées avant, après et (éventuellement) durant le traitement.

DÉTERMINATION DE LA VITESSE DE CROISSANCE DES AXES RACINAIRES : MÉTHODE DU TIME-LAPSE

Des images des systèmes racinaires des plantes âgées de trois à sept jours après germination sont réalisées en utilisant un appareil photo Canon 450D. Le suivi de la croissance de ces racines est réalisé pendant cinq jours consécutifs, les images étant obtenues tous les jours à la même heure. En fin d'expérience, lorsque les RL sont formées, on utilise, pour la prise d'image, un scanner par transparence avec une résolution de 600 dpi. Lors de la prise d'image, les racines sont étalées sur un film d'eau déminéralisée (+/- 2 mm) et recouvertes d'une feuille de plastique transparente assurant la planéité de la surface de l'eau.

Les images ainsi obtenues sont analysées à l'aide du programme SmartRoot[164]. Ce programme permet d'annoter les axes racinaires et de déterminer les longueurs des racines principales. Ainsi pour chacune des racines analysées, la position de l'apex associée à un jour et à une heure est exportée dans une table de donnée Excel. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel SAS pour déterminer les vitesses de croissance des différentes racines analysées et calculer la vitesse de croissance moyenne au différents temps. L'analyse statistique a également été réalisée avec le logiciel SAS.

POSITIONNEMENT DE LA ZONE INHIBÉE PAR RAPPORT À LA BASE DE LA RACINE

Détermination des vitesses de croissance et de la position de l'apex au différents temps (avant et après) la période de déficit hydrique.

Afin de connaître la position de l'apex lors de l'application du traitement des images des systèmes racinaires des plantes ont été réalisées au moment de l'arrêt de la brumisation (temps 0 h) et à la fin du traitement (temps 8 h) à l'aide d'un appareil photo de type Canon 450D. Puis, sept jours après le traitement, une fois que les RL sont apparues, une image du système racinaire finale est acquise à l'aide d'un scanner par transparence avec une résolution de 600 dpi.

Les images ainsi obtenues sont analysées à l'aide du programme SmartRoot[164] pour déterminer la longueur de la racine au temps 0h et au temps 8 h, ce qui nous permet de localiser, sur l'image finale du système racinaire, la position de l'apex au début et à la fin de la période de déficit hydrique. De plus, il est possible de positionner sur cette image la limite proximale et distale de la zone dépourvue de RL.

Les distances sont déterminées par rapport à la base de la racine, seul point commun et fixe reliant les différentes images. Les données ainsi obtenues (position de l'apex, début et fin de la zone inhibée) sont ensuite exportées dans une feuille de calcul Excel.

Le calcul de la différence entre la position de l'apex au temps 0 et le début de la zone inhibée permet de calculer le décalage existant entre la position

de la zone inhibée et l'apex au moment de l'application du déficit hydrique. Le même calcul peut être réalisé à partir de la position de l'apex au temps 8h et la fin de la zone inhibée. L'analyse a été réalisée sur 21 racines d'orges et 12 racines de maïs.

Détermination de la distance séparant l'apex de la limite proximale et distale de la zone dépourvue de RL par modélisation inverse

Calcul des écarts d1 et d2 en une distance exprimée en mm :

Cette technique a été utilisée afin de positionner de manière plus objective, la zone dépourvue de RL. Pour ce faire, un modèle se basant sur la vitesse de croissance racinaire, la position de l'apex au début et à la fin du traitement, et la position des RL le long de l'axe racinaire a été considérée (figure 75).

La première étape a consisté à déterminer la fréquence des RL le long de l'axe racinaire en se basant sur la méthode des moyennes mobiles. Pour ce faire, une fenêtre de largeur fixe est déplacée le long de l'axe racinaire selon «un pas» de distance prédéfini et une fréquence locale de ramification est estimée en ramenant le nombre de ramifications dans la fenêtre à la taille de celle-ci. Cette méthode permet de représenter de manière continue la densité de ramification le long de la racine et assure un lissage de la courbe (figure 75 a et b).

Les écarts d1 et d2 entre l'apex et, respectivement la limite proximale et distale de la zone inhibée (figure 75 c et d) sont ensuite déterminés par modélisation inverse. Dans le premier modèle, ces écarts sont exprimés en termes de distance (d1 et d2).

La modélisation inverse procède en testant, racine par racine, une série de scénarios d'écarts réalistes, dont on retient celui qui paraît le plus probable sur base d'un critère statistique. Pour chaque scénario (un couple de valeurs d1 et d2), on calcule les positions de début et de fin de zone au départ de la position (connue) de l'apex en début et fin de stress. On répartit alors les données de fréquences en trois groupes correspondant aux trois zones présentes dans les données (la zone inhibée et ses deux zones voisines). Le jeu de données obtenu est soumis à une analyse de la variance de la fréquence de ramification en fonction de la zone (ANOVA1)

dont on retient la variance résiduelle (CMR). Plus faible est cette valeur, meilleur est l'ajustement du modèle d'ANOVA aux données et donc plus cohérente est le scénario testé. Le scénario auquel correspond le CMR le plus faible est alors retenu, ainsi que les limites correspondantes de la zone inhibée (figure 75 e).

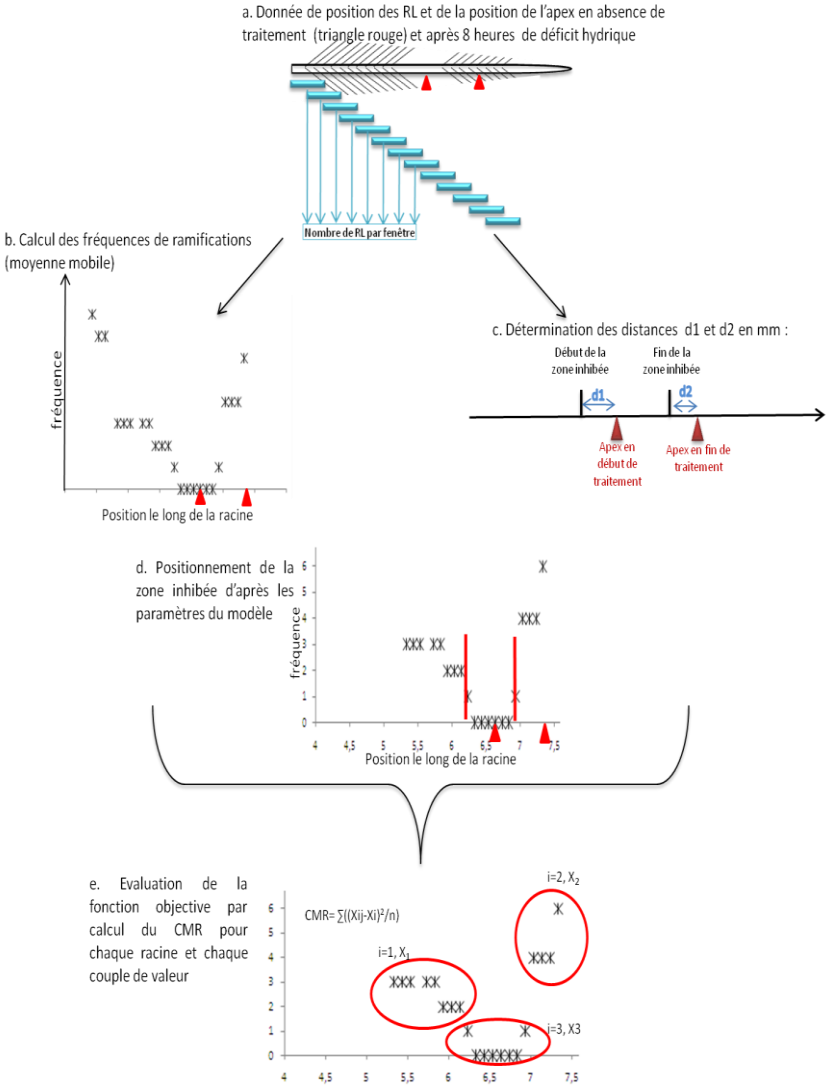


Figure 75. Schéma représentant le déroulement des différentes étapes de l'évaluation des modèles mathématiques.

Calcul des écarts d1 et d2 sur une échelle temporelle :

En divisant les écarts d1 et d2 par les vitesses de croissance durant l'intervalle de temps précédent respectivement le début et la fin du traitement on obtient une formulation des écarts (t1 et t2) sur une échelle temporelle :

$$t1=d1/v1 \text{ et } t2=d2/v2$$

ANALYSE CINÉMATIQUE DE LA CROISSANCE

L'analyse cinématique consiste en un suivie du déplacement des irrégularités présentent à la surface de la racine. Ces irrégularités peuvent être observées directement avec une caméra à haute résolution sous des conditions particulières de luminosité.

Nous avons mis en place une méthode permettant de suivre la croissance des racines séminales d'orge, afin de localiser de manière plus précise la fin de la zone d'élongation. Le dispositif expérimental (figure 76) conçu, afin de prendre les images de la racine à des pas de temps réguliers tout en assurant son hydratation comprend un support pour la racine, une pompe faisant circuler de l'eau déminéralisée, une caméra infrarouge commandée par un ordinateur et enfin des diodes infrarouges pour éclairer l'apex de la racine.

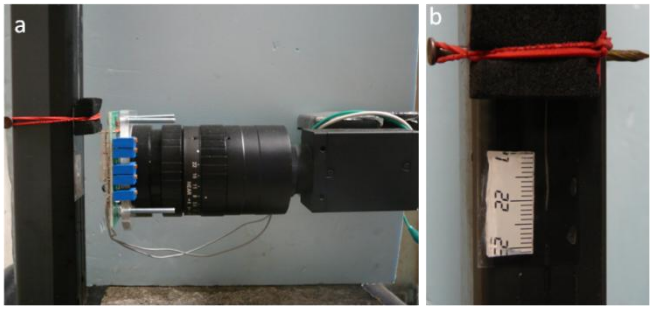


Figure 76. Photos du dispositif vu de profil (a) et de face (b), comprenant la caméra ainsi que le support.

ACQUISITION DES SÉQUENCES D'IMAGES

Les images des apex de racines âgées de quatre à six jours après germination sont réalisées sous un éclairage NIR (λ = 890 nm) avec une

caméra CCD (Point Grey, modèle GRAS-20S4M 2.0MP 1/1.8", CCD, 30 FPS, B/W, 1600x1200 pixels) équipé d'un objectif haute résolution de focale 25 mm (Fujinon HF25SA-1) et d'un filtre (BP880 Vision Light Tech) ne laissant passer que le rayonnement NIR.

L'éclairage NIR est assuré par deux rangées de cinq diodes émettrices (Vishay TSFF5210, 250mW pour les quatre diodes inférieures et Vishay TSHF5210, 180mW pour les six diodes supérieures) situées de part et d'autre de l'objectif de la caméra à hauteur de sa face avant.

Ces diodes émettent un rayonnement IR d'une longueur d'onde proche de 870-890 nm. L'intensité de chaque diode est réglée par un potentiomètre de manière à assurer une intensité lumineuse plus forte sur la zone de division de la racine, cette dernière réfléchissant moins le rayonnement lumineux que le reste de la racine. Un papier calque placé sur les huit diodes supérieures diffuse la lumière émise et d'éviter la formation de points chauds liés à la réflexion d'un rayonnement direct trop intense (figure 77)

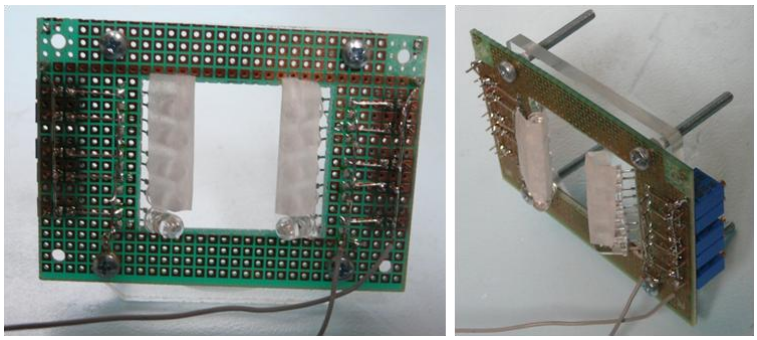


Figure 77. Système d'éclairage de la racine vu de face et de biais. Sur l'image de gauche, on distingue les dix diodes au centre, dont les huit supérieures sont recouvertes d'un papier calque. Sur l'image de droite, on voit que les diodes forment un angle d'environ 45 degrés avec la plaque.

La plantule est fixée sur un support en PVC (30 cm de long) de section carrée (3 cm x 3 cm) à l'aide d'un élastique situé au niveau de la graine. La racine est maintenue dans une chambre formée par rainure longitudinale dans le support en PVC recouverte par une lamelle de verre. Cette chambre

racinaire permet ainsi à la racine de s'allonger sans contrainte à une distance constante de la caméra durant la prise d'images (figure 76 b).

L'hydratation est réalisée par un apport constant et régulier d'eau déminéralisée au sommet de cette « chambre racinaire » par deux orifices réalisés dans le profil PVC.

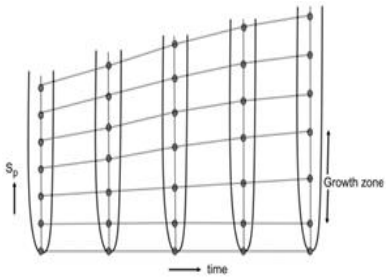
ANALYSE DES SÉQUENCES D'IMAGES

L'analyse des séquences d'images obtenues consiste à caractériser la trajectoire de ces irrégularités au cours du temps. La mesure de la distance séparant leur position et l'apex au cours du temps permet d'établir le profil de vélocité ou profil de déplacement des particules au cours du temps. La dérivée de cette vélocité (dv/dx), permet d'obtenir le taux de croissance relatif local (REGR), qui correspond à l'élongation instantanée d'un petit segment de racine (dx). La détermination de ces grandeurs est à la base de l'analyse cinématique de la croissance.

Les images obtenues ont été analysées selon la méthode « *structure tensor* » [128] permettant de déterminer le profil de vélocité et le *relative growth rate*.

Principe de la détermination de la vélocité

La vélocité peut être définie comme la vitesse de déplacement d'un point x sur l'axe racinaire. Le profil de velocité (figure 78) est une fonction qui représente graphiquement l'évolution de cette vitesse le long de l'axe racinaire. Cette mesure est obtenue en mesurant la distance entre la position d'une marque (x) et l'apex, au cours du temps[4,127]. La vitesse de déplacement d'une marque (x), le long de l'axe racinaire sera différente en fonction de la zone où l'on se trouve. Ainsi, lorsque les cellules se divisent, la distance séparant la marque de l'apex reste relativement constante, et plus on avance dans la zone d'élongation, plus la distance augmente pour atteindre une vitesse constante en fin de zone d'élongation.



$$V=(x_2-x_1)/(t_1-t_2)$$

Figure 78. Evolution de la distance séparant des marques à la surface de la racine dont on tire le profil de vélocité. D'après Basu et *al*[4].

Principe de la détermination du taux de croissance relatif local.

Le taux de croissance relatif local décrit la contribution de chaque zone de la région apicale à la croissance de la racine. D'un point de vue mathématique, cette valeur est représentée comme la dérivée de la vélocité (REGR= $\delta v/\delta t)*100$).

Elle peut aussi être obtenue en suivant le déplacement de deux particules le long de l'axe racinaire et en déterminant la vitesse à laquelle ces deux marques s'éloignent l'une de l'autre (figure 79).

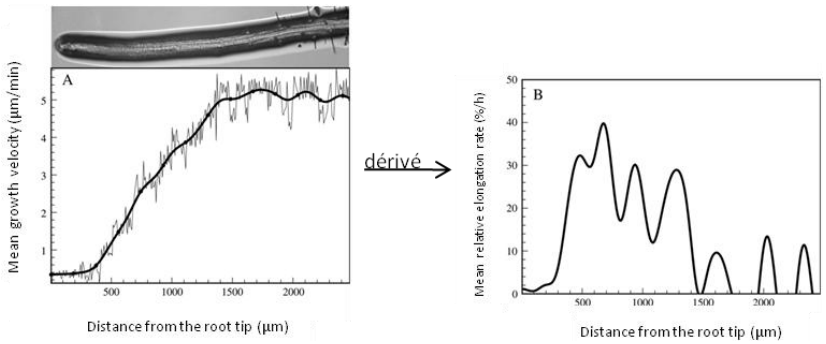


Figure 79. a. profil de vélocité ou vitesse de déplacement d'une marque le long de l'axe racinaire au cours du temps. b. Profil du taux de croissance relatif en fonction de la distance par rapport à l'apex[4].

APPLICATION EXOGÈNE DE LA SOLUTION D'AUXINE

L'application exogène d'une solution d'auxine consiste à augmenter la concentration en auxine dans les tissus racinaire en amont ou en aval de l'application d'une période de déficit hydrique. Deux expériences ont donc été réalisées.

Dans la première expérience, les plantules d'orge âgées de 4 jours après germination sont placées pendant 1 heure dans un bac de culture aéroponique contenant une solution d'auxine sous forme d'acide 3-indolbutyrique (>99%, Fluka) (10^{-3}, 10^{-4},10^{-5} ou 10^{-6} M). La solution d'IBA est préparée dans de l'eau déminéralisée afin d'éviter le phénomène de floculation observée lors de l'utilisation de la solution nutritive Hewitt[160]. Elles sont ensuite transférées sans rinçage dans un bac de culture aéroponique où elles subissent deux épisodes de déficit hydrique transitoire pendant 8 heures (phase nocturne) entrecoupés de périodes de brumisation de solution nutritive (sans auxine) de 16 heures.

Dans la seconde expérience, les plantules d'orge âgées de 4 jours après germination subissent un premier épisode de déficit hydrique de 8 heures avant d'être placées pendant 16 heures dans un bac hydroponique contenant la solution d'IBA (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} ou 10^{-6} M). Après traitement, les plantes sont transférées dans le bac de culture aéroponique pour y subir un second cycle de déficit hydrique de 8 heures.

Dans les deux cas, des images des systèmes racinaires des plantes ont été réalisées au moment de l'arrêt de la brumisation (temps 0 h) et à la fin du traitement (temps 8 h), puis, sept jours après le traitement, une fois que les RL sont apparues, une image du système racinaire finale est acquise à l'aide d'un scanner par transparence avec une résolution de 600 dpi.

Les images ainsi obtenues sont analysées à l'aide du programme SmartRoot[164].

ANALYSE DE L'EFFET DE L'ABA

APPLICATION D'UNE SOLUTION EXOGÈNE D'ACIDE ABSCISSIQUE SUR DES RACINES D'ORGE

Les plantules d'orge âgées de 6 jours après germination sont traitées en aéroponique par brumisation d'une solution nutritive Hewitt half strenght contenant 10 ou 50 µM d'ABA ((+/-)-2-cis-4-trans-Abscisic acid, 99%, Alpha Cesar) pendant huit heures. Le traitement est appliqué soit durant la période nocturne soit durant le jour. Les plantules sont ensuite rincées par immersion dans trois bains successifs de solution nutritive, puis replacées

en culture aéroponique sans ABA, et laissées en culture pendant 7 jours supplémentaires jusqu'à l'émergence des racines latérales.

Conditions de croissance et application de l'acide abscissique sur des plantules d'Arabidopsis

Les expériences utilisant la plante modèle Arabidopsis ont été réalisées par Maria Njo (groupe du Prof. T. Beeckman, UGent).

Les lignées transgéniques CYCB1;1::GUS[153], DR5 ::GUS[138] et GATA23::GUS[71] ont été utilisées pour ces expériences. Les graines sont mises en germination pendant 48 heures sur un milieu ½MS (Murashige and Skoog) contenant 10 µM de NPA (acide naphtylphtalamique). Les plantules sont ensuite transférées pendant 24 heures sur un milieu ½MS contenant 10 µM de NPA additionné de 5 ou 50 µM d'acide abscissique (prétraitement). Les plantules sont ensuite transférées sur un milieu ½MS contenant 10 µM de NAA (acide 1-naphtalène-acétique) et 5 ou 50 µM d'ABA pendant 8 heures. L'expression des différents marqueurs (CYCB1;1, DR5 et GATA23) est mise en évidence par révélation histochimique de la β-glucoronidase, et observé en microscopie optique.

La culture des plantes est réalisée à 21°C, sous 40% d'humidité relative et sous lumière continue.

Dosage de l'ABA dans les échantillons racinaires des plantules d'orge

Le dosage de l'ABA dans les échantillons racinaires a été réalisé par le laboratoire du Prof. I. Dodd (Unisersity of Lancaster).

Des échantillons racinaires provenant de trois traitements différents, réalisés le même jour, ont été analysés (figure 80)

- Echantillons racinaires contrôles
- Echantillons racinaires ayant subi un déficit hydrique de 2 heures, 4 heures ou 8 heures
- Echantillons racinaires ayant subi une application d'ABA à 50 µM.

Pour chacun des traitements, deux types d'échantillons ont été récoltés :

- Racine entière (séminale et latérale)

- Partie apicale de la racine séminale (2 cm, 5 cm, 10 cm).

Une fois récoltés, les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide puis cryo-lyophilisés, pesés et envoyés pour analyse. Le dosage est réalisé par immuno-localisation via un test ELISA.

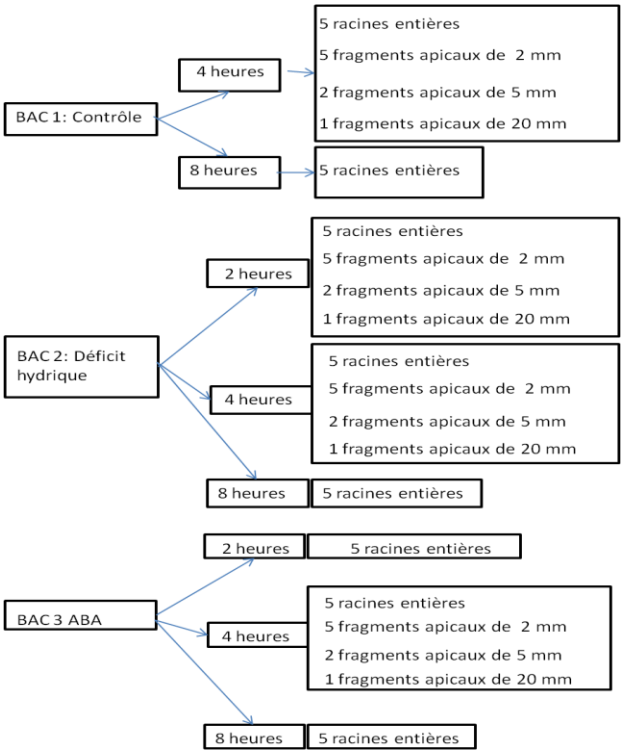


Figure 80. Schéma de l'échantillonnage utilisé pour le dosage de la quantité d'ABA dans les différents échantillons.

ANALYSE HISTOLOGIE

L'analyse a été réalisée sur 15 racines récoltées huit jours après germination et dont la longueur atteint approximativement 15 cm. Après fixation dans une solution de FAA (5 % de formaldéhyde à 37%, 5 % d'acide acétique, 45 % d'éthanol 96%, 45 % eau déminéralisée) pendant 24 heures à température ambiante, des fragments racinaires de 10 mm de long sont coupés (en repérant chaque extrémité apicale), puis progressivement

déshydratés par passage successif dans des bains d'éthanol (70%, 80%, 96%, 96%), 1 heure dans chaque bain.

Les fragments racinaires sont ensuite pré-enrobés dans un mélange contenant 50 % de résine de méthacrylate glycol (Technovit® 7100, Kluzer), et 50% d'éthanol à 96%, pendant 2 heures à température ambiante, puis ce mélange est remplacé par la solution d'imprégnation (résine méthacrylate glycol) et les échantillons sont laissés une nuit à 4 °C. Les fragments racinaires sont ensuite déposés dans le fonds des moules en faisant attention à bien les orienter, c'est-à-dire l'extrémité apicale du fragment vers la pointe du moule, et en vérifiant que ces derniers soient bien à plat.

Des coupes longitudinales et radiales de 5 à 8 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome Leitz 1512 (couteau histoknife H® (Kulzner)). Après coloration au bleu de toluidine (0.5 % dans un tampon phosphate à pH 7), les coupes sont observées en microscopie optique (Leitz® SM lux équipé d'une camera de type Leica DFC 320).

TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS RACINAIRE

Pour chaque traitement (déficit hydrique et témoins), les parties apicales (20 mm de long) de dix plantules d'orges âgées de six jours après germination sont récoltées à 0h, 2h, 4h et 8h après le début de la phase nocturne. Ces échantillons sont placés dans des tubes Eppendorfs stériles, immédiatement congelés par immersion dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C jusqu'au moment de l'extraction d'ARN.

Au moment de l'extraction, chaque fragment racinaire de 20 mm de long est découpé en 10 segments de 2 mm. Un échantillon unique est alors constitué pour chaque position (0-2, 2-4, 4-6,… 18-20), temps (0, 2, 4, 8 heures) et traitement (déficit hydrique et témoins) en groupant les segments correspondants des 10 racines.

Ces manipulations ont été réalisées 3 fois de manière indépendante pour les temps 0 et 2 heures et 2 fois pour les temps 4 et 8 heures.

EXTRACTION DE L'ARN TOTAL ET SYNTHÈSE DU CDNA

L'extraction de l'ARN total est réalisée en utilisant le kit d'extraction FastRNA® Pro Green de chez MP bio selon les recommandations du fournisseur. Chaque échantillon est placé dans un tube contenant des microbilles et 1 ml de solution de broyage et placé dans le « Fast-prep » (MP bio) pendant 45 secondes à vitesse 6. Chaque tube subit deux cycles de broyage de 45 secondes séparés par une immersion dans de la glace pendant 5 min. Une centrifugation de 5 min à 12000g permet de récupérer le surnageant qui est alors transféré dans un tube Eppendorf stérile. La suite de l'extraction été réalisée en suivant les étapes décrites dans le manuel d'utilisation.

La pureté et la quantité d'ARN extrait sont ensuite analysées par un dosage spectrophotométrie de 1 µL d'extrait (Nanodrop nd 1000). L'ARN total ainsi extrait est dissous dans 25 µL d'eau DEPC puis stocké à -80°C.

La synthèse de l'ADNc est réalisée à partir de 1 ng d'extrait d'ARN total mélangé à 1µl d'oligonucléotide triphosphate (oligodT 12-18 , (Invitrogen) et 1 µl d'un mix de DNTP à 10 mM dans un volume de 13 µL. Ce mélange est incubé pendant 5 min à 65°C puis placé 1 min à 4 °C dans de la glace. 7 µL d'un mélange contenant 0.1 M de DTT, 40 unité d'un inhibiteur des Rnase (RnaseOut recombinant Rnase inhibitor, Invitrogen) et 200 unités de Superscript III reverse transcriptase (invitrogen) sont ensuite ajoutés dans le tube qui est incubé à 52°C pendant 60 minutes et 15 min à 70°C (superscript III first strand cDNA (Invitrogen)). Les produits d'amplification sont alors conservés à -80°C.

AMPLIFICATION DES GÈNES PAR QPCR

Choix des couples d'amorces.

Une étape préalable de mise au point de la réaction PCR a été réalisée avant de mettre en œuvre les réactions d'amplifications proprement dites. Cette mise au point consiste à déterminer pour chaque gène étudié, le couple d'amorces permettant d'obtenir une amplification efficace et similaire pour les différents gènes étudiés (nécessaire pour l'analyse des résultats).

Pour ce faire, une courbe standard a été réalisée pour chaque couple d'amorces, reprenant en abscisse le log de la dilution de l'ADNc (dilution en série au 1/10) et en ordonnée la valeur du Ct obtenu pour chaque dilution lors de l'amplification.

Les couples d'amorces ont été créés en utilisant le logiciel Primer 3, et testés avec le logiciel Amplify 3X. Les séquences cibles utilisées pour la création des couples d'amorces sont des séquences d'EST de l'orge. L'ADNc utilisé pour cette mise au point a été extrait d'un fragment racinaire apical de 20 mm de long issu de racine cultivée en absence de déficit hydrique.

Le choix des couples d'amorces utilisé pour l'étude de l'expression des gènes est fonction d'une part de l'absence de formation de dimère entre les deux amorces et d'autre part de la reproductibilité et l'efficience de la réaction d'amplification. Seuls les couples d'amorces présentant une pente de -3,3±0,1 ont été retenus.

Réaction d'amplification par qPCR

L'amplification des séquences d'intérêt par PCR en temps réel est réalisée à partir de 1 µL de ADNc dilué 1:2 et mélangé à 20 µl de milieu réactionnel contenant 200 nM de chaque couple d'amorce spécifique du gène à amplifier (tableau 10).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur IcyclerIQ (Biorad). Un contrôle négatif constitué du mélange réactionnel dépourvu de l'ADNc est réalisé pour contrôler l'absence de contamination par de l'ADN génomique et également la présence de dimère d'amorce.

Le programme utilisé pour la réaction PCR est formé d'une étape d'activation de la polymérase à 95°C pendant 15 min, puis de 40 cycles décomposés en trois étapes, 15 s à 95°C, 30 s à 60°C et 30 s à 72°C, la mesure de la fluorescence est réalisée lors de la phase d'hybridation à 60°C. La spécificité des amorces a été vérifiée par analyse d'une courbe de fusion réalisée de suite après les 40 cycles d'amplification (55°C à 95°C avec une augmentation de la température de 0,5°C toutes les 10 secondes). La fluorescence étant mesurée à chaque élévation de la température.

Tableau 10. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par qPCR

Nom	*Séquence du primer*	*Tm (°C)*
b-Zip-f	GAT-GAA-CTT-GGG-GCA-GAG-AG	62
b-Zip-r	TGT-TTA-GCA-CGG-TTG-GTG-TC	60
Ef1α-1-f	ATG-GTT-GTG-GAG-ACC-TTT-GC	60
Ef1α-1-r	CAT-GTC-ACG-GAC-AGC-AAA- AC	60
ALF4 forward	GCA-ATC-GGA-ACT-CGA-GAA-AG	60
ALF4 Reverse	TGC-AGC-GGT-GAA-GTA-CTA-GC	60

Analyse statistique de l'expression du gène ALF4

Pour chaque échantillon, nous avons dans un premier temps normalisé les résultats obtenus sur base de l'expression du gène de référence EF1-α (H.*vulgare* mRNA, elongation factor 1-alpha (ef1), gi : Z50789, (Ef1α-1-forward : ATG-GTT-GTG-GAG-ACC-TTT-GC, Ef1α-1-reverse : CAT-GTC-ACG-GAC-AGC-AAA- AC) dont la stabilité de l'expression a été analysée dans les différents traitements analysés (figure 81)

Normalisation de l'expression du gène :

(1) [Expression normalisée] = [Expression *ALF4*] – [Expression EF1α]

Pour chaque temps, nous avons déterminé l'effet du déficit hydrique sur l'expression du gène ALF4 :

(2) [Réponse ALF4] = [Expression normalisée échantillons traité] – [Expression normalisée échantillons témoin].

Les comparaisons d'expression ont été réalisées par la méthode des contrastes (SAS) sur les valeurs normalisées.

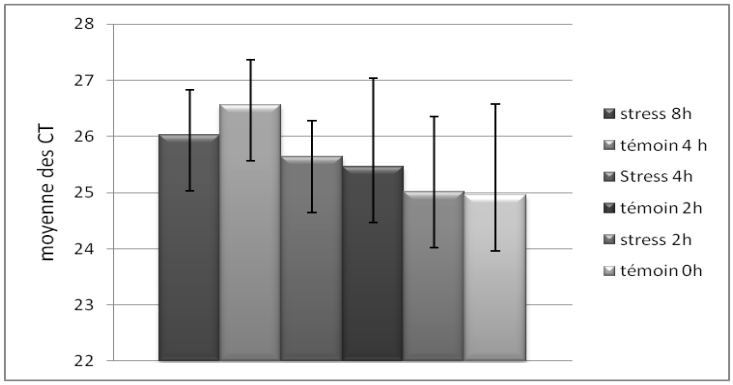


Figure 81. Expression moyenne du gène EF1-α dans les différents traitements appliqués. Pour les traitements témoin 0 h, 2 h et stress 2 h, l'analyse a été réalisée sur 40 valeurs de CT provenant de 3 qPCR différentes, pour ce qui est des autres traitements, l'analyse a été réalisée sur 20 valeurs de CT obtenue lors de 2 qPCR différentes.

Analyse statistique de l'expression du contig_10961

L'expression du contig_10961 est analysée selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$[165]. Une analyse de la variance à été réalisée pour calculer le degré de signification des différences d'expression entre les échantillons ayant subi un déficit hydrique et les contrôles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 Peret, B., Larrieu, A. & Bennett, M. J. Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3637-3643 (2009).

2 Petrasek, J. & Friml, J. Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**, 2675-2688 (2009).

3 Lloret, P. G. & Casero, P. J. in *Plant Roots: the hidden half* Vol. 3rd edition (ed Eshel A Waisel. Y, Kafkafi U) 127-156 (Marcel Dekker, 2002).

4 Basu, P., Pal, A., Lynch, J. P. & Brown, K. M. A Novel Image-Analysis Technique for Kinematic Study of Growth and Curvature. *Plant Physiol.* **145**, 305-316 (2007).

5 Gandar., P. W. Growth in root apices. I The kinematic description of growth. *Botanical Gazette* **144**, 1-10 (1983).

6 De Smet, I. *et al.* Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* **134**, 681-690 (2007).

7 Kramer, E. M. & Bennett, M. J. Auxin transport: a field in flux. *Trends in Plant Science* **11**, 382-386 (2006).

8 Beeckman, T., Burssens, S. & Inze, D. The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 403-411 (2001).

9 Grunewald, W., Parizot, B., Inzé, D., Gheysen, G. & Beeckman, T. Developmental biology of roots: one common pathway for all Angiosperms? *International journal of plant developmental biology* **1**, 212-225 (2007).

10 Krouk, G. *et al.* Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* **18**, 927-937 (2010).

11 Hodge, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**, 9-24 (2003).

12 Robinson, D. Compensatory changes in the partitioning of dry matter in relation to nitrogen uptake and optimal variations in growth. *Annals of Botany* **58**, 841-848 (1986).

13 Malamy, J. E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell and Environment* **28**, 67-77 (2005).

14 López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. & Herrera-Estrella, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 280-287 (2003).

15 Forde, B. & Lorenzo, H. The nutritional control of root development. *Plant and Soil* **232**, 51-68 (2001).

16 Lynch, J. Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* **109** (1995).

17 McCully, M. C., M. Pathways and processes of water and nutrient movement in roots. *Plant and Soil* **111**, 159-170 (1988).

18 Varney G, C. M. Rates of water uptake into the mature root system of maize plants. *New Phytologist* **123**, 775-786 (1993).

19 Wang, X. L., Canny, M. J. & McCully, M. E. The water status of the roots of soil-grown maize in relation to the maturity of their xylem. *Physiologia Plantarum* **82**, 157-162 (1991).

20 de Dorlodot, S. *Root system architecture: a genetic analysis in rice.* , UCL, (2006).

21 Hochholdinger, F., Park, W. J., Sauer, M. & Woll, K. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends in Plant Science* **9**, 42-48 (2004).

22 Mallory T.E, Chiang S, Cutter E.G & E.M., G. Sequence and pattern of lateral root formation in five selected species. *American Journal Botany* **57**, 800-809 (1970).

23 Casero, P. J., Casimiro, I. & Lloret, P. G. Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant species: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota. Protoplasma* **188**, 49-58 (1995).

24 Charlton, W. A. in *Plants Roots : the hidden half-Second eddition* (ed Eshel A Waisel. Y, Kafkafi U) (Marcel Dekker, 1996).

25 Bell, J. K. & McCully, M. E. A histological study of lateral root initiation and development in Zea mays. *Protoplasma* **70**, 179-205 (1970).

26 MacLeod, R. D. Lateral root primordium inception in Zea mays L. *Environmental and Experimental Botany* **30**, 225-234 (1990).

27 Charlton, W. A. Relationship Between Lateral Root Primordia in Different Ranks. *Annals of Botany* **60**, 455-458 (1987).

28 Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernandez-Barrera, A., Shishkova, S. & Gonzalez, I. Lateral root initiation in Arabidopsis: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* **98**, 1115-1115 (2006).

29 Dubrovsky, J. G. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *Planta* **214**, 30-36 (2001).

30 Casero, P., Casimiro, I. & lloret, P. G. Pericycle proliferation pattern during the lateral root initiation in adventitious roots of *Alium cepa. Protoplasma* **191**, 136-147 (1996).

31 De Smet, I., Vanneste, S., Inze, D. & Beeckman, T. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* **60**, 871-887 (2006).

32 Casimiro, I. *et al.* Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**, 165-171 (2003).

33 DiDonato, R. J. *et al.* Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant Journal* **37**, 340-353 (2004).

34 Celenza, J. L., Grisafi, P. L. & Fink, G. R. A pathway for lateral root-formation in *Arabidopsis-thaliana*. *Genes Dev.* **9**, 2131-2142 (1995).

35 Dubrovsky, J. G., Rost, T. L., Colón-Carmona, A. & Doerner, P. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana. Planta* **214**, 30-36 (2001).

36 Parizot, B. *et al.* Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiology* **146**, 140-148 (2008).

37 Péret, B. *et al.* Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**, 399-408 (2009).

38 Casero, P. J., Casimiro, I., Rodríguez-Gallardo, L., Martín-Partido, G. & Lloret, P. G. Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in adventitious roots of*Allium cepa. Protoplasma* **176** (1993).

39 Malamy, J. E. & Benfey, P. N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44 (1997).

40 Malamy, J. E. & Benfey, P. N. Down and out in Arabidopsis : The formation of lateral roots. *Trends in Plant Science* **2**, 390-396 (1997).

41 Popham, R. Zonation of primary and lateral root apices fo Pisum sativum. *American Journal Botany* **42**, 267-273 (1955).

42 Jaillais, Y. *Arabidopsis lateral root development*, <http://www.ens-lyon.fr/RDP/SiCE/cartoon/Lateralrootdevelopment.jpg> (

43 Swarup, K. *et al.* The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**, 946-954 (2008).

44 Nibau, C., Gibbs, D. J. & Coates, J. C. Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist* **179**, 595-614 (2008).

45 Davies, P. J. in *Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Vol. Third edition eds Peter J. Davies & Cornell University) 1-15 (Springer Netherlands, 2010).

46 Vanneste, S. & Friml, J. Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* **136**, 1005-1016 (2009).

47 Leyser, O. The Power of Auxin in Plants. *Plant Physiol.* **154**, 501-505 (2010).

48 Benková, E. & Hejátko, J. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology* **69**, 383-396 (2009).

49 Robert, H. S. & Friml, J. Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology* **5**, 325-332 (2009).

50 Woodward, A. W. & Bartel, B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735 (2005).

51 Overvoorde, P., Fukaki, H. & Beeckman, T. Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **4**, 1-16 (2010).

52 Teale, W. D., Paponov, I. A. & Palme, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 847-859 (2006).

53 Paciorek, T. & Friml, J. Auxin signaling. *J Cell Sci* **119**, 1199-1202 (2006).

54 Chapman, E. J. & Estelle, M. Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Genetics* **43**, 265-285 (2009).

55 Weijers, D. *et al.* Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO Journal* **24**, 1874-1885 (2005).

56 Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A. & Tasaka, M. Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. *The Plant Journal* **44**, 382-395 (2005).

57 Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H. & Tasaka, M. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**, 153-168 (2002).

58 Himanen, K. *et al.* Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**, 2339-2351 (2002).

59 Chapman, E. & Estelle, M. Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biology* **10**, 210 (2009).

60 Grieneisen, V. A., Jian, X., Marée, A. F. M., Hogeweg, P. & Scheres, B. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013 (2007).

61 Bennett, M. J. *et al.* Arabidopsis AUX1 Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. *Science* **273**, 948-950 (1996).

62 Friml, J. Auxin transport - shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 7-12 (2003).

63 Luschnig, C. Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends in Plant Science* **7**, 329-332 (2002).

64 Tromas, A. & Perrot-Rechenmann, C. Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 297-306, doi:10.1016/j.crvi.2010.01.005 (2010).

65 Marchant, A. *et al.* AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal* **18**, 2066-2073 (1999).

66 Rahman, A. *et al.* Gravitropism of Arabidopsis thaliana Roots Requires the Polarization of PIN2 toward the Root Tip in Meristematic Cortical Cells. *Plant Cell* **22**, 1762-1776 (2010).

67 Lucas, M., Guedon, Y., Jay-Allemand, C., Godin, C. & Laplaze, L. An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* (2008).

68 Casimiro, I. *et al.* Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-852 (2001).

69 Reed, R. C., Brady, S. R. & Muday, G. K. Inhibition of Auxin Movement from the Shoot to the Root Inhibits Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant physiology* **118**, 1369-1378 (1998).

70 Smith, R. S. & Bayer, E. M. Auxin transport-feedback models of patterning in plants. *Plant Cell and Environment* **32**, 1258-1271 (2009).

71 De Rybel, B. *et al.* A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity. *Current biology* **20**, 1697-1706 (2010).

72 Fukaki, H. & Tasaka, M. Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* **69**, 437-449 (2009).

73 Benková, E. *et al.* Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* **115**, 591-602 (2003).

74 Vanneste, S. *et al.* Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* **123**, 139-146 (2005).

75 Debi, B. R., Taketa, S. & Ichii, M. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (Oryza sativa). *Journal of Plant Physiology* **162**, 507-515 (2005).

76 Li, X., Mo, X. R., Shou, H. X. & Wu, P. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **47**, 1112-1123 (2006).

77 Laplaze, L. *et al.* Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *Plant Cell* **19**, 3889-3900 (2007).

78 Růžička, K. *et al.* Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4284-4289 (2009).

79 Zhu, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247-273 (2002).

80 Verslues, P. E. & Zhu, J.-K. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions* **33**, 375-379 (2005).

81 Wasilewska, A. *et al.* An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant* **1**, 198-217 (2008).

82 De Smet, I. *et al.* An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *Plant Journal* **33**, 543-555 (2003).

83 Guo, D., Liang, J. & Li, L. Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regulation* **58**, 173-179 (2009).

84 Léon-Kloosterziel, K. M. *et al.* Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *The Plant Journal* **10**, 655-661 (1996).

85 Shkolnik-Inbar, D. & Bar-Zvi, D. ABI4 Mediates Abscisic Acid and Cytokinin Inhibition of Lateral Root Formation by Reducing Polar Auxin Transport in Arabidopsis. *Plant Cell*, tpc.110.074641, doi:10.1105/tpc.110.074641 (2010).

86 Wang, H. *et al.* ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* **15**, 501-510 (1998).

87 Osmont, K. S., Sibout, R. & Hardtke, C. S. Hidden Branches developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 93-113 (2007).

88 Drew, M. C. Comparison of the Effects of a Localized Supply of Phosphate, Nitrate, Ammonium and Potassium on the Growth of the Seminal Root System, and the Shoot, in Barley. *New Phytologist* **75**, 479-490 (1975).

89 Zhang, H. & Forde, B. G. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* **51**, 51-59 (2000).

90 Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J. & Verbruggen, N. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* **11**, 610-617 (2006).

91 Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H. & Leyser, H. M. O. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**, 751-760 (2002).

92 Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P. W. & Forde, B. G. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6529-6534 (1999).

93 Malamy, J. E. & Ryan, K. S. Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **127**, 899-909 (2001).

94 Zhang, H., Rong, H. & Pilbeam, D. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2329-2338 (2007).

95 Signora, L., De Smet, I., Foyer, C. H. & Zhang, H. M. ABA plays a central role in mediating them regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. *Plant Journal* **28**, 655-662 (2001).

96 Chhun, T. *et al.* Saturated humidity accelerates lateral root development in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by increasing phloem-based auxin transport. *J. Exp. Bot.* **58**, 1695-1704 (2007).

97 Deak, K. I. & Malamy, J. Osmotic regulation of root system architecture. *Plant Journal* **43**, 17-28 (2005).

98 Ito, K. T., Koji; Morita, Shigenori; Abe, Jun; Inanaga, Shinobu. Lateral root development, including responses to soil drying, of maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) seminal roots. *Physiologia Plantarum* **127**, 260-267 (2006).

99 Malamy, J. in *root development* Vol. 37 (ed T. Beeckman) 93-127 (Annual plant reviews, 2009).

100 Datta, S., Hettiarachchi, G. H. C. M., Deng, X.-W. & Holm, M. Arabidopsis CONSTANS-LIKE3 Is a Positive Regulator of Red Light Signaling and Root Growth. *Plant Cell* **18**, 70-84 (2006).

101 Cluis, C. P., Mouchel, C. F. & Hardtke, C. S. The Arabidopsis transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *The Plant Journal* **38**, 332-347 (2004).

102 Salisbury, F. J., Hall, A., Grierson, C. S. & Halliday, K. J. Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *The Plant Journal* **50**, 429-438 (2007).

103 Halliday, K. J., Martinez-Garcia, J. F. & Josse, E. M. Integration of Light and Auxin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1** (2009).

104 Hochholdinger, F. & Zimmermann, R. Conserved and diverse mechanisms in root development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 70-74 (2008).

105 Heimsch, C. Development of Vascular Tissues in Barley Roots. *American Journal of Botany* **38**, 523-537 (1951).

106 Jansen, L., Rybel, B., Vassileva, V. & Beeckman, T. in *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives* eds Eng Chong Pua & Michael R. Davey) 71-90 (Springer Berlin Heidelberg, 2010).

107 Beemster, G. T. S., Fiorani, F. & Inzé, D. Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* **8**, 154-158 (2003).

108 Oparka, K. J., Prior, D. A. M. & Wright, K. M. Symplastic communication between primary and developing lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **46**, 187-197 (1995).

109 Luxova, M. effecte of Lateral Root formation on the Vascular pattern of Barley Roots. *Botanica acta* **103**, 305-310 (1989).

110 Deak, K. I. a. J. M. Osmotic regulation of root system architecture. *Plant journal* **43**, 17-28 (2005).

111 Van der Weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E. & Baskin, T. I. Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* **51**, 1555-1562 (2000).

112 Read, D. J. & Bartlett, E. M. The Physiology of drought resistance in the soy-bean plant (Glycinemax). *Journal of Applied Ecology* **9**, 487-499 (1972).

113 Lloret, P. G., Casero, P. J., Navascues, J. & Pulgarin, A. The Effects of Removal of the Root-Tip on Lateral Root Distribution in Adventitious Roots of Anion. *New Phytologist* **110**, 143-149 (1988).

114 Thaler, P. & Pages, L. Competition within the root system of rubber seedlings (Hevea brasiliensis) studied by root pruning and blockage. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1451-1459 (1997).

115 Willaume, M. & Pagès, L. How periodic growth pattern and source/sink relations affect root growth in oak tree seedlings. *Journal of Experimental Botany* **57**, 815-826, doi:10.1093/jxb/erj059 (2006).

116 Freixes, S., Thibaud, M. C., Tardieu, F. & Muller, B. Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell & Environment* **25**, 1357-1366 (2002).

117 Mishra, B. S., Manjul, S., Priyanka, A. & Ashverya, L. Glucose and auxin signaling interaction in controlling Arabidopsis thaliana seedlings root growth and development. *PLoS ONE*, e4502 (2009).

118 Karthikeyan, A. *et al.* Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 907-918 (2007).

119 Booker, K. S., Schwarz, J., Garrett, M. B. & Jones, A. M. Glucose Attenuation of Auxin-Mediated Bimodality in Lateral Root Formation Is Partly Coupled by the Heterotrimeric G Protein Complex. *PLoS ONE* **5**, 1-6 (2010).

120 Sharp, R. E., W. K. Silk,. Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials : I. Spatial Distribution of Expansive Growth. *Plant Physiology* **87**, 50-57 (1988).

121 Sharp, R. E., V. Poroyko, L.G.Hejlek, W.L. Spollen, G.K. Springer, H.J. Bohnert and H.T. Nguyen. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2343-2351 (2004).

122 Laskowski, M. *et al.* Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. *PLoS Computational Biology* **6**, 2721-2735 (2008).

123 Bingham, I. J., Blackwood, J. M. & Stevenson, E. A. Relationship between tissue sugar content, phloem import and lateral root initiation in wheat. *Physiologia Plantarum* **103**, 107-113 (1998).

124 Sharp, R. E. *et al.* Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2343-2351 (2004).

125 Pagès, L., Serra, V., Draye, X., Doussan, C. & Pierret, A. Estimating root elongation rates from morphological measurements of the root tip. *Plant & Soil* **328**, 35-44 (2010).

126 Walter, A. *et al.* Spatio-temporal dynamics of expansion growth in roots: automatic quantification of diurnal course and temperature response by digital image sequence processing. *Journal of Experimental Botany* **53**, 689-698 (2002).

127 Beemster, G. T. S. & Baskin, T. I. Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**, 1515-1526 (1998).

128 Schmundt, D., Stitt, M., Jähne, B. & Schurr, U. Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *The Plant Journal* **16**, 505 -514 (1998).

129 Nagel, K. A., Schurr, U. & Walter, A. Dynamics of root growth stimulation in Nicotiana tabacum in increasing light intensity. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1936-1945 (2006).

130 Croser, C., Bengough, A. G. & Pritchard, J. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (Pisum sativum). II. Cell expansion and wall rheology during recovery. *Physiologia Plantarum* **109**, 150-159 (2000).

131 Muller, B., Stosser, M. & Tardieu, F. Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant, Cell & Environment* **21**, 149-158 (1998).

132 Chen, C. W., Yang, Y. W., Lur, H. S., Tsai, Y. G. & Chang, M. C. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (Oryza sativa L.) root growth and development. *Plant and Cell Physiology* **47**, 1-13 (2006).

133 Del Pozo, J. C., Lopez-Matas, M. A., Ramirez-Parra, E. & Gutierrez, C. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* **123**, 173-183 (2005).

134 Dubrovsky, J. G. *et al.* Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 8790-8794 (2008).

135 Seo, M. & Koshiba, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**, 41-48 (2002).

136 Taylor, I. B., Burbidge, A. & Thompson, A. J. control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1563-1574 (2000).

137 Ferreira, P. *et al.* Developmental Expression of the Arabidopsis Cyclin Gene cyc1At. *Plant Cell* **6**, 1763-1774 (1994).

138 Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971 (1997).

139 Hartung, W. & Davies, W. J. in *Abscisic acid physiology and biochemistry* eds Hartung W. & W. J. Davies) Ch. 6, 63-79 (environmental plant biology, 1992).

140 Zhang, J. & Davies, W. J. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell & Environment* **12**, 73-81 (1989).

141 Xiong, L., Wang, R.-G., Mao, G. & Koczan, J. M. Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiol.* **142**, 1065-1074 (2006).

142 De Smet, I., Zhang, H. M., Inze, D. & Beeckman, T. A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* **11**, 434-439 (2006).

143 Brady, S. M., Sarkar, S. F., Bonetta, D. & McCourt, P. The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. *The Plant Journal* **34**, 67-75 (2003).

144 Malamy, J. in *root development* Vol. 37 (ed T. Beeckman) 93-127 (Annual plant reviews, 2010).

145 Xu, J., Gao, G. L., Du, J. J., Guo, Y. & Yang, C. W. Cell cycle modulation in response of the primary root of Arabidopsis to ABA. *Pak. J. Bot.* **42**, 2703-2710 (2010).

146 Croser, C., Bengough, A. G. & Pritchard, J. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (Pisum sativum). I. Rates of cell flux, mitosis, and strain during recovery. *Physiologia Plantarum* **107**, 277-286 (1999).

147 Sharp, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell & Environment* **25**, 211-222 (2002).

148 Spollen, W. G., LeNoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N. & Sharp, R. E. Abscisic Acid Accumulation Maintains Maize Primary Root Elongation at Low Water Potentials by Restricting Ethylene Production. *Plant Physiol.* **122**, 967-976 (2000).

149 Davies, W., Kudoyarova, G. & Hartung, W. Long-distance ABA Signaling and Its Relation to Other Signaling Pathways in the Detection of Soil Drying and the Mediation of the Plant's Response to Drought. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 285-295 (2005).

150 Yamaguchi, M. & Sharp, R. E. Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell & Environment* **33**, 590-603 (2010).

151 Parent, B. *et al.* Drought and Abscisic Acid Effects on Aquaporin Content Translate into Changes in Hydraulic Conductivity and Leaf Growth Rate: A Trans-Scale Approach. *Plant Physiol.* **149**, 2000-2012 (2009).

152 Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H. & Xiong, L. Characterization of OsbZIP23 as a Key Player of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor Family for Conferring Abscisic Acid Sensitivity and Salinity and Drought Tolerance in Rice. *Plant Physiol.* **148**, 1938-1952 (2008).

153 Uno, Y. *et al.* Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11632-11637 (2000).

154 Finkelstein, R. R. & Lynch, T. J. The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *Plant Cell* **12**, 599-610 (2000).

155 Draye, X., Kim, Y., Lobet, G. & Javaux, M. Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils. *J. Exp. Bot.* **61**, 2145-2155 (2010).

156 Liu, J. *et al.* Auxin transport in maize roots in response to localized nitrate supply. *Annals of Botany* **106**, 1019-1026 (2010).

157 Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. D. & McCarty, D. R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12235-12240 (1997).

158 Hooker, T. & Thorpe, T. Effects of fluridone and abscisic acid on lateral root initiation and root elongation of excised tomato roots cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **52**, 199-203 (1998).

159 de Dorlodot, S. F., Brian Pagès, Loïc Price, Adam Tuberosa, Roberto Draye, Xavier. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science* **12**, 474-481 (2007).

160 Hewitt. Sand and water culture methodes used in the study of plant nutrition. *Common wealt agricultural bureaux*, 233 (1966).

161 Hetz, W., F. Hochholdinger , M. Schwall, G. Feix. Isolation and characterization of *rtcs*, a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. *The Plant Journal* **10**, 845-857 (1996).

162 Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M. & Dembinsky, D. Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specific developmental programmes. *Annals of Botany* **93**, 359-368 (2004).

163 Hoagland, D. R. & Snyder, W. C. Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci* **30**, 288-296 (1933).

164 Lobet, G. *et al.* A novel image analysis toolbox enabling quantitative analyses of root system architecture. *in* (2010).

165 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45 (2001).

Annexes

Annexes

Annexe 1. Préparation de la solution nutritive pour la culture de l'orge

Tableau 11. Composition détaillée de la solution nutritive Hewitt

	masse molaire (g/mol)	Solution Stock (g/l)	concentration finale en sel (mg/l)
$MnCl^2,4H_2O$	197,916	0,995	0,989
$CuSO_4,5H_2O$	248,369	0,126	0,125
$ZnSO_4,7H_2O$	287,569	0,145	0,144
H_3BO_3	61,837	1,555	1,546
NaCl	58,440	2,940	2,922
$(NH_4)^6Mo_7O_{24},4H_2O$	1235,932	0,044	0,044
$MgSO_4,7H_2O$	246,489	185,879	184,770
$NaH_2PO_4,2H_2O$	156,014	104,369	103,747
FeEDTANa	371,112	18,463	18,353
$Ca(NO_3)^2,4H_2O$	236,170	475,114	472,280
KNO_3	101,107	203,413	202,200

Préparation solution fille Hewitt half strenght avec Si:

- dissoudre 2,26g de $Na_2O_3Si,5H_2O$ dans 20L eau déminéralisée
- rectifier le pH avec apport de 1,95ml HCl 32%, pour atteindre pH 5,6-5,8
- ajouter les sels minéraux Hewitt (dans l'ordre)
- rectifier le pH avec apport de 0,3ml KOH, pour atteindre pH 5,6-5,8