HAL
open science

Gravitropisme chez le peuplier : implication des kinases associées à la paroi (WAK) dans les évènements précoces après inclinaison

Kévin Tocquard

▶ **To cite this version:**

Kévin Tocquard. Gravitropisme chez le peuplier : implication des kinases associées à la paroi (WAK) dans les évènements précoces après inclinaison. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22735 . tel-01490030

HAL Id: tel-01490030

https://theses.hal.science/tel-01490030

Submitted on 14 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL **UNIVERSITE D'AUVERGNE**
N° D. U. 2735
ANNEE : 2016

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre : 698

Thèse :

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour
l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Physiologie et génétique moléculaire)

Présentée et soutenue publiquement
par

Kévin TOCQUARD

le 07 octobre 2016

Gravitropisme chez le peuplier : Implication des kinases associées à la paroi (WAK) dans les événements précoces après inclinaison

---

Rapporteurs : **Dr Annabelle DEJARDIN**, UR 0588, INRA, Orléans
Pr Soulaiman SAKR, UMR 1345, Agrocampus Ouest, Angers

Examinateurs : **Dr Gwyneth INGRAM**, UMR 5667, CNRS, Lyon
Pr Claude BEAUDOIN, UMR 6293, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand

Directeur de thèse : **Pr Patricia ROECKEL-DREVET**, UMR 547, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand
Co-encadrement **Dr Jean-Stéphane VENISSE**, UMR 547, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand

Laboratoire de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier
(UMR PIAF, Université Blaise Pascal)

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement Annabelle DEJARDIN et Soulaiman SAKR d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Gwyneth INGRAM et Claude BEAUDOIN d'examiner mon travail.

Je remercie également Jean-Louis JULIEN de m'avoir accepté au sein du laboratoire PIAF, de son soutien mais également de ses débriefs d'après match, et de m'avoir sorti du ruisseau.

J'adresse mes plus grands remerciements à Patricia ROECKEL-DREVET et Jean-Stéphane VENISSE de m'avoir encadré, soutenu, conseillé, guidé, stimulé, éclairé pendant ces années. Merci sincèrement de votre disponibilité, du temps investi, de votre – longue – patience, votre bienveillance et votre franchise. Vous m'avez permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie également tous les membres du PIAF qui ont pu contribuer de façon directe ou indirecte à la réalisation de ce travail. Je remercie tout particulièrement Nicole BRUNEL lors de ton aide à la réalisation des analyses de cytologie, Jérôme FRANCHEL de ton aide lors de mes débuts à la paillasse que ce soit pour la biologie moléculaire ou la biochimie des protéines, Sylvaine LABERNIA de votre aide lors des nombreux broyages, Christelle BOISSELET et Brigitte GIRARD de m'avoir fourni du matériel végétal en quantité et de qualité, Stéphanie MASSEY de ton aide lors des prélèvements, Boris FUMANAL et Gisèle BRONNER de votre aide lors des analyses phylogénétiques, Philippe LABEL de ton aide en statistique, et David LOPEZ de ton aide très précieuse et très diverse dès le premier jour où je suis arrivé jusqu'à la fin.

J'adresse également un immense merci à Ludo, Jo, Matthias, Coco, Marine, Raf, Heidi, Betty, Lauriane, Micka, Fab, Seb, Boris, David, Caro, Jeanne, Jérôme pour tous les petits et grands moments que l'on a partagés ensemble et de votre soutien. Je souhaite également remercier infiniment Honorine, Caro et Jeanne de m'avoir hébergé sans qui je n'aurais sans doute pas pu terminer ce travail.

Je souhaite remercier ma famille et ma belle-famille de leur soutien et leurs encouragements sans faille. Je tiens à remercier plus particulièrement ma mère et ma grand-mère de m'avoir permis de faire des études dans les meilleures conditions.

Enfin, je souhaite remercier plus que tout Géraldine, toi qui partage ma vie depuis presque le début de nos études, toi qui as été mon moteur pendant toutes ces années, toi qui ne m'as jamais abandonné et toujours soutenu, je ne te remercierai jamais assez de tous tes sacrifices et ton extraordinaire soutien.

Résumé

Les plantes adaptent leur croissance en fonction des facteurs environnementaux dont la gravité qui est un facteur constant. Une modification de l'orientation de la plante par rapport à l'axe de la gravité, *i.e.* une inclinaison induit une réponse de redressement : le gravitropisme. Pour les parties aériennes le gravitropisme est négatif, c'est-à-dire que les plantes vont adapter leur croissance dans la direction opposée à la gravité. Chez les arbres, le redressement est assuré par à la formation asymétrique d'un bois aux propriétés physico-chimiques particulières appelé le bois de réaction. Des récepteurs kinases pourraient participer à la perception et à la réponse précoce au stimulus gravitropique qu'est l'inclinaison. Parmi ces familles protéiques, les kinases associées à la paroi (WAK) sont des candidats intéressants. La liaison de ces protéines à la paroi permettrait de percevoir les déformations qui sont supposées se produire par l'inclinaison de la tige. Nous avons alors identifié et caractérisé pour la première fois la famille WAKs chez une espèce ligneuse, le peuplier, qui est composée de 175 membres. L'étude d'accumulation des transcrits WAKs a permis d'identifier les gènes WAKs qui s'expriment dans la tige puis l'expression de ces gènes a été suivie lors d'une cinétique après inclinaison. Il s'avère que les gènes WAKs sont faiblement exprimés et que 25% des gènes présentent une expression différentielle après inclinaison. Ces données transcriptomiques suggèrent que les WAKs participeraient aux événements cellulaires précoces après l'inclinaison de tiges chez le peuplier. Enfin, une étude plus approfondie a été initiée sur PtWAK70 qui est localisée dans le jeune xylème et le phloème secondaire. Nous avons également généré des outils moléculaires dont l'objectif est d'identifier les interacteurs potentiels de la partie apoplastique de PtWAK70.

Abstract

Plants adapt their growth to environmental factors whose gravity is a continuous one. A modification of plant orientation by tilting leads to a straightening response: gravitropism. For aerial parts, plants will adapt their growth upward (negative gravitropism). In trees, straightening is accomplished through asymmetric formation of reaction wood which exhibits modifications in its physicochemical properties. Receptors-like kinases could play a role in both perception and early response to a gravitropic stimulus. Among them, Wall-Associated Kinases (WAKs) are interesting candidates because they are bind to the cell wall. They could detect wall deformations that are supposed to occur after tilting of the stem. We identified and characterized for the first time in a woody species (poplar) the largest WAKs family with 175 members. An extensive study of WAKs transcripts accumulation was carried out to identify genes expressed in woody stem. These genes expressions were analyzed during a kinetic after tilting. WAKs genes were overall weakly expressed but 25% of analyzed genes showed a modulation in their transcript accumulation after tilting. This suggests they could play a role in early events after tilting of poplar stems. Lastly, a deeper study was initiated on PtWAK70 which is localized in young xylem and secondary phloem. We generated molecular tools to identify potentials interactors of PtWAK70 apoplastic part.

Abréviations

2D-DIGE : Two-Dimensional Differential in Gel Electrophoresis

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ARG1 : Altered Response to Gravity

ARN : Acide RiboNucléique

ARNtx : Acide RiboNucléique totaux

BAK1 : BRI1 Associated receptor Kinase 1

BK1 : BRI1 Kinase Inhibitor

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BN-PAGE : Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

BRI1 : BRassinosteroid Insensitive 1

BSA : Bovine Sereum albumine

cGMP : guanosinr 3',5'-cyclic monophosphate

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate

CLV : Clavata

Col-0 : Columbia-0

CPMCW : Cytoskeleton – Plasma Membrane – Cell Wall

Cq : Cycle seuil

CTAB : cetyltrimethylammonium bromide

DEPC : diéthyl pyrocarbonate

DIG : Dioxygénine

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EF1α : Elongation Factor 1α

EGF : Epidermal Growth Factor

GFP : Green Fluorescent Protein

GRP : Glycine-Rich Protein

GST : Glutathion S-Transferase

GubWAK : Galacturonide-binding Wall-Associated Kinase

GUS : Gène de la β-glucuronidase

HSD : Honest significant different

INA : 2,6-dichloroisonicotinic acid

InsP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate

IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside

KAPP : Kinase Associated Phosphatase Protein

LC/MSMS : Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LG : Linkage Group

LRR-RLK : Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

OEE : Oxygen-Evolving Enhancer Protein

OG : Oligogaracturonides

PCR : Polymérase Chain Reaction

PGA : Acides Polygalacturoniques

PLC : Phospholipase C

PR : Pathogen Related

RFO : Resistance to Fusarium Oxyporum

RFP : Ring Finger Protein

RGI : Rhamnogalacturonanes I

RGII : Rhamnogalacturonanes II

RLCK : Receptor-Like Cytoplasmic Kinase

RLK : Receptor-Like Kinase

RLP : Receptor-Like Protein

RNAseq : RNA sequencing

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR : Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction

SA : Acide Salycilique

TAE : Tris – Acétate – EDTA

TBS : Tris Buffered Saline

TOC : Translocon at the Outer enveloppe membrane of Chloroplasts

UBC : Ubiquitine

WAK : Wall-Associated Kinase

WAKassoc : Wall-associated receptor kinase C-terminal

WAKL : Wall-Associated Kinase like

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Structure schématique d'une protéine AtWAK (He *et al.* 1999)

Figure 2. Structure schématique des pectines (Harholt *et al.* 2010)

Figure 3. Représentation de la conformation en « boite à œufs » (Caffall et Mohnen, 2009)

Figure 4. Modèle de signalisation induite par les WAKs chez Arabidopsis (Kohorn 2015)

Figure 5. Représentation de l'inclinaison d'un peuplier *Populus tremula x alba*

Figure 6. Représentation du dispositif de lumière isotrope

Figure 7. Carte du vecteur pGEX-4T-1

Figure 8. Carte des vecteurs pGEM-T Easy et pBlueScript

Figure 9. Schéma représentant la transcription *in vitro*

Figure 10. Schéma de la démarche expérimentale conduisant à l'identification des *WAKs* exprimées dans la tige de *Populus tremula x alba* et dont l'accumulation des transcrits est analysée dans des tiges de peuplier droites et après un stimulus gravitropique

Figure 11. Heatmap du niveau d'expression des *PtWAKs* dans différents organes de peuplier *Populus tremula x alba*

Figure 12. Etude de la quantité de transcrits de 31 *PtWAKs* chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique

Figure 13. Heatmap du niveau de transcrits de 31 *PtWAKs* chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique

Figure 14. Ellipses de confiance de la distribution des facteurs expérimentaux

Figure 15. Représentation de la variance totale de l'ACP par chaque axe

Figure 16. Ellipses de confiance de la distribution des facteurs expérimentaux

Figure 17. Cercles de corrélations des variables de l'ACP

Figure 18. Heatmap du niveau de transcrits de 16 *PtWAKs* chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique en conditions de lumière isotropique

Figure 19. Arbre phylogénétique des PtWAKs

Figure 20. Représentation de la séquence protéique de WAK70

Figure 21. Western blot sur protéines totales d'*Escherichia coli* après induction de GST ou GST-WAK

Figure 22. Western blot sur protéines totales de peuplier (*Populus tremula x alba*)

Figure 23. Gel après électrophorèse bidimensionnelle (A) et western blot anti-WAK70 (B)

Figure 24. Immunolocalisation de PtWAK70 sur des sections de tiges de peuplier *Populus tremula x alba*

Figure 25. Immunolocalisation de PtWAK70 sur des sections de tiges de peuplier *Populus tremula x alba* inclinés plusieurs jours

Figure 26. Alignement des 150 acides aminés extracellulaires de PtWAK70 avec la séquence correspondante d'autres WAKs

Tableau 1. Liste des amorces *PtWAKs* amplifiant de l'ADNg chez *Populus trichocarpa* et résultats des tests d'amplification sur ADNg et ADNc de *Populus tremula x alba*

Tableau 2. Séquence de la sonde pour l'hybridation *in situ*

Tableau 3. Localisation génomique, type protéique et domaines des 31 *PtWAKs* dont l'accumulation des transcrits est analysée dans les tiges de peupliers inclinés en serre

Tableau 4. Résultats des analyses des accumulations de transcrits entre des plantes droites et inclinées en condition de lumière isotropique

Tableau 5. Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans des spots protéiques prélevés sur gel

Sommaire

INTRODUCTION ..... **- 1 -**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ..... **- 5 -**

1. PERCEPTION DE L'INCLINAISON ..... - 6 -
2. RÉPONSE PRÉCOCE INDUITES PAR LA GRAVI-STIMULATION ..... - 7 -
3. LES WAKS ..... - 9 -
   - *3.1. Description de la famille multigénique* ..... *- 9 -*
   - *3.2. Capacité d'interaction des WAKs…* ..... *- 10 -*
     - 3.2.1. … Avec les sucres pariétaux ..... - 10 -
     - 3.2.2. … Avec des protéines ..... - 12 -
   - *3.3. Fonction des WAKs* ..... *- 13 -*
     - 3.3.1. Rôle dans l'élongation cellulaire ..... - 13 -
     - 3.3.2. Rôle dans la réponse aux pathogènes ..... - 14 -
     - 3.3.3. Rôle dans la réponse aux minéraux ..... - 16 -
   - *3.4. Fonctionnement des WAKs : un modèle hypothétique* ..... *- 16 -*

HYPOTHESES ET OBJECTIFS ..... **- 18 -**

MATERIEL ET METHODES ..... **- 20 -**

1. MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITION DE CULTURE ..... - 21 -
2. STIMULATION GRAVITROPIQUE EN SERRE ..... - 21 -
3. STIMULATION GRAVITROPIQUE AU SEIN D'UN DISPOSITIF DE LUMIÈRE ISOTROPE ..... - 22 -
4. EXTRACTION ADNG, ARNTX, SYNTHÈSE DES ADNC ..... - 22 -
5. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL ..... - 23 -
6. PCR QUANTITATIVE À HAUT DÉBIT ..... - 24 -
7. CONSTRUCTION ET EXPRESSION D'UNE PROTÉINE FUSION GLUTATHION S-TRANSFÉRASE ..... - 24 -
8. EXTRACTION DE PROTÉINES VÉGÉTALES ..... - 25 -
9. ELECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE ET TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE ..... - 26 -
10. ELECTROPHORÈSE MONODIMENSIONNELLE ET TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE ..... - 26 -
11. ANALYSE PAR WESTERN BLOT ..... - 27 -
12. PRÉLÈVEMENTS ET INCLUSION EN PARAFFINE ..... - 27 -
13. IMMUNOLOCALISATION IN SITU ..... - 28 -
14. CLONAGE DE LA SONDE POUR HYBRIDATION IN SITU ET TRANSCRIPTION IN VITRO ..... - 29 -
15. HYBRIDATION IN SITU ..... - 30 -

RESULTATS ..... **- 32 -**

1. CHAPITRE 1 ..... - 33 -
2. CHAPITRE 2 ANALYSE DE LA QUANTITÉ DE TRANSCRITS DES GÈNES WAKS CHEZ LE PEUPLIER SUITE À UN STIMULUS GRAVITROPIQUE ..... - 35 -
   - *2.1. Introduction* ..... *- 35 -*
   - *2.2. Résultats* ..... *- 35 -*
     - 2.2.1. Expression des WAKs dans différents organes de peuplier ..... - 35 -
     - 2.2.2. Identification des gènes WAKs dont la transcription est modulée dans les tiges inclinées en serre ..... - 36 -
     - 2.2.3. Identification des gènes WAKs dont la transcription est modulée dans les tiges inclinées en condition de lumière isotrope ..... - 37 -
   - *2.3. Discussion* ..... *- 39 -*
3. CHAPITRE 3 : PRÉPARATION D'OUTILS POUR LOCALISER L'EXPRESSION DES WAKS ET RECHERCHER LES INTERACTEURS PROTÉIQUES ..... - 44 -
   - *3.1. Introduction* ..... *- 44 -*
   - *3.2. Résultats* ..... *- 45 -*
     - 3.2.1. Création d'un outil moléculaire pour identifier de potentiels interacteurs apoplastiques de PtWAK70 - 45 -
     - 3.2.2. Création d'un anticorps anti-WAK70 ..... - 46 -

3.2.3. Localisation de la protéine WAK70 dans des tiges de peuplier en croissance secondaire par immunolocalisation in situ. ..... - 47 -

3.3. Discussion ..... *- 48 -*

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ..... - 52 -

1. IMPLICATION DANS LA RÉPONSE PRÉCOCE À UN STIMULUS GRAVITROPIQUE ..... - 53 -
2. IMPLICATION DANS LA PERCEPTION D'UN STIMULUS GRAVITROPIQUE ..... - 54 -
3. LES WAKS POURRAIENT AVOIR DES RÔLES DANS D'AUTRES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ..... - 55 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 57 -

INTRODUCTION

La gravité est un des principaux facteurs qui contrôle le port de la plante. Suite à une modification de l'orientation d'une plante par rapport à la gravité (*i.e.* inclinaison), une réponse active de redressement se met en place : le gravitropisme. Les parties aériennes vont globalement se développer en direction inverse de la gravité (gravitropisme négatif) tandis que les parties souterraines, les racines, se développent dans la direction de la gravité (gravitropisme positif). La réponse de la plante, dite gravitropique, est différente selon que l'organe est en croissance primaire ou secondaire. Pour les tiges en croissance primaire, les cellules vont s'allonger différentiellement entre les faces supérieure et inférieure par rapport à l'axe d'inclinaison, ce qui permet à l'organe de se redresser (Fukaki *et al.*, 1998). Pour les tiges en croissance secondaire, le redressement est dû à la maturation différentielle des cellules issues du cambium entre les faces supérieure et inférieure (Telewski, 2006). Ce méristème secondaire va produire un bois particulier que l'on appelle le bois de réaction (Pilate *et al.*, 2004). Le redressement de l'arbre se fait progressivement chez le peuplier. Après l'inclinaison, une première phase dite de latence sans redressement est observable. Ensuite vient une deuxième phase dite gravitropique pendant laquelle l'arbre se redresse grâce à la production de bois de tension sur la phase supérieure par rapport à l'axe d'inclinaison. Enfin, une troisième et dernière phase dite autotropique a lieu où le bois de tension est produit sur la face opposée (Coutand *et al.*, 2007).

Comment l'inclinaison est-elle perçue par la plante ? La perception de l'inclinaison par la cellule végétale se ferait selon deux modèles actuellement admis dans la littérature qui ne sont pas exclusifs : (i) la sédimentation de grains d'amidon (ou amyloplastes, encore appelés statolithes) dans certaines cellules (les statocytes) selon le champ gravitaire (Sack, 1997) et (ii) le modèle de pression gravitaire initialement proposé par Pfeffer (1894) et Czapek (1898) puis ensuite amendé par Pickard et Ding (1993) et Pickard (2007).

Le rôle de la sédimentation des statolithes dans la graviperception a principalement été étudié chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Morita, 2010). Dans les parties racinaires, les statocytes constituent un petit amas de cellules à la pointe de la racine (Tsugeki and Fedoroff, 1999), la columelle. Dans les parties aériennes en croissance primaire, les jeunes tiges montrent ces statocytes dans une couche cellulaire bien définie que l'on appelle l'endoderme (Fukaki *et al.*, 1998). Cette couche se retrouve aussi chez de jeunes arbres en croissance primaire mais tend à disparaitre lors de la croissance secondaire, et pourrait être remplacée dans sa fonction par des cellules du phloème secondaire qui contiennent des grains d'amidon (Azri *et al.*, 2009; Gerttula *et al.*, 2015). Le criblage de mutants d'Arabidopsis dont la hampe florale est agravitropique ou l'utilisation de drogues déstructurant l'actine du cytosquelette tendent à montrer que la sédimentation des statolithes semble être un mécanisme actif impliquant la vacuole (Morita *et al.*, 2002) et des interactions avec le

cytosquelette (Blancaflor, 2013). La modification des mouvements des statolithes pourrait agir sur des canaux mécano-sensibles situés sur la membrane plasmique permettant le passage d'ions. Cette action pourrait être directe en appliquant une force sur la membrane, ou indirecte par l'intermédiaire de liens physiques entre les canaux, le cytosquelette et des protéines des plastes (Haswell *et al.*, 2011; Perbal and Driss-Ecole, 2003).

D'après le modèle de pression gravitaire actuel (Baluška and Volkmann, 2011), lorsque la plante est verticale, le protoplaste repose au sein de la matrice extracellulaire, et il en résulte une tension entre la membrane plasmique et la paroi sur la face supérieure de la cellule et une compression au niveau de la face inférieure. L'inclinaison provoque alors des déformations au niveau du système continu et flexible constitué des membranes, du cytosquelette et des parois. Dans ce concept, le phénomène de sédimentation des statolithes n'agirait pas comme un senseur *stricto sensu* mais comme un système d'amplification du signal (Baluška and Volkmann, 2011). Les senseurs pourraient être des protéines situées à l'interface entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire.

D'après notre analyse, pour le modèle des statolithes, c'est le continuum plaste, cytosquelette, membrane plasmique qui semble mis en avant. Le continuum avec la paroi n'apparait pas comme essentiel pour la perception dans ce modèle. Pour le modèle de pression gravitaire, le continuum Cytosquelette – Membrane Plasmique – Paroi nommé CPMCW pour Cytoskeleton – Plasma Membrane – Cell Wall (Baluška *et al.*, 2003) a un rôle central dans la perception de la gravité. De nombreux auteurs considèrent maintenant que la paroi est une structure dynamique impliquée dans la perception de signaux environnementaux (Kasprowicz *et al.*, 2011). Ainsi, des molécules ou des complexes capables de connecter la paroi, la membrane plasmique et le cytosquelette pourraient avoir une fonction clé dans la perception de stimulations mécaniques comme l'inclinaison, ou dans la réponse précoce à ces stimulations. Parmi les protéines situées à l'interface du continuum CPMCW et qui pourraient être impliquées dans ce processus d'échange entre la paroi et l'espace intracellulaire (Baluška *et al.*, 2003), les récepteurs kinases (RLK, pour Receptor-Like Kinase) de la sous-famille des RLK/Pelles semblent être de bons candidats moléculaires pour la perception de signaux pariétaux (Monshausen and Gilroy, 2009; Monshausen and Haswell, 2013). En effet, la famille RLKs/Pelles est composée de protéines transmembranaires avec un domaine kinase intracellulaire et différents types de domaines extracellulaires (Shiu and Bleecker, 2001). Chez le peuplier, la famille RLK/Pelles est représentée par près de 1200 gènes parmi lesquels 726 codent des récepteurs transmembranaires et 466 codent uniquement le domaine kinase respectivement répartis en 36 et 16 sous-familles (Lehti-Shiu *et al.*, 2009).

Parmi les RLK, la sous-famille des WAKs (Wall-Associated Kinases) est particulièrement intéressante. Les protéines de cette famille multigénique sont situées à l'interface du continuum CPMCW et possèdent une partie N-terminale extracellulaire capable de se lier aux pectines de la paroi (Decreux and Messiaen, 2005; He *et al.*, 1996; Wagner and Kohorn, 2001). Dans le cadre du modèle de pression gravitaire, des déformations du continuum CPMCW provoquées par l'inclinaison pourraient être perçues au niveau des WAKs, et être à l'origine d'une signalisation cellulaire qui débuterait par l'activation du domaine kinase intracellulaire. Si, conformément au modèle de statocytes, le déplacement des statolithes est responsable de déformations de la membrane plasmique, on peut aussi supposer que l'activité des protéines transmembranaires WAKs pourrait être modulée en réponse au stimulus gravitropique. Dans ce cas, les WAKs seraient des acteurs de la réponse précoce à la stimulation gravitropique.

Les travaux de cette thèse ont pour objectif d'analyser si les WAKs sont impliquées dans la perception/réponse précoce à un stimulus gravitropique de tiges de peuplier en croissance secondaire. La plupart des travaux réalisés dans le cadre de stimulation gravitropique a porté sur des organes en croissance primaire (Toyota and Gilroy, 2013). Ceux portant sur des organes en croissance secondaire ont surtout visé à comprendre la mise en place du bois de réaction qui permet le redressement de l'arbre. Le plus souvent, l'objet de ces études était l'arbre âgé et incliné au minimum depuis plusieurs semaines (Tocquard *et al.*, 2014b). Nos travaux seront donc pionniers à plus d'un titre :

- Les WAKs font partie d'une famille multigénique non caractérisée chez les ligneux.
- Aucun résultat expérimental publié ne relie à ce jour les WAKs à la réponse gravitropique.
- Les variations précoces d'expression des gènes après inclinaison des tiges ligneuses ont été très peu étudiées.

Après une synthèse bibliographique rappelant les hypothèses sur les mécanismes de perception et de réponses précoces à l'inclinaison ainsi que les données connues sur la famille multigénique des WAKs, nous formulerons nos hypothèses quant à leur rôle dans la perception ou la réponse à cette stimulation. Les résultats obtenus seront ensuite présentés et discutés.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Perception de l'inclinaison

La gravité est un facteur environnemental permanent sur Terre. Les plantes adaptent leur croissance en fonction de son orientation, mécanisme appelé gravitropisme. Il existe différents modèles qui décrivent le gravitropisme des tiges (Lopez *et al.*, 2014). D'après ces modèles, la plante perçoit l'inclinaison et la courbure locale - ou proprioception - tout au long du processus de redressement de la tige. Il est donc nécessaire de définir des protocoles expérimentaux pour différencier la réponse à l'inclinaison et la réponse à la déformation due à la courbure de la tige sous son poids propre ou sous l'effet du redressement. Il est également nécessaire d'identifier clairement les lieux de perception de l'inclinaison dans la plante. S'il semble admis que cela se déroule au niveau de la columelle dans la racine (Tsugeki and Fedoroff, 1999) et de l'endoderme dans la tige (Fukaki *et al.*, 1998) pour des organes en croissance primaire, les sites de perception restent à identifier dans les organes en croissance secondaire. Gertulla *et al.* (2015) proposent que la perception puissent se dérouler au niveau de cellules de l'écorce dans des troncs de peupliers mais cela reste à démontrer. Enfin, quel que soit le tissu de perception de l'inclinaison, différents concepts existent quant au système de perception. Toutefois, les données sont majoritairement obtenues sur des plantes en croissance primaire.

Le manuscrit suivant publié par D. Lopez, K. Tocquard, J.S. Venisse, V. Legué et P. Roeckel-Drevet dans le journal « Frontiers in Plant Science » intitulé : « Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth », 2014, volume 5, est une synthèse bibliographique des travaux effectués sur ces questions.

frontiers in
PLANT SCIENCE

MINI REVIEW ARTICLE
published: 05 November 2014
doi: 10.3389/fpls.2014.00610

Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth

David Lopez[1,2†], Kévin Tocquard[1,2†], Jean-Stéphane Venisse[1,2], Valerie Legué[1,2]* and Patricia Roeckel-Drevet[1,2]*

[1] Clermont Université – Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, Aubière, France
[2] INRA, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand, France

Edited by:
Sara Puijalon, Université Lyon 1, France

Reviewed by:
Uener Kolukisaoglu, University of Tübingen, Germany
Miyo Terao Morita, Nagoya University, Japan

***Correspondence:**
Valerie Legué and Patricia Roeckel-Drevet, Clermont Université – Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, BP 10448, F-63171 Aubière, France
e-mail: valerie.legue@univ-boclermont.fr; patricia.drevet@univ-bpclermont.fr

[†] David Lopez and Kévin Tocquard have contributed equally to this work.

Gravity is a crucial environmental factor regulating plant growth and development. Plants have the ability to sense a change in the direction of gravity, which leads to the re-orientation of their growth direction, so-called gravitropism. In general, plant stems grow upward (negative gravitropism), whereas roots grow downward (positive gravitropism). Models describing the gravitropic response following the tilting of plants are presented and highlight that gravitropic curvature involves both gravisensing and mechanosensing, thus allowing to revisit experimental data. We also discuss the challenge to set up experimental designs for discriminating between gravisensing and mechanosensing. We then present the cellular events and the molecular actors known to be specifically involved in gravity sensing.

Keywords: amyloplast, gravisensing, membrane receptor, reaction wood, root growth, stem growth

INTRODUCTION

Among the factors that influence the growth orientation in plants (e.g., light, gravity, water availability, and touch), gravity represents one of the most important environmental signals. This biological process known as gravitropism, starts from seed germination through the upright growth of shoots, ensuring the photosynthesis and the reproduction as well as the dispersion of seeds, and the downright growth of roots, supplying the plant in water and nutrients. When a plant organ is tilted, it adjusts its growth orientation relative to gravity direction, which is achieved by a curvature of the organ. Growth reorientation is the result of a differential cell elongation rate between the two sides of organs undergoing primary growth (Barlow and Rathfelder, 1985; Tomos et al., 1989). In trees and perennial plants, the active cambium initiated in organs undergoing secondary growth contributes to the reorientation of the shoot through the differentiation and shrinkage of reaction wood (RW – i.e., tension wood or compression wood in eudicotyledonous and conifers respectively; IAWA, 1964; Archer, 1986). Gravitropism is therefore essential in the control of the posture and the form of land plants (Coutand et al., 2007; Moulia et al., 2011).

MODELS DESCRIBE THE GRAVITROPIC MOVEMENTS IN PLANTS

Mathematic and kinematic tools have been extensively used for describing and quantifying the gravitropic movements in plants, and have been recently supplemented by integrative models. Even if gravity sensing events are not yet completely deciphered, these tools provide essential information to address the complex molecular and cellular mechanisms involved in gravitropism.

The time course of gravitropic curvature investigated in hypocotyl, stem, as well as in the trunk and branches illustrate the following steps in several species: the upward curving of the organs is observed after a latency phase and progressively followed by a "decurving" which starts at the tip and propagates downward. This latest has been described as autotropic (Firn and Digby, 1979) and may occur before the tip reaches the vertical (Firn and Digby, 1979; Stankovic et al., 1998).

Curvature time course in growing organs was initially calculated using the inclination angle of the organ's tip relative to the vertical, and revealed that the gravitropic curvature obeys the so-called sine law (Sachs, 1882; review, Moulia and Fournier, 2009). The sine law represents the size of the gravitropic stimulus (S_{gravi}) as equal to g sin γ, where g is the gravitational acceleration and γ the inclination angle. In other words this law predicts that the amplitude of gravitropism depends of the sinus of inclination angle. Even if this sine law has been confirmed in several species both in stems and roots, it is valid only in a limited range of inclination angles, ranging from 0 to 90° (see introduction in Göttig and Galland, 2014) and therefore, it does not characterize gravitropic movements of the whole organ over-time (reviewed in Moulia and Fournier, 2009). Later on, a curvature angle which is the change in tip inclination angle over time was proposed (Galland, 2002; Perbal et al., 2002; Hoshino et al., 2007). This parameter again is not satisfactory especially because it was not measured using the same reference from one experiment to another (horizontal, vertical, initial position of the tilted stem). Starting from the observation that the gravitropic

responses of aerial organs showed general curving followed by basipetal straightening (Pickard, 1985), Bastien et al. (2013) proposed a model that takes into account the sensing of the local inclination angle but also of the local curvature, which progressively takes place. The sensing of the local inclination reflects the gravisensing mechanisms while the sensing of the local curvature could be referred as mechanosensing which has been described as graviproprioceptive. The authors defined a measurable ratio B that is a ratio between graviceptive and proprioceptive sensitivities. B was shown to control crucial aspects of the dynamics of the gravitropic response. The curving and decurving phases initially described as sequential, are in fact concomitant and linked to the initial degrees of inclination and curvature (Bastien et al., 2013). Recently, Bastien et al. (2014) extended this model by taking into account the growth effects, considered as the motor of movement, i.e., expansion of the curved zone and immobilization of the curvature state at elongation zone boundary (Selker and Sievers, 1987; Ishikawa and Evans, 1993). This model highlights that stems in primary growth rapidly straightened as to escape the growth destabilizing effects. To our mind, these findings precised the notion of autotropism as a reorientation of the axis controlled by internal cues such as the organ curvature. The consequence of the autotropic decurving is that RW and/or increased cell elongation occur alternatively from one side of the stem to the other.

Despite the fact that proprioceptive sensitivity has not been integrated in models of root gravitropism, it seems that the autotropic decurving has been observed during the last step of the gravitropic response in stems and as well in roots. Curiously, the analysis of the position of the lentil root tip and the root curvature as a function of time in microgravity revealed that the embryonic root curved strongly away from the cotyledons and then straightened out slowly following hydration (Perbal and Driss-Ecole, 2003; Driss-Ecole et al., 2008), suggesting an autotropic decurving in the absence of gravity signal. It is not clear if this decurving could occur in soil which structure can sometimes greatly restrict root growth and where the root system is mediated by a wide variety of processes including nutrient and water uptake, anchoring and mechanical support.

Another parameter that has been explored for elucidating the gravisensing mechanisms is the measurement of thresholds. Detailed kinetics of gravitropic curvature in horizontally stimulated roots have been reported in several studies and revealed for example that maize roots oriented at $<40°$ from the vertical, overshot the vertical and then oscillated around this axis (Barlow et al., 1993). The angle of 10° seemed to be the minimum angle to induce a gravitropic response. On the contrary, when roots were tilted at more than 60°, verticality was hardly achieved. It is interesting to note that comparable thresholds occurred in root and stem. When coleoptiles were tilted at an angle of $<10°$ from the vertical, the gravitropic response did not happen (Iiono et al., 1996). The first models of differential root growth leading to curvature took into account the presentation time (minimal duration of stimulation in the gravitational field; Larsen, 1957), in which the response was the function of the logarithm of the stimulus. Later, Perbal et al. (2002) observed that the hyperbolic model (H), related to a ligand-receptor system response, fitted better the experimental data. Other models took into account the differential growth among opposite cell lineages (Zieschang et al., 1997). Another interesting parameter used for approaching gravisensing mechanisms is the estimation of threshold acceleration perceived by organs. Lentil seedlings were grown in microgravity and subjected to low accelerations for several hours (Driss-Ecole et al., 2008). In these conditions, threshold acceleration perceived was inferior to 2.0×10^{-3} *g*.

MOST EXPERIMENTAL DESIGNS DO NOT ALLOW TO DISCRIMINATE BETWEEN GRAVISENSING AND MECHANOSENSING

As demonstrated above through mathematical models of stem gravitropic movements (Bastien et al., 2013, 2014), both gravisensing and mechanosensing lead to the reorientation of the plant. It is not clear whether gravisensing and mechanosensing act through the same mechanisms, and to what extent one can differentiate these stimuli. Trewavas and Knight (1994) considered that gravisensing is derived from an ancestral touch perception apparatus.

Mechanosensing occurs when plants are touched. Jaffe (1973) used the term of thigmomorphogenesis when describing the growth response of plants over time following repeated touching. In the literature numerous studies referring to mechanical stimulation concerned the response induced by external loading (Chehab et al., 2008) demonstrating that mechanical cues from the environment are sensed by the plant. Mechanical stresses are also intrinsic to plants and an increasing number of studies illustrate the occurrence of mechanosensing in cells and organs and its importance for the shape determination (Mirabet et al., 2011; Hamant, 2013). For example, it has been demonstrated that cells in *Arabidopsis* shoot apical meristem respond to local mechanical stresses by reorienting their growth, thereby guiding morphogenesis (Uyttewaal et al., 2012).

A gravistimulation as such should induce neither organ deformation nor touch. In several gravitropism studies, the plant or the organ have been tilted without being staked before (Azri et al., 2009; Tocquard et al., 2014b). Although such conditions allowed gravitropic movements, they also allowed organ bending under its own weight. This deformation of the organ can be considered as a thigmomorphogenetic stimulus (Coutand, 2010). In this context, both mechanosensing and gravisensing occur. Alternatively, staking of plants just before tilting might induce touch gene expression that could also interfere with graviresponse pathways. It remains a challenge to find an experimental design, which could allow discriminating between gravi and mechanosensing mechanisms.

IDENTIFICATION OF CELLULAR AND MOLECULAR ACTORS IN GRAVISENSING MECHANISMS

THE GRAVI-SENSING SITES

The most challenging research question is the identification of the tissues and/or cells able to sense and then perceive changes in the gravity vector.

Much insight on plant response to gravity is obtained by the study of organs exhibiting primary growth. The root columella located inside the root cap, which comprises polarized cells, is considered to be the key site of gravity sensing and perception.

Columella cells contain starch-filled amyloplasts able to move under a change of gravity direction. The singularity of these organs is the spatial separation of the perception site from the responsive zone. Conversely, gravity sensing and response occur in the same region of young stems. The endoderm, located between the epiderm and the phloem, is considered as the gravi-sensing site. This tissue contains amyloplasts in young stems of herbaceous and ligneous species such as poplar (**Figures 1A,C**; Azri et al., 2013).

What happens in organs showing secondary growth? It is not possible to identify the endoderm in tree shoots since most bark cells are filled with starch (**Figures 1B,D**). Hence, the gravisensing cells are not identified yet neither are the gravisensing mechanisms (Tocquard et al., 2014b) leading to RW formation. RW can be induced by inclining a staked tree (Coutand et al., 2014) which suggests the modulation of cambial activity by gravistimulation *per se*, that occurs without the influence of mechanical deformation of the stem. Even if the gravisensing site for root undergoing a secondary growth in root is not yet identified, one could question if the cambium could be considered as an additional gravi-sensing site in roots.

PROPOSED CONCEPTS AND MOLECULAR ACTORS

Despite, or maybe because of, the lack of indisputable protocol for the study of gravisensing in plants, various (opposite or complementary?) concepts are proposed related to the perception-transduction of the gravitropic stimulus. The starch-statolith hypothesis (Sack, 1997) explains that the direction of gravity is perceived by the plant through the sedimentation of starch-filled amyloplasts, named statolith, within specialized cells. The gravitational pressure hypothesis (Staves, 1997) suggests that mechanical deformation of the protoplast, cytoskeleton and cell wall components is the starting event of gravitropism. Another concept called "the tensegrity concept" (Ingber, 1997) assumes that the membrane is outstretched on the cytoskeleton backbone and that this system is in a state of equilibrium, between tensile and compressive forces. This concept is very suitable for explaining the perception of mechanical stress at the cell surface and the transmission to the intracellular compartment. The common idea that gravity-induced effects are initiated within the cells (Trewavas and Knight, 1994), is compatible with the tensegrity model which proposes that gravistimulation may unbalance the tensegrity forces and trigger

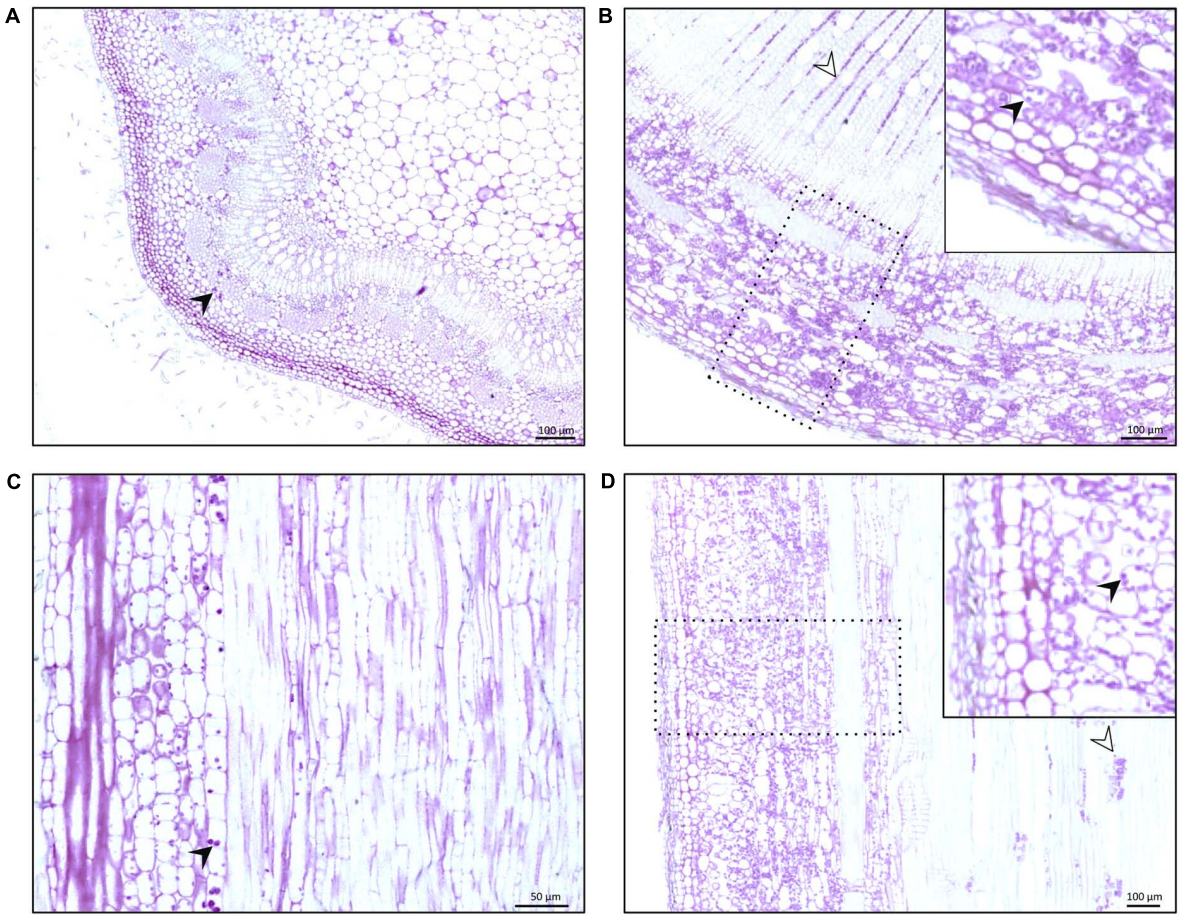


FIGURE 1 | Transversal (A,B) and longitudinal (C,D) stem sections of poplar tree, *Populus tremula* × *alba*, stained with Periodic Acid-Schiff (PAS). This stain reveals the presence of starch and polysaccharides in dark purple. **(A,C)** Arrows indicate the presence of starch rich-amyloplasts in the endoderm of the primary growth-stem, at 3 cm from the stem apex. **(B,D)** Arrows and rectangles indicate wood rays and bark of secondary growth stem, respectively. Both tissues contain starch rich-granules.

cellular responses via membrane kinase proteins (Volkmann and Baluška, 2006). A complementary concept proposes that plant cells could sense gravity using the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum (CPMCW; Pickard and Ding, 1993; Baluška et al., 2003). Baluška and Volkmann (2011) discussed these different theories. Whichever theory is applied, the role of the amyloplasts and of the CPMCW with possible protein linkers seems realistic.

In the literature, some arguments corroborate parts of these hypothetic mechanisms. In roots, it has been suggested that the gravity-induced movements of amyloplasts could activate mechanosensing ion channels either in the amyloplast envelope or in reticulum endoplasmic and/or plasma membrane (Boonsirichai et al., 2002; Perbal and Driss-Ecole, 2003). These mechanosensing channels could be considered as gravi-receptors in inducing calcium dependent-signaling pathways. More recently it has been shown that plastids participate to root gravitropism not only through their sedimentation but also they likely play a role in the signal transduction pathway through the Translocon of the Outer envelope of the Chloroplast (TOC; Strohm et al., 2014). These findings implicate the functional interaction between plastids and actin cytoskeleton possibly via functions of TOC. In the same way, the investigation of plastid behavior in stem clearly demonstrates their role in gravi-perception (Morita and Nakamura, 2012). The plastid movements in stem are affected by the large and central vacuole of the endodermal cells. Moreover, genetic screening for *Arabidopsis* mutants with modified shoot gravitropism indicated that the vacuole is important for gravity perception (Morita, 2010).

More generally, within a putative perceptive cell, several molecular candidates could play a role in gravisensing. Two types of receptors could be involved including mechanosensitive ion channels and receptor like kinases (RLK). RLK are transmembrane proteins, composed of one or more extracellular domains, a single transmembrane domain and an intracellular kinase domain (Lehti-Shiu et al., 2009; Gish and Clark, 2011). RLK could act as sensors of the cell wall and restore its status to the cell wall by phosphorylation of the kinase domain. Among RLK, wall associated kinase (WAK) and *Catharanthus roseus* RLK1-like subfamilies are proposed to be cell wall status sensors (Gish and Clark, 2011; Engelsdorf and Hamann, 2014; Tocquard et al., 2014a). They could be involved in gravisensing by perceiving the deformation between the cell wall and the plasma membrane. Gens et al. (2000) hypothesized the existence of an architectural organization involving WAK, arabinogalactan proteins (AGP) at the interface between cytoplasm and cell wall. Several studies also showed the upregulation of AGP in response to gravistimulation (Lafarguette et al., 2004; Azri et al., 2014). This "plasmalemmal reticulum" could play a critical role in mechanosensing and possibly gravisensing (Gens et al., 2000). More recently, it has been shown that mechanosensitive channels including MCA2 could be also involved in gravisensing (Monshausen and Haswell, 2013; Iida et al., 2014).

The plant cytoskeleton is considered as a major receiver as well as transducer of mechanical signals. Nick (2011) presented the cytoskeleton as a tensegrity sensor. In this model, microfilaments (MF) are considered as the contractile and tensile elements while the microtubules (MT) are more rigid and resistant to compression. Bancaflor (2013) highlighted the apparent inconsistencies about the effects of actin inhibitory compounds on root gravitropism, and proposed models for how MF might regulate negatively gravitropism. The full understanding of the MF involvement in gravitropism has also to take into account the differences in actin organization between the root columella and the shoot endodermis cells, the former having first fine and short MF while the latter contain distinct F-actin bundles (Morita, 2010; Bancaflor, 2013). Several authors have suggested that gravitropic bending can trigger altered MT organization (Ikushima and Shimmen, 2005; Jacques et al., 2013; Toyota and Gilroy, 2013). In addition, gravitropism can be inhibited by antimicrotubular drugs or mutations affecting the dynamics of MT (Nick, 2012). On the contrary, tropic bending occurred in roots pretreated with microtubule depolymerizing agents (Bisgrove, 2008). These observations and others (Bisgrove, 2008) do not allow to discriminate the involvement of MT in gravisensing versus graviresponse, i.e., gravitropic bending. The difficulty to univocally show that the cytoskeleton is a tensegrity sensor may come from the fact that most studies examined either the involvement of MF or MT (Nick, 2013; Tatsumi et al., 2014) in gravitropism, although the cytoskeleton is far more complex. Indeed, evidence was brought that functional and structural interactions occurred between MT and actin, and that numerous proteins interacted with the cytoskeleton (Collings et al., 1998; Kotzer and Wasteneys, 2006).

HOW TO GO FURTHER TO GRASP GRAVISENSING?

As just highlighted above, it is crucial to reliably discriminate gravisensing from mechanosensing, and the same goes for sensing from the signal transduction and early responsive elements. According to Nick (2011) clear concepts of the sensing mechanisms have to be elaborated in order to design unequivocal experimental approaches. Incidentally, the effect of the direction of light as well as the light quality have also to be taken into account in designing an experiment that wish to focus on gravisensing and graviresponse as multiple light signaling pathways interact with gravitropism (Mullen and Kiss, 2008). Importantly, to our mind the gravistimulation should not cause bending that could lead to organ and tissue deformation. Consequently, the study of gravisensing has to be done before any curving response occurred. Another way is the utilization of microgravity conditions through space experiments (Ruyters and Braun, 2014).

Furthermore, there is a general consensus on the identity of the gravisensing cells in primary shoot and root while these cells remained to be localized in organs driven by secondary growth. Further insights on this subject are impaired by the compulsory use of ligneous species models. For instance, in the ligneous model *Populus trichocarpa*, very few mutants are available compared to *Arabidopsis thaliana*, which was used in most studies. One can even ask if the tissues in secondary growth are able to perceive gravity or if they respond to a signal coming from the apexes.

Another challenge is to identify the gravity receptors in roots and in stems. Approaches such as transcriptomics and proteomics

combined with the study of mutants could lead to the inference of a network of genes involved in gravisensing. In addition, it will be interesting to investigate the functional interaction between the cytoskeleton and gravi-sensors. In parallel, modelization of the mechanical deformation of the cytoskeleton could help to understand the function of the cytoskeleton network in gravitropism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by the French National Research Agency (ANR, "TROPIC" project 11-BSV7-0012). The authors thank the French Space Agency, the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) for financial support.

REFERENCES

Archer, R. R. (1986). *Growth Stresses and Strains in Trees.* Berlin: Springer-Verlag.

Azri, W., Brunel, N., Franchel, J., Ben Rejeb, I., Jacquot, J.-P., Julien, J.-L., et al. (2013). Putative involvement of thioredoxin H in early response to gravitropic stimulation of poplar stems. *J. Plant Physiol.* 170, 707–711. doi: 10.1016/j.jplph.2012.12.017

Azri, W., Chambon, C., Herbette, S., Brunel, N., Coutand, C., Leplé, J. C., et al. (2009). Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation. *Physiol. Plant.* 136, 193–208. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01230.x

Azri, W., Ennajah, A., Nasr, Z., Woo, S.-Y., and Khaldi, A. (2014). Transcriptome profiling the basal region of poplar stems during the early gravitropic response. *Biol. Plant.* 58, 55–63. doi: 10.1007/s10535-013-0364-7

Baluška, F., Šamaj, J., Wojtaszek, P., Volkmann, D., and Menzel, D. (2003). Cytoskeleton – plasma membrane – cell wall continuum in plants: emerging links revisited. *Plant Physiol.* 133, 482–491. doi: 10.1104/pp.103.027250

Baluška, F., and Volkmann, D. (2011). "Mechanical aspects of gravity-controlled growth, development and morphogenesis," in *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants, Signaling and Communication in Plants*, ed. P. Wojtaszek (Heidelberg: Springer), 195–223.

Bancaflor, E. B. (2013). Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton. *Am. J. Bot.* 100, 143–152. doi: 10.3732/ajb.1200283

Barlow, P. W., Parker, J. S., Butler, R., and Brain, P. (1993). Gravitropism of primary roots of *Zea mays* L. at different displacement angles. *Ann. Bot.* 71, 383–388. doi: 10.1006/anbo.1993.1048

Barlow, P. W., and Rathfelder, E. L. (1985). Distribution and redistribution of extension growth along vertical and horizontal gravireacting maize roots. *Planta* 165, 134–141. doi: 10.1007/BF00392222

Bastien, R., Bohr, T., Moulia, B., and Douady, S. (2013). Unifying model of shoot gravitropism reveals proprioception as a central feature of posture control in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 755–760. doi: 10.1073/pnas.1214301109

Bastien, R., Douady, S., and Moulia, B. (2014). A unifying modeling of plant shoot gravitropism with an explicit account of the effects of growth. *Front. Plant Sci.* 5:136. doi: 10.3389/fpls.2014.00136

Bisgrove, S. R. (2008). The roles of microtubules in tropisms. *Plant Sci.* 175, 74. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.08.009

Boonsirichai, K., Guan, C., Chen, R., and Masson, P. H. (2002). Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53, 421–447. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135158

Chehab, W., Eich, E., and Braam, J. (2008). Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *J. Exp. Bot.* 60, 43–56. doi: 10.1093/jxb/ern315

Collings, D. A., Asada, T., Allen, N. S., and Shibaoka, H. (1998). Plasma membrane-associated actin in bright yellow 2 tobacco cells – evidence for interaction with microtubules. *Plant Physiol.* 118, 917–928. doi: 10.1104/pp.118.3.917

Coutand, C. (2010). Mechanosensing and thigmomorphogenesis, a physiological and biomechanical point of view. *Plant Sci.* 179, 168–182. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.05.001

Coutand, C., Fournier, M., and Moulia, B. (2007). The gravitropic response of poplar trunks: key roles of prestressed wood regulation and the relative kinetics of cambial growth versus wood maturation. *Plant Physiol.* 144, 1166–1180. doi: 10.1104/pp.106.088153

Coutand, C., Pot, G., and Badel, E. (2014). Mechanosensing is involved in the regulation of autostress levels in tension wood. *Trees* 28, 687–697. doi: 10.1007/s00468-014-0981-6

Driss-Ecole, D., Driss-Ecole, D., Legué, V., Carnero-Diaz, E., and Perbal, G. (2008). Gravisensitivity and automorphogenesis of lentil seedling roots grown on board the International Space Station. *Physiol. Plant.* 134, 191–201. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01121.x

Engelsdorf, T., and Hamann, T. (2014). An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity. *Ann. Bot.* 114, 1339–1347. doi: 10.1093/aob/mcu043

Firn, R. D., and Digby, J. (1979). A study of the autotropic straightening reaction of a shoot previously curved during geotropism. *Plant Cell Environ.* 2, 149–154. doi: 10.1111/j.1365-3040.1979.tb00786.x

Galland, P. (2002). Tropisms of Avena coleoptiles: sine law for gravitropism, exponential law for photogravitropic equilibrium. *Planta* 215, 779–784. doi: 10.1007/s00425-002-0813-6

Gens, J. G., Fujiki, M., and Pickard, B. G. (2000). Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma* 212, 115–134. doi: 10.1007/BF01279353

Gish, L. A., and Clark, S. E. (2011). The RLK/Pelle family of kinases. *Plant J.* 66, 117–127. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04518.x

Göttig, M., and Galland, P. (2014). Gravitropism in Phycomyces: violation of the so-called resultant law – evidence for two response components. *Plant Biol.* 16, 158–166. doi: 10.1111/plb.12112

Hamant, O. (2013). Widespread mechanosensing controls the structure behind the architecture in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 654–660. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.006

Hoshino, T., Miyamoto, K., and Ueda, J. (2007). Gravity controlled asymmetrical transport of auxin regulates a gravitropic response in the early growth stage of etiolated pea (*Pisum sativum*) epicotyls: studies using stimulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat and using an agravitropic mutant, ageotropum. *J. Plant Res.* 120, 619–628. doi: 10.1007/s10265-007-0103-2

IAWA. (1964). Multilingual glossary of terms used in wood anatomy. International Association of Wood Anatomists, Committee on Nomenclature Vergsanstalt Buchdruckerei Konkordia, Winterthur, 186.

Iida, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Sokabe, M., and Tatsumi, H. (2014). New candidates for mechano-sensitive channels potentially involved in gravity sensing in *Arabidopsis thaliana. Plant Biol.* 16, 39–42. doi: 10.1111/plb.12044

Iiono, M., Tarui, Y., and Uematsu, C. (1996). Gravitropism of maize and rice coleoptiles: dependence on the stimulation angle. *Plant Cell Environ.* 19, 1160–1168. doi: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00431.x

Ikushima, T., and Shimmen, T. (2005). Mechano-sensitive orientation of cortical microtubules during gravitropism in azuki bean epicotyls. *J. Plant Res.* 118, 19–26. doi: 10.1007/s10265-004-0189-8

Ingber, D. E. (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 575–599. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.575

Ishikawa, H., and Evans, M. L. (1993). The role of the distal elongation zone in the response of maize rots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* 102, 1203–1210. doi: 10.1104/pp.102.4.1203

Jacques, E., Buytaert, J., Wells, D. M., Lewandowski, M., Bennett, M. J., Dirckx, J., et al. (2013). Microfilament analyzer, an image analysis tool for quantifying fibrillar orientation, reveals changes in microtubule organization during gravitropism. *Plant J.* 74, 1045–1058. doi: 10.1111/tpj.12174

Jaffe, M. J. (1973). Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* 114, 143–157. doi: 10.1007/BF00387472

Kotzer, A. M., and Wasteneys, G. O. (2006). Mechanisms behind the puzzle: microtubule-microfilament cross-talk in pavement cell formation. *Can. J. Bot.* 84, 594–603. doi: 10.1139/b06-023

Lafarguette, F., Leple, J. C., Dejardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M. C., et al. (2004). Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol.* 164, 107–121. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01175.x

Larsen, P. (1957). The development of geotropic and spontaneous curvatures in roots. *Physiol. Plant.* 10, 12–163. doi: 10.1111/j.1399-3054.1957.tb07617.x

Lehti-Shiu, M. D., Zou, C., Hanada, K., and Shiu, S. H. (2009). Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol.* 150, 12–26. doi: 10.1104/pp.108.134353

Mirabet, V., Das, P., Boudaoud, A., and Hamant, O. (2011). The role of mechanical forces in plant morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 365–385. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103852

Monshausen, G. B., and Haswell, E. S. (2013). A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *J. Exp. Bot.* 64, 4663–4680. doi: 10.1093/jxb/ert204

Morita, M. T. (2010). Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 705–720. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092042

Morita, M. T., and Nakamura, M. (2012). Dynamic behavior of plastids related to environmental response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 722–728. doi: 10.1016/j.pbi.2012.08.003

Moulia, B., Der Loughian, C., Bastien, R., Martin, L., Rodriguez, M., Gourcilleau, D., et al. (2011). "Integrative mechanobiology of growth and architectural development in changing mechanical environments," in *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants, Signaling and Communication in Plants,* ed. P. Wojtaszek (Heidelberg: Springer), 269–302.

Moulia, B., and Fournier, M. (2009). The power and control of gravitropic movements in plants: a biochemical and systems view. *J. Exp. Bot.* 60, 461–486. doi: 10.1093/jxb/ern341

Mullen, J. L., and Kiss, J. Z. (2008). "Phototropism and its relationship to gravitropism," in *Plant Tropisms* eds S. Gilroy and P. Masson (Ames: Blackwell Publishing), 79–90.

Nick, P. (2011). "Mechanics of the cytoskeleton," in *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants, Signaling and Communication in Plants*, ed. P. Wojtaszek (Heidelberg: Springer), 53–90. doi: 10.1007/978-3-642-19091-9_3

Nick, P. (2012). Microtubules and the tax payer. *Protoplasma* 249(Suppl. 2), S81–S94. doi: 10.1007/s00709-011-0339-5

Nick, P. (2013). A glorious half-century of microtubules–microtubules, signaling and abiotic stress. *Plant J.* 75, 309–323. doi: 10.1111/tpj.12102

Perbal, D., and Driss-Ecole, D. (2003). Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends Plant Sci.* 8, 498–504. doi: 10.1016/j.tplants.2003.09.005

Perbal, G., Jeune, B., Lefranc, A., Carnero-Diaz, E., and Driss-Ecole, D. (2002). The dose-response curve of the gravitropic reaction: a re-analysis. *Physiol. Plant.* 114, 336–342. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140302.x

Pickard, B. G. (1985). "Roles of hormones, protons and calcium in geotropism," in *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 3, eds R. P. Phais and D. M. Reid (Berlin: Springer), 193–281.

Pickard, B. G., and Ding, J. P. (1993). The mechanosensory calcium-selective ion channel: key component of a plasmalemmal control centre? *Aust. J. Plant Physiol.* 20, 439–459. doi: 10.1071/PP9930439

Ruyters, G., and Braun, M. (2014). Plant biology in space: recent accomplishments and recommendations for future research. *Plant Biol.* 16(Suppl. 1), 4–11. doi: 10.1111/plb.12127

Sachs, J. (1882). "Uber Ausschlieβung der geotropischen und heliotropischen Krümmungen während des Waschsens," in *Arbeiten des Botanischen Instituts in Würzburg* , Vol. 2 (Leipzig: Verlag Von Wilhelm Engelmann), 209–225.

Sack, F. D. (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta* 203, S63–S68. doi: 10.1007/PL00008116

Selker, J. M. L., and Sievers, A. (1987). Analysis of extension and curvature during the graviresponse in Lepidium roots. *Am. J. Bot.* 74, 1863–1871. doi: 10.2307/2443968

Stankovic, B., Volkmann, D., and Sack, F. D. (1998). Autotropism, automorphogenesis and gravity. *Physiol. Plant.* 102, 328–335. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1020222.x

Staves, M. P. (1997). Cytoplasmic streaming and gravity sensing in Chara internodal cells. *Planta* 203, S79–S84. doi: 10.1007/PL00008119

Strohm, A. K., Barrett-Wilt, G. A., and Masson, P. H. (2014). A functional TOC complex contributes to gravity signal transduction in *Arabidopsis. Front. Plant Sci.* 5:148. doi: 10.3389/fpls.2014.00148

Tatsumi, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Hayakawa, K., Sokabe, M., et al. (2014). Mechanosensitive channels are activated by stress in the actin stress fibres, and could be involved in gravity sensing in plants. *Plant Biol.* 16, 18–22. doi: 10.1111/plb.12095

Tocquard, K., Lafon-Placette, C., Auguin, D., Muries, B., Bronner, G., Lopez, D., et al. (2014a). In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale expansion potentially connected with functional diversification in *Populus. Tree Genet. Genomes* 10, 1135–1147. doi: 10.1007/s11295-014-0748-7

Tocquard, K., Lopez, D., Decourteix, M., Thibaut, B., Julien, J. L., Label, P., et al. (2014b). "The molecular mechanisms of reaction wood induction," in *The Biology of Reaction Wood*, eds B. Gardiner, J. Barnett, P. Saranpää, and J. Gril (Heidelberg: Springer), 107–138.

Tomos, A. D., Malone, M., and Pritchard, J. (1989). The biophysics of differential growth. *Environ. Exp. Bot.* 29, 7–23. doi: 10.1016/0098-8472(89)90035-X

Toyota, M., and Gilroy, S. (2013). Gravitropism and mechanical signaling in plants. *Am. J. Bot.* 100, 111–125. doi: 10.3732/ajb.1200408

Trewavas, A., and Knight, M. (1994). Mechanical signaling, calcium and plant form. *Plant Mol. Biol.* 26, 1329–1341. doi: 10.1007/BF00016478

Uyttewaal, M., Burian, A., Alim, K., Landrein, B., Borowska-Wykret, D., Dedieu, A., et al. (2012). Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis. Cell* 149, 439–451. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.048

Volkmann, D., and Baluška, F. (2006). Gravity: one of the driving forces for evolution. *Protoplasma* 229, 143–148. doi: 10.1007/s00709-006-0200-4

Zieschang, H. E., Brain, P., and Barlow, P. W. (1997). Modelling of root growth and bending in two dimensions. *J. Theor. Biol.* 184, 237–246. doi: 10.1006/jtbi.1996.0259

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 02 June 2014; accepted: 20 October 2014; published online: 05 November 2014.

*Citation: Lopez D, Tocquard K, Venisse J-S, Legué V and Roeckel-Drevet P (2014) Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. Front. Plant Sci. **5**:610. doi: 10.3389/fpls.2014.00610*

This article was submitted to Plant Physiology, a section of the journal Frontiers in Plant Science.

Copyright © 2014 Lopez, Tocquard, Venisse, Legué and Roeckel-Drevet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Réponse précoce induites par la gravi-stimulation

La perception de l'inclinaison correspond à la transformation d'un signal physique en signal biochimique (Toyota and Gilroy, 2013). Après que l'inclinaison soit perçue par la plante, une transduction du signal biochimique *via* des messagers secondaires se met en place pour initier les réponses cellulaires précoces permettant le redressement. Ces réponses correspondent à des modifications du métabolisme de la cellule ainsi qu'à la modulation de l'expression de gènes.

Les différents messagers cellulaires ont principalement été étudiés chez des plantes annuelles en croissance primaire, où la réponse de redressement se met en place en quelques heures. Différentes voies de signalisation semblent être initiées après inclinaison. Ces différentes voies de signalisation conduisent à la modulation de l'expression de gènes pour mettre en place la réponse physiologique de redressement. Parmi les voies de signalisation mises en jeu dans le cadre du gravitropisme, celle(s) impliquant le calcium sont les plus étudiées (Toyota and Gilroy, 2013). Gehring *et al.* (1990) localisent une augmentation rapide de la concentration en Ca^{2+} cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) au niveau de la face inférieure de coléoptiles de maïs inclinés. L'intensité et la durée des flux calciques ont été étudiées dans des plantules d'Arabidopsis exprimant une protéine luminescente en présence de calcium (aequorine). Ces études montrent une augmentation biphasique de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ lors d'une gravistimulation contrairement aux augmentations monophasiques lors d'autres stimuli mécaniques (Plieth and Trewavas, 2002). La première phase dure une vingtaine de seconde et la seconde phase observée seulement lors d'une gravistimulation démarre 90 secondes après l'inclinaison et dure plusieurs minutes. Toyota *et al.* (2008) ont montré que cette augmentation était localisée plutôt au niveau de l'hypotcotyle et des pétioles de plantules d'Arabidopsis. Ils montrent que le second pic est spécifique de l'inclinaison et dépend de l'angle d'orientation des plantules alors que le premier est dépendant de la vitesse d'orientation.

L'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) est un autre messager secondaire montrant une accumulation asymétrique après gravistimulation (Perera *et al.*, 1999). L'InsP3 est produit à partir de l'hydrolyse de PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) par la phospholipase C (PLC). La suppression de l'accumulation d'InsP3 causée par un inhibiteur de l'activité de la PLC diminue la réponse gravitropique (Perera *et al.*, 2001). L'utilisation de plantes surexprimant constitutivement une protéine qui hydrolyse InsP3 montre une réduction de 30% du redressement de racines, d'inflorescence et d'hypocotyles d'Arabidopsis. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation par l'InsP3 intervient dans les réponses précoces à l'inclinaison.

D'autres mécanismes moléculaires seraient mis en place après l'inclinaison. Selon Boonsirichai *et al.* (2003), la protéine ARG1 (Altered Response to Gravity) est nécessaire dans la réponse précoce des racines et des hypocotyles d'Arabidopsis après inclinaison. Des plantes d'Arabidopsis mutantes pour ce gène ont comme leur nom l'indique une réponse de redressement altérée (Sedbrook *et al.*, 1999). Des plantes mutantes *arg1* transformées par des constructions où le gène *ARG1* est sous le contrôle de promoteurs spécifiques des cellules de la coiffe racinaire ou de l'endoderme présentent une réponse de redressement comme les plantes sauvages suggérant un rôle de ces protéines dans les statocytes lors du redressement (Boonsirichai *et al.*, 2003). Le phénotype *arg1* est accentué dans des plantes présentant la double mutation *arg1* et *toc132* (Stanga *et al.*, 2009). Les complexes protéiques TOC au niveau de la membrane de plastes (Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplasts) pourraient alors assurer un rôle dans le gravitropisme chez Arabidopsis (Strohm *et al.*, 2014). Selon ces auteurs, l'import de molécule(s) dans les plastes serait requis pour le redressement. Toutefois l'identification de la (des) molécule(s) importées ainsi que la (les) interaction(s) avec la (les) voie(s) nécessitant ARG1 est nécessaire pour mieux comprendre ce mécanisme.

Chez le peuplier, le redressement des tiges grâce au retrait des microfibrilles de cellulose lors de la maturation des cellules du bois de tension est visible 1 à 2 semaines après inclinaison (Coutand *et al.*, 2007). Au sein de ce processus de plusieurs jours, nous appelons réponses précoces les événements qui se déroulent dans les premières heures après inclinaison. Cela correspond aux mécanismes de signalisation qui suivent l'inclinaison et qui commanderaient à des modifications de processus métaboliques et/ou de transcription de gènes. Il peut être pertinent de se focaliser sur ces étapes précoces dans l'étude de la perception puis la transmission du signal car, si l'on regarde plusieurs jours après inclinaison, les processus de réponses cellulaires se sont mis en place au sein des tissus bien que le redressement ne soit pas visible, mais la stimulation gravitropique est toujours effective.

Le chapitre suivant, publié par K. Tocquard, D. Lopez, M. Decourteix, B. Thibaut, JL. Julien, P. Label, N. Leblanc-Fournier et P. Roeckel-Drevet dans le livre « The Biology of Reaction Wood » aux éditions Springer dans la série « Wood Science » intitulé : « The Molecular Mechanisms of Reaction Wood Induction », 2014, volume 5, est une synthèse bibliographique des travaux effectués sur les mécanismes moléculaires mis en place dans la production de bois de tension. Le paragraphe 4.2.3 développe plus spécifiquement les différentes voies de signalisation qui interviendraient dans la réponse précoce à l'inclinaison.

Chapter 4
The Molecular Mechanisms of Reaction Wood Induction

Kévin Tocquard, David Lopez, Mélanie Decourteix, Bernard Thibaut, Jean-Louis Julien, Philippe Label, Nathalie Leblanc-Fournier, and Patricia Roeckel-Drevet

Abstract Reaction wood originates from cambial activity which adjust cell division activity, proportion of fibres, cell wall structure and properties, so that the resulting growth event will be the appropriate response to endogenous and environmental stimuli.

When addressing the question of the induction of reaction wood formation, the physical parameters inducing reaction wood are first presented leading to discuss the importance of gravisensing versus proprioception (sensing of the local curvature of the stem) in this process.

Molecular candidates for the perception of cellular deformation that is hypothesized to occur in a gravistimulated stem are located at the CPMCW (cytoskeleton–plasma membrane–cell wall) continuum. These candidates would mediate intracellular signalling. Insights from global approaches (e.g. transcriptome and proteome analyses) performed on tilted trees suggest calcium, reactive oxygen species and phosphatidylinositol signalling in the gravitropism sensing network. It has been unambiguously shown that several of the aux/IAA gene family mediators of auxin signal transduction pathway change on induction of tension wood formation. Gibberellins and ethylene seem also to be involved in reaction wood formation. The role of these different plant hormones in upstream primary response to reaction wood sensing or alternatively in the transmission of the signal from the perception to the reaction wood forming cells is discussed.

K. Tocquard • D. Lopez • M. Decourteix • J.-L. Julien • P. Label • N. Leblanc-Fournier • P. Roeckel-Drevet (✉)
Clermont Université – Université Blaise Pascal, INRA, UMR PIAF, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

B. Thibaut
Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC), CNRS, Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, cc 048, 34095 Montpellier cedex 5, France

B. Gardiner et al. (eds.), *The Biology of Reaction Wood*, Springer Series in Wood Science, DOI 10.1007/978-3-642-10814-3_4, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

4.1 Introduction

Reaction wood (RW) develops in stems and branches in response to the perception of endogeneous and environmental stimuli caused by a change in the natural position. As a result the stem or branch bends back towards its original position. It is generally stated that in most cases, in gymnosperms RW is formed on the lower side of branches and bent stems and is called compression wood (CW). In angiosperms it is formed on the upper side of branches and bent stems and is called tension wood (TW). Wood formed on the other side of branches and bent stems is called opposite wood (OW).

It was commonly believed until the end of the 1980s that RW was induced by the stress state of the new wood layer at cambium vicinity. The bottom of a branch should be in compression thus promoting CW in gymnosperms, the top being in tension should promote TW in angiosperms. For experimentation the challenge was to submit the external layer of a living stem to high tensile or compressive axial stress without any other signal such as gravity or light, and without too big a physiological stress due to the mechanical loading. Fournier et al. (1994) showed that the cross section grows while it is loaded. For each material point, the superposition of stress and strain begins from the time the material is differentiated. That comes from the obvious assumption that "a tissue cannot be loaded before it exists". The main consequence is that the new wood layer does not contribute at all to support the load of the existing trunk or branch and the resulting support stress should be zero at the stem periphery. A change of paradigm therefore had to be made: it is not the stress that induces RW formation but the RW formation that produces different stress levels (in tension or compression) in the new wood layer.

Very often, successive growth events are used by trees "to solve" some mechanical problem, in addition to building of the prescribed structure, in order to restore the posture of an inclined tree (Thibaut et al. 2001; Moulia et al. 2006), to search for the light, to change the tree architecture after death of a major axis, and so on. RW is a solution for a drastic and sudden change in the existing wooden structure of the tree. It is commonly used by all trees, particularly in the juvenile stage. RW is created very locally in answer to a global mechanical problem for the tree by creating a step change in the pre-stressing state of the new layer. According to modelling simulations, the curving efficiency of asymmetrical stressing of the axis using RW is nearly five times higher than the best solution using normal wood asymmetry alone (Almeras and Fournier 2009).

Solving the mechanical problems of a tree through growth is possible because of the flexibility in growth of the meristematic tissues in the length or ramification (primary growth) and the diameter (secondary growth) of each axis (trunks and branches). This structure needs to be mechanically sound and able to respond to most hazards faced by the tree. In the tree, each elementary growth event has to be precisely managed: action or dormancy, rapid or slow cell division, cell differentiation and cell wall formation. And each of these events has mechanical consequences. In addition, the new growth events that involve primary and/or secondary

growth seem to be coordinated at the whole tree level. RW originates from cambial activity (secondary meristem), which adjusts the number of cell division to modify the axis diameter and in particular its second moment of area, as well as the proportion of fibers and the cell wall thickness to modify the density and the mechanical properties of the new layer. Through cambial activity the microfibril angle (MFA) in the S2 layer of the cell wall is also adjusted to modify the axis flexibility both by changing the modulus of elasticity for a given tissue density and the maximum allowed strain before damage (more flexibility appears to be an adaptation to wind); this may also modify the pre-stressing state of the new wooden layer. Last but not least, cambial activity adjusts the chemistry of cell wall components to modify the pre-stressing state of the new wooden layer; this may be done in conjunction with the adjustment of MFA (these changes are discussed further in Chaps. 2, 3, 5 and 6).

Hence, the following questions are raised concerning the induction of RW through modulation of cambial activity. What are the different external or internal signals related to secondary growth in order to solve different mechanical requirements? Where are the perception sites for the new mechanical requirements for the tree? Could a signal get to particular cells in the cambium in order to manage new growth? If such a signal exists from the perceptive cells to the cambium, what about the conversion of the perception into messages transmitted to the secondary meristem? What is the process of "regulation"? How are these messages transcribed in the making of RW? Also most of the questions raised for RW formation could also be addressed to the regulation of primary growth since both primary and secondary growth must be coordinated at the whole tree level.

In this chapter, after reviewing different kinds of signals (gravity, light, mechanical strain) that can induce a mechanical reaction causing RW formation, we will focus on the molecular mechanisms that might be involved in the perception and response to gravity and other mechanical stimuli. Since it is quite clear that the signal perception gives way to synthesis of proteins guiding the production or translocation of various plant hormones, we will review their implication in the gravitropic or phototropic mechanical response inducing the making of RW. We will also discuss the insights provided by global approaches such as transcriptomic, proteomic and metabolomics, made possible by the sequencing and annotation of the genome of trees such as poplar and eucalyptus. In particular, these global approaches gave new information on genes involved in RW formation.

4.2 Perception and Signal Transduction

4.2.1 Physical Parameters Inducing RW

To maintain a branching architecture that is optimal for growth and reproduction, plant stems continuously control their posture to counterbalance environmental physical parameters such as gravity, wind and light, that shift their orientation

from the vertical (Moulia et al. 2006). In trees, this postural control has been mainly studied in response to gravity (Du and Yamamoto 2007). In the primary growing zone of stems, reorientation of woody plant organs involves local differential elongation growth between opposite sides of the stem. In stem parts undergoing radial growth, sectors of RW are produced that can be associated with eccentric cambial growth. In angiosperm woody species, TW is often characterized by fewer vessels and the formation of fibres with smaller diameter containing a gelatinous layer inside the S2 layer of secondary cell walls where cellulose microfibrils are aligned into a vertical orientation (Fig. 4.1 and Mellerowicz et al. 2008; see also Chap. 3) with a lower lignin content (Pilate et al. 2004). In conifers, CW is characterized by tracheids with a thicker secondary cell wall than in normal wood, with higher lignin content, intercellular spaces at cell corners, and a realignment of cellulose microfibrils in the S2 layer orientation with respect to the axis of the stem (Timell 1986). These differences in secondary cell wall biochemical composition and architecture of RW generate internal growth stresses in the stem (Chap. 5), and because of its unilateral formation in the stem, it induces a directional movement, bending the stem towards a favourable position.

As discussed recently by Felten and Sundberg (2013), many experiments were performed where branches or stems are tilted, bent into complicated shapes, grown on clinostats or centrifuges, to identify if a single stimulus is responsible for the induction of RW. For loop experiments on shoots or branches, the localization of RW suggested that its induction depends rather more on positional sensing (sensing of the local angle of the growing organ relative to the gravitational field) than sensing of mechanical stresses such as tensile or compressive stresses (Spurr and Hyvärinen 1954).

However, RW formation is not only induced by gravitational stimulus. TW has been reported to form in the vertical stems of rapidly growing poplar (*Populus*) trees (Telewski 2006). RW was also observed in branches and stems contributing to crowns reshaping after loss of apical dominance (Wilson and Archer 1977) and is part of the mechanism allowing up-righting of apricot tree stems in response to increased shoot and fruit load (Almeras et al. 2004). Plant exposure to wind spray or to repeated stem bending to mimic the wind triggers (1) transitory inclination of the stem, but with a duration of stem inclination much shorter than the presentation time necessary to observe the induction of RW (Jourez and Avella-Shaw 2003) and (2) mechanical signals such as stresses and strains. Exposition of poplar stems to repeated transitory bendings produced a flexure wood with anatomical similarities to TW (Pruyn 1997; Pruyn et al. 2000). In *Abies fraseri*, the morphology and function of wood developed after daily flexures (<20 s) were more closely related to CW than normal wood (Telewski 1989). CW was also detected in wind-treated *Pinus* (Berthier and Stokes 2005). One of the best examples demonstrating that RW is not exclusively induced in response to positional sensing came from analysis of the kinematics of stem straightening (for review, see Moulia et al. 2006; Moulia and Fournier 2009). The characterization of the spatio-temporal curvature field during stem straightening allowed the recognition of a biphasic pattern: an initial phase of spatially homogeneous up-curving due to gravitropic response and a second phase of stem decurving that propagates basipetally to finally reach a steady state where

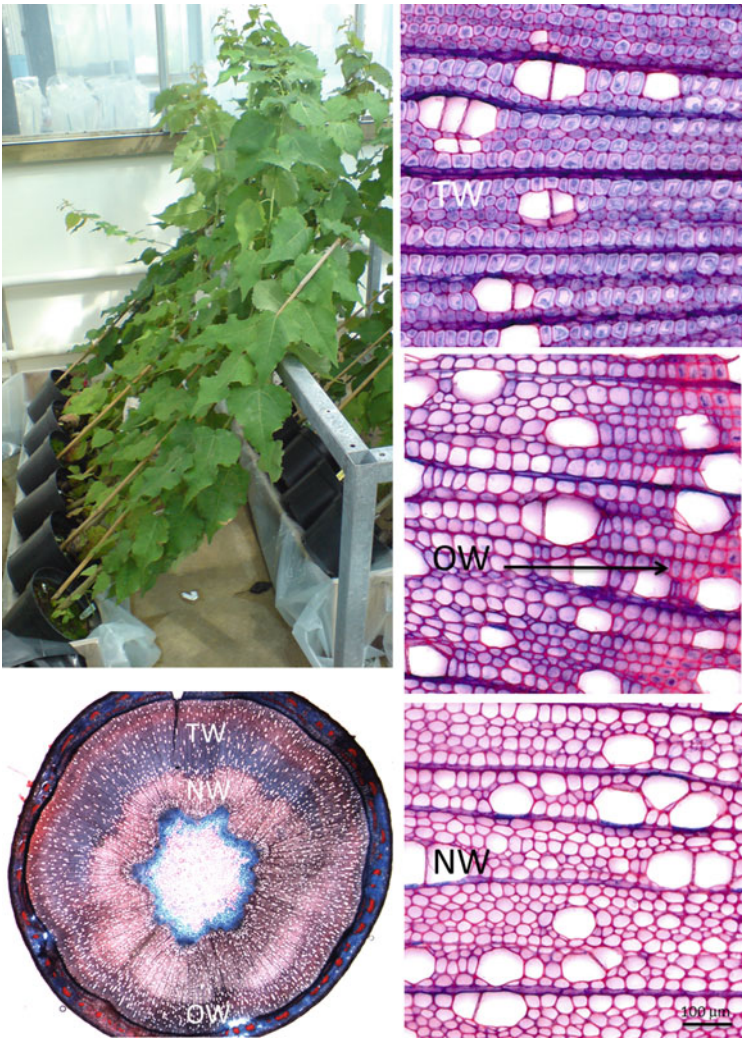


Fig. 4.1 Induction of TW by tilting of hybrid aspen trees (*Populus tremula* × *tremuloides*). After 17 days of tilting, a band of TW (TW) is seen on the upper side of the tilted stems. The mature normal wood (NW) produced before tilting, and the opposite wood (OW) produced at the lower side of the stems are shown at higher magnification on the right side of the figure. The sections were stained with safranin and alcian blue. Picture courtesy of Ewa Mellerowicz

the curvature is concentrated to the base of the growth zone. In some plants, this decurving phase occurred before the shoot apex had overshot the vertical, demonstrating that this phenomenon was not due to the perception of the inclination angle, and was called autotropism. This autotropic decurving has been observed in many plants (Moulia et al. 2006). Studying this process in poplars (*Populus nigra* × *Populus deltoides*), Coutand et al. (2007) observed that no part of the trunk overshot

the vertical during stem straightening. Indeed, during the initial phase of up-righting, arcs of RW were detected homogeneously all along the upper side of the trunk, whereas a second sector of RW was produced on the initially lower side in the most distal part of the trunk, contributing to this autotropic decurving. Recently, Bastien et al. (2013) studied the gravitropism kinematics of different organs from 11 angiosperms by time lapse photography, including both primary elongation zones and zones of secondary growth in which active bending is achieved through the production of TW. The biphasic pattern of tropic reactions described above was found to be generic whatever the type of the organ, and it was shown to lead to a steady state shape in which the apical part is straightened whereas the curvature is more concentrated at the base of the stem. However, inter- and intra-specific variability occurred in the steady states and in the transients: whereas some plant organs reached a steady state without overshooting the vertical, others exhibited oscillations around the vertical axis. Bastien et al. (2013) also demonstrated that the minimal dynamic model cannot involve only gravisensing but the simultaneous sensing of the local curvature, referred by the authors as proprioception. When the organ is tilted and straight, gravisensitive control is dominant and the organ bends up actively. However as curvature increases, the inclination angle decreases and proprioceptive control takes over and autotropic counter-bending is produced starting in the apical parts of the organs, allowing it to straighten and align with the gravity vector. These data also suggest that the different shapes observed along the straightening response reflected a different ratio between graviceptive and proprioceptive sensitivities.

Another physical parameter that can influence reorientation of the stem by RW formation is light interception. Because of their co-occurrence under natural conditions gravi- and phototropism are intrinsically linked (Correll and Kiss 2002). Remarkably, phototropism sensing converges to common molecular actors with gravitropism and notably auxin transport and perception (Hohm et al. 2013). Typically, stems and stem-like organs have positive phototropism and negative gravitropism. Additive or synergetic effects were reported (Kern and Sack 1999) making the identification of their relative contribution and their possible interactions problematic. To address this issue, gravity effects were experimentally reduced or abolished (e.g. microgravity, space flight) while applying directional light source to induce phototropism (Millar and Kiss 2013). To date, it remains technically difficult to alleviate or reduce gravity effects on trees. The few possibilities offered to researchers consist in the manipulation of gravity orientation by tilting potted trees in combination with directional light modifications. Matsuzaki et al. (2006) report phototropism in trees submitted to different gravitational stimulations as observed on mountain slopes. Basal parts of the trees did not show bending in response to tropisms, which was limited to upper parts of stems. The authors suggested that reorientation could be achieved by asymmetric radial growth due to the formation of RW as is the case for gravitropism and further proposed trees inclination on slopes depends on phototropism. The same team later proved that the mechanism involved in phototropism required differential xylem production (Matsuzaki et al. 2007). In a recent study, Collet et al. (2011) studied long-term (4 years) phototropic response of *Fagus sylvatica* and *Acer*

pseudoplatanus after canopy opening in natural conditions. Plants reacted by righting themselves towards the light source and this involved reorientation of the lignified parts of the stems through asymmetrical formation of RW. Herrera et al. (2010) noticed changes in the orientation of apical part of pine seedlings but not in the basal parts even after 22 days of light and gravi-stimulation. Although limited to primary growth, this work provided molecular data on the interaction of these two tropisms, scarce for tree models. Interestingly, photo- and gravitropic responses of potato plants were different depending on the time of the day suggesting they were also regulated by an endogenous circadian clock to some extent (Vinterhalter et al. 2012). Such complexity, far from being completely understood in herbaceous plants, still needs to be established in trees where secondary growth in reaction to phototropism and gravitropism is still a matter of exploration.

All these data converge on the induction of RW during plant postural control. Clearly the triggering of RW formation during tropic reaction not only is related to the sensing of the inclination of the stem versus gravity but also involves curvature sensing. TW has been shown to systematically be formed on the lower side of the branch when autotropism dominates gravitropism, allowing for curvature compensation (Coutand et al. 2007). Similar shifts in the location of RW along the tropic motion have also been described for CW in conifers (Sierra de Grado et al. 2008). But, how these diverse physical parameters (gravity, local curvature, light) are perceived by plant cells in order to induce RW remains unclear. Are all these physical parameters perceived by a common sensing mechanism or is there any crosstalk at a later stage during the signaling pathway?

4.2.2 Molecular Mechanisms Involved in the Perception of Mechanical Stimulation Leading to RW Formation

In case of a gravitational stimulus, the resulting physical forces can deform or move objects of specific mass inside the cell. Two hypotheses are currently favoured: (1) the amyloplast-sedimentation in specialized cells named statocytes and the perception of the direction of this sedimentation and (2) the weight of the protoplasm itself triggering mechanical deformation of subcellular structures such as membrane, cytoskeleton elements and cell wall (Baluška and Volkmann 2011).

The role of starch-filled amyloplast sedimentation during graviperception is well documented in *Arabidopsis* (Morita 2010). In young shoots, statocytes are localized in the endodermis layer surrounding vascular tissues. These cells are highly vacuolated and equipped with prominent F-actin bundlets (Morita et al. 2002). The studies of different mutants affected either in starch formation (*pgm*) or in intracellular components such as the vacuolar membrane (VM) or actin microfilaments (AFs) that both modify cytoplasm viscosity and activity showed that amyloplast dynamics are important during shoot gravisensing (for review, Hashiguchi et al. 2013). Recently, by using a centrifuge microscope to analyse gravitropic

mutants in *Arabidopsis*, Toyota et al. (2013) confirmed the importance of amyloplast movement perception during shoot gravisensing. In woody species, amyloplast localization in endoderm cells has been observed (Nakamura 2003) in the young shoots of Japanese flowering cherry tree (*Prunus spachiana*) and in young poplars (*Populus tremula* × *alba*) (Fig. 4.2a–d). However, a link between amyloplasts sedimentation and RW formation has not yet been demonstrated. Moreover, the endoderm is disrupted by secondary growth. In cross sections of older poplar stem, lugol-stained starch grains are observed in whole bark tissue as well as in the wood rays (Fig. 4.2e).

The cellular mechanism underlying curvature proprioception is unknown (Bastien et al. 2013). The sensing of cell deformation (strain sensing) or more precisely of the deformation of some cellular component is a good candidate (Wilson and Archer 1977; Bastien et al. 2013). Moreover the perception of the deformation of cellular components is suggested also through amyloplast sedimentation, in the gravitational pressure model (Baluška and Volkmann 2011), and through wind sensing (Moulia et al. 2011). A few molecular candidates have been identified as mechanoperceptors of this deformation. In trees, these are only putative. Results obtained from the herbaceous model plant *Arabidopsis thaliana* suggest molecular candidates at the CPMCW (cytoskeleton—plasma membrane—cell wall) continuum. They would be able to sense the mechanical signal from the plant cell wall and convert it into a molecular signal in the cell (Baluška et al. 2003; Telewski 2006).

The first molecular candidates are mechanosensitive (MS) ion channels. MS ion channels are membrane proteins that allow the transit of ions through cellular membranes. They open either directly by the force applied on the membrane or indirectly through links between the channels and/or both the cytoskeleton and cell wall components (Haswell et al. 2011). To date the involvement of MS ion channels in the perception of mechanical signals has yet to be clearly established. Nevertheless, several pieces of evidence show that ionic changes occurred after mechanical signals (Haley et al. 1995). In plants, MS ion channels (Cl^-, K^+ and Ca^{2+}) have been identified at plasma membranes using patch-clamp electrophysiology (Cosgrove and Hedrich 1991; Ding and Pickard 1993; Haswell et al. 2008). Currently three main groups of MS ion channels have been described in plants. First, the mechanosensitive channel of the small conductance (MscS) family from *Escherichia coli* which releases osmolytes from the cell (Booth and Blount 2012) has ten homologues (MSL1–10) in the *A. thaliana* genome (Pivetti et al. 2003). MscS homologues may release osmolytes in response to membrane tension and may be modulated by additional signals (Monshausen and Haswell 2013). The second Mid1-complementing activity (MCA) family is structurally unique to the plant kingdom. The MCA proteins are located in the plasma membrane and promote calcium influx upon mechanical stimulation (Nakagawa et al. 2007). Finally, the Piezo proteins are a class of MS cation channels which respond to mechanical stimuli (Coste et al. 2012; Kim et al. 2012). In *Arabidopsis*, there is a single Piezo protein (Coste et al. 2010; Kurusu et al. 2013; Monshausen and Haswell 2013) but it has yet to be characterized.

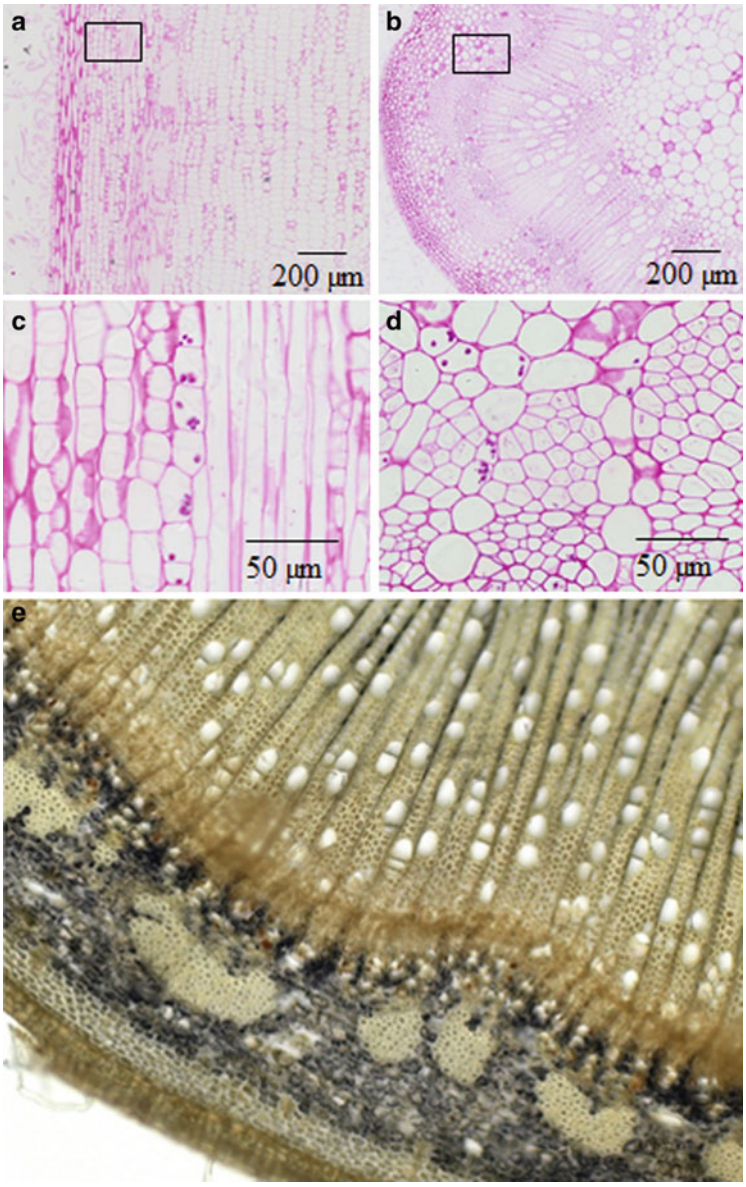


Fig. 4.2 Sections of poplar stems (*Populus tremula* × *alba*). Photographs (**a**–**d**) represent sections from the fourth bottom internode of a young plant with 20 developed internodes. Longitudinal sections (**a**, **c**) or transversal sections (**b**, **d**) were stained using Periodic acid/Schiff (PAS) reaction to detect starch and polysaccharides. Photographs (**c**) and (**d**) are, respectively, enlarged views of the photographs (**a**) and (**b**) (*black rectangle area*). Photographs courtesy of Wassim Azri. (**e**) This picture represents a cross section of a poplar stem, 40 cm under the apex. The tree height was 2.35 m and the diameter of the section is 5.3 mm. The freehand cut was stained by lugol. Photographs courtesy of Kevin Tocquard

Other molecular candidates are receptor-like kinases proteins (RLKs) that are a family of proteins with an extracellular domain, a single transmembrane region and an intracellular cytoplasmic kinase (Shiu and Bleecker 2001). Among RLKs, wall-associated kinases (WAKs) are the most well-studied potential cell wall status receptors (He et al. 1999; Verica and He 2002). They are of particular interest because WAKs extracellular domains are able to bind to the cell wall (He et al. 1996). Notably, Wagner and Kohorn (2001) showed that *At*WAKs covalently bind the cell wall pectins, in a calcium-induced conformation (Decreux and Messiaen 2005). Moreover, a reduction of *WAK* expression inhibited cell elongation and altered morphology (Lally et al. 2001; Wagner and Kohorn 2001), indicating an activity in growth control. Therefore, WAKs are interesting candidates as sensors of cell wall integrity. Another candidate among RLKs for sensing the cell wall integrity is the *Catharanthus roseus* RLK1-like subfamily (*Cr*RLK1L). The 17 members present an extracellular malectin-like domain (Lindner et al. 2012). Malectin proteins bind to glycoproteins in animal endoplasmic reticulum (Qin et al. 2012). The hypothesis that the malectin-like domain of CrRLK1L proteins binds cell wall polysaccharides or glycoproteins in plants has been proposed (Monshausen and Haswell 2013). In this subfamily THESEUS1 (THE1), a particular member with a plasma membrane location, could be a candidate for cell wall integrity sensing in *Arabidopsis*. THE1 was identified at a suppressor screen of cellulose-deficient mutant *cesA6* (Hématy et al. 2007). The *the1* mutant partially restored the hypocotyl elongation of the *cesA6*. However, mutations or over-expression of the *THE1* gene did not exhibit any effects in *Arabidopsis*. Consequently, THE1 was therefore proposed as a sensor of the cell wall status and modulator of cell elongation during perturbed cellulose synthesis.

Members of ArabinoGalactan proteins (AGPs) bind pectins and are also hypothesized to be cell wall integrity sensors. Indeed, AGPs are highly glycosylated proteins located in the cell wall (for more detail see Chap. 3). Some AGPs bind cell wall pectin (Serpe and Nothnagel 1995) and could be attached to the plasma membrane via GPI anchors which would mediate intracellular signaling (Humphrey et al. 2007).

4.2.3 Mechanical Signal Transduction: Secondary Messengers

Regarding secondary messengers, few data are available in trees and almost lacking in the context of gravitropic stimulation and/or stem bending. However, herbaceous plant model data can be a starting point for future studies on tree models. According to Toyota and Gilroy (2013), calcium is an important and ubiquitous cell secondary messenger. Its specific role as a secondary effector in MS signaling has been extensively investigated in *Arabidopsis* and *Nicotiana* (Knight et al. 1991, 1992; Haley et al. 1995; Plieth and Trewavas 2002; Toyota et al. 2008). Gravity

stimulation of *Arabidopsis* seedlings indicated a cytosolic Ca^{2+} concentration $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase with a first sharp increase followed by another less intense but longer signal (Plieth and Trewavas 2002). Wind also induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase in *Nicotiana* and *Arabidopsis* seedlings (Knight et al. 1992; Haley et al. 1995; Plieth and Trewavas 2002). Experiments conducted on trees support the involvement of Ca^{2+} in RW formation. By using a Ca^{2+} chelator (EGTA) or a calcium channel inhibitor ($LaCl_3$) which allowed modification of Ca^{2+} availability, CW formation was inhibited in *Taxodium distichum* gravistimulated stems (Du and Yamamoto 2003). The involvement of calcium in TW induction has also been suggested by indirect data obtained from several global approaches (see Sect. 4.4) notably through regulation of protein accumulation such as calreticulin, a Ca^{2+} storage protein (Azri et al. 2009). The overall results suggested Ca^{2+} ion as a second messenger in the early stages of mechanical signal transduction.

Other secondary messengers have been identified as important after mechanical/gravitational stimulation. Azri et al. (2009) suggested the involvement of reactive oxygen species (ROS) in poplar TW formation induced through the accumulation of glutathione-dehydroascorbate reductase (GSH-DHAR), glutathione S-transferase (GST) and thioredoxin *h* (Thr *h*) proteins. Azri et al. (2013) further showed an induction of the *Thr h* gene in response to gravitropic stimulus. With an immuno-chemistry approach, they co-located Thr *h* proteins with amyloplasts in stem endoderm cells, thus providing a coherent framework for graviperception. More evidence from herbaceous models demonstrates that an interplay of ROS and Ca^{2+} could mediate mechanosensing: ROS can stimulate $[Ca^{2+}]_{cyt}$, and an increase of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ can also lead to a ROS production via NADPH oxidase (Mori and Schroeder 2004).

Molecular candidates to convert the transient ionic Ca^{2+} signal to long-term biochemical signal are mainly calmodulins (CaM) and Ca^{2+}-dependent protein kinases (CDPK). Calmodulins are Ca^{2+}-dependent regulation proteins linking calcium to MS. CDPK are cytosolic proteins with a kinase domain, an autoinhibitory domain, and a calmodulin-like domain that bind calcium ions (Hrabak et al. 2003). In poplar, the expression of calmodulin encoding genes is up-regulated as soon as 10 min after a transient stem bending (Martin et al. 2009). Although very likely, a role for these proteins in the Ca^{2+} signaling after mechanical stimulation still needs to be demonstrated.

Phosphatidylinositol signaling is another part of the gravitropism sensing network (Strohm et al. 2012). Membrane phospholipid Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) releases inositol 1,4,5 triphosphate (IP3 or InsP3) after phospholipase C (PLC) hydrolysis. InsP3 is accumulated during gravitropic response which later is repressed through PLC inhibition (Perera et al. 2001). InsP3, like Ca^{2+}, is a second messenger suggested as triggering intracellular calcium flow from vacuole (Allen et al. 1995).

Taken together, these results indicate that complex and interactive signaling pathways are involved after mechanical/gravitational stimulation. To date, no study has yet addressed these mechanisms in tree stems. Numerous questions remain to be resolved to understand the induction of RW. Why RW is produced in only one side

of the stems, whereas the physical parameters triggering RW production are potentially perceived on both sides of the stem. Are the putative receptors uniformly localized in cells? Furthermore, if the endodermis cells are considered as sensitive cells, how is the inductive signal transmitted to cambium cells or developing xylem cells to modify the secondary wall composition and architecture? What cells act as gravisensor in older stems? How and where does crosstalk between gravisensing and proprioception occur?

4.3 Signal Transmission to Reaction Wood-Forming Cells

4.3.1 Hormone Action and Reaction Wood

The anatomical and biochemical features of RW have been the subject of extensive studies, which are described and reviewed in Chaps. 2 and 3. However the physiological and molecular signals inducing the formation of RW remain poorly described. Several plant hormones have been implicated in the regulation of cambial cell proliferation activity and in wood cell differentiation (for review, see Elo et al. 2009; Nieminen et al. 2012; Ursache et al. 2013). Until recently, their role in RW formation was studied through the application of exogenous compounds, the hormones themselves, their antagonists or transport/perception inhibitors. These experiments proved to be very informative as a first step towards deciphering whether hormones have the potential to induce RW formation. However, the possibility to genetically transform poplar and the use of high throughput molecular technics are, and will continue to be, of great help in confirming and completing these observations.

4.3.1.1 Auxin

The application of auxin antagonists or transport inhibitors on both gymnosperm and angiosperm tree stems led to the assumption that auxin plays a role in RW formation. Increased amounts of auxin could induce CW formation in gymnosperms while a deficiency in auxin was required to form TW in angiosperm (for review, see Du and Yamamoto 2007; Felten and Sundberg 2013). However, such experiments do not prove the function of auxin under natural conditions because of the risk of uncontrolled modification of auxin homeostasis. To be validated, they need a better documentation of *in planta* auxin concentrations/amounts. Reports on the relationship between endogenous auxin levels and the formation of CW or TW are scarce and sometimes contradictory. For example, while Wilson et al. (1989) did not find a clear and conclusive correlation between the occurrence of CW and auxin concentrations, Funada et al. (1990) working on *Cryptomeria japonica* and Du et al. (2004) working on *Metasequoia glyptostroboides* found a higher amount

of endogenous IAA (indole-3-acetic acid) in the cambial region producing CW. More recently, Hellgren et al. (2004) conducted a kinetic survey of endogenous IAA distribution across the cambial region of Aspen (*P. tremula*) and Scots pine (*Pinus sylvestris*) trees after bent-stem gravistimulation. These experiments showed that RW could be formed even when the pattern of IAA distribution in the cambial region is unmodified. The authors concluded that modulation of the auxin concentration gradient across the cambial zone might not be the signal that maintains the cells in an RW developmental state.

Data found in the literature are contradictory and were obtained on different species with different techniques and at different time points after stimulation. It is therefore difficult to give a clear model of auxin role in RW formation. However, an involvement of auxin in the early steps of the induction process has not yet been ruled out. Actually, several reports showed that auxin signaling is responsive to gravistimulation. After 6 h of stem bending, the expression of two *AUX/IAA* genes in poplar (*P. tremula* × *tremuloides*) (Moyle et al. 2002) and one in *Eucalyptus* (Paux et al. 2005) was altered in TW compared to normal wood in unbent trees. In yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*), a species that does not produce a typical G-layer, the expression of ARFs and AUX/IAA genes as well as other auxin-related genes is modified in TW compared to OW (Jin et al. 2011). Similar results were also obtained in poplar (*P. tremula* × *tremuloides*) after 3 weeks of TW induction by leaning the stem (Andersson-Gunnerås et al. 2006).

High throughput approaches have already helped in improving our knowledge of auxin function in TW formation. Coupling these with functional genomic approaches could help to gain a better understanding of the role of auxin in TW formation.

4.3.1.2 Ethylene

The gaseous hormone ethylene has long been known to be produced in response to diverse stresses including mechanical solicitations (for review, see Braam 2005; Telewski 2006; Du and Yamamoto 2007) such as bending and tilting. These stresses usually stimulated wood production by increasing cambial activity and sometimes led to the production of RW. Like auxin, ethylene involvement in RW formation was first investigated by measuring ethylene or its precursor (ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), and by using application experiments. For example, in the vascular cambium of *Pinus contorta* Dougl. ssp. *latifolia* branches, endogenous ACC was detected in association with CW differentiation, but not with OW (Savidge et al. 1983). Applications of ethrel, an ethylene releasing compound, stimulated wood production and were able to modify anatomical features of xylem in gymnosperm and angiosperm trees (Du and Yamamoto 2007). In angiosperm, although some of these features, like fewer and smaller vessels, can be reminiscent of TW characteristics (Little and Savidge 1987; Du and Yamamoto 2007; Love et al. 2009), it has to be noted that there is no report of G-layer induction by ethylene treatments.

Molecular approaches have helped to gain new insights about regulation of TW formation by ethylene. In bent poplars (*P. tremula* × *tremuloides*), a clear induction of *PttACO1* (ACC oxidase the last enzyme in the ethylene biosynthesis pathway) expression and relative activity were observed in the TW-forming tissues (Andersson-Gunnerås et al. 2003). Therefore, PttACO1 may represent a major control of ethylene asymmetric production during TW formation. In poplars leant for 3 weeks, the expression of genes related to ethylene signaling was also modified in TW compared to OW (Andersson-Gunnerås et al. 2006). In *L. tulipifera*, such modifications were seen as soon as 6 h after bending of the stem (Jin et al. 2011). Love et al. (2009) combined the use of ethylene-insensitive trees, ethylene-overproducing trees, and the application of the ethylene-perception inhibitor MCP (1-methylcyclopropene) to explore ethylene physiological function in gravistimulated poplars. They showed that ethylene could be responsible for the stimulation of cambial cell divisions on the upper TW-forming side of leaning stems. In 2013, Vahala et al. identified 170 gene models encoding ERFs (ethylene response factors) in the *Populus trichocarpa* genome. Among these, 17 had a minimum of a twofold induction of expression in TW compared to normal wood. Over-expression of some of them in poplar resulted in anatomical or wall chemistry modifications that are reminiscent of TW features.

Ethylene and its signaling pathway seem therefore to control part of the molecular and physiological modifications underlying RW formation, especially the asymmetric increase in radial growth. However, it seems that the establishment of the full characteristics of RW involves ethylene in combination with yet unidentified other signaling factors (Love et al. 2009; Vahala et al. 2013; Felten and Sundberg 2013).

4.3.1.3 Gibberellins

Gibberellins (GAs) constitute another group of plant hormones known to promote secondary growth and xylem fibre length (Eriksson et al. 2000; Mauriat and Moritz 2009; Gou et al. 2011). Applications of exogenous GAs or GA inhibitors to tree stems can only provide indirect evidence for a role of GA in RW formation. In gymnosperms, the possibility of a role of GAs in CW formation has not yet been clearly demonstrated. However, experiments conducted on upright or tilted angiosperm trees helped to establish a correlation between GA and TW formation. For example, it has been shown that the application of GA to vertical stems of *Fraxinus mandshurica*, *Quercus mongolica*, *Kalopanax pictus* and *Populus sieboldii* induced the development of TW with typical G-fibres in the absence of gravistimulus (Funada et al. 2008). When tilted *Acacia mangium* seedlings were treated with GA their negative gravitropsim was stimulated. On the contrary, when they were treated with paclobutrazole or uniconazole-P, inhibitors of gibberellin biosynthesis, the gravistimulated upright movement of the acacia stems was inhibited and the formation of TW was suppressed (Nugroho et al. 2012, 2013).

No functional genomic experiment has yet proved that gibberellins could control RW formation. However, the use of a natural weeping mutant of *P. spachiana* brought some evidence for a role of GAs in TW formation. Exogenous application of GAs on branches of these Japanese cherry trees (*P. spachiana*) stimulated cambial growth and promoted TW formation on the upper side of branches resulting in an upright movement (Nakamura et al. 1994; Baba et al. 1995; Yoshida et al. 1999).

Together these results indicate that GAs seem to be involved in RW formation. However, more direct supporting evidence and a better understanding of the involved signaling factors is still needed to make a clearer conclusion.

As mentioned above, although sometimes quite indirect, an important amount of data indicates a role for auxin, ethylene and gibberellins in RW formation. This holds especially true for angiosperms since knowledge obtained on CW is less advanced. On the contrary, no such relation has been identified for cytokinins, abscissic acid or brassinosteroids. Most of the experiments designed to gain a better understanding of the role of plant hormones in TW formation focused on a single hormone, studied independently. It is, however, important to keep in mind that many hormones have been shown to interact with each other in a synergistic or inhibitory manner. For example, GA is known to stimulate polar auxin transport (Björklund et al. 2007) and IAA to promote ethylene biosynthesis (Abeles et al. 1992). Although the studies made so far have greatly improved our knowledge of RW biology, the use of high throughput molecular technics combined with functional genomics has started to, and should in the future, help to gain a deeper understanding of the processes underlying RW development. Moreover, hormones are currently mostly regarded as upstream primary responses to TW sensing (Felten and Sundberg 2013), but studies on hormone distribution and transport are still too scarce and contradictory to rule out the possibility of their involvement in the transmission of the signal from the perceptive to the RW-forming cells.

4.3.2 Other Candidates for Signal Transmission to Reaction Wood-Forming Cells

miRNAs are small non-coding RNA molecules (about 21 nucleotides) which cleave or degrade messenger RNA targets. In plants, they are involved in the regulation of a large number of physiological processes (Jones-Rhodes et al. 2006) through the targeting of cell metabolism, signal transduction and stress response mRNAs. Different authors (Griffiths-Jones et al. 2008; Lu et al. 2005, 2008; Zhang et al. 2010) have characterized mechanical stress-responsive miRNAs in *P. trichocarpa*, especially miRNA that were differentially regulated by bending. The predicted target genes encode transcription factors and proteins involved in various cellular processes. For example, the function of the target of miR1446 is a gibberellin response modulator-like protein and the target of miR160 is an auxin

responsive factor. Although a direct link between miRNAs and RW has never been proven, the above-mentioned data indicate that these small molecules could be good candidates to explore the molecular network controlling RW formation. To do so, further genome-wide identification of miRNAs using a different experimental design (inclination) is needed, as well as functional characterization of the identified miRNA and corresponding targets.

Recently, several authors reported intercellular signaling by miRNAs and showed that some can move from one cell to another or over long distances (for review, see Marín-González and Suárez-López 2012). Since signaling from the cells that perceive the RW-generating stimuli to the RW-forming cells may require long distance regulation of gene expression, it is tempting to consider miRNAs as good candidates for the signal transmission from perceptive cells to RW-forming cells.

4.4 Insights from Global Approaches

Despite the economic impact of RW occurrence in industrial process and its importance from a tree developmental point of view, the molecular mechanisms involved in the perception and response to the gravitational stimulus have not been extensively studied. Furthermore, very few studies have addressed this question by global approaches, which require the genome of the studied tree species to be sequenced and annotated.

Investigating the induction of RW is also a very complex question because RW is formed very locally in answer to a global mechanical problem for the tree. In addition most of the regulations used in RW formation (division rate, cell elongation, cell wall thickening, MFA setting) are also used for normal wood formation. Experimental setups have to take into account this point to specifically address the question of RW induction. Most of the studies on genes or proteins acting as regulators of RW making were done on inclining experiments. By inclining the whole tree system by an angle of around 30° and letting it grow afterwards (see Chap. 5) a pure, long-lasting RW formation is induced at the base of the stem (see Fig. 4.1 and Fig. 9.11). At inclination angles of this magnitude there is a strong perception of disequilibrium, secondary growth processes are very active and no new primary axillary growth is observed. This is in contrast to very inclined (nearly horizontal) trees, which use growth through axillary buds (i.e. primary growth) to create new vertical axes.

4.4.1 Transcriptome Analysis

Transcriptomics of RW is still in its infancy. Quite limited reports are available although studies have been conducted for about two decades. Regarding the vast majority of transcriptomics works on normal wood, the reader should refer to the

most recent review of Zhong and Ye (2013). Early work addressed gene expression during RW formation through target genes approaches, leading progressively to recent transcriptome-wide overviews. Tools for deciphering gene involvement in the control of RW formation are becoming increasingly available and although most recent gene expression measurement tools, such as RNAseq, are still under-used in this research field, hopefully this will change in the near future.

Most studies of angiosperm RW formation using transcriptomics have been conducted with poplar species and less frequently with *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. Other angiosperms species have been rarely studied with the exceptions of *A. thaliana* and the tulip tree (*Liriodendron* sp.). In gymnosperms, most studies have been conducted with *Picea taeda* although *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Picea abies*, *Picea glauca* and *Chamaecyparis obtusa* have also been examined. Target gene studies began in this research area with the reporting of the involvement of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) during CW formation (Zhang and Chiang 1997). Along with up-regulation of *4CL* transcripts, the corresponding enzyme activity was also increased and its impact on lignin composition was observed. Regulators of lignin biosynthesis have been targeted as well, namely MYB factors in *P. glauca* (Bedon et al. 2007).

Meanwhile, transcriptome profiling started with the pioneering work showing *Pinus taeda* transcripts down-regulated for genes involved in lignin biosynthesis (Allona et al. 1998) and later in *C. obtusa* (Yamashita et al. 2008). At the same time, a large diversity of responses was reported for carbohydrates enzymes, i.e. xyloglucan endo-transglycosylase (XET), in CW using 1,097 ESTs in a co-expression clustering study (Allona et al. 1998). AGPs were reported as key-players through cDNAs encoding six novel so-called cell wall-associated proteins in CW formation by the same approach (Zhang et al. 2000). These results were further developed with a set of 2,400 ESTs from a cDNA microarray where 33 out of 69 transcripts were differential in CW and related to monolignols biosynthesis (Whetten et al. 2001). Following this, studies on angiosperms provided additional information by deciphering the gelatinous layer (G-layer) deposition in the so-called G-fibres during TW formation. Fasciclin-like arabinogalactan (FLA) proteins and their corresponding transcripts have been intensively studied emphasizing their involvement as a hypothetical adhesion factor facilitating cellulose deposition in the G-layer during TW formation in *P. tremula* × *tremuloides* (Andersson-Gunnerås et al. 2003, 2006), *P. tremula* × *alba* (Lafarguette et al. 2004), *E. grandis* (Qiu et al. 2008), *E. nitens* and *A. thaliana* (MacMillan et al. 2010). Along with FLA studies, transcriptional mechanisms of saccharide metabolism and deposition were also functionally dissected, even down to the cell scale using microgenomic tools (Goué et al. 2008). Major works outlined the role of sucrose synthase (SuSy) in *P. tremula* × *alba* (Déjardin et al. 2004), cellulose synthase (CesA) in *E. globulus* (Paux et al. 2005), XET and xylo-glucan endo-transglycosylase/hydrolase (XTH) in *P. tremula* × *tremuloides*, *Populus alba* and *P. tremula* (Nishikubo et al. 2007) and XET in *L. tulipifera* (Jin et al. 2011).

With the improvement of sequencing facilities and transcriptome-wide studies, development of collections of ESTs related to wood formation transcriptomics were

set-up, some of them including data related to RW formation as for *P. tremula* × *tremuloides* (Sterky et al. 2004), but also including expression data in RW for several other poplar species (Sjodin et al. 2009), for *P. abies* (Koutaniemi et al. 2007), for *P. radiata* (Ramos et al. 2012) and for *P. pinaster* (Villalobos et al. 2012).

A striking point with timescale studies of RW formation is that very few reports deal with early molecular events of the process. In other words, most of the published works dealing with transcriptomics of RW formation, either gene-targeted or genome-wide, focus at developmental stages when RW is already histologically observable in the xylem. Precursor work in the field of the induction of RW does exist but is only gene-targeted at the moment. ZFP2 transcription factor was firstly reported in *Juglans regia* (Leblanc-Fournier et al. 2008) and *P. tremula* × *alba* (Martin et al. 2009). This ZFP2 is coined "mechano-sensitive" and addresses the xylem cell response to mechanical stress at a very early stage in a timely and structured manner in the transduction pathway to TW formation in trees, along with TCH2 and TCH4 as reported in *P. tremula* × *alba* from quantitative PCR studies (Martin et al. 2010). TCH4, reported to encode an XET in *A. thaliana* (Xu et al. 1995), draws attention to enzymatic-oriented cellulose modifications in the cell wall. The field of early RW induction, at the cell level and before any macroscopic tissue organization can be observed in the stem, is hopefully a must in any forthcoming experiments.

4.4.2 Techniques for Proteome Measurement

Proteomics is a powerful molecular tool for describing proteomes at the organelle, cell, organ or tissue levels and for showing the modifications of protein expression in response to environmental changes (Abbasi and Komatsu 2004). Proteomics completes the large-scale analysis of the transcriptome. On many occasions, the level of mRNA is not correlated with protein expression level. One transcript may be translated into more than one protein because of alternative splicing or alternative post-translational modifications. In addition, post-translational modifications such as phosphorylation and glycosylation may modify protein activities and subcellular localization (Yan et al. 2005).

Although attempts have been made at identifying proteins whose abundance, localization, and/or post-transcriptional modifications are altered by gravistimulation, most studies were conducted on *A. thaliana* seedlings and tended to unravel the mechanisms that control root gravitropism (for review, see Harrison et al. 2008). As for the understanding of the response of tree shoots to gravity, both gymnosperm and angiosperm species should be considered separately since the structure and properties of CW are different from those of TW. Although studies have been conducted to elucidate wood formation in trees, few of them have addressed the problem at the proteomic level, and even less focussed on RW genesis.

Among the first global attempts to unravel xylogenesis in trees, two-dimensional (2D) electrophoresis has been used to characterize xylem maritime pine proteins (Costa et al. 1999) or seasonal changes in protein expression in wood-forming tissues of poplar (Minsbrugge et al. 2000). The first description of the proteome of maritime pine wood-forming tissue (identification of 175 proteins) was provided by Gion et al. (2005). The variations in the proteome of differentiating xylem collected from the top to the bottom of adult maritime pine (*P. pinaster*) trees have provided a list of candidate genes for wood properties (Paiva et al. 2007). Using a large-scale approach, regeneration of the secondary vascular system in poplar was studied after peeling of the bark and sampling by scraping regenerating tissues (Juan et al. 2006). A dynamic view of the changes occurring during the juvenile wood formation in the proteome of *E. grandis* has been provided using xylem tissues from 3- and 6-year-old trees (Celedon et al. 2007). More recently, a focussed analysis of plasma membrane proteomes from different tissues isolated from 3 to 4 m high poplar trees identified 108 proteins that were specifically expressed in the xylem (Nilsson et al. 2010). The authors proposed a schematic model for wood formation, integrating proteins expressed in the xylem such as cellulose-synthesizing complex, receptors, glucan sythase, AGPs, and enzymes of lignin biosynthesis. In particular the thorough investigation of cellulose synthase complexes in differentiating *Populus* xylem has been realized using complementary approaches including laser microdissection, immunolocalization along with proteomic analysis (Song et al. 2010).

With the aim of understanding TW induction or formation, proteomic analyses have been conducted on *Poplar* and *Eucalyptus*. These species are used as models in forest genetics and woody plant studies because they grow rapidly, they can be genetically transformed and the size of their genome is relatively small (5 to 6×10^8 bp) (Plomion et al. 2001). As for CW, different pine species, Sitka spruce (*Picea sitchensis*) and Japanese cypress (*C. obtusa*) have been used because of their economic and ecological interest. To investigate differentially expressed proteins in response to gravity, most studies report 2D polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) patterns and include identification of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF), mass spectrometry (MS) or by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). One study using Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) reported on the proteome of *Populus* developing xylem (Kalluri et al. 2009). The proteins were extracted from subcellular fractions of xylem stems, enzymatically digested and the resulting peptides were analysed using LC-MS/MS. However, this study was not specifically addressing RW induction/formation. In the next paragraphs, proteomic studies on TW induction/formation are first presented, followed by data on CW. Depending on the studies, the gravistimulation design, the organs and tissues used for protein extraction have been very different. In addition, studies on TW formation after bending using constraining strings are also presented. Because of the diversity of experimental designs, the synthesis of the results remains problematic.

4.4.3 Measured Changes in Proteome

Azri et al. (2009) studied young poplars (14–20 internodes) inclined at 35° from the vertical axis. Whole internodes from the basal and apical regions of vertical and gravistimulated stems were collected. The purpose of this experimental procedure was to allow analysis of the differential expression caused by gravistimulation between regions showing different motors for stem reorientation. The apical region responds to inclination by differential growth due to elongation of primary tissues while reorientation is due to asymmetrical formation of RW at the base. After 45 min of gravistimulation, the stem showed no reorientation. After 1 week, RW was observed at the base of the stem. Differential protein expression was reported between inclined or non-inclined conditions and also between the regions of the stem. Among 300 protein spots, 40 % showed significant changes after inclination. Sixty protein spots whose staining intensity was altered by gravistimulation were identified by mass spectrometry. These 60 proteins fell into a large range of functional categories. Interestingly, the patterns of expression of these selected proteins differed strongly between the conditions tested (apical and basal regions, 45 min and 1 week of inclination). At 45 min and 1 week, respectively, three and four proteins were similarly regulated by gravistimulation between the top and the basal regions. These observations suggested that different metabolisms and signaling pathways were involved in each region of the stem following a short (45 min) or a long (1 week) exposure to gravistimulation. At 45 min, before any visible reorientation of the stem, some of the proteins regulated by gravistimulation may be involved in graviperception. At the top of the stem (where reorientation will later occur through differential elongation of primary tissues), the results suggested the implication of ROS (regulation of oxidative stress-responsive enzymes). The regulation of actin and tubulin subunits, or microtubule-binding proteins showed the importance of cell wall—plasma membrane—cytoskeleton structural continuum for graviperception. Several proteins suggested some signaling via the endomembrane system and that calcium and phosphoinositides might act as cellular messengers (calreticulin, phosphatidyl inositol transfer protein SEC14). At the base of the stem (where orientation will later occur through the formation of RW), the most noticeable enzymes that were differentially expressed by gravistimulation were involved in lignin biosynthesis (phenylcoumaran benzylic ether reductase, S-adenosylmethionine synthase). However, members of the S-adenosyl-L-methionine-synthase gene family, which serve as universal methyl-group donors, are potentially involved in lignin as well as in ethylene biosynthesis pathways.

In *Eucalyptus gunnii*, proteins were extracted from xylem tissue harvested from a crooked tree. Two-dimensional gel electrophoresis images from normal and TW were compared showing that 12 proteins out of 140 proteins analysed were differentially expressed (Plomion et al. 2003). However, none of these proteins were identified.

A different approach was carried out by Kaku et al. (2009) who focused on the proteome of the G-layer in poplar TW. Leaning stems and branches from field-grown poplars were used as sources for isolation of G-layers from TW. Among the

proteins separated by 2D gel electrophoresis, 108 were identified. Most abundant were lignin synthesis-related proteins although the G layer did not contain lignin itself. Cytoskeleton proteins, methionine synthesis-related proteins and cell wall-related proteins were also identified. Lignification in TW is still a matter of debate. Andersson-Gunnerås et al. (2006) using a global analysis reported a decrease in monolignol biosynthesis in TW compared with normal wood. However, on-going lignification was observed during G layer deposition in the compound middle lamella, S1 and S2 layers in poplar TW (Yoshinaga et al. 2012). An assay based on protein cleavage isotope dilution mass spectroscopy (PC-IDMS) has been developed for quantification of proteins regulating monolignol biosynthesis in *P. trichocarpa* (Shuford et al. 2012) and could potentially bring valuable data to decipher lignification in RW.

In conifers, CW is formed in response to gravitropic stimulus or environmental disturbances such as prevailing winds, and "pushes" the stems toward a vertical orientation. In the same way as for the TW studies, proteomic analyses of CW formation concerned either developing CW or inclined stems where no CW had been formed yet.

A comparative protein-based approach to identify proteins specifically expressed in CW was conducted with branches of Sitka spruce (*P. sitchensis*) (McDougall 2000). The developing xylem was sampled from the compression and non-compression sides of the branches. The comparison of polypeptides patterns by SDS-PAGE led to the identification of a laccase-type polyphenol oxidase that was over-expressed in compression tissues. This enzyme is thought to be involved in lignin biosynthesis.

On a larger scale, the identification of CW responsive proteins has been conducted with a 22-year-old crooked maritime pine (*P. pinaster* Ait.) (Plomion et al. 2000). Wood samples were mechanically and chemically characterized by measuring growth strains and lignin and cellulose contents, respectively. Of the 137 spots studied, 19 % were associated with growth strain effect. The results indicated the importance of ethylene in CW formation. The implication of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase which catalyses the final reaction of the ethylene biosynthetic pathway in CW formation has also been suggested by Yuan et al. (2010). These authors examined PtACO1 and *PtACO1*-like (encoding putative ACC oxidases) transcript levels by quantitative PCR in loblolly pine seedling stems that were bent to a 90° angle using constraining strings. They observed an increase in these transcripts levels starting at 30 min and peaking at 3 h after bending. *PtACO1*-like transcripts were higher in CW than in opposite wood (OW). Besides, Plomion et al. (2000) have found that lignin biosynthesis was also affected during CW formation and that enzymes involved in Krebs cycle, sucrose and starch metabolism were up-regulated.

In another study, sampling of compression and OW was done with 16-year-old maritime pines bent to a 15° angle by tying their trunks to neighbouring trees for 2 years (Gion et al. 2005). Other types of wood were also analysed (juvenile and mature woods, early and late woods). The clustering of 215 proteins identified over the six types of wood was presented. It appeared that 20 % of the identified proteins

exhibited distinctive expression patterns between CW and OW. Profilin, actin and nucleoside diphosphate kinase, 40S ribosomal S12 proteins were under-expressed in CW.

LC-MS analysis of Golgi-enriched membrane fraction from developing *P. radiata* CW has been done following in-solution digestion with trypsin (Mast et al. 2010). CW was sampled from 6-year-old trees in late summer to maximize the identification of proteins involved in secondary cell wall formation. As expected most proteins detected were involved not only in cell wall synthesis (i.e. cellulose synthase, laccase, phenyl alanine ammonia-lyase) but also in hormone biosynthesis and signaling (i.e. auxin-induced proteins, ACC synthase) and stress and defence response. Within this last putative functional category, numerous receptors were found (CC-NBS-LRR protein, NBS/LRR, TIR/NBS, TIR/NBS/LRR disease resistance protein).

Gravitropism is not the only process that determines stem orientation; phototropism is also an important factor that can lead to RW production. The interaction between these two processes has not been extensively studied in trees. Herrera et al. (2010) have presented a proteomic analysis of inclined pine seedlings submitted to an orthogonal light source. However, the apices were collected instead of the basal part of the stem where secondary growth takes place. Thus this study mainly identified differentially expressed proteins in the primary response to stem tilting.

Proteomic studies have been realized with different organs and tissues (stem, branches, whole internodes, xylem, G layer) from seedlings to trees aged from 2 month-old to 22 year-old. In some cases the plants were inclined or mechanically bent and the proteome was analysed after varying times depending on the study (from 45 min to days or weeks). In other cases, aged plants showing RW were used. The problem is to discriminate between overlapping events such as induction, signal transduction (first events following stimulation) in the stimulated cells which are not clearly identified yet, reorientation of cambial cell programming, and differentiation of newly formed cells in the developing xylem. In addition, perception of the gravitropic stimulus and response probably occur in different cells. The proteomic approach has been executed either on whole internodes or on xylem tissue which may not contain the perceptive cells. Among the proteins listings published, large functional categories appear such as primary metabolism, cytoskeleton organization and biogenesis, cell wall synthesis, hormone biosynthesis and signaling. However, the role of most proteins is still hypothetical. Focused studies are needed to evaluate the role of the proteins brought forward by global proteomic analyses.

4.4.4 Metabolomics and RW Formation

Metabolomics is a global approach used in biology for systematic metabolite quantification, a metabolite being any intermediate or product of the metabolism,

e.g. amino acids, carbohydrates, hormones, and many more. Although several studies targeted some metabolites related to carbon and secondary metabolism that potentially play a role in RW formation (Yeh et al. 2005, 2006; Shi and Li 2012), "without *a priori*" approaches have been marginally exploited in this field. To date, only Andersson-Gunnerås et al. (2006) have published work using this technique. A combination of metabolomics and transcriptomics recently gave precious insights on the *Arabidopsis* gravitropism and phototropism interplay (Millar and Kiss 2013). Andersson-Gunnerås et al. (2006) used a similar approach to gain access to the G-layer formation in poplar TW induced after 11 days bending. Conclusions from biochemical measurements follow predictions coherent with gene expression showing in TW: an increased activity of cellulose synthesis and pectin degradation-related genes while those involved in lignin biosynthesis are decreased. An advantage of their transcriptomic approach consists in fine identification of differentially expressed genes from multigenic families, thus refining the implication of gene candidates individually. Based on their expression and metabolic profiles, they propose extensive relational models for carbon metabolism and lignin biosynthesis in TW. Despite the importance of this work that provides a coherent framework based on quantitative and qualitative data on TW chemistry and gene expression, the earlier steps remain a matter of discovery.

4.5 Concluding Remarks

The formation of RW allows woody structures to adapt their position in response to gravitational and mechanical stimulation and/or a change in the light environment. The deciphering of the molecular mechanisms underlying this particular growth response is complex. It requires at the very least, tree models with sequenced genomes, which allow global approaches such as transcriptomics and proteomics. Functional genomics which aims to elucidate the function of proteins encoded by candidate genes is limited by a scarcity of mutants and the long generation times of forest trees. In the face of these complex challenges, Wyatt et al. (2010) presented *A. thaliana* as a model for a molecular and genetic analysis of the mechanisms of TW formation. In addition, RW formation having many external or internal causal agents (gravity, light, interactions of both stimuli, inherent patterning mechanisms), it is difficult to set up an experimental design that addresses the impact of one particular stimulus in trees. Most studies utilized inclined trees in greenhouse conditions, although both phototropic and gravitropic reactions occurred in such conditions. Signalisation pathways leading to tree stature adjustments are different whether starting from a light or a gravi-mechanical stimulus. For a short period of time, dark or isotropic light conditions could be used to gain insight into gravitropic signalisation pathway leading to RW formation. Moreover the issues around staking also need to be considered since different molecular pathways may be induced if stem deformation is allowed or not.

Hypotheses about perception of gravistimulation were previously defined through studies using *A. thaliana* mutants. However, in trees the question about the role of amyloplasts remains since starch is present in high level and everywhere in old woody structures. In trees, the tissue/cell that perceives gravistimulation is not clearly identified. As for the early events of signal transduction, one has to emphasize that very few studies were done at the very beginning of induction of RW, before any macroscopic observation of RW formation. Mechano-receptors involved in RW induction have still to be characterized. Global approaches suggest the role of calcium and ROS as second messengers and some signaling via the endomembrane system and phosphoinositides. Although components of the signaling network have been identified through global analyses, the way they relate to one another in space and time is still unknown. Wyatt and Kiss (2013) speak about a "more or less amorphous gray cloud" when relating to the understanding of the signaling network. More precision could come from microdissection of chosen tissues or cells prior to molecular investigations. Typically, the early events of signal transduction are supposed to lead to hormonal response (i.e. synthesis, degradation, redistribution, reallocation, compartmentalization, and so on) that will finally provoke the growth and cell differentiation response. The involvement of ethylene gibberellin and auxin has been discussed but more studies are needed in order to decipher hormone signaling crosstalk in RW induction at the cell level, and also at the organ and whole plant level. For example, Azri et al. (2009) suggested that different signaling pathways occurred at the top and the base of a tilted poplar stems.

In conclusion, global approaches reveal the complexity of the RW induction both on a temporal scale and as a function of the location in the tree. Therefore, although the transcriptional network, the organization of protein synthesis and the subsequent hormonal response at the whole tree level is still unknown, the beginning of an understanding of how trees manipulate RW formation to solve their mechanical requirements is emerging.

References

Abbasi FM, Komatsu S (2004) A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. Proteomics 4:2072–2081

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in plant biology, 2nd edn. Academic, San Diego

Allen GJ, Muir SR, Sanders D (1995) Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. Science 268:735–737

Allona I, Quinn M, Shoop E, Swope K, Saint Cyr S, Carlis J, Riedl J, Retzel E, Campbell MM, Sederoff R, Whetten RW (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 95:9693–9698

Almeras T, Fournier M (2009) Biomechanical design and long-term stability of trees: morphological and wood traits involved in the balance between weight increase and the gravitropic reaction. J Theor Biol 256:370–381

Almeras T, Costes E, Salles JC (2004) Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between apricot tree varieties. Ann Bot 93:455–468

Andersson-Gunnerås S, Hellgren JM, Björklund S, Regan S, Moritz T, Sundberg B (2003) Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravitational induction of tension wood. Plant J 34:339–349

Andersson-Gunnerås S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. Plant J 45:144–165

Azri W, Chambon C, Herbette S, Brunel N, Coutand C, Leplé JC, Ben Rejeb I, Ammar S, Julien JL, Roeckel-Drevet P (2009) Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation. Physiol Plant 136:193–208

Azri W, Brunel N, Franchel J, Ben Rejeb I, Jacquot JP, Julien J-L, Herbette S, Roeckel-Drevet P (2013) Putative involvement of thioredoxin *h* in early response to gravitropic stimulation of poplar stems. J Plant Physiol 170:707–711

Baba K, Adachi K, Take T, Yokoyama T, Ito T, Nakamura T (1995) Induction of tension wood in GA_3-treated branches of the weeping type of Japanese cherry, *Prunus spachiana*. Plant Cell Physiol 36:983–988

Baluška F, Volkmann D (2011) Mechanical aspects of gravity-controlled growth, development and morphogenesis. In: Wojtaszek P (ed) Mechanical integration of plant cells and plants, Signaling and communication in plants. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, pp 195–222

Baluška F, Šamaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D (2003) Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. Plant Physiol 133:482–491

Bastien R, Bohr T, Moulia B, Douady S (2013) Unifying model of shoot gravitropism reveals proprioception as a central feature of posture control in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 110:755–760

Bedon F, Grima-Pettenati J, Mackay J (2007) Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*). BMC Plant Biol 7:17

Berthier S, Stokes A (2005) Phototropic response induced by wind loading in Maritime pine seedlings (*Pinus pinaster* Ait.). J Exp Bot 56:851–856

Björklund S, Antti H, Uddestrand I, Moritz T, Sundberg B (2007) Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. Plant J 52:499–511

Booth IR, Blount P (2012) The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves. J Bacteriol 194:4802–4809

Braam J (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. New Phytol 165:373–389

Celedon PAF, de Andrade A, Xavier Meireles KG, Gallo de Carvalho MC, Gomes Caldas DG, Moon DH, Tozelli Carneiro R, Franceschini LM, Oda S, Labate CA (2007) Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. Proteomics 7:2258–2274

Collet C, Fournier M, Ningre F, Hounzandji AP, Constant T (2011) Growth and posture control strategies in *Fagus sylvatica* and *Acer pseudoplatanus* saplings in response to canopy disturbance. Ann Bot 107:1345–1353

Correll MJ, Kiss JZ (2002) Interactions between gravitropism and phototropism in plants. J Plant Growth Regul 21:89–101

Cosgrove DJ, Hedrich R (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. Planta 186:143–153

Costa P, Pionneau C, Bauw G, Dubos C, Bahrmann N, Kremer A, Frigerio J-M, Plomion C (1999) Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. Electrophoresis 20:1098–1108

Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science 330:55–60

Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. Nature 483:176–181

Coutand C, Fournier M, Moulia B (2007) The gravitropic response of poplar trunks: key roles of prestressed wood regulation and the relative kinetics of cambial growth versus wood maturation. Plant Physiol 144:1166–1180

Decreux A, Messiaen J (2005) Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. Plant Cell Physiol 46:268–278

Déjardin A, Leplé J-C, Lesage-Descauses M-C, Costa G, Pilate G (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues – a comparative analysis from multiple libraries. Plant Biol 6:55–64

Ding JP, Pickard BG (1993) Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. Plant J 3:713–720

Du S, Yamamoto F (2003) A study on the role of calcium in xylem development and compression wood formation in *Taxodium distichum* seedlings. IAWA J 24:75–85

Du S, Sugano M, Tsushima M, Nakamura T, Yamamoto F (2004) Endogenous indole-3-acetic acid and ethylene evolution in tilted *Metasequoia glyptostroboides* stems in relation to compression-wood formation. J Plant Res 117:171–174

Du S, Yamamoto F (2007) An overview of the biology of reaction wood formation. J Integr Plant Biol 49:131–143

Elo A, Immanen J, Nieminen K, Helariutta Y (2009) Stem cell function during plant vascular development. Semin Cell Dev Biol 20:1097–1106

Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. Nat Biotechnol 18:784–788

Felten J, Sundberg B (2013) Biology, chemistry and structure of tension wood. In: Fromm J (ed) Cellular aspects of wood formation, plant cell monographs 20. Springer, Heidelberg, pp 203–224

Fournier M, Chanson B, Thibaut B, Guitard D (1994) Measurements of residual growth strains at the stem surface observations on different species. Ann Sci For 51:249–266

Funada R, Kubo T, Fushitani M (1990) Earlywood and latewood formation in *Pinus densiflora* trees with different amounts of crown. IAWA Bull 11:281–288

Funada R, Miura T, Shimizu Y, Kinase T, Nakaba S, Kubo T, Sano Y (2008) Gibberellin-induced formation of tension wood in angiosperm trees. Planta 227:1409–1414

Gion J-M, Lalanne C, Le Provost G, Ferry-Dumazet H, Paiva J, Chaumeil P, Frigerio J-M, Brach J, Barré A, de Daruvar A, Claverol S, Bonneu M, Sommerer N, Negroni L, Plomion C (2005) The proteome of maritime pine wood forming tissue. Proteomics 5:3731–3751

Gou J, Ma C, Kadmiel M, Gai Y, Strauss S, Jiang X, Busov V (2011) Tissue-specific expression of *Populus* C_{19} GA 2-oxidases differentially regulate above- and below-ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations. New Phytol 192:626–639

Goué N, Lesage-Descauses M-C, Mellerowicz EJ, Magel E, Label P, Sundberg B (2008) Microgenomic analysis reveals cell type-specific gene expression patterns between ray and fusiform initials within the cambial meristem of *Populus*. New Phytol 180:45–56

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res 36:D154–D158

Haley ANN, Russellt AJ, Wood N, Allan AC, Knight M, Campbell AK (1995) Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium. Proc Natl Acad Sci U S A 92:4124–4128

Harrison BR, Morita MT, Masson PH, Tasaka M (2008) Signal transduction in gravitropism. In: Gilroy S, Masson PH (eds) Plant tropisms. Blackwell Publishing, Oxford, pp 21–46

Hashiguchi Y, Tasaka M, Morita MT (2013) Mechanism of higher plant gravity sensing. Am J Bot 100:91–100

Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. Curr Biol 18:730–734

Haswell ES, Phillips R, Rees DC (2011) Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? Structure 19:1356–1369

He ZH, Fujiki M, Kohorn BD (1996) A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. J Biol Chem 271:19789–19793

He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 39:1189–1196

Hellgren JM, Olofsson K, Sundberg B (2004) Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. Plant Physiol 135:212–220

Hématy K, Sado PE, Van Tuinen A, Rochange S, Desnos T, Balzergue S, Pelletier S, Renou JP, Höfte H (2007) A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. Curr Biol 17:922–931

Herrera R, Krier C, Lalanne C, Ba EHM, Stokes A, Salin F, Fourcaud T, Claverol S, Plomion C (2010) (Not) keeping the stem straight: a proteomic analysis of maritime pine seedlings undergoing phototropism and gravitropism. BMC Plant Biol 10:217–229

Hohm T, Preuten T, Fankhauser C (2013) Phototropism: translating light into directional growth. Am J Bot 100:47–59

Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiol 132:666–680

Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. New Phytol 176:7–21

Jin H, Do J, Moon D, Noh EW, Kim W, Kwon M (2011) EST analysis of functional genes associated with cell wall biosynthesis and modification in the secondary xylem of the yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) stem during early stage of tension wood formation. Planta 234:959–977

Jones-Rhodes MW, Bartel DP, Barterl B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu Rev Plant Biol 57:19–53

Jourez B, Avella-Shaw T (2003) Effet de la durée d'application d'un stimulus gravitationnel sur la formation de bois de tension et de bois opposé dans de jeunes pousses de peuplier (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). Ann For Sci 60:31–41

Juan D, Hong-Li X, De-Qiang Z, Xin-Qinag H, Min-Jie W, Ying-Zhang L, Ke-Ming C, Meng-Zhu L (2006) Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. Proteomics 6:881–895

Kaku T, Serada S, Baba K, Tanaka F, Hayashi T (2009) Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. J Wood Sci 55:250–257

Kalluri UC, Hurst GB, Lankford PK, Ranjan P, Pelletier DA (2009) Shotgun proteome profile of *Populus* developing xylem. Proteomics 9:4871–4880

Kern VD, Sack FD (1999) Irradiance-dependent regulation of gravitropism by red light in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. Planta 209:299–307

Kim SE, Coste B, Chadha A, Cook B, Patapoutian A (2012) The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. Nature 483:209–212

Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. Nature 352:524–526

Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. Proc Natl Acad Sci U S A 89:4967–4971

Koutaniemi S, Warinowski T, Karkonen A, Alatalo E, Fossdal CG, Saranpaa P, Laakso T, Fagerstedt KV, Simola LK, Paulin L, Rudd S, Teeri TH (2007) Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. Plant Mol Biol 65:311–328

Kurusu T, Kuchitsu K, Nakano M, Nakayama Y, Iida H (2013) Plant mechanosensing and Ca^{2+} transport. Trends Plant Sci 18:227–233

Lafarguette F, Leplé J-C, Déjardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses M-C, Pilate G (2004) Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. New Phytol 164:107–121

Lally D, Ingmire P, Tong HY, He ZH (2001) Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. Plant Cell 13:1317–1331

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

Lindner H, Müller LM, Boisson-Dernier A, Grossniklaus U (2012) CrRLK1L receptor-like kinases: not just another brick in the wall. Curr Opin Plant Biol 15:659–669

Little CHA, Savidge RA (1987) The role of plant-growth regulators in forest tree cambial growth. Plant Growth Regul 6:137–169

Love J, Björklund S, Vahala J, Hertzberg M, Kangasjärvi J, Sundberg B (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. Proc Natl Acad Sci U S A 106:5984–5986

Lu S, Sun Y-H, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL (2005) Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. Plant Cell 17:2186–2205

Lu S, Li L, Yi X, Joshi CP, Chiang VL (2008) Differential expression of three *Eucalyptus* secondary cell wall-related cellulose synthase genes in response to tension stress. J Exp Bot 59:681–695

MacMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG (2010) Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. Plant J 62:689–703

Marín-González E, Suárez-López P (2012) "And yet it moves": cell-to-cell and long-distance signaling by plant microRNAs. Plant Sci 196:18–30

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

Martin L, Leblanc-Fournier N, Julien J-L, Moulia B, Coutand C (2010) Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. J Exp Bot 61:2403–2412

Mast S, Peng L, Jordan W, Flint H, Phillips L, Donaldson L, Strabala TJ, Wagner A (2010) Proteomic analysis of membrane preparations from developing *Pinus radiata* compression wood. Tree Physiol 30:1456–1468

Matsuzaki J, Masumori M, Tange T (2006) Stem phototropism of trees: a possible significant factor in determining stem inclination on forest slopes. Ann Bot 98:573–581

Matsuzaki J, Masumori M, Tange T (2007) Phototropic bending of non-elongating and radially growing woody stems results from asymmetrical xylem formation. Plant Cell Environ 30:646–653

Mauriat M, Moritz T (2009) Analyses of *GA20ox*- and *GID1*-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. Plant J 58:989–1003

McDougall GJ (2000) A comparison of proteins from the developing xylem of compression and non-compression wood of branches of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) reveals a differentially expressed laccase. J Exp Bot 51:1395–1401

Mellerowicz EJ, Immerzeel P, Hayashi T (2008) Xyloglucan: the molecular muscle of trees. Ann Bot 102:659–665

Millar KD, Kiss JZ (2013) Analyses of tropistic responses using metabolomics. Am J Bot 100:79–90

Minsbrugge KV, Meyermans H, Van Montagu M, Bauw G, Boerjan W (2000) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. Planta 210:589–598

Monshausen GB, Haswell ES (2013) A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. J Exp Bot. doi:10.1093/jxb/ert204 (Epub ahead of print)

Mori IC, Schroeder JI (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. Signaling mechanisms in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. Plant Physiol 135:702–708

Morita MT (2010) Directional gravity sensing in gravitropism. Annu Rev Plant Biol 61:705–720

Morita MT, Kato T, Nagafusa K, Saito C, Ueda T, Nakano A, Tasaka M (2002) Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. Plant Cell 14:47–56

Moulia B, Fournier M (2009) The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view. J Exp Bot 60:461–486

Moulia B, Coutand C, Lenne C (2006) Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: implications for mechanical modeling of plant architecture. Am J Bot 93:1477–1489

Moulia B, Der Loughian C, Bastien R, Martin L, Rodríguez M, Gourcilleau D, Barbacci A, Badel E, Franchel J, Lenne C, Roeckel-Drevet P, Allain JM, Frachisse JM, de Langre E, Coutand C, Leblanc-Fournier N, Julien JL (2011) Integrative mechanobiology of growth and architectural development in changing mechanical environments. In: Wojtaszek P (ed) Mechanical integration of plant cells and plants, Signaling and communication in plants. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, pp 269–302

Moyle R, Schrader J, Stenberg A, Olsson O, Saxena S, Sandberg G, Bhalerao RP (2002) Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the *Aux/IAA* gene family in hybrid aspen. Plant J 31:675–685

Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T (2007) *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. Proc Natl Acad Sci U S A 104:3639–3644

Nakamura T (2003) Control of morphogenesis of woody plant by gravity on earth. Biol Sci Space 17:144–148

Nakamura T, Saotome M, Ishiguro Y, Itoh R, Higurashi S, Hosono M, Ishii Y (1994) The effects of GA_3 on weeping of growing shoots of the Japanese cherry, *Prunus spachiana*. Plant Cell Physiol 35:523–527

Nieminen K, Robischon M, Immanen J, Helariutta Y (2012) Towards optimizing wood development in bioenergy trees. New Phytol 194:46–53

Nilsson R, Bernfur K, Gustavsson N, Bygdell J, Wingsle G, Larsson C (2010) Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation. Mol Cell Proteomics 9:368–387

Nishikubo N, Awano T, Banasiak A, Bourquin V, Ibatullin F, Funada R, Brumer H, Teeri TT, Hayashi T, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2007) Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar—a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. Plant Cell Physiol 48:843–855

Nugroho WD, Yamagishi Y, Nakaba S, Fukuhara S, Begum S, Marsoem SN, Ko JH, Jin HO, Funada R (2012) Gibberellin is required for the formation of tension wood and stem gravitropism in *Acacia mangium* seedlings. Ann Bot 110:887–895

Nugroho WD, Nakaba S, Yamagishi Y, Begum S, Marsoem SN, Ko JH, Jin HO, Funada R (2013) Gibberellin mediates the development of gelatinous fibres in the tension wood of inclined *Acacia mangium* seedlings. Ann Bot 112:1321–1329. doi:10.1093/aob/mct198 (Epub ahead of print)

Paiva JAP, Gracès M, Alves A, Garnier-Géré P, Rodrigues JC, Lalanne C, Porcon S, Le Provost G, da Silva Perez D, Brach J, Frigerio J-M, Claverol S, Barré A, Fevereiro P, Plomion C (2007) Molecular and phenotypic profiling from the base to the crown in maritime pine wood-forming tissue. New Phytol 178:283–301

Paux E, Carocha V, Marques C, Mendes de Sousa A, Borralho N, Sivadon P, Grima-Pettenati J (2005) Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. New Phytol 167:89–100

Perera IY, Heilmann I, Chang SC, Boss WF, Kaufman PB (2001) A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. Plant Physiol 125:1499–1507

Pilate G, Chabbert B, Cathala B, Yoshinaga A, Leple' J-C, Laurans F, Lapierre C, Ruel K (2004) Lignification and tension wood. C R Biol 327:889–901

Pivetti CD, Yen MR, Miller S, Busch W, Tseng YH, Booth IR, Saier MH (2003) Two families of mechanosensitive channel proteins. Microbiol Mol Biol Rev 67:66–85

Plieth C, Trewavas AJ (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiol 129:786–796

Plomion C, Pionneau C, Brach J, Costa P, Baillères H (2000) Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). Plant Physiol 123:959–969

Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001) Wood formation in trees. Plant Physiol 127:1513–1523

Plomion C, Pionneau C, Baillères H (2003) Analysis of protein expression along the normal to tension wood gradient in *Eucalyptus gunnii*. Holzforschung 57:353–358

Pruyn ML (1997) Thigmomorphogenesis: responses of two *Populus* hybrids to mechanical stress. MSc. Thesis, Michigan State University, East Lansing, MI, 90 p

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

Qin SY, Hu D, Matsumoto K, Takeda K, Matsumoto N, Yamaguchi Y, Yamamoto K (2012) Malectin forms a complex with ribophorin I for enhanced association with misfolded glycoproteins. J Biol Chem 287:38080–38089

Qiu D, Wilson IW, Gan S, Washusen R, Moran GF, Southerton SG (2008) Gene expression in *Eucalyptus* branch wood with marked variation in cellulose microfibril orientation and lacking G-layers. New Phytol 179:94–103

Ramos P, Le Provost G, Gantz C, Plomion C, Herrera R (2012) Transcriptional analysis of differentially expressed genes in response to stem inclination in young seedlings of pine. Plant Biol 14:923–933

Savidge RA, Mutumba GM, Heald JK, Wareing PF (1983) Gas chromatography-mass spectroscopy identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in compression wood vascular cambium of *Pinus contorta* Dougl. Plant Physiol 71:434–436

Serpe MD, Nothnagel EA (1995) Fractionation and structural characterization of arabinogalactan-proteins from the cell wall of rose cells. Plant Physiol 109:1007–1016

Shi J, Li J (2012) Metabolites changes in inclined stem. BioResources 7:3463–3475

Shiu SH, Bleecker AB (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. Sci STKE 2001:re22

Shuford CM, Li Q, Sun Y-H, Chen H-C, Wang J, Shi R, Sederoff RR, Chaing VL, Muddiman DC (2012) Comprehensive quantification of monolignol-pathway enzymes in *Populus trichocarpa* by protein cleavage isotope dilution mass spectrometry. J Proteome Res 11:3390–3404

Sierra de Grado R, Pando V, Martinez-Zurimendi P, Penalvo A, Bascones E, Moulia B (2008) Biomechanical differences in the stem straightening process among *Pinus pinaster* provenances. A new approach for early selection of stem straightness. Tree Physiol 28:835–846

Sjodin A, Street NR, Sandberg G, Gustafsson P, Jansson S (2009) The *Populus* genome integrative explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. New Phytol 182:1013–1025

Song D, Shen J, Li L (2010) Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation. New Phytol 187:777–790

Spurr S, Hyvärinen M (1954) Compression wood in conifers as a morphogenetic phenomenon. Bot Rev 20:551–560

Sterky F, Bhalerao RR, Unneberg P, Segerman B, Nilsson P, Brunner AM, Charbonnel-Campaa L, Lindvall JJ, Tandre K, Strauss SH, Sundberg B, Gustafsson P, Uhlen M, Bhalerao RP, Nilsson O, Sandberg G, Karlsson J, Lundeberg J, Jansson S (2004) A *Populus* EST resource for plant functional genomics. Proc Natl Acad Sci U S A 101:13951–13956

Strohm AK, Baldwin KL, Masson PH (2012) Multiple roles for membrane-associated protein trafficking and signaling in gravitropism. Front Plant Sci 3:274

Telewski FW (1989) Structure and function of flexure wood in *Abies fraseri*. Tree Physiol 5:113–122

Telewski FW (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. Am J Bot 93:1466–1476

Thibaut B, Gril J, Fournier M (2001) Mechanics of wood and trees: some new highlights for an old story. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie II Fascicule B-Mécanique 329:701–716

Timell TE (1986) Compression wood in gymnosperms. Springer, Berlin, 2150 p

Toyota M, Gilroy S (2013) Gravitropism and mechanical signaling in plants. Am J Bot 100:111–125

Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M (2008) Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiol 146:505–514

Toyota M, Ikeda N, Sawai-Toyota S, Kato T, Gilroy S (2013) Amyloplast displacement is necessary for gravisensing in *Arabidopsis* shoots as revealed by a centrifuge microscope. Plant J. doi:10.1111/tpj.12324

Ursache R, Nieminen K, Helariutta Y (2013) Genetic and hormonal regulation of cambial development. Physiol Plant 147:36–45

Vahala J, Felten J, Love J, Gorzsás A, Gerber L, Lamminmäki A, Kangasjärvi J, Sundberg B (2013) A genome-wide screen for ethylene-induced ethylene response factors (ERFs) in hybrid aspen stem identifies ERF genes that modify stem growth and wood properties. New Phytol. doi:10.1111/nph.12386

Verica JA, He ZH (2002) The cell wall-associated kinase (*WAK*) and *WAK-like* kinase gene family. Plant Physiol 129:455–459

Villalobos D, Diaz-Moreno S, Said E-S, Canas R, Osuna D, Van Kerckhoven SH, Bautista R, Claros M, Canovas F, Canton F (2012) Reprogramming of gene expression during compression wood formation in pine: coordinated modulation of S-adenosylmethionine, lignin and lignan related genes. BMC Plant Biol 12:100

Vinterhalter D, Vinterhalter B, Orbovic V (2012) Photo- and gravitropic bending of potato plantlets obtained in vitro from single-node explants. J Plant Growth Regul 31:560–569

Wagner TA, Kohorn BD (2001) Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. Plant Cell 13:303–318

Whetten R, Ying-Hsuan S, Zhang Y, Sederoff R (2001) Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. Plant Mol Biol 47:275–291

Wilson BF, Archer RR (1977) Reaction wood: induction and mechanical action. Annu Rev Plant Physiol 28:23–43

Wilson BF, Chien CT, Zaerr JB (1989) Distribution of endogenous indole-3-acetic acid and compression wood formation in reoriented branches of Douglas-fir. Plant Physiol 91:338–344

Wyatt SE, Kiss JZ (2013) Plant tropisms: from Darwin to the international space station. Am J Bot 100:1–3

Wyatt SE, Sederoff R, Flaishman MA, Lev-Yadun S (2010) *Arabidopsis thaliana* as a model for gelatinous fiber formation. Russ J Plant Physiol 57:363–367

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

Yamashita S, Yoshida M, Yamamoto H, Okuyama T (2008) Screening genes that change expression during compression wood formation in *Chamaecyparis obtusa*. Tree Physiol 28:1331–1340

Yan S, Tang Z, Su W, Sun W (2005) Proteomic analysis of salt-responsive proteins in rice root. Proteomics 5:235–244

Yeh TF, Goldfarb B, Chang HM, Peszlen I, Braun JL, Kadla JF (2005) Comparison of morphological and chemical properties between juvenile wood and compression wood of loblolly pine. Holzforschung 59:669–674

Yeh TF, Morris CR, Goldfarb B, Chang HM, Kadla JF (2006) Utilization of polar metabolite profiling in the comparison of juvenile wood and compression wood in loblolly pine (*Pinus taeda*). Tree Physiol 26:1497–1503

Yoshida M, Nakamura T, Yamamoto H, Okuyama T (1999) Negative gravitropism and growth stress in GA_3-treated branches of *Prunus spachiana* Kitamura f. *Spachiana* cv. *Plenarosea*. J Wood Sci 45:368–372

Yoshinaga A, Kusumoto H, Laurans F, Pilate G, Takabe K (2012) Lignifications in poplar tension wood lignified cell wall layers. Tree Physiol 32:1129–1136

Yuan S, Wang Y, Dean JFD (2010) ACC oxidase genes expressed in the wood-forming tissues of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) include a pair of nearly identical paralogs (NIPs). Gene 453:24–36

Zhang XH, Chiang VL (1997) Molecular cloning of 4-coumarate:coenzyme a ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. Plant Physiol 113:65–74

Zhang Y, Sederoff R, Allona I (2000) Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees. Tree Physiol 20:457–466

Zhang Z, Yu J, Li D, Zhang Z, Liu F, Zhou X, Wang T, Ling Y, Su Z (2010) PMRD: plant microRNA database. Nucleic Acids Res 38:D806–D813

Zhong R, Ye Z-H (2013) Transcriptional regulation of wood formation in tree species. In: Fromm J (ed) Cellular aspects of wood formation. Springer, Heidelberg, pp 141–158

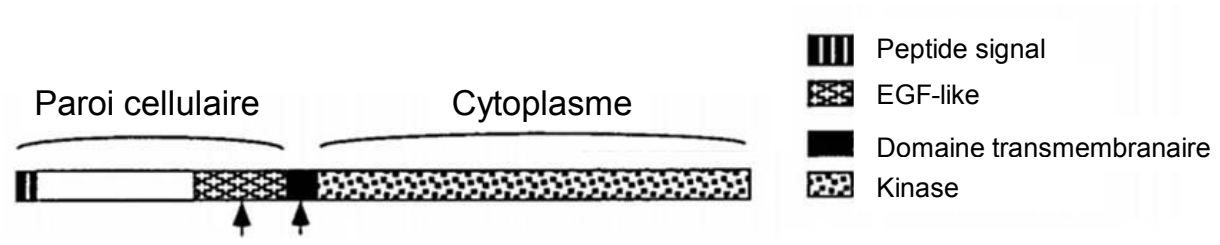


Figure 1. Structure schématique d'une protéine AtWAK (He *et al.* 1999)

Les 5 AtWAKs sont composée d'une partie N-terminale extracellulaire comprenant 2 domaines de type EGF en amont de la région transmembranaire. La partie C-terminale cytoplasmique code un domaine kinase.

3. Les WAKs

Les WAKs (pour Wall-Associated Kinases) sont codées par une famille multigénique décrite principalement chez *Arabidopsis* et le riz (He *et al.*, 1999; Verica *et al.*, 2003; Verica and He, 2002). Ces protéines sont des récepteurs transmembranaires de la famille des RLK/Pelles (Shiu and Bleecker, 2001) capables de se lier aux pectines de la paroi (Decreux and Messiaen, 2005; He *et al.*, 1996). Elles ont une fonction dans le contrôle de l'élongation cellulaire dans les tissus en croissance primaire (Kohorn *et al.*, 2006b; Lally *et al.*, 2001) ainsi que dans la la mise en place des réponses cellulaires liées à l'attaque d'agents phytopathogènes (He *et al.*, 1998; Kohorn *et al.*, 2009; Kohorn *et al.*, 2012; Konlasuk *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009).

3.1. Description de la famille multigénique

La famille des WAKs est relativement peu connue. Elle a été exclusivement décrite chez Arabidopsis et chez le riz (He *et al.*, 1999; Verica *et al.*, 2003; Verica and He, 2002). Chez Arabidopsis, 26 gènes ont été identifiés dont 5 membres *AtWAK* (He *et al.*, 1999) regroupés en un cluster de 30 Kb sur le chromosome 1, et 21 membres *AtWAK*-like (AtWAKLs) répartis sur l'ensemble des 5 chromosomes (Verica and He, 2002).

Les gènes *AtWAKs* codent des protéines composées d'une partie N-terminale apoplastique, d'une unique région transmembranaire, et d'une partie C-terminale cytosolique (He *et al.*, 1999). Cette dernière possède un domaine Sérine/Thréonine kinase conservé à environ 86% entre chaque membre. Les parties extracellulaires des 5 AtWAKs sont similaires de 40 à 64%. Chacune possède 2 domaines EGF-like (Epidermal Growth Factor) situés juste en amont de la région transmembranaire (Figure 1). Chez Arabidopsis, deux types de domaine EGF-like ont été rapportés : EGF-2 et EGF-Ca^{2+}. Chez les animaux, les domaines EGF participent à la dimérisation de protéines dans des conformations induites par le calcium (Stenflo *et al.*, 2000).

Des analyses bio-informatiques subséquentes ont été réalisées sur le gène *AtWAK1*, ce qui a permis l'identification de 21 gènes supplémentaires appelés *AtWAK*-like. Ces gènes sont également répartis en petits clusters sur le génome, le long des 5 chromosomes (Verica and He, 2002). Dix-sept *AtWAKLs* sont prédites pour coder des protéines avec une structure transmembranaire comparable aux 5 AtWAKs. Toutefois, ces séquences montrent une divergence au niveau de la partie extracellulaire, et

dans quelques cas, les domaines de type EGF sont altérés. Les autres gènes semblent coder des protéines tronquées correspondant seulement à la partie extracellulaire (Verica *et al.*, 2003).

Le génome du riz (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) présente une expansion de cette famille multigénique bien plus importante. En effet, il contient 125 gènes *WAKs*, classés selon la conformation de la protéine prédite (Zhang *et al.*, 2005) : 67 sont dites OsWAK-RLKs (Receptor-like kinases) contenant à la fois les domaines kinase intracellulaire et EGF extracellulaire, 28 des OsWAK-RLCKs (Receptor-like cytoplasmic kinases) contenant uniquement le domaine kinase cytoplasmique, 13 des OsWAK-RLPs (Receptor-like protein) contenant seulement un domaine EGF extracellulaire. Enfin 12 membres OsWAKs sont qualifiés de « short genes », car sans domaine particulier mais dont les séquences en acides aminés présentent au moins 40% d'identité avec les OsWAKs transmembranaires. Enfin, 5 séquences sont des pseudogènes. Les 125 *OsWAKs* sont répartis sur les 12 chromosomes qui composent le génome du riz, et à l'instar d'Arabidopsis, ils sont pour la plupart organisés sous forme de clusters. Une analyse réalisée à partir d'une version d'annotation du génome plus récente dénombre 130 *OsWAKs* dans le génome de la sous-espèce *japonica* et 111 chez *indica*. Cette différence peut s'expliquer à la fois par l'évolution distincte de ces deux sous-espèces ainsi que par des différences d'assemblage des génomes (De Oliveira *et al.*, 2014). Des analyses phylogénétiques des protéines WAKs du riz et d'Arabidopsis montrent un regroupement espèce-spécifique. D'après Zhang *et al.* (2005) qui ont inclus dans leur analyse quelques séquences de l'orge, l'expansion plus importante de cette famille multigénique au cours de l'évolution serait spécifique aux monocotylédones.

3.2. Capacité d'interaction des WAKs…

3.2.1. … Avec les sucres pariétaux

La structure des WAKs leur confère un intérêt particulier au sein du continuum CPMCW. De part et d'autre de leur région transmembranaire, elles présentent un domaine kinase intracellulaire impliqué dans des cascades de phosphorylation, mais ont surtout la propriété de se lier à la paroi *via* leur partie extracellulaire. Cette liaison WAK-paroi a été démontrée chez Arabidopsis en utilisant un anticorps dirigé contre AtWAK1 qui localise ces protéines au niveau de la paroi (He *et al.*, 1996). Après broyage des feuilles d'Arabidopsis, AtWAK1 est retrouvée dans la fraction insoluble. AtWAK1 peut être extraite en utilisant des protocoles différents mettant en jeu des préparations enzymatiques servant à produire des protoplastes, ou alors des milieux très réducteurs contenant une grande quantité de détergents (He *et al.*, 1996). Une étude utilisant des enzymes plus

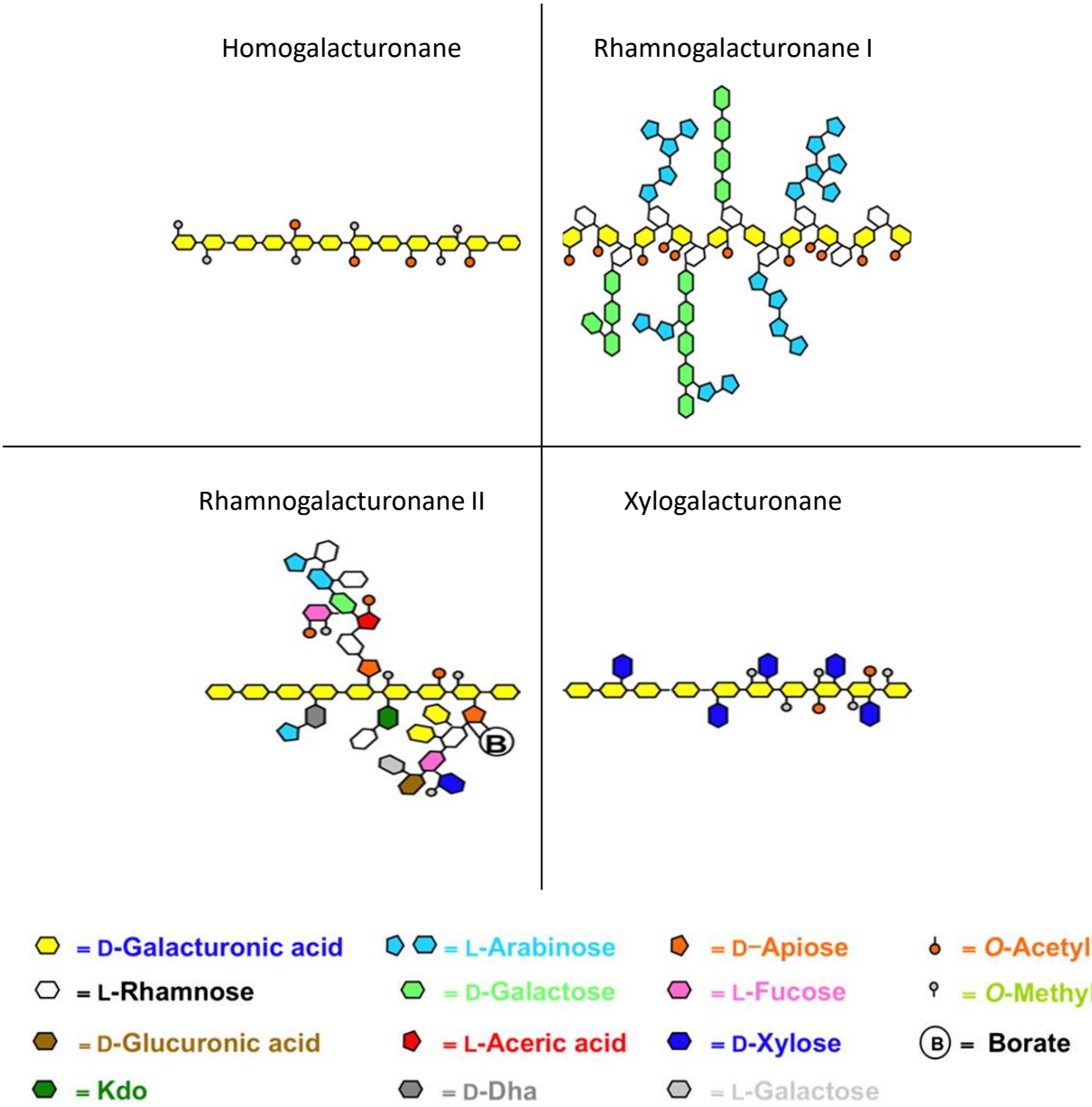


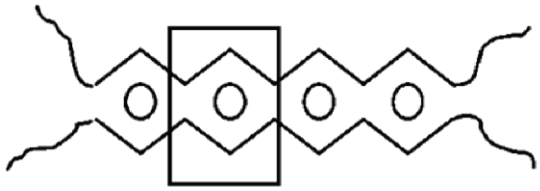
Figure 2. Structure schématique des pectines (Harholt *et al.* 2010)

Les pectines sont des polysaccharides pariétaux riches en acide galacturonique constitués de quatre types majeurs de polysaccharides dont les structures sont montrées dans ce schéma. Kdo : 3-Deoxy-d-manno-2-octulosonic acid, DHA : 3-deoxy-d-lyxo-2-heptulosaric acid.

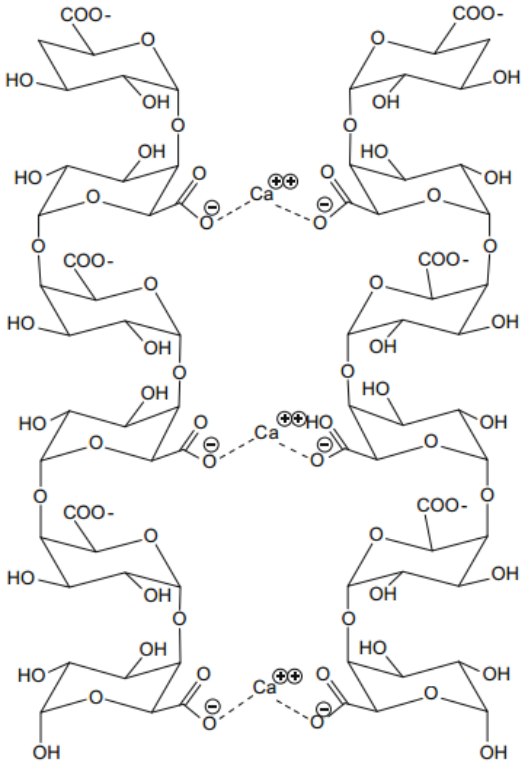
spécifiques montre que seule l'utilisation de pectinases permet l'extraction d'AtWAK1 (Wagner and Kohorn, 2001). Ceci a été confirmé en utilisant des anticorps anti-WAK1 et anti-pectine JIM5 et JIM7 qui reconnaissent le même complexe de 68 kDa par western blot, ce qui pour ces auteurs suggère la possibilité d'une liaison covalente entre les protéines WAKs extraites et des fragments de pectine (Wagner and Kohorn, 2001). Les pectines sont des polysaccharides pariétaux qui peuvent exister sous plusieurs formes (Figure 2, Harholt *et al.*, 2010). La liaison s'effectue grâce à la région N-terminale de WAK1. En effet, une protéine recombinante correspondant aux acides aminés 67 à 254 d'AtWAK1 a la capacité de se lier *in vitro* à des oligogalacturonides (OGs), polygalacturonides et pectines extraites de la paroi d'Arabidopsis. Cette liaison est possible en présence de calcium dans des conditions ioniques (rapport calcium/ion monovalents) permettant la liaison des sucres dans une conformation dite en « boite à œufs » (Figure 3, Caffall and Mohnen, 2009; Decreux and Messiaen, 2005). Ainsi, la modification de ces paramètres (en remplaçant des acides polygalacturoniques (PGA) par d'autres polyanions, du calcium par du magnésium, l'utilisation de chélateurs de calcium, la présence d'OGs avec un degré de polymérisation <9 ou la méthylestérification du groupement carboxyle des sucres) inhibent cette interaction. AtWAK2 peut également se lier aux pectines dé-estérifiées, ainsi qu'aux rhamnogalacturonanes I et II (RGI et II ,Kohorn *et al.*, 2009) et requiert la dé-estérification de ces pectines pour activer son domaine kinase (Kohorn *et al.*, 2014).

Des mutations d'acides aminés d'AtWAK1 chargés positivement en acides aminés neutres provoquent une diminution de la liaison entre WAK1 et des dimères de PGA. Cela suggère une interaction sucre/protéine en partie basée sur la charge de la protéine. Toutefois, ces mutations n'affectent que partiellement la capacité d'interaction avec des multimères de PGA, ce qui laisse penser que le mécanisme d'interaction avec les pectines pariétales est plus complexe (Decreux *et al.*, 2006). Effectivement, la façon dont interagissent les acides aminés chargés négativement et les homogalacturonanes n'est pas encore identifiée.

L'étude de protoplastes transformés par une fusion AtWAK1-GFP montre qu'AtWAK1 co-localise avec des pectines reconnues par un anticorps JIM5, un jour après transformation au sein de vésicules cytoplasmiques. *At*WAK1-GFP co-localise également avec des marqueurs de Golgi (SYP31 et SYP41) mais pas avec FM4-64, un marqueur d'endocytose. Trois jours après transformation, AtWAK1 n'est plus extractible par un détergent dans une fraction soluble mais co-localise toujours avec des pectines. Il se pourrait alors qu'AtWAK1 forme un complexe avec des pectines dans ce compartiment cytoplasmique (Kohorn *et al.*, 2006a). Toutefois, cette liaison doit encore être démontrée. L'ensemble est excrété vers la surface cellulaire seulement si le reste de la paroi est en cours de formation. En effet, en inhibant la formation de cellulose avec de l'isoxaben, la protéine *At*WAK1-GFP s'accumule dans le système endomembranaire (Kohorn *et al.*, 2006a). Ces résultats suggèrent que le



A



B

Figure 3. Représentation de la conformation en « boite à œufs » (Caffall et Mohnen, 2009)

(A) Ce graphique représente 2 chaines d'homogalacturonanes (HG) arrangées autour d'ions calcium (cercle blanc). L'ensemble de la structure est appelée boite à œufs en raison de la ressemblance de l'ultrastructure pectine/calcium avec une boite à œuf. (B) Représentation moléculaire des liaisons entre les acides galacturoniques O-acétylés des HG avec le calcium.

complexe WAK1-pectine est formé en amont de la formation de la paroi au sein de vésicules cytoplasmiques. Ce complexe est ensuite excrété *via* l'appareil de golgi à la surface de la cellule pour former la paroi. Ces vésicules cytoplasmiques sont transitoirement observables sur des feuilles en croissance lors de l'élongation cellulaire (Kohorn *et al.*, 2006a). Au sein de feuilles ayant terminées leur croissance, les WAKs sont détectées à l'interface membrane plasmique/paroi (He *et al.*, 1996).

Sur des protoplastes d'Arabidopsis, un apport exogène de pectines modifie la transcription de 250 gènes, majoritairement impliqués dans la synthèse de la paroi et dans la réponse à l'attaque d'agents phytopthogènes (Kohorn *et al.*, 2009). Pour des protoplastes de mutants *wak2-1*, seulement 1 seul de ces gènes présente cette modification d'accumulation des transcrits ce qui suggère qu'AtWAK2 est nécessaire dans la signalisation qui conduit à la modification de la transcription de ces gènes (Kohorn *et al.*, 2009). Enfin, lorsque la protéine chimère constituée du domaine extracellulaire d'AtWAK1 et du domaine kinase d'une autre protéine transmembranaire (EFR) est exprimée transitoirement dans des feuilles de tabac, il apparait qu'un apport exogène d'OGs provoque l'activation du domaine kinase EFR, ce qui suggère que le domaine extracellulaire des WAKs répond à ces OGs (Brutus *et al.*, 2010). Tous ces éléments laissent à penser que les WAKs sont des récepteurs des pectines (Kohorn, 2015).

3.2.2. … Avec des protéines

Certains membres WAKs de type RLK décrits chez Arabidopsis et le riz possèdent un ou deux domaines de type EGFs en amont de la région transmembranaire. Chez les animaux, les domaines EGF-like sont principalement retrouvés sur des protéines extracellulaires ou membranaires et ont, sauf exceptions, un rôle dans des interactions protéine-protéine (Stenflo *et al.*, 2000). Par exemple, les laminines, des protéines de la matrice extracellulaire, contiennent plusieurs domaines EGF-like (Sasaki *et al.*, 1988) dont un des domaines permet la liaison de cette protéine à son ligand, Nidogen1, chez la souris (Mayer *et al.*, 1993). Les récepteurs transmembranaires Notchs contiennent également des domaines EGF-like au niveau de leur partie extracellulaire (entre 29 et 36 répétitions) responsables pour certains d'entre eux de la liaison avec les ligands Delta, Jagged1 ou Jagged2. Ces domaines pourraient être glycosylés par une glycosyltransférase Fringe, ce qui modifierait la capacité de liaison de la protéine Notch à ses ligands (Kojika and Griffin, 2001). Une sous-famille des domaines EGF-like (EGF-Ca^{2+}) requiert une interaction avec l'ion calcium Ca^{2+} pour assurer les interactions protéine-protéine (Stenflo *et al.*, 2000).

Deux types de domaine EGF-like ont été rapportés chez les WAKs: EGF-2 et EGF-Ca^{2+} (He *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005). Le domaine EGF-Ca^{2+} correspondrait structurellement à celui décrit chez les animaux et interagirait avec le calcium. Le domaine EGF-2 correspondrait à un domaine avec un nombre de résidus différent entre les cystéines qui forment des ponts disulfures et pourrait ne s'associer que facultativement avec le calcium (Stenflo *et al.*, 2000; Wouters *et al.*, 2005). La présence de ces domaines chez les WAKs, qui présentent une structure primaire conservée par rapport aux animaux, laisse penser que les WAKs peuvent interagir avec des protéines.

Des interactions WAKs avec d'autres protéines ont déjà été décrites. Toutefois, aucune preuve n'indique que cette interaction se fait grâce au(x) domaine(s) EGF-like. Des expérimentations de double-hybride ont permis d'identifier AtGRP3, une protéine riche en glycine (Glycine-Rich Protein) comme pouvant interagir avec la partie extracellulaire d'AtWAK1 (acides aminés 178-334), mais des tests d'interaction *in vitro* ont montré qu'AtGRP3 est également capable d'interagir avec la partie extracellulaire d'AtWAK3 et AtWAK5. Au contraire, AtGRP2, -4, -6, -7 et -8 ne se lient à aucune des 5 WAKs (Park *et al.*, 2001). La partie C-terminale d'AtGRP3, riche en cystéines, est essentielle pour la liaison avec AtWAK1. Ces deux protéines forment un complexe *in vivo* avec une phosphatase associée à des kinases, KAPP (Kinase-Associated Protein Phosphatase). Le complexe AtGRP3/AtWAK1 pourrait avoir comme cible une protéine chloroplastique, AtOEE2 (Oxygen-Evolving Enhancer Protein 2), qui est phosphorylée *in vivo* lors de l'ajout d'AtGRP3 et est de plus capable de se lier et d'être phosphorylée par AtWAK1 *in vitro* (Yang *et al.*, 2003).

3.3. Fonction des WAKs

Les études ont été réalisées chez Arabidopsis et chez le riz. Les WAKs semblent être impliquées dans la réponse aux agents phytopathogènes et l'élongation cellulaire. De même, certaines WAKs auraient un rôle dans la réponse aux stress minéraux.

3.3.1. Rôle dans l'élongation cellulaire

Plusieurs types de mutants chez Arabidopsis indiquent que les WAKs sont nécessaires pour l'expansion cellulaire. L'expression d'un gène antisens *wak4* inductible par la dexamethasone diminue la quantité de protéines WAKs par rapport au sauvage. Cela provoque un brusque arrêt de l'élongation cellulaire, et un arrêt de développement des plants d'Arabidopsis. La germination n'est

pas altérée, mais l'élongation des racines, des hypocotyles ainsi que le développement des feuilles sont stoppés (Lally *et al.*, 2001; Wagner and Kohorn, 2001).

De plus, un mutant du gène *WAK2* (*wak2-1*) montre une perte d'expansion cellulaire au niveau des racines dans des conditions limitantes en sels et en sucre (Kohorn *et al.*, 2006b). L'étude de ce mutant montre qu'AtWAK2 est nécessaire pour que les pectines activent l'accumulation des transcrits d'une invertase vacuolaire ainsi qu'AtMAPK3 (Kohorn *et al.*, 2009). AtMAPK3 est un gène impliqué dans des voies de régulation du développement cellulaire ainsi que les réponses à différents stress notamment biotiques. L'ensemble de ces observations suggère qu'AtWAK2 a un rôle sur la régulation de la pression de turgescence des cellules, et par conséquent sur l'élongation cellulaire (Kohorn *et al.*, 2009; Kohorn *et al.*, 2006b).

Chez le riz également, un gène appelé *OsiWAK1* (pour *Oryza sativa indica*) est impliqué dans le développement cellulaire (Kanneganti and Gupta, 2011). Les mutants *Osiwak1* montrent un phénotype nain, dû à la réduction de la taille des cellules. En effet, l'élongation et non la division cellulaire est affectée (Lally *et al.*, 2001). Chez l'orge (Hordeum vulgare), les mutants du gène *HvWAK1*, normalement exprimé dans les racines, ont des racines plus courtes lors d'un stress salin (Kaur *et al.*, 2013). Toutefois les auteurs n'ont pas vérifié s'il s'agissait d'une diminution due au nombre de cellule et/ou à leur longueur.

3.3.2. Rôle dans la réponse aux pathogènes

Les caractéristiques d'interaction des WAKs décrites auparavant ont pour la plupart été découvertes dans le but de comprendre le rôle des WAKs dans la réponse aux pathogènes.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *AtWAK1* participe à l'établissement des réponses de défense végétale lors d'attaques d'agents infectieux (He *et al.*, 1998). En effet, on observe une accumulation des transcrits du gène *AtWAK1* après une inoculation ou lors d'une simulation d'attaque infectieuse par ajout d'acide salicylique (SA) ou d'un analogue structural INA (2,6-dichloroisonicotinic acid). Cette réponse transcriptionnelle ne démontre pas en soi un rôle de la protéine en tant que récepteur. Toutefois, une plante possédant un gène *AtWAK1* antisens, ou alors un allèle négatif dominant, est sensible à une simulation d'attaque pathogène par de l'INA. Une expression ectopique de *AtWAK1* permet aux plantes mutantes d'être résistantes à des concentrations normalement létales de SA (He *et al.*, 1998). Les gènes *AtWAK1* et *AtGRP3* sont tous les deux surexprimés suite à une induction par de l'AS. L'ajout d'une protéine recombinante GRP3 sur des protoplastes induit une accumulation des

transcrits des gènes *WAK1*, *AtGRP3* et également *PR1* (Pathogen Related) chez Arabidopsis (Park *et al.*, 2001) alors que l'expression d'un gène antisens *WAK1* inhibe l'induction de *PR1* (He *et al.*, 1998). De plus, ce complexe AtWAK1/GRP3 est capable de phosphoryler AtOEE2 qui est également phosphorylée lorsque des plantes d'Arabidopsis sont infectées par des bactéries *Pseudomonas syringae* (Yang *et al.*, 2003). L'ensemble de ces travaux suggère qu'AtWAK1 est impliquée dans la signalisation cellulaire induite par un agent infectieux.

Certains gènes *AtWAKLs* seraient également impliqués dans ce mécanisme. En effet, tout comme *AtWAK1*, les gènes *AtWAKL5* et *AtWAKL7* présentent une accumulation de transcrits par un apport de SA ou d'INA, ainsi qu'après des blessures suggérant la possibilité d'une intervention de ces protéines dans la réponse aux attaques phytopathogènes (Verica *et al.*, 2003). Meier *et al.* (2010) ont montré que l'accumulation des transcrits du gène *AtWAKL10* est induite après inoculation par des agents phytopathogènes de la même manière que de nombreux gènes dont les produits seraient impliqués dans les défenses du végétal. De plus, AtWAKL10 est une protéine à double action enzymatique : sa partie C-terminale cytoplasmique peut agir en tant que kinase mais aussi de guanylyl cyclase dans la formation du cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate). Ces deux activités interviennent potentiellement dans les premières étapes de transduction de signaux, le cGMP agissant comme messager secondaire dans de nombreuses fonctions physiologiques dont les stress biotiques et la réponse gravitropique dans des racines de soja (Hu *et al.*, 2005). Enfin, un allèle d'*AtWAKL22* dans le génotype Columbia-0 (Col-0) chez Arabidopsis, aussi connu sous le nom de RFO1 (Resistance to Fusarium Oxyporum 1), code une protéine permettant à des génotypes sensibles à la fusariose de devenir plus résistants, alors qu'une mutation de cet allèle rend des plantes de génotype Col-0 normalement résistantes plus sensibles (Diener and Ausubel, 2005).

Chez d'autres espèces, un rôle des WAKs dans la réponse aux agents phytopathogènes a aussi été mis en évidence. (Hurni *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009; Rosli *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Zuo *et al.*, 2015). Chez le riz, le gène *OsWAK1*, tout comme *AtWAK1*, *AtWAKL5*, *AtWAKL7*, *AtWAKL10* et *AtWAKL22*, est impliqué dans la réponse aux agents pathogènes (Li *et al.*, 2009). Une attaque par le champignon *Magnaporthe oryzae* provoque une modification de l'accumulation des transcrits d'*OsWAK1* dans les feuilles de riz. Des mutants surexprimant ce gène sont résistants à *M. oryzae*. Chez le génotype sauvage, *OsWAK1* est surexprimé par des traitements mimant une attaque pathogène (comme le SA ou le méthyl-jasmonate). Enfin, OsWAK1 est capable de s'autophosphoryler ainsi que de phosphoryler la protéine OsRFP1 (Li *et al.*, 2009). OsRFP est un facteur de transcription à doigt de zinc qui serait impliqué chez le riz dans la réponse aux agents phytopathogènes induite par l'éthylène (Zhou *et al.*, 2008). Certaines WAKs semblent intervenir dans la réponse immune des

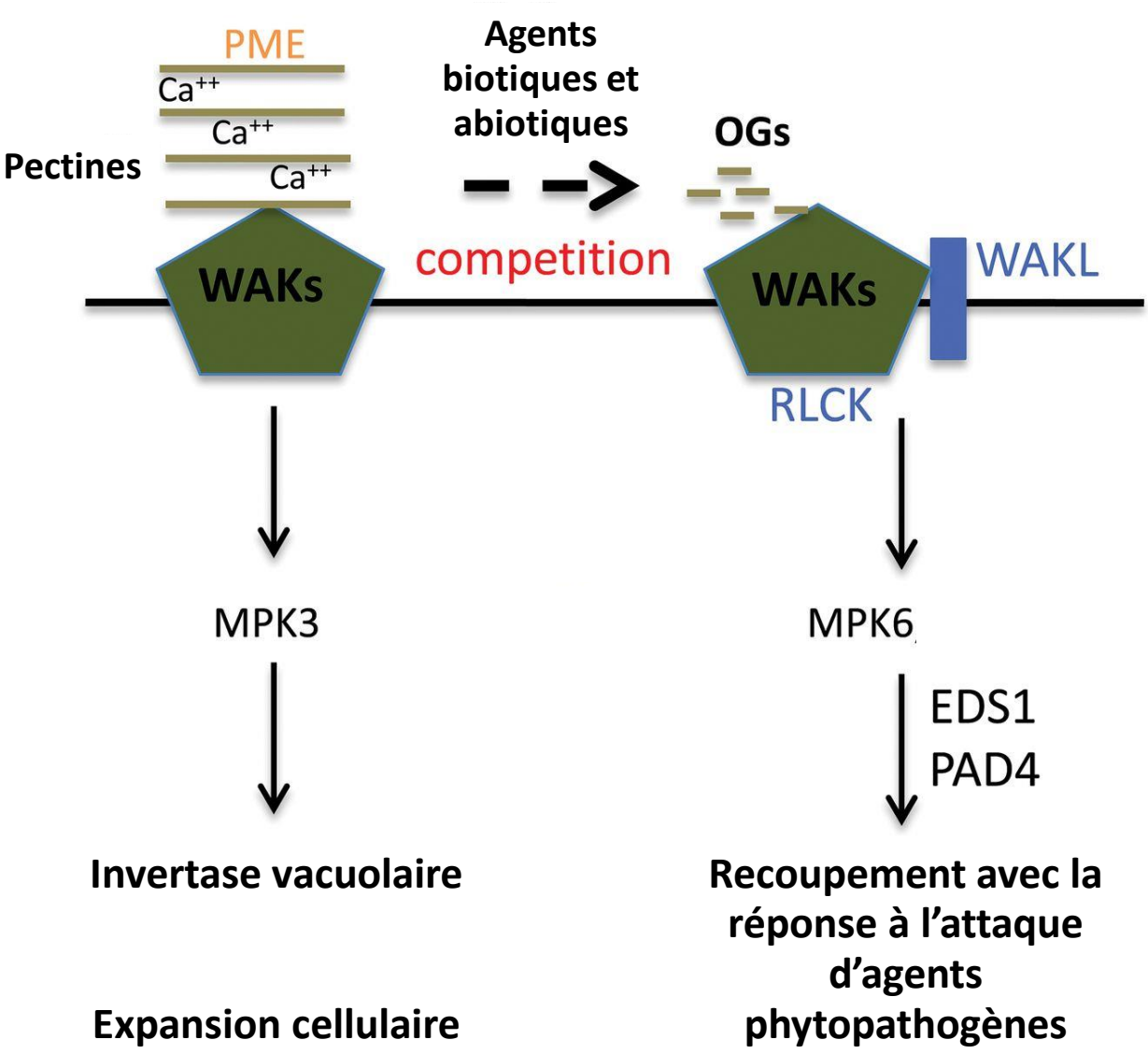


Figure 4. Modèle de signalisation induite par les WAKs chez Arabidopsis (Kohorn 2015)

Ce modèle décrit les WAKs comme système de perception des pectines. Les polymères de pectines (marron) peuvent être liés dans la paroi par du calcium et la (les) WAK(s) (vert) peuvent se lier à ces pectines. La transduction d'un signal au travers une MAP Kinase (MPK3) conduit à l'activation d'une invertase vacuolaire ainsi qu'à d'autres protéines impliquées dans l'élongation cellulaire. Le niveau de méthyl-estérification des pectines est modulé par des pectine-methylestérases (PME) et les WAKs se lient aux pectines dé-méthylées avec une plus grande affinité. Les pectines peuvent également être fragmentées par des évènements biotiques et abiotiques et les oligogalacturonides (OGs) produits qui ont une meilleure affinité pour les WAKs que les pectines non fragmentées induisent au travers leur liaison une réponse cellulaire de stress. Ces liaisons activeraient MPK6 ainsi que les facteurs de transcription EDS1 et PAD4. Les auteurs émettent l'hypothèse que ce signal puisse se faire à l'aide de liaison des WAKs avec des WAKs-like et des protéines kinase (RLCK, en bleu sur la figure).

plantes car leur inactivation diminue les réponses de défense chez la tomate (Rosli *et al.*, 2013), le blé (Yang *et al.*, 2014) et le maïs (Hurni *et al.*, 2015; Zuo *et al.*, 2015).

3.3.3. Rôle dans la réponse aux minéraux

Certains membres WAKs semblent également intervenir dans la réponse à différents minéraux bien que leur mode d'action reste à élucider. En effet, l'apport d'aluminium dans le substrat provoque une accumulation de transcrits et de protéines AtWAK1 dans les racines d'Arabidopsis. Des plantes transgéniques sur-exprimant AtWAK1 ont une meilleure tolérance à l'aluminium (Sivaguru *et al.*, 2003). De plus, l'expression d'AtWAKL4 est induite par les ions Na^+, K^+, Cu^{2+}, Ni^{2+} et Zn^{2+} (Hou *et al.*, 2005). Des mutations du promoteur d'*AtWAKL4* le rendent non inductible par Na^+, K^+, Cu^{2+} et Zn^{2+} et provoque l'hypersensibilité des plantes à ces ions mais étrangement leur tolérance à l'ion Ni^{2+}. AtWAKL4 régule aussi les gènes de transporteur de zinc lors d'une carence. En effet, le mutant *wakl-4* montre une diminution de l'accumulation de l'ion Zn^{2+} dans les tiges (Hou *et al.*, 2005).

Chez le riz, on observe une modification de l'accumulation des transcrits *OsWAK11* après une stimulation par les minéraux Al, Na et Cu ou après des blessures, ce qui laisse penser qu'il puisse être impliqué dans différents processus (Hu *et al.*, 2014).

3.4. Fonctionnement des WAKs : un modèle hypothétique

L'ensemble de données obtenues sur AtWAK1 et AtWAK2 a conduit Kohorn et ses collaborateurs à proposer un modèle où les WAKs sont des récepteurs des pectines (Figure 4, Kohorn, 2015). Ce modèle suggère que les WAKs moduleraient un signal différent selon le type de sucre auquel elles sont liées. Lorsque les WAKs sont liées aux pectines pariétales dé-estérifiées par AtPME3 (Kohorn *et al.*, 2014) et structurées en « boite à œufs » grâce aux ions Ca^{2+}, le domaine kinase intracellulaire serait actif et initierait une voie de signalisation relayée par AtMAPK3. Ceci conduirait à l'activation d'une invertase vacuolaire (Kohorn *et al.*, 2006b) et à la modification de l'accumulation de transcrits de différents gènes (Kohorn *et al.*, 2009). Ces mécanismes participeraient à la régulation de la croissance cellulaire. Lors de la dégradation des pectines pariétales, par l'intrusion d'un agent biotique notamment, les fragments de pectines générés (OGs) qui ont une meilleure affinité que les pectines se lieraient préférentiellement aux WAKs et induiraient par l'intermédiaire d'AtMAPK6 une réponse de stress (Kohorn *et al.*, 2012).

Toutefois dans ce modèle, le rôle spécifique de chaque membre WAK n'est pas précisé. Cela est dû à la proximité génomique des 5 AtWAKs sur un locus de 30 kb qui rend difficile l'obtention de mutants avec différentes combinaisons de gènes WAKs mutés (Kohorn and Kohorn, 2012). Surtout, de simples mutants ne présentent que peu ou pas de variation phénotypique, ce qui peut être dû à la redondance fonctionnelle des membres de cette famille multigénique, ou alors à une compensation des voies de signalisation affectées par d'autres mécanismes qui ne sont pas encore identifiés à l'heure actuelle.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Dans le cadre de la thèse, nous souhaitons analyser l'implication des WAKs après un stimulus gravitropique chez le peuplier. Nous émettons 3 hypothèses quant à leur possible implication. Dans les deux premières hypothèses, une ou plusieurs WAKs seraient des protéines présentes de façon constitutive dont l'activité serait modulée suite aux contraintes mécaniques s'exerçant sur le continuum CPMCW lors d'une stimulation gravitropique. Ainsi, ces WAKs seraient des senseurs de l'état du CPMCW. (1) Les déformations du continuum CPMCW pourraient avoir des répercussions sur les liaisons entre la partie extracellulaire des WAKs et les sucres pariétaux, ce qui modifierait l'activité du domaine kinase intracellulaire. (2) Les déformations du continuum CPMCW modifieraient la structure 3D du domaine extracellulaire des WAKs, ce qui modifierait des interactions avec des protéines extracellulaires et entrainerait la modification de l'activité du domaine kinase intracellulaire. En effet, l'interaction de récepteurs WAKs avec d'autres protéines a été décrite chez *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2001) et la présence du domaine de type EGF suppose la possibilité d'interactions avec d'autres protéines apoplastiques. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives. Dans une troisième hypothèse, les WAKs ne seraient pas des senseurs de l'état du CPMCW mais interviendraient plutôt dans la réponse précoce à un stimulus gravitropique. Nous supposons que la synthèse des WAKs et leur mise en place au niveau de la membrane plasmique seraient modifiées à la suite de l'inclinaison de la plante. Chez Arabidopsis, les WAKs s'assemblent aux pectines dans le compartiment golgien de la cellule avant que l'ensemble WAK/pectine soit excrété vers la paroi (Kohorn *et al.*, 2006a) et ait un rôle dans le contrôle de l'élongation cellulaire (Kohorn *et al.*, 2006b). Ainsi chez le peuplier incliné, une expression différentielle entre la face supérieure de la tige et la face inférieure suggèrerait un rôle, par exemple, dans l'élongation différentielle des cellules nouvellement formées par le cambium entre les faces supérieure et inférieure (Plomion *et al.*, 2001). En effet, chez de jeunes tiges de peuplier tuteurés puis inclinés, les fibres et les vaisseaux du bois de tension sont respectivement 4.5% et 2.6% plus longues que celles du bois opposé (Jourez *et al.*, 2001).

La première partie des résultats de ce manuscrit présente sous la forme d'une publication les résultats d'une analyse *in silico* qui a permis de caractériser cette famille multigénique chez le peuplier. La seconde présente une analyse transcriptomique qui a permis d'analyser si la stimulation gravitropique modifie l'accumulation des transcrits *WAKs*. La troisième partie présente le développement d'outils pour localiser les protéines WAKs au sein des différents tissus de la tige en croissance secondaire, et pour rechercher des interacteurs protéiques avec la partie extracellulaire. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans le cadre de la problématique de l'implication des WAKs après un stimulus gravitropique chez le peuplier.

MATERIEL ET METHODES

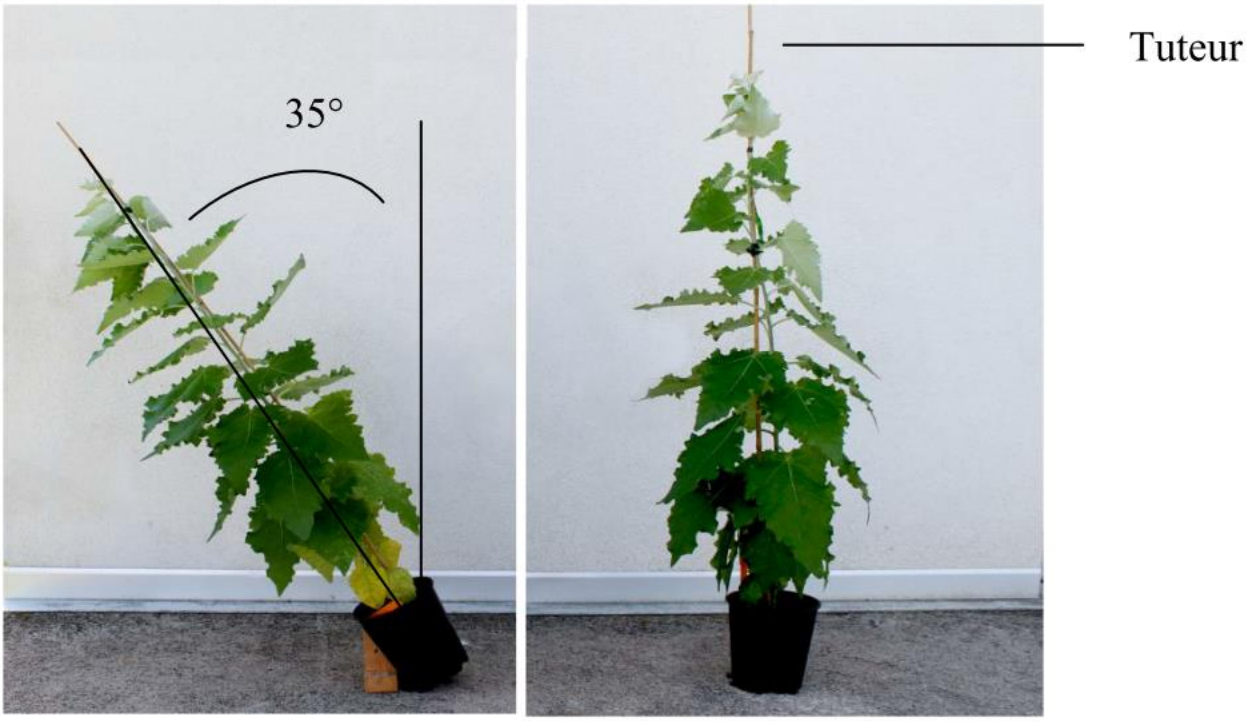


Figure 5. Représentation de l'inclinaison d'un peuplier *Populus tremula x alba*

Les peupliers sont tuteurés 10 jours avant le début de l'expérience dans laquelle ils sont inclinés selon un angle de 35° par rapport à la verticale en utilisant un dispositif placé sous le pot.

1. Matériel végétal et condition de culture

Des peupliers hybrides (*Populus tremula x alba*, clone INRA '717-1B4') sont générés à partir de culture *in vitro* sur milieu de culture MS (Murashige and Skoog, 1962). Lorsque la partie aérienne atteint 4 cm, les plantules sont progressivement acclimatées en chambre de culture (16h-22°C/8h-19°C jour/nuit, 60 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, humidité relative 70%) dans une solution hydroponique (Morizet and Mingeau, 1976). Dès que les plantes atteignent 20 cm de hauteur (*i.e.* 14 entrenœuds), elles sont transférées sur un autre système hydroponique permettant de poursuivre leur croissance jusqu'à une hauteur de 70 cm (43 entrenœuds). Les conditions de culture restent inchangées. Différents organes [apex, tige en croissance (entrenœud 38), pétiole en croissance (entrenœud 38), limbe en croissance (entrenœud 38), pétiole mature (entrenœud 10), limbe mature (entrenœud 10) et bourgeons] et différents tissus [écorce mature (entrenœud 10), xylème mature (entrenœud 10)] sont prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C. Simultanément, un lot de plantes cultivées en hydroponie ayant atteint 20 cm de hauteur sont repiquées en pots de 5 L contenant un mélange de sols commerciaux (50% Monagri® NF U 44-551, 50% Humustar, Champeix, France) complémenté d'une solution d'engrais 1 $g.L^{-1}$ Algospeed® (Algochimie, Château-Renault, France) contenant les minéraux N : P : K : Mg dans les proportions respectives de 17 : 7 : 22 : 3. Les pots sont placés en serre dans les conditions suivantes : 16 h jour / 8 h nuit, 22°C / 19°C (jour / nuit), 350 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ et 70% ± 10% d'humidité relative. Les plantes ont été arrosées chaque jour par remplissage des coupelles au pied des pots jusqu'à la stimulation gravitropique. Dix jours avant la stimulation gravitropique, les plantes ont été tuteurées afin d'éviter les déformations mécaniques à l'échelle de l'organe (courbure de la tige) causé par le poids propre de la plante pendant le stimulus. Pour chaque arbre, des observations cytologiques après coloration au safranine/bleu astra ont été réalisées pour vérifier l'absence de bois de tension qui aurait pu être provoqué par 10 jours de tuteurage.

2. Stimulation gravitropique en serre

Les stimulations sont assurées par inclinaison de 35° par rapport à l'axe vertical naturel à l'aide d'un support calibré sous les pots (Figure 5). Cet angle permet une réponse gravitropique des tiges en évitant tout développement de branches latérales. L'inclinaison est réalisée 7h après le début du jour. Après inclinaison, la partie basale des tiges de 3 peupliers (entrenœuds 5 à 10) est collectée après 30 min, 1 h et 2 h d'inclinaison. Les parties supérieure et inférieure sont alors séparées à l'aide

A

B

Figure 6. Représentation du dispositif de lumière isotrope

Les photos montrent une sphère ouverte qui refermée offre un environnement lumineux isotrope à la plante. Le peuplier (*Populus tremula x alba*) est droit (A) ou incliné (B) par rotation du système de support du pot aux angles de 15° et 35° par rapport à la verticale.

d'un scalpel. Pour chaque partie, le xylème et l'écorce sont séparés manuellement. Ces différents tissus sont congelés individuellement et immédiatement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

3. Stimulation gravitropique au sein d'un dispositif de lumière isotrope

Nous disposons de sphères de 150 cm de diamètre qui confèrent un environnement lumineux isotrope (Figure 6, Coutand *et al.*, 2015). La photopériode appliquée est la même que dans les chambres de culture. La température est maintenue à 24°C la journée et 18°C la nuit. Les plantes ayant atteint 40 à 50 cm de hauteur, préalablement tuteurées comme décrit précédemment, sont acclimatées dans ces sphères pendant 24h, en position verticale. Elles sont ensuite inclinées par rotation du support du pot pendant 30, 60, 120 ou 180 minutes selon 2 angles différents : 15° et 35°. Des segments de tige de 7 peupliers (15 cm de longueur, 5 cm au-dessus du collet) sont collectés 4h après le début du jour après 30 min, 1 h, 2 h et 3h d'inclinaison. Les parties supérieure et inférieure du xylème sont alors séparées à l'aide d'un scalpel. Ces différents tissus sont congelés individuellement et immédiatement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

4. Extraction ADNg, ARNtx, synthèse des ADNc

Les ARN totaux (ARNtx) ont été extraits à partir de 150 mg de broyat d'organes ou de tissus végétal en utilisant un tampon d'extraction au CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) selon le protocole décrit par Chang *et al.* (1993). La concentration et la qualité des ARNtx sont déterminées par dosage spectrophotométrique aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), ainsi que par dépôt d'1 µg d'ARNtx sur un gel TAE 0,5X - agarose 1,5%. La synthèse d'ADNc simple brin est réalisée à partir de 4 µg d'ARNtx avec le kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en respectant le protocole du fabricant.

Les ADN génomiques (ADNg) sont extraits à partir de 150 mg de limbe mature de peuplier en utilisant un tampon d'extraction au CTAB d'après le protocole de Novaes *et al.* (2009). La quantité et la qualité de l'ADNg extrait sont évaluées par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm (NanoDrop ND-1000) et par migration sur un gel TAE 0,5X – agarose 1%.

5. PCR quantitative en temps réel

Les amorces spécifiques de WAKs (Tableau 1) sont dessinées manuellement à partir des séquences WAKs de la troisième version d'annotation du génome du peuplier *Populus trichocarpa*. Les amorces sont testées par PCR sur les matrices d'ADNg de *Populus trichocarpa* et *Populus tremula x alba*. Si aucun produit d'amplification n'est observable sur ADNg de *P.trichocarpa* ou s'il y a plusieurs fragments amplifiés après électrophorèse du produit sur un gel TAE 0.5X – Agarose 1.5%, les amorces sont rejetées. Chaque couple d'amorce générant un produit d'amplification à partir de l'ADNg de *P.tremula x alba* est testé sur un mix d'ADNc issus de différents organes de peuplier. Les fragments amplifiés sont alors séquencés. La température optimale d'hybridation des amorces retenues est ensuite déterminée lors d'une PCR en gradient de température (gamme de 50°C à 65°C). L'efficacité des amplifications (E) est appréciée au cours d'une PCR sur une gamme de dilution d'ADNc allant du 20ème au 160ème. Les efficacités sont toutes comprises entre 94% et 107%. L'amplification en PCR quantitative est réalisée à l'aide du thermocycleur iCycleur iQ (BioRad, Hercules, CA, USA) grâce au kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgique) dans un volume final de 18 µL et dans lequel sont ajoutés 2 µL d'ADNc dilués au 1/20. Après une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, le programme est constitué de 40 cycles comprenant une dénaturation de l'ADN (15 s à 95°C), l'hybridation des amorces (15 s à 58°C) puis la polymérisation (20 s à 72°C), et se termine par une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C.

Les niveaux d'expression des transcrits de différents gènes *WAK* sont estimés dans les tissus et organes analysés. Les cycles seuils (*C*q) bruts sont dans un premier temps normalisés par 2 gènes de références EF1α (Elongation Factor-1α, EF1f 5'-GACAACTAGGTACTACTGCACTGTC-3' / EF1r 5'-TTGGTGGACCTCTCGATCATG-3') et UBC (ubiquitine, UBQf 5'-CCCGGCTCTAACCATATCCA-3' / UBQr 5'-GGGTCCAGCTTCTTGCAGTC-3') sélectionnés parmi un pool de 4 candidats à l'aide de l'outil BestKeeper (http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html ; Pfaffl *et al.*, 2001). Les valeurs corrigées Cq_c sont dans un second temps exprimées en unités arbitraires à partir de l'équation : Valeur = - 0,0588 x Cq_c + 2.3529. Cette formule correspond à l'équation d'une droite étalon qui associe le Cq_c le plus précoce (cycle 23 ; c'est-à-dire la *WAK* la plus exprimée) à la valeur 1 et au Cq_c le plus tardif (cycle 39 ; considéré comme limite de non expression) à la valeur 0 (Lopez *et al.*, 2012).

Les niveaux d'expression des transcrits des gènes *WAKs* sont également estimés après 30 min, 1 h et 2 h de stimulation gravitropique. Les cycles seuils *C*q bruts sont normalisés en utilisant l'index BestKepper des 3 gènes de références *EF1α*, *UBC* et *UP2* (UP2f 5'-TATCGTCTTGTGACAATTTTTAG-3' et

	Amorce Sens (5'-3')	Amorce Antisens (5'-3')	Taille amplicon	*Pta* ADNg	*Pta* ADNc
WAK001	TTCGGGTGTCAAAAGGAGCTCC	TCGCCAATTGTTACTGAAGTAGT	121	-	NT
WAK002	CAAGAAATTAATAGTCTCTGTTCC	CAACCCATTCTTGGTCTGCT	154	+	-
WAK005	AACGAAATGGTGGTTTATTGCTG	GTTGTGAAAGGATGACGACT	284	+	-
WAK007	CGGAAGACAATAGACTGTCC	TCATTGCTTGCATCATCCAT	241	+	-
WAK010	CATGTTCAAGGCACTTTTGG	ATATCAAATATCTTGTTCTCTTCCAC	206	+	-
WAK011	TGCGAAAAGATGCTTGAATTTG	GCCAGTATCAAAATCACCG	202	+	+
WAK012	GTATCAGATTTCGGAACTTCAAGG	ATTGGTTTTTGCCCACTCAA	182	+	+
WAK014	TTCTTGATGAACGACTTATGA	CTGAAGTAGGAGGCCCAGCA	243	+	+
WAK015	TGGAGTGGTTCTGGTTGAGC	CTCCTGAATATTTAGCTCTTG	295	+	-
WAK016	TGCTAGAGTTAAGGAGGGT	TGTCGAAACTGCATCCCAA	229	+	+
WAK017	AACCAGGATAATATTAGGCAGCTC	AGCCCCTCTAATTCCATTGCTACG	116	+	+
WAK019	AAGCAGGATAATATTAGGCAGCTG	CATCCAGTGATTGCATTAAATAATTCTG	277	+	-
WAK020	CTGATAGGATTGGCAGGGGGAG	TTTAGAGGCTTGTCGCTGACATTA	280	+	+
WAK025	ATTTACATTCGGCAGCATCC	CGTAAATTGACTAGATTGGAAGTAT	203	+	-
WAK026	CGACTTCTTCTGAAACATGGTGACG	GACTAAGAACATGTGCTAAAACACAG	149	+	+
WAK027	TGCCCCCGAAGTATTTTGTC	ATGCACCACAAGCTTGCCG	258	+	+
WAK028	TGATGTTTATAGCTACGGGATGC	GCACCACAAGCTTGCCAG	208	-	NT
WAK029	GGACAGCTTGGTTGGATTGT	AACCCCATTGATTCTGCAAG	163	+	-
WAK030	TTTCGTGGTGAGGAAGATGG	CACTCATAGAATCTGGTGAT	230	-	NT
WAK031	TTATACTGGATCTTCGGAAACT	CTACCACCTTTGTCATTGATGA	150	+	-
WAK032	GAATTAGCTTTCCGGTGTTTGC	CTACTCACATATTTTAAGCACAA	290	+	+
WAK033	TCTGCAGAAATTTTGGAGGAGT	CTTCCTCTTCTGATATACCC	201	+	+
WAK034	ATAAGGACTTCGTGGTAAGAG	CTTCAATAGCCAACATCATCG	191	+	-
WAK035	GCTTTCTAGGCTAACATCACTCC	ACAAGTTTCAACAGCTCAAAATGTTGT	288	-	NT
WAK036	CTTGCTAAGCAGAAGGCCCTTC	CTACAGCTTGCTAAAATGTGGCATTCC	303	+	-
WAK037	ATCGGTTGTTGGGATTGAAA	CTTGTTGAAGATAGGGGTGTTTA	167	+	-
WAK038	CGGGTATTTTAACCGCAAGG	CTTCTATCTCATCCATCTCG	207	+	+
WAK039	CTTGCAAAAGGATGTCTAAATG	GGGAGGACTTGCATTCTTGC	180	-	NT
WAK040	ATGAGCTTTCTAAGCTTAAAGATTTTC	TTTTCTGTTCTCTATTTCTGCCAAAT	139	+	-
WAK041	GTGCTGATGTCTCCTGGCA	TCACCTTCATCAGCTGTCTGG	275	+	+
WAK042	GCCCATTCACTGAAAACCAT	CATCGCAACTTCTCTCATTGG	195	+	-
WAK043	CAGACAGCTGATGAAGGTGAAATT	GCTCATCGGACACTTCCTTCATT	115	+	+
WAK044	TCGAACCAGTCAATTAACAGG	CAAACATCTCTTTGCAAGATTCG	241	+	+
WAK046	GGATGAGATAGAAGCTGTAGCTGT	CATCAATAGCCATAATCTACAATTTAG	343	+	-
WAK047	GCAGGGTTGAATTCCCTACA	AAGAAAACTCTCCACCGCCC	206	+	-
WAK048	CAGACTACTTGTTAGGCGAATCC	CAATTTATTAATGGAGCTATCTGACTTG	175	+	+
WAK050	AGTAGATCCATATCTTGACCCGG	CAGTGATTTCTGACTTCCATGGTC	232	+	-
WAK052	GCTGAACTTGTGCTGCAGGCTC	GAAATCATTCTGTAATATTTGAATGTC	150	+	-
WAK053	CATTGGGATCCCTGGCAGCAGC	CTGAAATAAGGAGGATTTTTCTGCAG	228	+	-
WAK054	TAACTGGCACGGAGCCATCAAG	AGCTCTATTTTGACCATGCGTTC	148	+	+
WAK055	GATAATAGATCCATATCTTGACCCAA	CAGTGATTTCTGACTTCCATTTTG	235	+	+
WAK056	GCGACAGAGCATGAAAAGAAC	CGATGCTACAAACATTCGATGA	241	+	+
WAK057	TGGAGATGGTGGCACAGAAG	ATCAAGCTGACTGATCCAGT	246	+	+
WAK058	GGAGAAGACCTGCGGTTACA	GTGTACTTAACCTGTCTCCTCT	163	+	-
WAK060	CCCAGCAAATGAGACCGAG	TCTTCCGTGCCACCATCTC	267	-	NT
WAK061	TAGCCATTGTGGGACTGTGG	CCTGCATTCGTTCTCTTTGC	151	-	NT
WAK062	GGATGAAAACTTCGCTCCAAA	AATTCTCTGTCAATGCGTTCC	233	+	-
WAK063	CTAACCAGTGAGATTCCGGTA	TGAACTTCTGCAGCGAATCG	196	-	NT
WAK064	TTACTGGCCAGATTGGGTTC	GAATAATCAGACATGGAAGATGAT	237	+	-
WAK065	AGAAGACCTGCGGTTCCAAA	ATGGCTGCCAATTCTTGATGT	246	+	+
WAK066	TGAGCAGGTTTGTGAAGGAAA	CATTTGTAGGGATTCAACATCG	181	+	+
WAK067	CACAGAGTTGTACAGATGCTTC	ATGAAGAATCGATGCTACAAC	160	-	NT
WAK068	CAGTGCTTAGCTGCAGTGCT	TACTGTATTCGATCGCCTGAAT	207	-	NT
WAK069	AAGCCTTTTCTCGTTCCACA	AGTTTAGATAGTTCAGGCACG	192	+	-
WAK070	CTGAGGAAATTGAGTACATTACGAC	GATGCATGTATGTTCATGATCACATC	247	+	+
WAK071	GGCTGCAATAGCAAGAAAGCTGTG	TTGGAAGGCAATTGCAGATCATCG	132	+	+
WAK072	ACAGAGCACTTGCTAGGCGAAC	ATAAAGCTGCAACTTAATCAAACAAC	217	+	-
WAK073	AACAAAATAACGAAGAAGCTGAGAG	GGAAAAACTTACAGAGTCGAGACACG	193	-	NT
WAK074	CTCAAATGCCAAGTCAGGAAAG	GATGGGCGGTTTACTCCTG	183	+	-
WAK075	AAACGAGTCACAAGAACACAC	CGTTCAAATTCAAGCATCTCTC	161	+	-
WAK076	TTAAGGAGCACTGCCCCAAG	ATTACTTCAGCCGTGATGCC	196	+	+
WAK077	TGTCACAGACTCTCTGCCCAGT	GCAGAAAAGCTATAGAGTACC	214	+	+
WAK078	AGAACATCCGTCTGCCACCT	TAAACTCGCCAATGCTGTGC	234	+	+
WAK079	ACCATACTTGTCTTCCCCTCC	TGGACTAGCTCAGGCCATAGA	176	-	NT
WAK080	AGGGCAAGGAAATCAGACCT	CCGGATATTCTTTAGCAATGCAA	170	+	+
WAK081	TGGCTTTGTTATGCTTGCAG	CAGTTGTGGAATTCGATGGCC	219	-	NT
WAK082	TGCTCCAAGGATCAGAGTGC	CCATTCTGGGAAGTAGATTTGA	210	+	-
WAK083	GCAAGGCTTTTGCTTATTGG	TGGGCATGAAGTTATGGTGA	167	-	NT
WAK084	AGTGGCACCCCGTGGATC	TCAAAGATTATAGAACGCCTCA	257	+	+
WAK086	GGAATGGTGTTGCTCGAAAT	GACAGTATTCATGGACGGACA	231	+	+
WAK087	ATAAACCATGAGCCCTGTGC	CACGATTGTTCTCGCAAGTC	157	+	-
WAK088	CTGTCGTGCAAATGTTGGAA	CTTCTACTTGACTACTTGATCG	176	+	+
WAK089	GCCTCCTAGCCCTTTTGCTT	TATTACATGCCTTGCTTTCAGA	223	+	+
WAK090	CAATCAGGGGATGCAACTCT	CAGACAACTATTCAGCCAAACC	173	+	+
WAK091	AGGTTCAAAATCCCCATTCC	TATTCCTTTCGAAGCCATGC	153	+	-
WAK092	TAATGGGGTGCCAACTTCAG	TGTTGTTGTTGAATATGGAATTAAC	205	+	-
WAK093	CATTAAATGAACTTGTTGACCCA	CCTCTGCCCTTTCCGCAG	192	+	-
WAK094	TTGACAAGATTGGCAGGGGGCT	TAGAGCCTTCTCGCTGACATGG	213	-	NT
WAK096	GGATAACGGAGAAGAGCTGAT	GATTTCATTCTTCCTGGACCC	213	+	+
WAK097	CAAATGCTGGAAGGAGAAGG	GCTTGTGGGAACAATCAAATG	227	+	-
WAK098	TCGTCCCTCAATGAATGCTG	GTCACCGAAGAGTGTAAATCAA	232	+	+
WAK100	AGTGGCACTGTGGTGCATAC	CATTCGAGTCAAATAGCATAGAA	194	+	+
WAK101	TCCTTCAGATGATGTTGGGA	GGCAAATAAATAGAGAGTGGCG	205	-	NT
WAK102	TGTTGGAGGACGAAAGAATCA	GGATTTGTGAGGATGCACCAA	186	-	NT
WAK103	CAGATTGCGATAAGCCCTTT	ATTGCTTTAGATTCAATAAGCGA	177	-	NT
WAK104	TCAGATTACGCAGCGAGAAA	CAGTATCAGGTGAAGGCGGA	223	-	NT
WAK105	ATGCAAGCTTCAAAAGGGGAT	TCGAGCAACGCCAACTAAAA	243	+	+

WAK106	TTGAGGCCAAATGATCGTCCG	GCAGGAGTCGATACAATCAC	177	+	+
WAK107	AAGATGCCATGGAACATGAAG	TATCATCTTCTTCTAGCGTCC	192	-	NT
WAK108	CCCTTCATGGGTTTATGACC	GGCTTAGGAGGCATTCGC	207	+	-
WAK110	GTGGCTCATGGCATTGAATA	GTCAGAGACACGTCCAATAC	234	+	-
WAK111	TTGTGGCATTGTGGTGCATA	GATTAGCTCTATCATCTTCTTCA	156	+	-
WAK112	GCAAATCTTACATTTTGATATCAG	TTCTTCCTGCCATTTCCATC	245	-	NT
WAK113	GGCAAATCATTCAAGCCAAA	GGCTTAGGAGGCATTCGTAT	234	+	-
WAK114	CAACATTTATCCATGTACGAAG	CCCAATAATTTAACTGCTGCC	197	-	NT
WAK116	AGCATGTTGATCGTCCCTCT	CGACCAAACTGATATGAAGAGTA	187	-	NT
WAK117	TTCCCTTCATGGGTTTATGAT	CTGGCATCTGATGTGGGGTA	235	+	-
WAK118	CAAGAAGATGCCATGGAACA	TCTGATAACTTTACATGATTAGCTT	221	+	-
WAK119	AAGGAAAGGATATAGAAGTACAG	CCAAACTGATATGAAGAGTCAG	280	+	-
WAK120	AGGTGATGATTGTGGCGTTG	ATTATTTAGTGGATCTGATAACC	194	-	NT
WAK121	ATGAGCAAGTTAGTGCAGGC	GGGAGGCATTTGTAGGGATT	188	+	+
WAK122	ATGGCAGGCAAAAGAAAGAA	ATACACCACAATCCAACCAC	176	+	-
WAK125	AGACCTGCGGTTTCATATCG	AGGCGTCTCGCTGGCATGT	225	+	+
WAK126	CGGGATGATGGTTCTTGAAA	GTCTATCTAATGGATTGGTTTGA	209	+	+
WAK127	TTTTGGTCTCGCGAAGCTAT	CTTCTAGGAGAAGAAAAGGTC	387	-	NT
WAK128	GTGCATCCAAACCATTCCAT	GATGATACAGTGGAAGAGTGAA	150	+	-
WAK131	CTCGGGAATGCAATCGTAGT	AGTAACAAGTTGTTTGATTAGTTG	207	-	NT
WAK134	ATTAGCTTTCCGGTGTTTGC	CTTCAGTAACCCGACATCATCA	151	+	+
WAK135	ACCTGCCTGTGGTATTCCTG	CTCGAAAACCTTCGGATTGA	196	+	+
WAK137	TCCTGGGGAATGCTATCGTA	CAAGTTGTTTGATTAGTTACATGC	207	-	NT
WAK138	GCACGATTTATGAGGGGATG	GTTGGGAATGAATTCATAGACAAT	170	+	-
WAK140	AGAGGATGTGTTGATGGTTGC	CTGTCATATTCATTCTCTTGTTC	150	+	+
WAK141	GCTTCCATCCCCATTTATCA	TCACTAAACTTCTGGCTTCATCA	238	-	NT
WAK142	GTGGTATTGACCATGTAACTAAG	CAAAACAGGAACGGAACTAAGG	168	-	NT
WAK143	CGGCACGATATTAATCTGTCT	AGTTGGCCTCATTTCCCTCT	177	+	-
WAK145	AGTAAAGATTTTGATATGGGATCGG	GTCATTGATGGTCTATGTGACGGC	197	+	-
WAK146	TGGCGAATGCTATCGTAGTG	ACAAGTTGTTTGATTAGTTACATC	208	-	NT
WAK147	CTTTATATCTGATAAAGGATCCCT	ATAGCTTCGCGAGACCAAAA	209	+	-
WAK148	ATTCGAGTGCCAATTCCTGA	CTGTGTATCAAATCCACAATACT	171	-	NT
WAK149	TCCTGGTGAATGCAATCGTA	TGTCTATTCCTGAAGAGGTGG	167	-	NT
WAK150	GTGCATCCAAACCATTCCAT	GATGATACAGTGGAAGAGTGC	150	+	-
WAK151	TTGATATGGGATCGTTGGAAC	AAGGAAGGTCTCGGTGGAAT	249	+	+
WAK152	TATGCCAGAGCAAAGTAAGTAAA	AACCAATCCGGGAAATACAA	214	+	-
WAK153	AGTGTCTTTGTGCCAATTTCC	GATCAGCATTTGGTGTCGAA	247	+	-
WAK154	GTTGTTGCTGTCGGCAATCT	CATGTATTGCATACTGAGATCAA	174	+	-
WAK155	AACCCATTCACTGGAAACCA	TTCAAACATCTCTTTGCAAGATTT	153	+	-
WAK156	AGAAGTTGTTGCTGTCGGAAA	CTGAGATCAGCCATGATATTC	165	+	+
WAK157	AAACCACGGACCACTAGCAC	AACCTCATTTATGAATTCTTCCT	193	+	-
WAK159	AATCAACAGCTGGGATGGAA	TGCTCTCCTTCCTAGTGCAA	196	-	NT
WAK160	GTGCACTCCCTTGGTCTC	TAACCAGGAGTCCCTTGTGG	217	-	NT
WAK161	GCTTCGGTGTAGTCCTCGTC	TTTCCTTTCATGCTCAAGCAGT	220	+	-
WAK162	AGGTTTCTGGGGCACTTTCT	TTGGCTGTCAACTGGCTTGT	229	+	-
WAK163	GTTGTGAAGCAAGGGGAAAG	CTGTCATATTCATTCTCTTGTTG	170	+	+
WAK168	GGAGAAGAGCTGCGAATCAG	GGGCTGGGAGGCATTGTC	173	+	-
WAK169	CTGCAGGTCAAGGAAGAAGG	CAGTTACGGAGACCTCTTTG	182	+	-
WAK170	TTGGAAATGGCTGGAAAAAG	CCATCACGACATTCACTGCT	229	-	NT
WAK171	TGTGGTGCATACAGATGAAGC	CGTCCGTTGAGTAAGAGTAC	150	-	NT
WAK172	AGGAACTTTGGGAACGTGTG	CTCTGCTTCCTGGATCTTGAG	189	+	-
WAK174	AAGTCAATCATAGAAATGTGGTG	TCACGGTGATAAACCGGAAT	226	+	-
WAK175	GCGAGGAAACAGACTACTTGTTAGA	TGTCAAGCTTCCAAGTTCCTGCTG	256	+	+

Tableau 1. Liste des amorces *PtWAKs* amplifiant de l'ADNg chez *Populus trichocarpa* et résultats des tests d'amplification sur ADNg et ADNc de *Populus tremula x alba*

La nomenclature utilisée correspond aux *PtWAKs* décrites dans la publication Tocquard et al. (2014a). Les couples d'amorces amplifiant de l'ADNg chez *P.trichocarpa* ont été testés sur de l'ADNg et un mix d'ADNc de *Populus tremula x alba* (*Pta*). Les signes '+' et '-' indiquent respectivement qu'un fragment a été amplifié ou non. Lorsqu'un couple d'amorce ne permet pas d'amplification d'ADNg, 'NT' signifie non testé sur les ADNc.

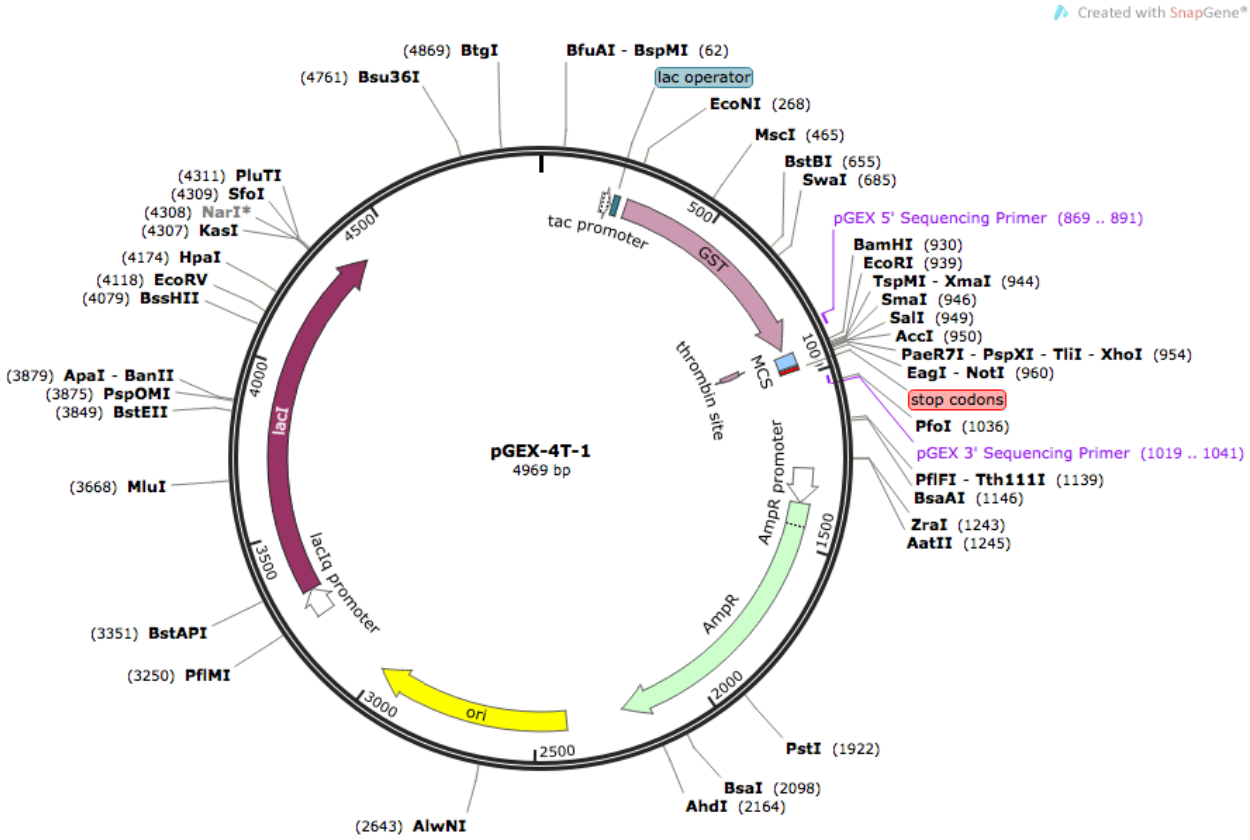


Figure 7. Carte du vecteur pGEX-4T-1 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

Le fragment *WAK70* est inséré dans le polylinker situé en aval de la GST.

UP2r 5'-ACGTCACTGTTATAGCACGC-3') sélectionnés comme précédemment. Les niveaux d'expression pour chaque échantillon sont calculés en utilisant la méthode $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Les données sont analysées à l'aide d'une ANOVA, suivie d'un test HSD de Fisher (α = 5%). Les calculs, la représentation des données ainsi que la classification hiérarchique ont été réalisés à l'aide du logiciel R version 3.2.1 (R Core Team, 2015).

6. PCR quantitative à haut débit

Pour les plantes récoltées dans les sphères, l'analyse de la quantité de transcrits a été réalisée à l'aide de plaques micro-fluidiques 96 x 96 de la société Fluidigm (Fluidigm, USA) selon les recommandations du constructeur dans le système Biomark. La quantification des transcrits a été réalisée en utilisant la méthode $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Les niveaux de transcrits sont calculés par rapport à la moyenne géométrique de l'ensemble des valeurs normalisées du jeu de données comme le propose l'outil bestkeeper (Pfaffl, 2001). Les analyses multivariées ont été réalisées par une analyse en composantes principales (ACP) sur les données brutes de niveau de transcrits normalisés. Les calculs, la représentation des données ainsi que la classification hiérarchique ont été réalisés à l'aide du logiciel R version 3.2.1 (R Core Team, 2015).

7. Construction et expression d'une protéine fusion Glutathion S-Transférase

Les acides nucléiques 107 à 717 de la séquence codante de PtaWAK70 ont été amplifiés grâce aux amorces sens (CCCGCCGTCGACTCCCCTACCCATTTAGCACTG) et antisens (TTTATTGCGGCCGCCCTCCTGACCCCAGTCAGATTT) puis clonés dans le vecteur pGEX-4T-1 (ref 28-9545-59, GE Healthcare, Little Chalfont, UK, Figure 7). Des bactéries compétentes *E.coli* souche BL21 ont été transformées par choc thermique de 42°C pendant 90 secondes puis incubées dans 800 µL de milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM et glucose 20 mM) pendant 1h30 à 37°C sous agitation à 200 rpm. Après centrifugation et élimination du surnageant, les bactéries sont étalées sur milieu LB sélectif (contenant 100 $\mu g.mL^{-1}$ d'ampicilline). Les clones sont ensuite vérifiés par PCR sur colonie grâce à des amorces semblables à celles ayant permis le clonage, auxquelles ont été retirés les sites de restriction (5'-TCCCCTACCCATTTAGCACTG-3' et 5'-CCTCCTGACCCCAGTCAGATTT-3').

Pour exprimer les protéines fusion, 100 µL d'un stock dilué au ½ dans du glycérol et stocké à -80°C sont mis en culture dans du LB + ampicilline (100 µg.mL^{-1}) pendant une nuit à 37°C, 220 rpm. Après 12h de culture, les bactéries sont diluées dans 50 mL de supermedium (tryptone 20%, extrait de levure 15%, NaCl 135 mM, Na_2HPO_4 14 mM, KH_2PO_4 7 mM) pour que la DO de ce milieu de culture à 600 nm soit de 0,1. Après incubation, lorsque la DO atteint 0.4, l'expression des protéines fusion est induite par l'ajout de 0.1 mM d'ITPG. Les bactéries sont ensuite incubées 4h supplémentaires. La culture est ensuite centrifugée 10 min à 4°C à 7000 rpm et le culot repris dans 3mL de tampon STE (Tris-HCl pH8 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM) additionné de 0.1 mg.mL^{-1} de lysozyme. Après 15 minutes d'incubation, l'action lytique du lysozyme est stoppée par l'ajout de 4 mM de DTT. La fin de l'extraction est réalisée après sonication pendant 1 min suivie d'une centrifugation pendant 30 min à 14000 rpm à 4°C. Les surnageants contenant les protéines solubles sont alors prélevés et stockés à -20°C.

8. Extraction de protéines végétales

Les protéines WAKs sont extraites avec les protéines solubles totales à partir de broyats des échantillons végétaux en utilisant le tampon de migration comme décrit par He *et al.* (1996). La seule modification concerne le broyage des échantillons de tige de peuplier, le protocole étant adapté à des tissus foliaires d'Arabidopsis. Du fait de la dureté des échantillons, nous les avons alors broyé dans de l'azote liquide, puis 200 mg broyat sont repris dans 1 mL de tampon d'extraction. Pour dénaturer les protéines, les échantillons sont portés à ébullition pendant 5 min, puis centrifugés 10 min à 4°C à 14000 rpm. La concentration en protéines dans le surnageant est alors mesurée par absorbance à 562 nm au spectrophotomètre et calculée *via* une courbe-étalon d'absorbance obtenue par une gamme de dilution d'albumine bovine (0 à 2 µg.µL^{-1} par intervalle de 0.4).

Pour les échantillons destinés à être séparés par électrophorèse bidimensionnelle, un tampon d'extraction adapté (Urée 7M, Thiourée 2M, DTT 70mM, CHAPS 4%, tampon IPG 1%, protease inhibitor cocktail 0.4% [Sigma, Steinheim, Allemagne]) est utilisé. La suite du protocole d'extraction et le dosage ne sont pas modifiés.

9. Electrophorèse bidimensionnelle et transfert sur membrane de nitrocellulose

Trois cents microgrammes de protéines totales de tige de peuplier sont dilués dans 250 µL de tampon d'extraction. Ce volume est utilisé pour hydrater 2 bandes de séparation de gradient de pH 3-10 (Immobiline drystrip pH3-10 13 cm, Dominique Dutcher, Brumath, France) pendant une nuit à température ambiante. L'isoélectrofocalisation est ensuite réalisée sur le système Ettan IPGphor (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) pendant 16h40 pour un total de 75 kVh (0.5 kV pendant 2h, 1 kV pendant 3h, 3 kV pendant 3h, 7 kV pendant 3h et 7 kV pendant 5h40). Les bandes sont ensuite équilibrées pendant 15 min dans un tampon d'équilibration (0.1M Tris-HCL pH8.8, Urée 6M, Glycérol 30%, SDS 2% et DTT 1%), puis traitées 10 min dans le même tampon contenant du bleu de bromophénol et 2.5% d'iodoacétamine à la place du DTT. Pour la seconde dimension, les 2 bandes sont transférées sur des gels de polyacrylamide 10% puis les protéines sont séparées par électrophorèse à 20 mA pendant 30 min puis 70 mA pendant 120 min. Un des gels est coloré au bleu de coomassie pour prélèvement de spots protéiques alors que l'autre est utilisé pour identifier des protéines par western blot. Pour ce gel, les protéines sont transférées en conditions semi-sèches sur membrane de nitrocellulose avec une intensité de 0.8 mA par cm^2 de membrane selon les recommandations du constructeur (TE77 Semi-dry transfer unit, GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

10. Electrophorèse monodimensionnelle et transfert sur membrane de nitrocellulose

Dix microgrammes de protéines dénaturées sont chargés dans chaque puits d'un gel de polyacrylamide 10% puis séparés par électrophorèse (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad, Hercules, CA, USA) dans un tampon SDS pendant 20 min à 80 V puis pendant 1h à 120 V. Les gels sont utilisés soit pour être colorés avec du bleu de coomassie, soit pour identifier des protéines par western blot. Dans ce cas, les protéines sont électrotransférées en conditions liquide (tampon Tris-HCl 25 mM pH 8.3, Glycine 192 mM, éthanol 20%) sur membrane de nitrocellulose pendant 1h à 100 V.

11. Analyse par western blot

La présence des protéines sur les membranes de nitrocellulose est vérifiée par coloration au rouge ponceau. Après rinçage à l'eau distillée, les membranes sont saturées par incubation dans du tampon TBS-Tween 0.1% + 3% BSA (TBS : Tris 20mM, NaCl 135 mM), puis rincées 2 x 5 min dans du TBS-Tween 0.1% et mises en présence de l'anticorps pour l'hybridation des protéines. Pour les anticorps polyclonaux anti-WAK70, l'incubation est réalisée pendant 1h à température ambiante avec une dilution au 1/1500ème dans du TBS-Tween 0.1%. Pour les anticorps polyclonaux commerciaux anti-GST (Ref 27-457701, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), l'hybridation est réalisée pendant 1h à température ambiante avec une dilution au 1/2000ème. La membrane est ensuite rincée 3 x 5 min dans du TBS-Tween 0.1% puis mise en présence d'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin [ref 4052-05, Southern Biotech] pour révéler PtWAK70 et anti-IgG de chèvre[ref A5420, Sigma-Aldrich] pour la GST). Ces anticorps couplés à la peroxydase de raifort sont dilués au 1/50000ème dans du TBS-Tween 0.1% + 3% BSA et incubés pendant 1h à température ambiante. Après rinçages 3 x 10 min dans du TBS-Tween 0.1% et 2 x 15 min dans du TBS, les membranes sont révélées en utilisant l'ECL Western Blotting Detectiong Reagents selon les recommandations du fournisseur (GE Healthcare).

12. Prélèvements et inclusion en paraffine

Les bases de tiges de peuplier (1 cm de longueur 5 cm au-dessus du collet) droits et inclinés pendant 30 min, 1h et 2h sont prélevées et les parties supérieure et inférieure par rapport à l'axe d'inclinaison sont séparées. Ces échantillons sont immédiatement plongés dans un tampon fixateur (Formaldéhyde 3.7%, éthanol 50%, acide acétique 5%) puis placés sous cloche à vide jusqu'à ce qu'ils soient complètement imprégnés. Le fixateur est alors renouvelé et les échantillons stockés une nuit à 4°C. Le lendemain, ils sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol (50%, 70%, 80%, 95% et 3 x 100%) pendant 30 min à 4°C puis progressivement changés de solvant à température ambiante (2h Ethanol ⅔-Histoclear⅓, 2h Ethanol ½-Histoclear ½, 2h Ethanol ⅓-Histoclear ⅔, 2 x 1h Histoclear 100%, 1 nuit Histoclear pur + 5 pastilles de paraplast Plus [ref P3683, Sigma-Aldrich]). Ce dernier mélange est renouvelé puis placé à 50°C pendant 3h. La température est ensuite augmentée à 60°C puis les pastilles de paraplast sont ajoutées 5 par 5 jusqu'à une quarantaine par tube et laissées 1 nuit à 60°C. Enfin, les échantillons sont imbibés dans des bains de paraffine pure (paraplast Plus) à 60°C renouvelés 1 fois par jour pendant 3 jours. Les échantillons sont individualisés puis placés sur la glace jusqu'à solidification de la paraffine puis stockés à 4°C.

Vecteur de clonage	pGEM®-T easy	pBlueScript
Amorce sens	GCTAGTGATCCAACCAGCCAG	TTTAATTGCGGCCGCGCTAGTGATCCAACCAGCCAG
Amorce antisens	TAGGAGCAGCTTGACAAGGA	CCCGCCGTCGACTAGGAGCAGCTTGACAAGGA
Sonde	GCTAGTGATCCAACCAGCCAGTCTTTTACCAAACACATGTGTCACGTCTGATTACATCTACGAAGGTATCTCGTTAAACGAGAGCTTACCTTTTAACATCACAAGCGATAACACCATCATGTTTTTGAACTGTACGGAGTCGTTGCTTAGATCTCCGTTGAACTGTACCTCAACCAGTTTGTGTCACGTGTACGTTAATAGTACCAAAGGGGAGGCTCCTTGTCAAGCTGCTCCTA	

Tableau 2. Séquence de la sonde pour l'hybridation *in situ*

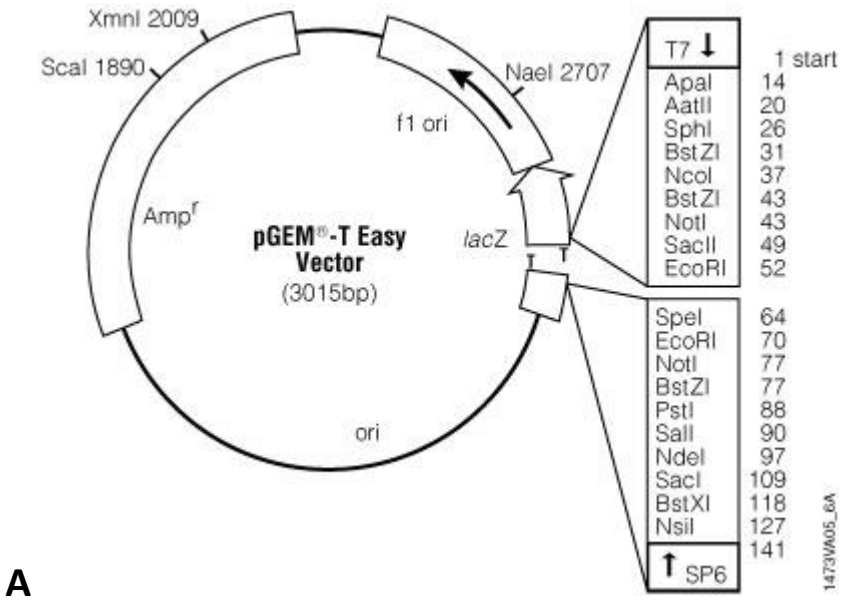
Ce tableau présente la séquence de la sonde utilisée pour les expérimentations d'hybridation *in situ*. Les amorces utilisées pour les clonages dans les vecteurs pGEM-T-easy et pBlueScript sont indiquées.

13. Immunolocalisation in situ

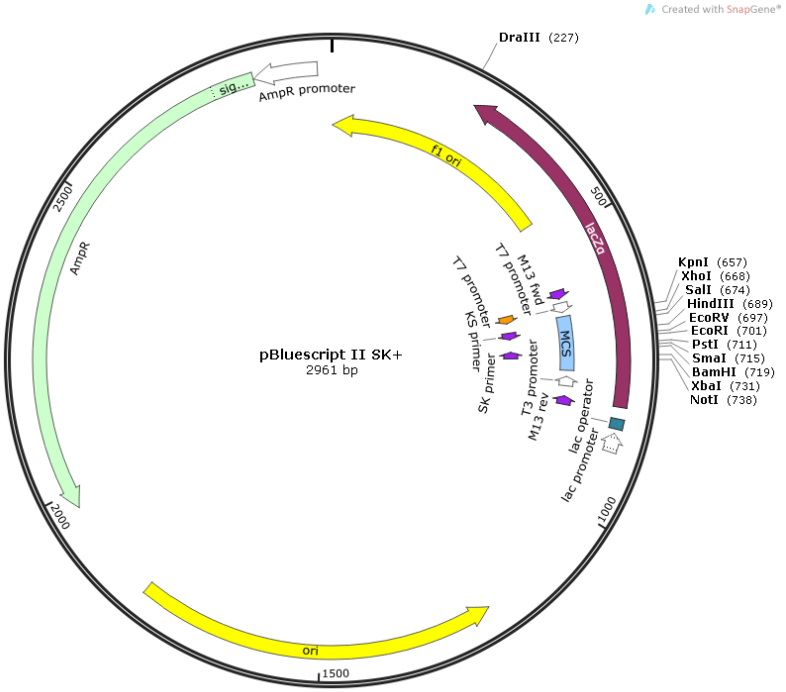
Des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur de tiges de peuplier incluses en paraffine sont réalisées à l'aide d'un microtome HM340 (ThermoFisher Scientific). Après élimination de la paraffine (à température ambiante : 2 x 10 min Histoclear, 2 x 1 min Ethanol 100%, 1 min des bains d'éthanol 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%), les sites non spécifiques sont saturés (à température ambiante : 10 min PBS pH7 [NaCl 1.4M, KCl 25 mM, Na_2HPO_4 100 mM, KH_2PO_4 20 mM], 15 min PBS + Triton X-100 0.1%, 15 min PBS + Triton X-100 0.1% + Glycine 0.2%, 10 min PBS + Triton X-100 0.1%, 45 min et à l'obscurité PBS + Triton X-100 0.1% + Tween 20 0.2% + BSA 0.1% + NGS 5%) puis les coupes sont mises en présence d'anticorps primaire (une nuit température ambiante à l'obscurité dans PBS + Triton X-100 0.1% + Tween 20 0.2% + BSA 0.1% + NGS 5%). Différentes dilutions d'anticorps primaire anti-WAK70 ont été testées (1/50, 1/100, 1/500, 1/1000 et 1/1500). Après 2 x 20 min (PBS + Triton X-100 0.1%) et 2 x 15 min (TBS pH8.2 + Triton X-100 0.2%) de lavage, les sites non spécifiques sont saturés pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité (TBS pH8.2 + Triton X-100 0.2% + Tween 20 0.2% + BSA 1% + NGS 5%). Les anticorps anti-PtWAK70 fabriqués chez le lapin sont ensuite marqués à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/40ème (fabriqué chez la chèvre dirigé contre les anticorps de lapin, Goat anti-Rabit ref 10418, Sigma-Aldrich) pendant 2h30 à l'obscurité et à température ambiante. Les révélations sont réalisées à l'aide du kit AP conjugate substrate (Biorad, Hercules, CA, USA). Les coupes sont mises en présence du tampon de révélation (10 min, température ambiante) puis incubées dans le mélange de révélation (tampon de révélation + NBT 1% + BCIP 1%) jusqu'à apparition du signal. La réaction est stoppée par immersion des coupes dans de l'eau (2 x 10 min). Les coupes sont placées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (ref 045798, Dominique Dutcher, Brumath, France) et observées sous microscope optique.

Lors des différents tests, les révélations apparaissent après 20 minutes lorsque l'anticorps primaire est dilué au 1/50ème, 30 minutes lorsqu'il est dilué au 1/100ème. Le signal est ensuite extrêmement faible à partir d'une dilution au 1/500ème, puis inexistant à partir d'une dilution au 1/1000ème, même pour un long temps de révélation de 55 min. Pour les immunolocalisations *in situ* réalisées ensuite sur des tiges de peuplier droites et inclinées, l'anticorps primaire est mis en contact avec les échantillons dilué au 1/50ème.

Pour réaliser des tests d'efficacité de marquage de notre anticorps en immunolocalisation *in situ*, nous avons bloqué l'anticorps anti-WAK70 par le peptide qui a permis sa purification (Nter-CGSQADCDGNSTCRPA-Cter). Nous avons reçu les anticorps anti-PtWAK70 purifiés par chromatographie d'affinité à une concentration de 0.84 $\mu g.\mu L^{-1}$. A la réception, nous les avons dilués



A



B

Figure 8. Carte des vecteurs A : pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) et B : pBlueScript (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

par 2 dans du glycérol puis stockés à -20°C. L'anticorps est alors concentré à 0.42 µg.µL^{-1}. Nous avons donc calculé la quantité d'anticorps nécessaire pour réaliser notre test et nous l'avons mis en présence du peptide 10 fois plus concentré. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 5h puis utilisé pour immunolocalisation pour que l'anticorps primaire soit dilué au 1/50ème.

14. Clonage de la sonde pour hybridation in situ et transcription in vitro

Pour localiser les ARNs messagers de PtWAK70 par hybridation *in situ* sur des coupes de tige de peuplier, nous avons choisi de cloner une sonde correspondant aux acides nucléiques 240 à 475 de la séquence codante (Tableau 2). La spécificité de la séquence a été vérifiée par BLASTn sur l'ensemble du génome de peuplier (*Populus trichocarpa*, assemblage v3, Phytozome). Les amorces utilisées pour amplifier la sonde à partir d'ADNc de tige de Populus *tremula x alba* et la cloner dans le vecteur pGEM®-T easy linéarisé (Figure 8A) sont indiquées dans le Tableau 2. Pour cloner la sonde dans le vecteur pBlueScript (Figure 8B), nous avons linéarisé le vecteur à l'aide des enzymes de restriction NotI et SalI. Les sites de restriction correspondant sont ajoutés respectivement aux amorces sens et antisens ainsi que quelques acides nucléiques en amont afin de digérer l'amplicon PCR. La sonde est alors liguée dans les vecteurs à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase. Les vecteurs pGEM®-T easy et pBlueScript contenant la sonde sont ensuite utilisés pour transformer des bactéries compétentes *Escherichia coli* (souche JM109). La présence de l'insert a été vérifiée par PCR à l'aide des couples d'amorces SP6/T7 et T3/T7 respectivement pour les vecteurs pGEM®-T easy et pBlueScript puis par électrophorèse sur gel TAE 0.5X – agarose 1.5%. Les clones positifs ont ensuite été séquencés à partir de ces mêmes amorces (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA).

Les plasmides sont extraits des bactéries à l'aide du kit 'Plasmid Miniprep' (ref 27104, QIAGEN, Hilden, Allemagne). Pour le vecteur pGEM®-T easy, 5 µg d'ADN plasmidique sont linéarisés à l'aide des enzymes de restriction NcoI et SpeI pendant 3h30 à 37°C pour respectivement effectuer une transcription *in vitro* grâce aux polymérases SP6 et T7. Cinq microgrammes du vecteur pBlueScript sont linéarisés par les enzymes NotI et SalI pendant 3h30 à 37°C pour transcription *in vitro* respectivement à l'aide des polymérases T7 et T3. La linéarisation est vérifiée par électrophorèse sur gel TAE 0.5X – agarose 1%. Les acides nucléiques sont ensuite purifiés par ajout de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) puis centrifugation à 4°C pendant 5 min à 16000 rpm. La phase aqueuse est prélevée et l'étape est répétée. L'ADN plasmidique linéarisé est ensuite précipité par ajout d'acétate de sodium (300 mM pH5.2) + 2 volumes d'éthanol absolu (-20°C) pendant 2h à -20°C puis centrifugé pour le collecter (30 min, 16000rpm, 4°C). Le culot est rincé avec

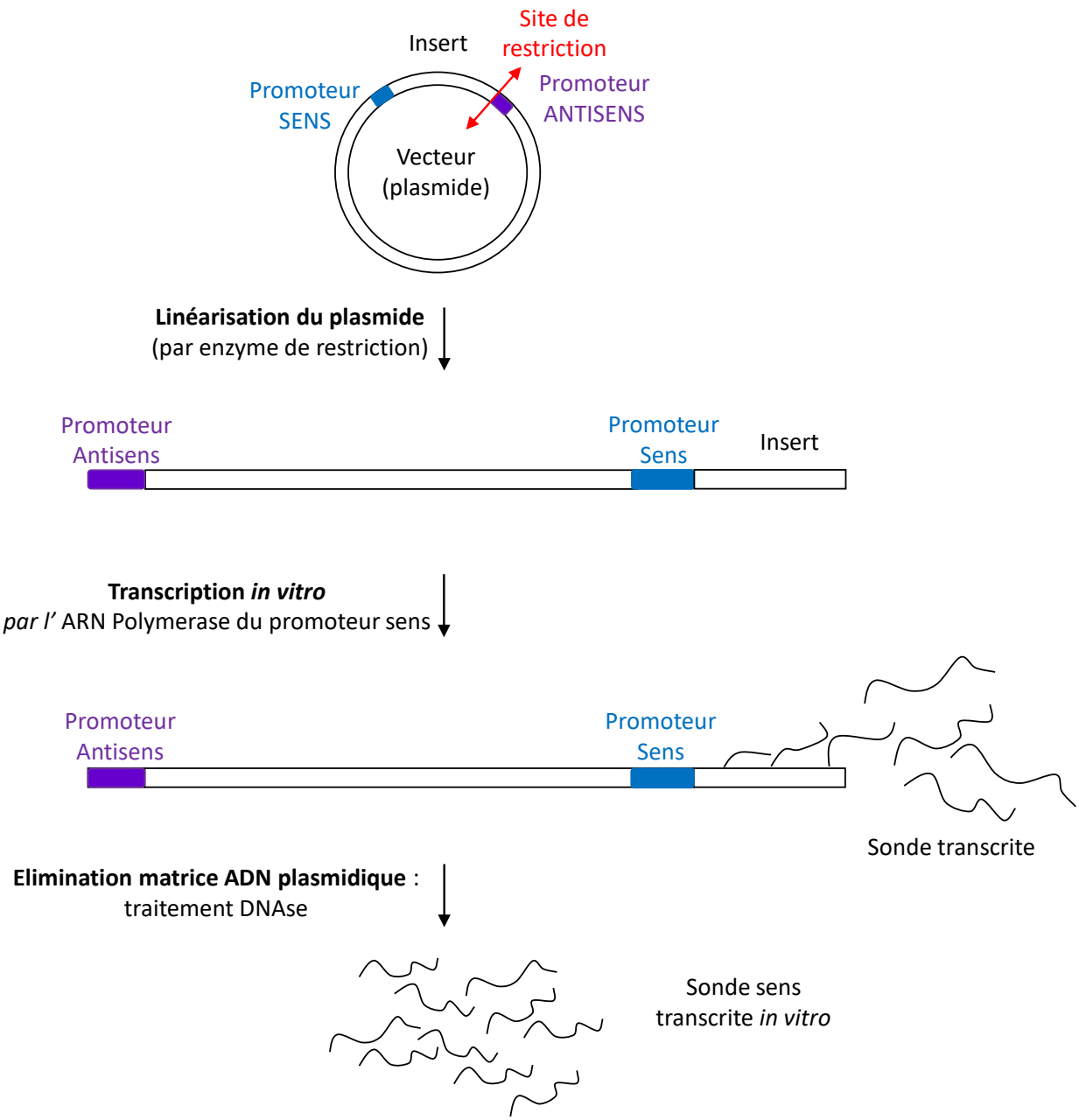


Figure 9. Schéma représentant la transcription *in vitro*

Ce schéma représente les grandes étapes de la transcription *in vitro*. Il est général et les promoteurs sens et antisens peuvent être remplacés par SP6/T7 ou T3/T7 selon que le vecteur utilisé soit respectivement le pGEM-T Easy ou le pBlueScript.

500 µL d'éthanol 70% (5 min, 16000rpm, 4°C) puis repris dans 25 µL d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC).

La transcription *in vitro* des sondes est ensuite réalisée sur 2 µg d'ADN plasmidique linéarisé dans le tampon de transcription (supplémenté de DTT 10 mM, de 40 unités de RNAsin, d'un mélange de nucléotides dont de l'uracile marqué à la digoxygénine (DIG) 2mM, 80 unités de polymérase) fourni avec la polymérase (SP6, T3 ou T7) pendant 2h à 37°C. L'ADN matrice est ensuite supprimé par traitement DNase RQI pendant 30 min à 37°C. L'action de la DNase est stoppée par l'ajout de 15 mM d'EDTA pH8 puis les ARNs sont précipités par ajout de 400 mM de LiCl + 3 volumes d'éthanol 100% pendant 2h à -80°C. Les ARNs sont récoltés par centrifugation (30 min, 16000rpm, 4°C), lavés avec 500 µL d'éthanol 70% (5min, 16000 rpm, 4°C) puis repris dans 40 µL d'eau DEPC. La qualité de la sonde est vérifiée par électrophorèse sur gel TAE 0.5X - agarose 1.5% puis conservée à -80°C. Les étapes principales de la transcription *in vitro* sont schématisées dans la Figure 9.

15. Hybridation in situ

Des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur de tiges de peuplier incluses en paraffine sont réalisées à l'aide d'un microtome HM340 (ThermoFisher Scientific). Après élimination de la paraffine (à température ambiante : 2 x 10 min Histoclear, 2 x 1 min Ethanol 100%, 1 min des bains d'éthanol 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%), les coupes sont réhydratées (à température ambiante : 1 min dans de l'eau traitée au DEPC, 2 x 5 min PBS) puis traitées à la protéinase K pour rendre les acides nucléiques cibles plus accessibles (10 min à 37°C à 10 $\mu g.mL^{-1}$, puis à température ambiante : 2 min PBS + Glycine 0.2%, 2 x 2min PBS). Les tissus étant fragilisés par l'étape précédente, une nouvelle fixation est réalisée (à température ambiante : 10 min PBS + PFA 4%, 2 x 5 min PBS). Les fonctions amines (majoritairement sous la forme protonée $-NH_3^+$ aux pH réactionnel) sont ensuite acétylées par de l'anhydride acétique pour diminuer les liaisons électrostatiques avec les groupements pyrophosphates de la sonde et par conséquent diminuer le bruit de fond (à température ambiante : 10 min de tampon triethanolamine 0.1M pH8 + anhydride acétique 0.5%, 2 x 5 min PBS). Les coupes sont ensuite déshydratées (à température ambiante : 1 min successivement d'éthanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% et 2 x 1 min éthanol 100%) puis hybridées 1 nuit à 50°C par la sonde synthétisée diluée à 0.8, 1.5 et 3 $ng.\mu L^{-1}$ dans du tampon d'hybridation (Tris-HCl 10 mM pH6.8, NaCl 0.3M, $NaPO_4$ 10 mM, EDTA 5 mM, Formamide déionisé 50%, Dextran sulfate 12.5%, ARNt 1.25$\mu g.\mu L^{-1}$, solution de Denhart 1X). Les lames sont ensuite lavées à 42 °C dans du tampon SSC (NaCl 150 mM, Citrate de tri-sodium dihydrate 15 mM) 2X (2 x 15 min), 0.1X (3 x 15 min puis 3 x 20 min) puis dans du PBS (2 x 10

min à température ambiante). Les lames sont ensuite révélées par hybridation d'un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/500ème. Les lames sont incubées à température ambiante 45 min dans le tampon I [Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Blocking reagent 1%], 45 min dans le tampon II [Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, BSA 1%, Triton X-100 0.3%], 2 h dans le tampon II dans lequel est dilué l'anticorps anti-DIG. Elles sont ensuite lavées (4 x 20 min dans le tampon II). Les révélations sont ensuite réalisées à l'aide du kit AP conjugate substrate comme décrit auparavant puis les coupes sont montées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt (ref 045798, Dominique Dutcher, Brumath, France) et observées sous microscope optique.

RESULTATS

1. CHAPITRE 1

L'étude *in silico* de la famille multigénique des WAKs (Wall Associated Kinases) chez *Populus* révèle une expansion génomique à grande échelle potentiellement connectée à une diversification fonctionnelle

Kévin Tocquard, Clément Lafon-Placette, Daniel Auguin, Beatriz Muries, Gisèle Bronner, David Lopez, Boris Fumanal, Jérôme Franchel, Sylvain Bourgerie, Stéphane Maury, Philippe Label, Jean-Louis Julien, Patricia Roeckel-Drevet, Jean-Stéphane Venisse

Tree Genetics & Genomes (2014) 10:1135-1147

La famille multigénique WAK n'a été décrite que chez deux espèces non ligneuses : l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) et le riz (*Oryza sativa*). Afin de répondre à notre objectif chez le peuplier, nous devions débuter par la caractérisation de l'ensemble des membres de cette famille multigénique chez l'espèce ligneuse *Populus trichcocarpa* dont le génome est entièrement séquencé (Tuskan *et al.*, 2006).

Avec 175 modèles de gènes prédits, nous avons mis en évidence la famille WAK la plus étendue jamais décrite dans le monde végétal. Les génomes d'*Arabidopsis* et du riz ne présentent respectivement que 27 et 125 modèles de gène. Cette expansion peut être expliquée par une forte duplication en tandem au sein du génome de peuplier car plus de 90% des WAKs se retrouvent en clusters génomiques. Ceci est conforté par des analyses phylogénétiques qui montrent que les membres d'un cluster sont phylogénétiquement très proches.

L'analyse des prédictions de domaines protéiques nous a montré qu'en plus du domaine kinase bien décrit dans la littérature, les protéines WAKs sont prédites pour coder de nombreux domaines extracellulaires. Parmi ceux-ci, nous avons identifié les domaines de type EGF et le domaine de liaison aux pectines décrits chez les WAKs d'*Arabidopsis* et du riz. En dépit de leur identification, la (les) fonction(s) des domaines EGFs chez les WAKs ne sont pas connues. De plus, nos recherches dans les bases de données ont mis en évidence l'existence d'autres structures primaires, les domaines WAK et WAKassoc. Nous avons décrit la composition en acides aminés de ces domaines. Aucune fonction biologique ne leur est encore attribuée.

L'analyse phylogénétique des séquences protéiques prédites du domaine kinase nous montre un regroupement des WAKs au sein de groupes monophylétiques présentant les mêmes combinaisons de domaines extracellulaires. Cela suggère une coévolution du domaine kinase intracellulaire et des différents domaines extracellulaires. De plus, les WAKs du peuplier sont divisées en deux grands clades distincts. Ces deux clades sont retrouvés après une analyse phylogénétique inter-espèce incluant les séquences du riz, du peuplier et d'Arabidopsis. Les séquences du clade 1 de WAK peuplier se regroupent avec les séquences WAK des autres espèces tandis que les séquences du clade 2 sont bien distinctes phylogénétiquement. Cela suggère une évolution des séquences du clade 1 dans l'ancêtre commun de ces trois espèces tandis que les séquences du clade 2 auraient évolué indépendamment chez le peuplier.

Enfin, des analyses *in silico* des données transcriptomiques existantes chez le peuplier nous ont permis de voir que l'accumulation de transcrits WAKs est faible comme cela a précédemment été observé chez Arabidopsis. Ces analyses d'expression combinées aux résultats phylogénétiques et à la disposition génomique des gènes WAKs ont permis de montrer que les WAKs modulées suite un l'attaque d'un agent phytopathogène appartiennent préférentiellement à des clusters génomiques et au clade phylogénétique n°2 – spécifique au peuplier – alors que les WAKs modulées lors de processus développementaux appartiennent plutôt au clade n°1 partagé avec *Arabidopsis* et le riz et leurs gènes sont plutôt situés sur des régions indépendantes du génome.

L'ensemble de ces données a permis pour la première fois de caractériser cette grande famille multigénique chez une plante ligneuse, le peuplier modèle *Populus trichocarpa*. Ce travail sert de base pour des analyses fonctionnelles de membres WAKs.

Tree Genetics & Genomes (2014) 10:1135–1147
DOI 10.1007/s11295-014-0748-7

ORIGINAL PAPER

In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale genomic expansion potentially connected with functional diversification in *Populus*

Kévin Tocquard · Clément Lafon-Placette · Daniel Auguin · Beatriz Muries · Gisèle Bronner · David Lopez · Boris Fumanal · Jérôme Franchel · Sylvain Bourgerie · Stéphane Maury · Philippe Label · Jean-Louis Julien · Patricia Roeckel-Drevet · Jean-Stéphane Venisse

Received: 28 January 2014 / Revised: 28 March 2014 / Accepted: 13 May 2014 / Published online: 30 May 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The wall-associated kinases (WAKs) are a family of transmembrane proteins involved in pathogen responses and cell elongation in *Arabidopsis*. They belong to the major receptor-like kinase (RLK) family in plants. Given their architecture and connection to the cell wall, WAKs are thought to perceive and propagate extracellular signals. This study reports the characterization of the WAK family in a woody species based on the v3.0 genome assembly of *Populus trichocarpa*. In silico analysis revealed a total of 175 *PtWAK* sequences classified into four groups based on protein domains. Of the *PtWAKs*, 91.5 % were found in tandem-duplicated clusters contributing to the expansion of the family in poplar. Microarray and EST expression data mining revealed contrasting temporal and spatial expression patterns in stress treatments for several *WAK* members. The *WAKs* in poplar form the largest WAK family encountered to date in plants. The combination of phylogenetic and transcriptional data showed that members in nonexpanded clusters were mainly expressed in developmental processes, whereas *Pt*WAKs that had evolved independently in a species-specific way were structured in clusters and were involved in resistance responses. This paper offers an overview of WAK family structure in *P. trichocarpa*, which will be useful for further functional analysis of the *Pt*WAK family.

Keywords WAK · *Populus* · Phylogeny · Microarray data mining · Abiotic biotic stress

Communicated by J. L. Wegrzyn

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11295-014-0748-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Tocquard · B. Muries · D. Lopez · B. Fumanal · J. Franchel · P. Label · J.-L. Julien · P. Roeckel-Drevet · J.-S. Venisse
Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

K. Tocquard · B. Muries · D. Lopez · B. Fumanal · J. Franchel · P. Label · J.-L. Julien · P. Roeckel-Drevet (✉) · J.-S. Venisse
INRA, UMR 547 PIAF, 63100 Clermont-Ferrand, France
e-mail: patricia.drevet@univ-bpclermont.fr

C. Lafon-Placette · D. Auguin · S. Bourgerie · S. Maury
Université Orléans, EA 1207 LBLGC, BP 6759, 45067 Orléans, France

C. Lafon-Placette · D. Auguin · S. Bourgerie · S. Maury
INRA, USC1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), BP 6759, 45067 Orléans, France

G. Bronner
Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 6023 LMGE, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

C. Lafon-Placette
Present address: Department of Plant Biology and Forest Genetics, Uppsala BioCenter, Swedish University of Agricultural Sciences and Linnean Center of Plant Biology, 75007 Uppsala, Sweden

Introduction

The plant cell wall is an important dynamic structure. It mechanically connects cells in tissues and controls the shape of plant cells (Wolf et al. 2012). There is increasing new evidence that this remarkable structure is also critical for sensing external stimuli and transmitting information into the intracellular space. For instance, transmembrane proteins connecting the apoplasm and cytoplasm compartments may well be able to perceive wall status and variation in cell volume (Humphrey et al. 2007). The wall-associated kinases

(WAKs) are a set of receptor-like kinases (RLKs; Shiu and Bleecker 2001) involved in signaling pathways (Kohorn et al. 2009). For example, *At*WAK1 is able to interact with oligogalacturonic acids playing a key functional role in responses to pathogens (Brutus et al. 2010). Various studies have suggested that WAKs are able to bind pectins through the presence of specific protein domains located in their extracellular region (He et al. 1998; Wagner and Kohorn 2001; Decreux and Messiaen 2005). This extracellular region contains one or two epidermal growth factor (EGF)-like domains (He et al. 1999; Verica and He 2002; Zhang et al. 2005) that could be involved in protein–protein interactions (Rao et al. 1995; Stenflo et al. 2000). The intracellular region of WAKs displays a Ser/Thr kinase domain that might be involved in signal transduction. It has been shown that when oligogalacturonic acids are produced by wall disruption, *At*WAK2 signaling by kinase activity modulates a MAP kinase activity (*At*MAPK6; Kohorn et al. 2009; Kohorn et al. 2012).

Until now, *WAKs* have been described exhaustively in two herbaceous model species: *Arabidopsis thaliana* (He et al. 1999; Verica and He 2002) and *Oryza sativa* (Zhang et al. 2005). The *Arabidopsis* genome contains 27 *WAKs*: five are termed *AtWAKs* (He et al. 1999) and 22 *AtWAK* like (*AtWAKLs*; Verica and He 2002). This gene family is larger in the rice genome, with 125 *OsWAKs* classified into 67 RLKs, 28 receptor-like cytoplasmic kinases (RLCKs), 13 receptor-like proteins (RLPs), and 12 predicted short proteins and five pseudogenes (Zhang et al. 2005).

In terms of genome location, the five *AtWAKs* are distributed along a 30-kb cluster on chromosome I (He et al. 1999); 14 *AtWAKLs* are also found on chromosome I and eight are located on the other four chromosomes (Verica and He 2002). This clustering was also observed in the organization of rice *WAKs*.

In woody species, WAKs, as receptors, may play a decisive part in development and in response to environmental constraints. The main characteristic of trees is wood production through secondary growth and perennialism, which implies short-term and long-lasting responses in continually changing environmental conditions. In addition, environmental stresses can induce specific modifications in secondary cell wall characteristics (Jourez et al. 2001), notably G layer deposition in the tension wood, which requires cellular communications between the apoplasm and the cytoplasm. The involvement of WAKs as potential mediators of the reaction wood formation in response to gravitropic stimulus has been proposed (Telewski 2006; Tocquard et al. 2014).

The evolutionary history of plant *RLK* genes, including *Populus* genes, was presented in a previous study (Lehti-Shiu et al. 2009). However, particular emphasis was not given to the WAK gene family. In the present study, we carried out a genome-wide identification of WAK family members from *Populus trichocarpa* (*Pt*WAKs), which is considered to be an important model for basic and applied research in forest biology (Yang et al. 2009). Extensive database searches and manual reannotation were made. A phylogenetic tree was constructed to evaluate the evolutionary relationships among WAK amino acid sequences between *Arabidopsis*, rice, and poplar and to gain insights into potential mechanisms of WAK gene family expansion in poplar. Additionally, the public microarray data and ESTs were used to monitor the expression of *PtWAKs* in different organs during various stages of development and under biotic and abiotic conditions, in a panel of *Populus* clones. Finally, we carried out a combined reading between the patterns of expansion and gene expression related to different physiological responses, in order to uncover physiological functions of chosen WAK members. This work provides a basis for a better understanding of the genomic organization and probable roles of these genes in plant growth/development and disease resistance in poplar.

Methods

WAK sequence retrieval from public databases

The DNA and protein-predicted sequences of *WAKs* were retrieved from poplar v3.0 genome assembly (*P. trichocarpa*, Torr. & Gray, Tuskan et al. 2006) in v9.0 gene annotation on the public database Phytozome (*P. trichocarpa* v3.0, DOE-JGI, http://www.phytozome.net/). Protein sequences *At*WAK1-5 of *A. thaliana* were used as queries for a tBLASTx on Phytozome using default parameters. Retrieved DNA sequences of *PtWAKs* were then used as queries for a BLASTn on Phytozome. In order to correct predicted sequences, an EST search was conducted on the NCBI resource database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) using BLASTn on both genomic and transcript *PtWAK* sequences. All sequences were then manually expertized to fit Phytozome-predicted open reading frames. When two predicted genes were separated by less than 5 kb, the first one coding an extracellular part of a WAK and the other a kinase part, a single sequence was created by merging the two parts and removing one stop codon. All changes are described in Online resource 1. As there was no standard WAK annotation assigned to these newly identified genes in poplar, we gave each of them an identity based on the order of their location on each poplar linkage group (LG) listed in increasing order.

Protein domains were predicted with Conserved Domain Database (CDD; Marchler-Bauer et al. 2011), a resource from the NCBI. The corresponding regions were extracted from the alignment performed with MUSCLE (Edgar 2004) in order to identify conserved amino acids between WAKs within each predicted domain. These sequences were then analyzed using the Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation

(MEME) program (Bailey et al. 2009) with default parameters.

Alignment and phylogenetic analysis

The kinase domains of WAK protein sequences were aligned using the MUSCLE interface in Geneious Pro v5.3.6 (Biomatters, Auckland, New Zealand). The phylogenetic analysis was performed on the kinase region of the alignment after removing incomplete sequences. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), and Bayesian inference (BI) methods with 1,000 bootstrap replicates using the JTT+G+I model determined with MEGA v5.1 (Tamura et al. 2011).

The congruence between the NJ, MP, and BI topologies was tested using the Kishino–Hasegawa test (Kishino and Hasegawa 1989) implemented in the PAUP*4.0b10 program (Swofford 2000), using the PaupUp graphical interface (Calendini and Martin 2005). The tree representation was constructed on the interactive Tree Of Life Web service (iTOL; Letunic and Bork 2011).

Transcriptomics data analyses

PtWAK expression patterns among tissues/conditions/genotypes

Most of the data used for transcriptomics data analysis in this study were robust multi-array average (RMA) normalized transcriptomics data obtained from Affymetrix Poplar Genome Array (Platform accession GPL4359). For the drought experiment in the apex only, data were obtained from the Agilent array with custom probe design based on v2.0 poplar gene models (Lafon-Placette et al., unpublished data). Values of gene expression were downloaded from the v2.2 PopGenIE Website (http://popgenie.org/, Sjödin et al. 2009). Analyses of WAK expression were conducted on different datasets: (i) tissue profiling (GSE13990, Wilkins et al. 2009a), (ii) light treatments (GSE13990, Wilkins et al. 2009a), (iii) pathogen infection (*Melampsora medusae*) (GSM412653, Levée et al. 2009; GSE9673 Azaiez et al. 2009), (iv) drought stress on roots (GSE17223, Cohen et al. 2010), (v) drought stress on leaves (GSE15242, Wilkins et al. 2009b; GSE17226, Balzergue et al., unpublished data; GSE17230, Cohen et al. 2010; and GSE21171, Hamanishi et al. 2010), (vi) drought/rewatering cycle on apex (Lafon-Placette et al., unpublished data), (vii) genotypes (GSE15242, Wilkins et al. 2009b; GSE17226, Balzergue et al., unpublished data; GSE17230, Cohen et al. 2010; and GSE21171, Hamanishi et al. 2010), (viii) aluminium stress (GSE19297, Grisel et al. 2010), and (ix) hypoxia stress by flooding (GSE13109, Hauberg et al., unpublished data). To avoid experimental bias when combining several studies (batch effect), data were normalized with the ComBat method (Johnson et al. 2007) in R v2.15.2 (R Development Core Team 2008) using "control" and "pathogen"/"drought" as covariates for the pathogen/drought effect. No covariate was defined for genotype effect, thus assuming no genotype effect to normalize data (only batch effect). Significant tissue/condition/genotype effects were tested using Welch's *t* test or one-way ANOVA for two or more samples, respectively. Adjusted Bonferroni correction was used to decrease false discovery rate. Statistical tests were considered significant at $*p<0.05$. Average linkage hierarchical clustering analysis was applied using Euclidean distance. These statistical analyses were performed with MeV software, v4.8.1(Saeed et al. 2003).

Entropy and random comparison

To evaluate the *Pt*WAK global expression, 72 genes were randomly selected using the "Random List" tool from the PopGenIE Website (Sjödin et al. 2009). To define tissue/condition/genotype specificity of *PtWAK* expression, the Shannon entropy value was calculated for each gene (Schug et al. 2005) using expression levels from the experiments described above instead of EST counts. Shannon entropy value ranks a gene according to the degree to which its expression pattern is similar to ubiquitous uniform expression among several samples. Thus, the more similar to ubiquity (i.e., the less specific) is the expression pattern, the higher is the Shannon entropy value. To evaluate *PtWAK* effect on entropy distribution, a χ^2 homogeneity test was performed at $*p<0.05$, $**p<0.01$, or $***p<0.001$ with R v2.15.2 (R Development Core Team 2008).

Results and discussion

A genome-wide analysis of the WAK multigenic family in *P. trichocarpa* was initiated. The monitoring of the dynamics of this family and of the transcriptional expression patterns in different tissues and stress conditions brings some insight into the structural and functional diversities of this family.

Features of WAK gene family in *Populus*

Exploration on the Phytozome portal (Goodstein et al. 2012) and NCBI databases enabled us to identify 175 putative *PtWAKs*. This represents 85 % more than *A. thaliana* and 28.5 % more than *O. sativa*. Marked expansions of multigenic families have already been described in poplar (Lan et al. 2009; Petre et al. 2011). This is especially observed for RLKs, the largest gene family in most plant species (Kohler et al. 2008), which comprises the WAK subfamily. According

to Lehti-Shiu et al. (2009), the RLK family expanded at a significantly higher rate than other kinases.

The fact that the poplar WAK family had more members than rice tempers the hypothesis of Zhang et al. (2005) whereby the expansion of WAKs arises specifically in monocot species. Although we cannot rule out the hypothesis of *WAK* gene loss events in *Arabidopsis*, the high number of *WAKs* in poplar and rice compared with the number of *WAKs* in *Arabidopsis* suggests, alternatively, that both poplar and rice genomes present a lineage-specific expansion of this WAK family.

In poplar, from the 175 WAK members identified, 141 *PtWAK* genes were distributed unevenly among 15 of the 19 LGs corresponding to the 19 poplar chromosomes. The remaining 34 *PtWAK* genes were localized on eight independent scaffolds not yet grouped to the chromosomes. Among the 141 *PtWAKs*, 12 were isolated genes and 129 (91.5 %) were grouped into 20 clusters containing 2 to 16 genes separated from 1 to 13 kb (Fig. 1). Such a high proportion of clustered genes was unexpected because in *Arabidopsis,* only 60 % of members were found in clusters (Shiu and Bleecker 2003). It is widely accepted that the tandem duplications drive most of the specific lineage expansion of various gene families involved in tolerance to any environmental deviances, and represent a noteworthy way to generate possible functional diversity of paralogs (Paterson et al. 2010; Lopez et al. 2012). The expansion of the *Pt*WAK family, as hypothesized for RLKs (Hanada et al. 2008), could be linked to the evolution of poplar to adapt to fluctuating environmental stimuli.

Putative *Pt*WAKs were only annotated as protein kinases in the poplar genome v3.0. They were predicted to encode a variable extracellular part with different domain organization, a single transmembrane region and an intracellular kinase domain. Our classification adapted from Zhang et al. (2005) distributed *Pt*WAKs into four groups (Table 1). A *Pt*WAK-RLK had one or more extracellular protein domains and an intracellular kinase domain, a *Pt*WAK-RLCK had a single intracellular kinase domain, and a *Pt*WAK-RLP had only extracellular protein domains. *WAK* genes without a functional domain were classified as *PtWAK* short genes, but their protein sequence showed at least 70 % of similarity with other WAKs. For comparison, the deduced protein sequences of *OsWAK* short genes showed 40 % similarity with the longer WAK sequence.

Analysis of the protein extracellular part

Numerous domains (GubWAK, WAK, WAKassoc, EGF-Ca^{2+}, cEGF, and EGF3) may be found in the extracellular part of the WAK proteins, which enhance its variability potential.

From the N-terminal, the majority of *Pt*WAK proteins displayed the wall-associated receptor kinase galacturonan-binding (Gub_WAK_bind, called GubWAK) domain, which was described by Decreux et al. (2006). In *Pt*WAKs, this domain had two different parts. The first part contained a highly conserved motif (YF)PF comprising aromatics (F and Y) and cyclic (P) amino acids. The second part of the domain comprised a C-X_{5-6}-F-X-(VL)-X-C motif dividing the set of sequences into two groups (Fig. 2). The conserved motifs could form a possible site of adhesion to a ligand in the cell wall matrix, where *At*WAKs were shown to bind cell wall pectins in the N-terminal of their extracellular region in a calcium-induced conformation (Decreux and Messiaen 2005).

Paradoxically, two domains were never found together in the same protein: the WAK domain, and the wall-associated receptor kinase C-terminal domain (WAK_assoc, termed WAKassoc). The role of the WAK domain remains unknown. It is described in the PFAM database as being associated with the kinase domain in plant WAK proteins. Our analysis showed three conserved parts in the WAK domain. Fifty percent of the proteins contained the first part, which was highly conserved (Fig. 2) and consisted of polar and noncharged residues (N, T, and S) plus some hydrophobic amino acids (V and L). The second and third parts were the most frequent (94 %). The second part mainly comprised hydrophobic amino acids. A highly conserved structure (CK(LV)AF(IL)V) was distinguishable in this part, composed of a charged lysine between a cysteine and a sequence of hydrophobic amino acids (Fig. 2). The third part was composed mainly of cyclic (P), aromatic (W and Y), and aliphatic (L and V) amino acids. The WAKassoc domain is described as a cysteine-rich domain, since it contained four highly conserved cysteines as described in the PFAM database (Punta et al. 2012).

The last downstream extracellular domain was represented by the EGF-like family with three EGF-like motifs. The calcium-binding EGF domain (EGF_CA, called EGF-Ca^{2+}) was the only domain found in *Arabidopsis*, rice and *Populus*. It contained six highly conserved cysteines. We note that the second cysteine is not represented in Fig. 2 because the MEME program did not detect this second cysteine as conserved, although it was present in the dataset of sequences and the alignment (Online resource 2). This might be due to a too-broad variability of the other amino acids flanking this cysteine. The (EGF2)-like domain described in rice and *Arabidopsis* was not found in poplar WAKs. Instead, two other EGF-like domains were observed: the complement Clr-like EGF_like domain (cEGF) and the EGF_3 domain (EGF3). The latter presented the same conserved residues described in the PFAM database except that the cysteine at the last position was missing and replaced by an aromatic residue (Y/F), whereas the poplar cEGF domain was as expected by the PFAM database description. The substitution of the sixth cysteine of the EGF3 domain by an aromatic residue (Y/F) suggested a possible cation–π interaction between an aromatic compound and a cation (Dougherty 2012). The main

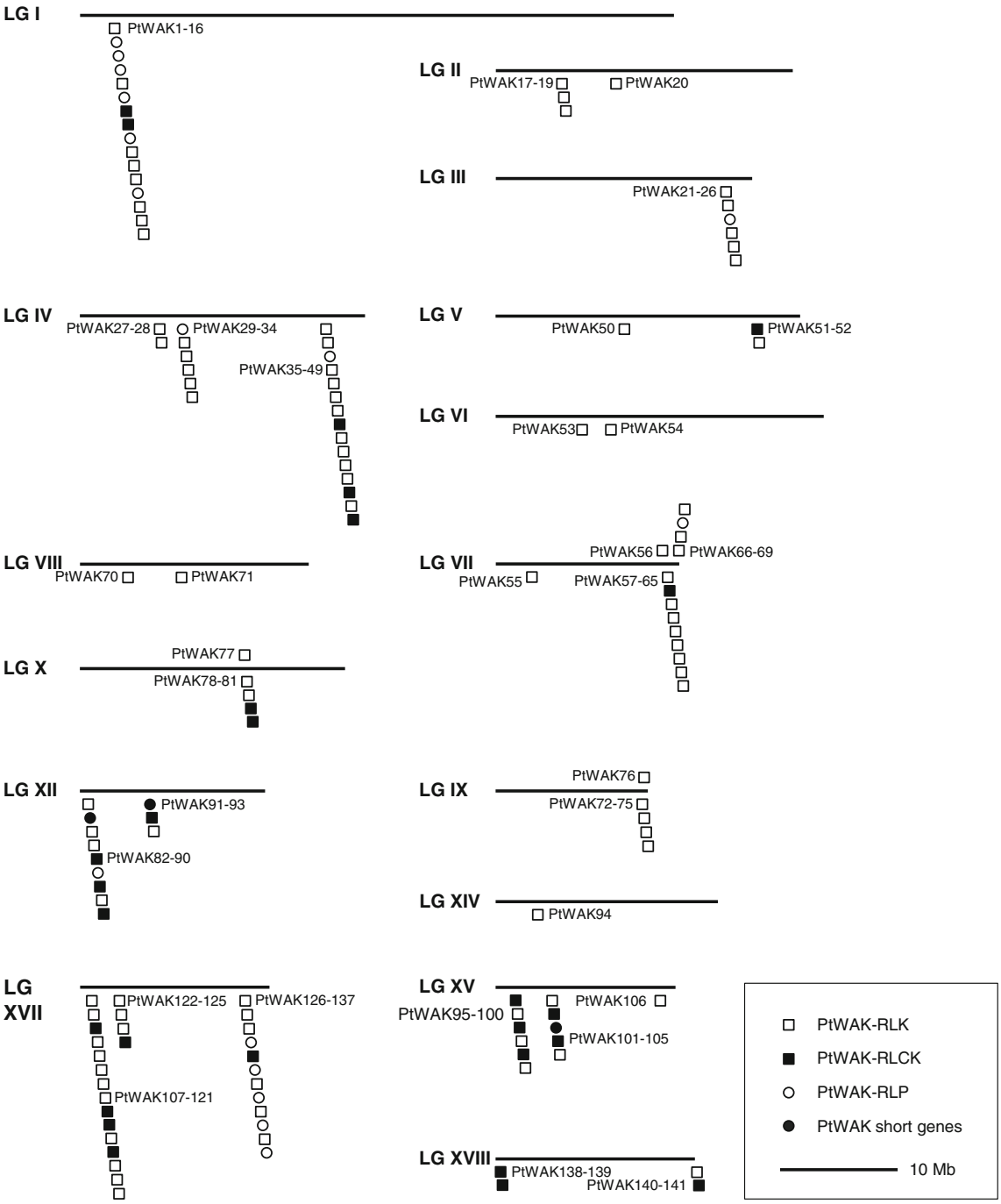


Fig. 1 Representation of *Pt*WAK types on 15 of the 19 poplar linkage groups (*LGs*). *Black bars* represent poplar LGs; their numbers are indicated on the *left*. *Stacked symbols* represent clusters. Within each cluster, the first *PtWAK* gene on an LG is found at the *top of the pile*, and the last is at the *bottom*. Clustered genes are noted *PtWAKx-y*, meaning that this cluster contains $(y-x+1)$ *PtWAK* genes. *Empty squares*, *PtWAK*-RLK; *filled squares*, *PtWAK*-RLCK; *empty circles*, *PtWAK*-RLP; and *filled circles*, *PtWAK* short genes

cation of the cell wall with which the protein may interact is calcium. This is consistent with EGF domains studied mainly in animals (Rao et al. 1995; Morgan et al. 1999; Stenflo et al. 2000; Wouters et al. 2005), which interact in a calcium-induced conformation. EGF-like domains can also be *O*-glycosylated and are known to take part in domain/domain interaction, both domains in part bridged by calcium chelation (Rao et al. 1995; Stenflo et al. 2000). The presence of one or more EGF-like domains on the extracellular part of WAK proteins also suggested potential protein-protein interactions in the extracellular part of these WAKs.

It is interesting to note that all the domains described above exhibit highly conserved cysteines that could indicate that WAK proteins may be regulated via redox processes and/or

Table 1 Classification of *Pt*WAKs based on their protein domains

Group	Specifications	Gene number
*Pt*WAK-receptor-like kinase (RLK)	One intracellular kinase domain and one or more extracellular domains (GubWAK, WAK, WAKassoc, and/or EGFs)	119
*Pt*WAK-receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK)	Only an intracellular kinase domain	32
*Pt*WAK-receptor-like protein (RLP)	At least one extracellular domains (GubWAK, WAK, WAKassoc, and/or EGF)	22
*Pt*WAK short genes	No domain	2
Total number of WAKs		175

via protein/protein interactions (Wrzaczek et al. 2010; Freisinger 2011). In addition, WAK proteins presented notable conserved domain architecture in the extracellular region, potentially offering a physical zoning of protein domains, which might be set in parallel with cell wall layers deposition, which is crucial in wood formation.

Phylogenetic analysis

The WAK family in *Populus* consists of a broad RLK subclass that differs in both intracellular kinase sequence and extracellular domain compositions. GubWAK, WAK, and WAKassoc protein domains are exclusive to the plant kingdom, and have been organized around the kinase domain during the course of plant evolution. Here, the phylogenetic analysis focused exclusively on the intracellular kinase domain, which is the single region common to most *Pt*WAKs, and the heart of the enzymatic activity. Accordingly, this analysis concerned the *Pt*WAK-RLK and *Pt*WAK-RLCK groups (see *PtWAK* classification in the section entitled "Features of WAK gene family in *Populus*"). After removing incomplete sequences from the alignment, a subset of 112 sequences was used for the phylogeny. The three topologies obtained using NJ, MP, and BI phylogenetic reconstruction were congruent (p=0.274); NJ and MP bootstrap values and BI posterior probability values are indicated at each node (Fig. 3). Two monophyletic clades were markedly differentiated (i.e. WAK Clades I and II), although the intracellular kinase domains of these WAKs were highly conserved (because of a single Ser/Thr catalytic domain and few downstream target recognition domains that must be evolutionarily constrained). In Fig. 3, the composition of the extracellular region is shown for each protein. The *Pt*WAK proteins with WAK and EGF-like (EGF-Ca^{2+}, cEGF, and EGF3) extracellular domains were found only in clade I, and were unexpectedly organized. Some subclades preferentially contained one type of extracellular domain combination. This result was supported by high posterior probability and bootstrap values (Fig. 3), suggesting an interesting parallel evolution between the kinase domain and the WAK/EGF-like domains of *Pt*WAK-RLK. By contrast, the WAKassoc domain was found in two distinct subclades belonging to WAK clades I and II. When a focused phylogenetic analysis of the WAKassoc domain was performed, the 18 proteins were not split into two groups (Online resource 3). These observations suggest that the 18 proteins recognize similar extracellular signals, but may be involved in two different intracellular signaling pathways. The last domain GubWAK was spread over the entire phylogeny, highlighting its older origin.

Using the same approach, a phylogenetic analysis of *Pt*WAKs, *Os*WAKs, and *At*WAKs was also carried out. The topologies obtained using MP and BI methods were congruent (p=0.842), but the three were not congruent with NJ topology. Although these analyses showed 18 highly conserved monophyletic groups, their organization was not rigorously conserved between the three topologies (data not shown). However, from the combined reading of the two phylogenetic analyses (Figs. 3 and 4), two divergent WAK family evolutionary threads can be drawn. A first thread (WAK group I) with several clades emerged containing members from the three species. In the second thread (WAK group II), one clade specifically addressed *PtWAK*. This result was supported by high bootstraps and posterior probability. This suggests that the evolution of the first WAK group had occurred in the monocot–dicot common ancestor, while the clade from the second WAK group evolved independently in poplar.

Transcriptomics data analyses

Intuitively, we might argue that such a remarkable expansion of the *WAK* family and its protein extra-intracellular domain organization could confer advantages on *Populus* processes involved in innate immunity and abiotic stress responses and/or in plant growth and development. Two main fundamental questions then arise: (i) what are the *PtWAK* members that show contrasting transcriptional expressions during specific physiological responses? (ii) what kind of evolutionary information could be highlighted in this panel of modulated *PtWAKs* given their genomic organization and their protein domain architecture?

In our study, 119 *PtWAKs* among the 175 predicted *WAK* genes retrieved in v3.0 poplar genome matched v2.2 gene models that were included in the publicly available transcriptomics analyses (Azaiez et al. 2009; Levée et al. 2009;

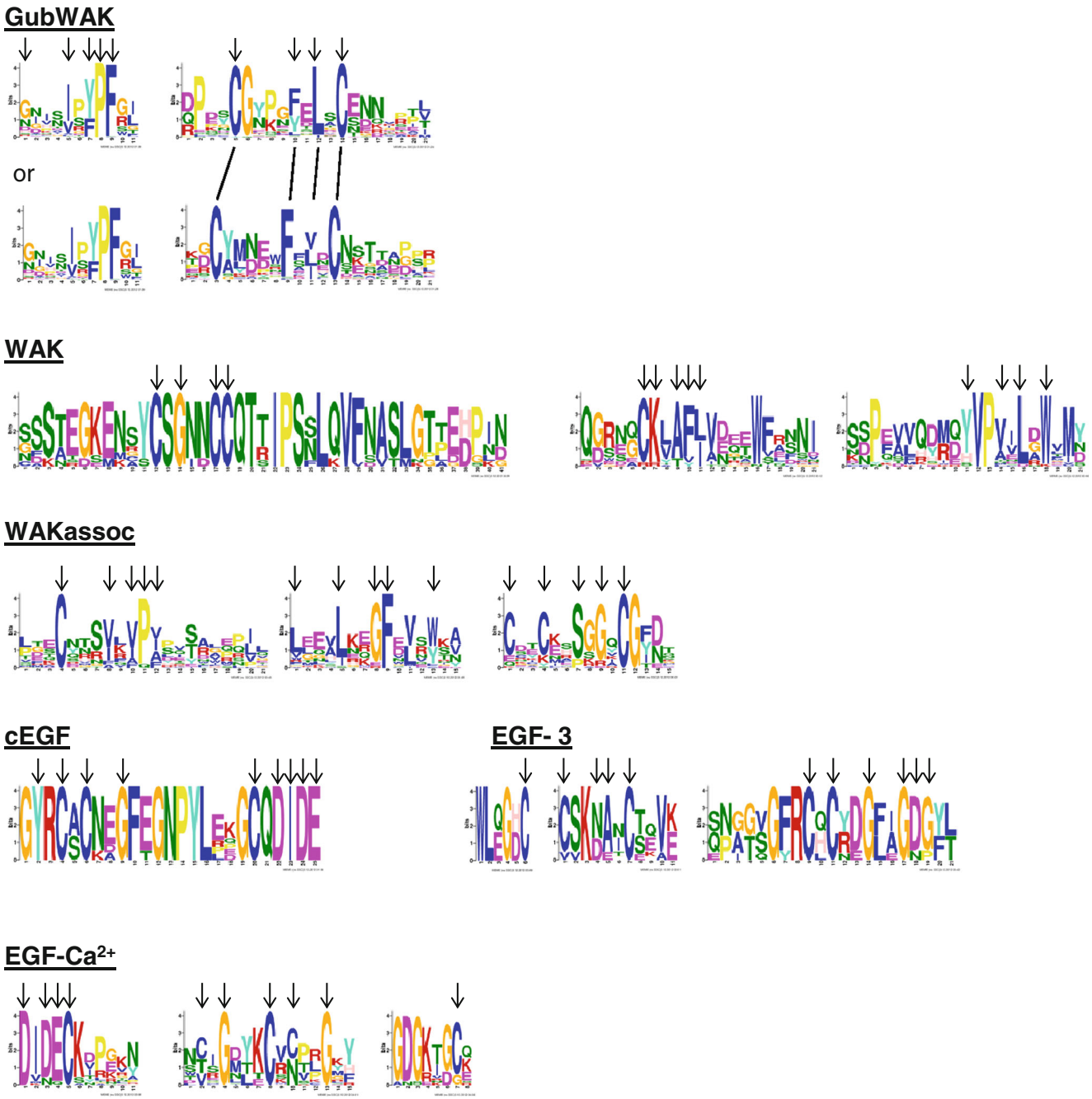
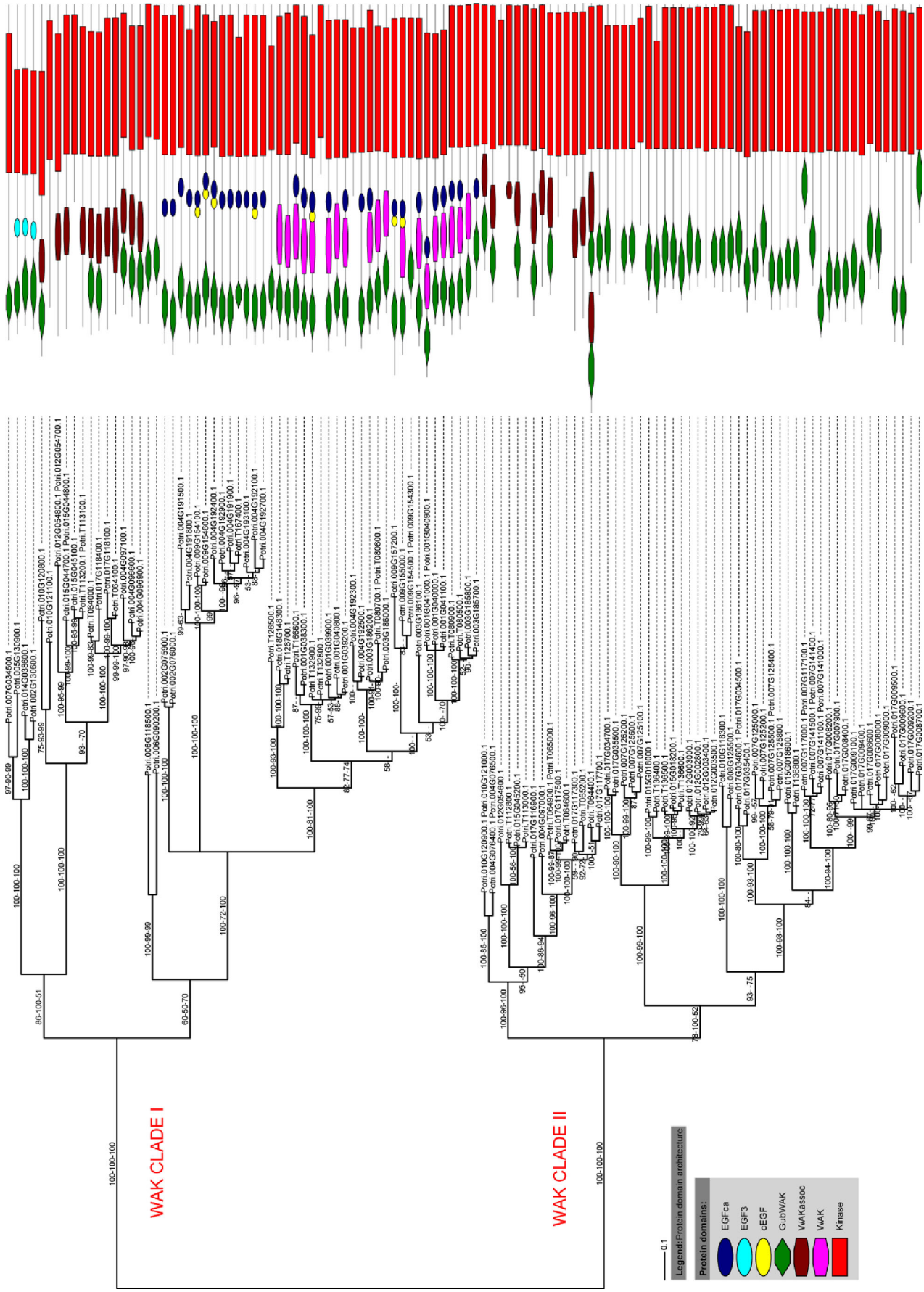


Fig. 2 Conserved motifs in poplar WAK protein domains. The conserved motifs are indicated in the order they appear in the different *Pt*WAK domains. *Arrows* indicate conserved amino acids described in PFAM database. *A* alanine, *R* arginine, *N* asparagine, *D* aspartic acid, *C* cysteine, *Q* glutamine, *E* glutamic acid, *G* glycine, *H* histidine, *I* isoleucine, *L* leucine, *K* lysine, *M* methionine, *F* phenylalanine, *P* proline, *S* serine, *T* threonine, *W* tryptophan, *Y* tyrosine, *V* valine

Wilkins et al. 2009a, b; Cohen et al. 2010; Grisel et al. 2010; Hamanishi et al. 2010). In the v2.2 genome assembly, only 120 *PtWAKs* were identified (data not shown). To our knowledge, since the v3.0 genome assembly has been released in August 2012, no transcriptomics analyses based on these data are available yet. We were able to obtain expression values for 72 genes (Affymetrix array) (Online resource 4). For comparison, another technology (Agilent custom probe design array) found a similar number with 76 *PtWAK*s expressed in apex. In view of the large number of sequences identified in the poplar v3.0 genome assembly, and the redundancy of sequences in the multigenic family, our results give a good indication of *PtWAK* expression profile, still limited, however, by probe design in chips. The WAK family presents a high level of homology between its members, especially among members within clusters. As a consequence, one cannot exclude that a


WAK CLADE I
WAK CLADE II
0.1
Legend: Protein domain architecture
Protein domains:
EGFca
EGF3
cEGF
GubWAK
WAKassoc
WAK
Kinase

◀ **Fig. 3** Phylogenetic tree of *Pt*WAKs. The conserved kinase domain was analyzed. The protein domain architecture is indicated on the *right*. Bar length and color shapes are proportional to the number of amino acids of the protein and to the NCBI's CDD prediction of domain length, respectively. The tree obtained by the BI method is represented, and posterior probability and bootstrap values of >0.5 are indicated at nodes as BI/NJ/MP

probe designed on the v2 genome assembly could hybridize transcripts from different genes. Alternatively, different probes could hybridize only one v3 gene. Keeping this limitation in mind, the observation of differential expression pattern suggests the modulation of expression of at least one WAK member.

Overall, the 72 *PtWAKs* exhibited a lower expression level than a randomly selected set of genes (Online resource 5a). Likewise, only 35 ESTs were retrieved from the database (Online resource 1, April 2013), representing a very small group of 17 *Pt*WAKs. This is in agreement with the commonly found low abundance of WAK transcripts in *Arabidopsis* (He et al. 1996; Kohorn et al. 2006). This indicated that these genes were transcribed at a very low level, or that their mRNAs were not accessible because of a possible too-short

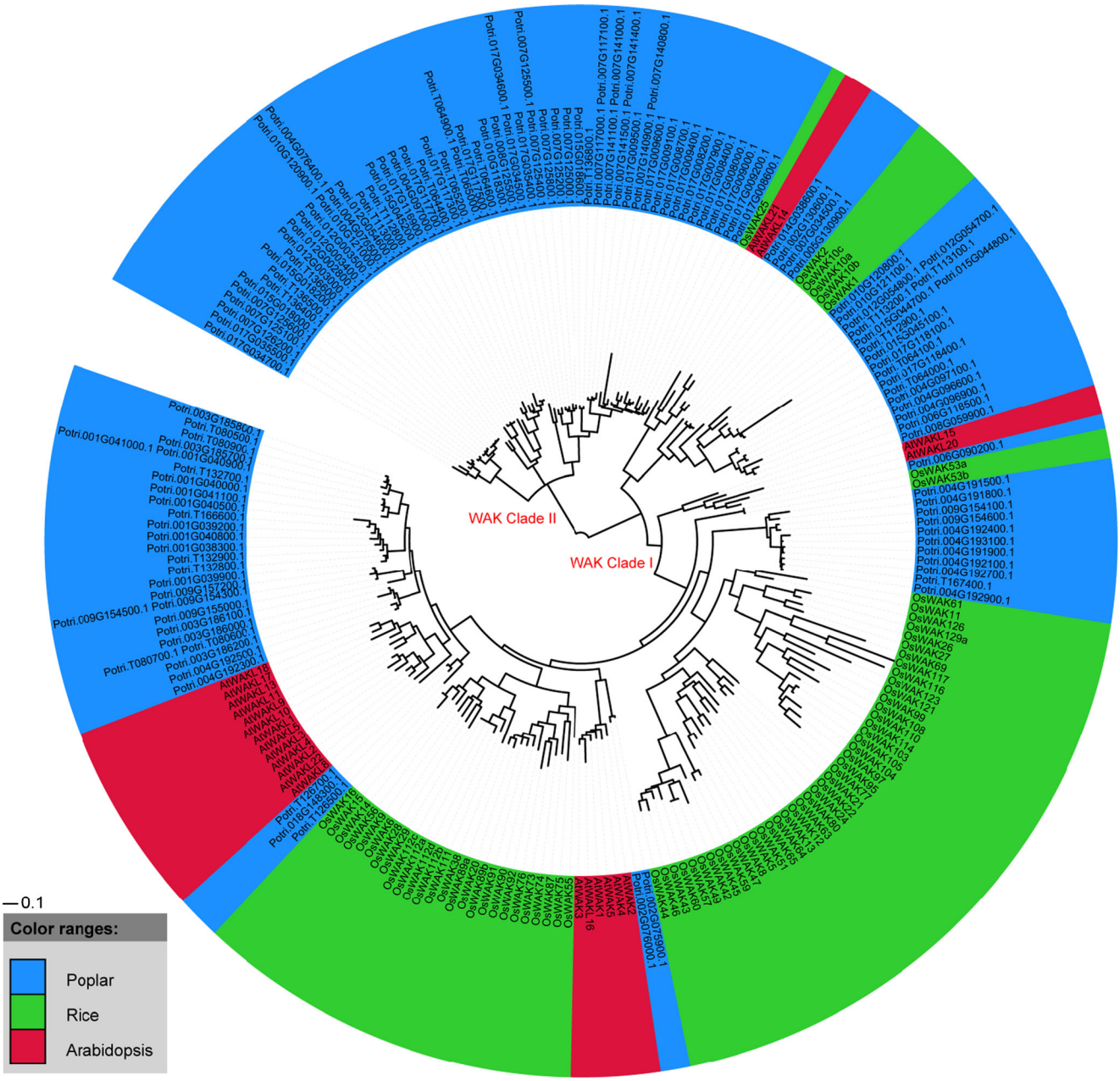


Fig. 4 Phylogenetic tree of *At*WAKs, *Os*WAKs and *Pt*WAKs. The conserved kinase domain of *Arabidopsis*, rice, and poplar WAKs was analyzed. The tree obtained by the BI method is represented. *Pt*WAK names are *underlined in blue*, *Os*WAK names in *green*, and *At*WAK names in *red*

half-life, or that these genes presented spatial and temporal expression patterns not recorded in the public libraries.

The WAK family has been shown to be involved in plant growth/development and plant-microbe interactions/abiotic stress responses in *Arabidopsis* (He et al. 1998; Sivaguru et al. 2003; Verica et al. 2003; Hou et al. 2005; Meier et al. 2010), and in plant–microbe interaction in rice (Li et al. 2009). An entropy calculation approach was used to evaluate the global expression of *PtWAKs*. This approach first indicated that the expression of *PtWAKs* was not significantly tissue-dependent (Online resource 5b). This contrasted with *AtWAKs* and *AtWAKLs* expressions, which were largely tissue-specific in green tissues and roots/flowers, respectively (Verica and He 2002; Verica et al. 2003). However, a detailed analysis yielded further information. Twenty-five *PtWAKs* showed a significant tissue-specific expression and were mainly overexpressed in mature leaves, roots, and flowers (Fig. 5). Secondly, the expression of 16 *PtWAKs* was significantly affected by changing environmental conditions (Online resource 5c), after pathogen attacks, light exposure or drought treatment. In line with the hypothesis that the ability to link with oligogalacturonic acids is a key factor for the pathogen attack response (Brutus et al. 2010), all the *PtWAKs* that were overexpressed during pathogen stress belonged to the *Pt*WAK-RLK group, in which members contain a GubWAK domain (Fig. 5; Online resource 1). However, we noted that the *Pt*WAK-RLCK Potri.017G117500, which has no GubWAK domain, was overexpressed during pathogen attacks, suggesting the existence of additional pathogen recognition mechanisms or a lack of structural annotation for this gene model. In addition, the expression of *PtWAKs* was significantly modified during light limitation (five members), and by water availability in shoot apical meristem (five members, Online resource 6), in roots (one member), and in leaves (one member, Fig. 5). These two abiotic parameters could be viewed as being two interconnected driving forces involved in the hydraulic conductivity of the plant, in which WAKs could play a sensing role (Lally et al. 2001; Kohorn et al. 2006; Ben Bâaziz et al. 2012). Lastly, neither aluminium nor flooding stresses had any significant effect on the expression of any of the 72 *PtWAKs* (Online resource 4).

Analysis of these expression data together with *WAK* family genome organization gave some interesting results. Except for Potri.008G059900, *Pt*WAK members showing significant transcript accumulation during pathogen attack all belonged to the largest tandem clusters (chromosome VII, IX, XII, and XVII). Intriguingly, WAK members of these chromosomes were spread preferentially over the monophyletic WAK clade II, which is specific to *Populus* (Fig. 4). These findings suggest duplication resulting from strong selection pressure exerted by poplar pathogens. This hypothesis has also been advanced by Lehti-Shiu et al. (2009) studying the RLK family in *Arabidopsis*, poplar, and rice. This may be functionally linked to phytopathogen features, which generally present narrow host spectrum specificities and display a corresponding genetic evolution (Jones and Dangl 2006). By contrast, most *Pt*WAK members that were differentially expressed during developmental/growth processes were not integrated into an expanded tandem cluster. These *WAKs* were found on chromosomes III, V, VII, XIV, XV, and XVIII, and were distributed in the monophyletic WAK clade I, which is shared with rice and *Arabidopsis* (Fig. 4). Genomic nontandem receptors involved in development could be more conserved between plants, probably because of the common role they play. A few tandem members belonging to chromosomes IV, VII, and XVII were also modulated in development processes. They could represent potential developmental innovations that meet specific woody-species needs. Their presence in clusters could be explained by specific duplication in poplar after its divergence.

The large proportion of tandem duplication of WAK genes raises the question of the functional redundancy of duplicates (or paralogs). According to Moore and Purugganan (2005), paralogs may undergo divergent evolutionary fates during subsequent genome evolution such as subfunctionalization (partition of original functions), neofunctionalization (acquisition of novel functions), or nonfunctionalization (loss of original functions), which could be paired with divergence in expression patterns. Of the 11 main phylogenetic homologous blocks of *Pt*WAK, nine showed near-similar expression patterns with respect to the tissues or stress conditions examined (Fig. 3; Online resource 4), suggesting that most expressed PtWAK genes have been retained by subfunctionalization. However, neofunctionalization may also have been involved, albeit on a smaller scale, with only two phylogenetic blocks: one composed of two segmental duplicates, the other containing three tandem duplicates. These five *WAK* sequences strongly diverged in their expression patterns. The segmental duplicate Potri.014G0386000 was predominantly expressed in roots and female catkin, whereas its counterpart Potri.002G130600 seemed specifically expressed in differentiating xylem. Furthermore, among the three tandem duplicated members Potri.002G075900, Potri.002G076000, and Potri.002G076100, only the second was differentially expressed in mature leaves.

Finally, our analysis revealed a randomly expressed *PtWAKs* distribution between genotypes and *Populus* species. 24 *PtWAKs* were modulated by drought stress in one or more of the ten genotypes studied here. In

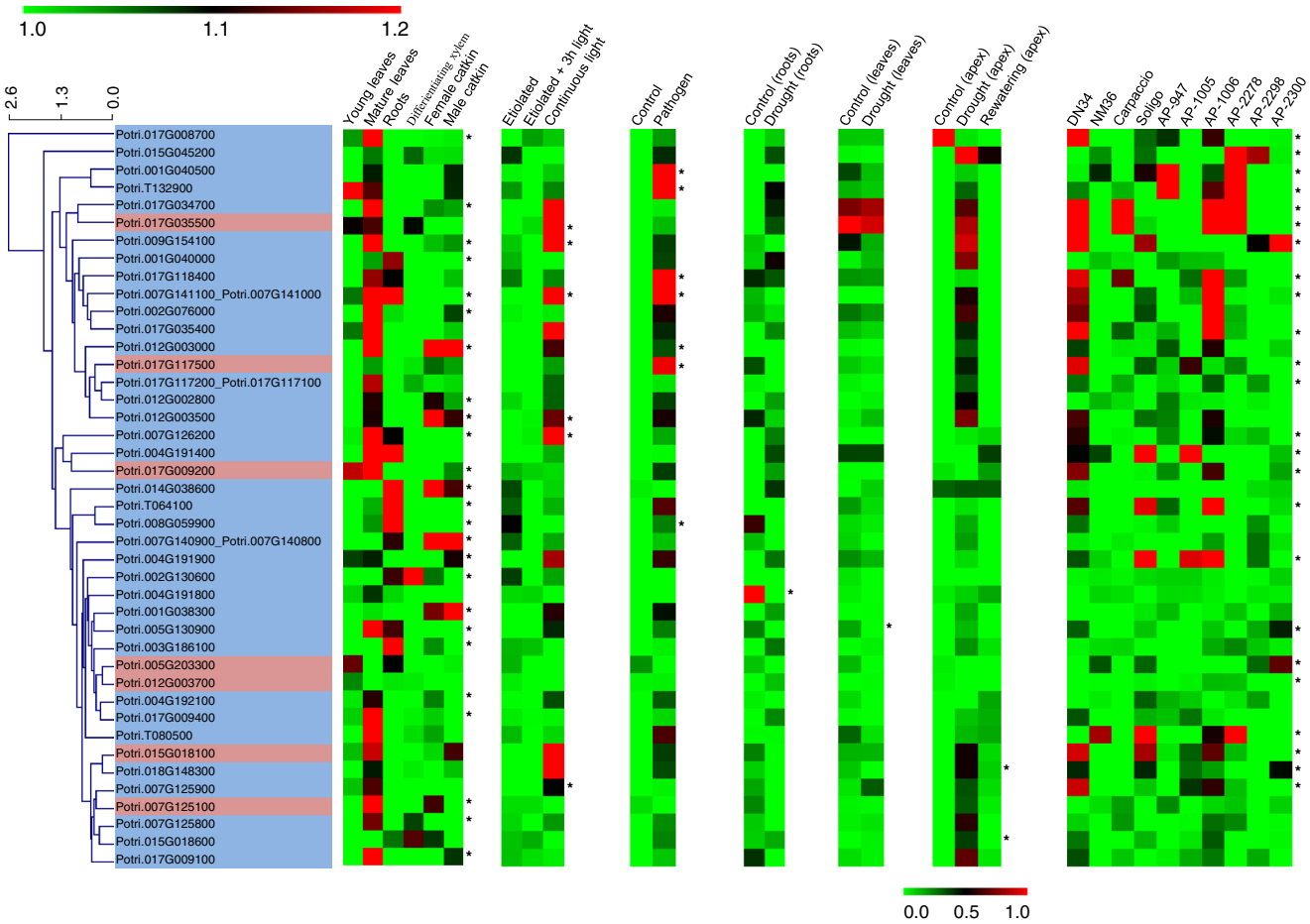


Fig. 5 Clustered heatmap showing expression patterns of significant tissue/condition/genotype specific expressed *WAKs* in poplar. *PtWAK* v3.0 gene model names are indicated. Only *PtWAKs* showing differential expression in at least one tissue/environmental condition/genotype are displayed (42 *PtWAKs*). For each tissue/environmental condition/genotype, mean relative expression values (three to four replicates) are shown. Scale from 0.0 to 1.0 corresponds to drought experiment in the apex; scale from 1.0 to 1.2 is for all the affymetrix array experiments. Relative expression value was calculated by dividing the absolute value (RMA normalized) by the median of absolute values of all samples, except for the apex assay. In this case, relative expression was obtained by dividing each array-normalized expression value by the median of absolute values of all samples, and was then $\log_2$-transformed. An *asterisk* indicates significant tissue/environmental condition/genotype effect on *PtWAK* expression according to Welch's *t* test/one-way ANOVA for two or more samples followed by adjusted Bonferroni correction (*$p<0.05$). Hierarchical clustering was performed for *PtWAKs* according to their expression patterns. "Carpaccio," "DN34," and "Soligo" are *Populuscanadensis* genotypes; "NM36" is *P. nigra*×*P. maximowiczii* while "AP-947," "AP-1005," "AP-1006," "AP-2278," "AP-2298," and "AP-2300" are *P. balsamifera* genotypes. *Blue-* and *red-shaded PtWAK* names belong to *PtWAK-RLK* and *PtWAK-RLCK* gene groups, respectively

other words, a *WAK* gene may be differentially expressed in various genotypes in response to the same constraint. This suggests complex regulations of the *WAK* gene family that may have been set up during evolution in response to a changing environment.

Conclusions

The WAK family in poplar comprises a very large number of members. The WAK proteins contain various extracellular domains putatively playing divergent functional roles. Together, these features make WAKs appealing candidates to investigate new communication networks that may relay the wall status to the cytoplasm in the context of the CPMCW continuum described by Baluška et al. (2003). The cell wall is an essential compartment affected not only by both pathogen attacks and developmental processes but also by abiotic stresses such as drought and various mechanical constraints. Our study reports that a panel of *Pt*WAKs was modulated at the transcriptional level in some of these physiological processes, suggesting that related encoded proteins could be involved, potentially as receptors of pathogen ligands or as sensors of hydromechanical cues. Thus this study provides new insight into the WAK gene family in *Populus*. Our findings may also be a starting point for a study of the physiological roles of WAKs in cellular regulatory networks in woody species.

Acknowledgments This work was supported by the French Ministery of Higher Education and Research (doctoral contract). Editing and proofreading were done by Auvergne Traduction Technique.

Data archiving statement A full list of the Phytozome gene sequences used for this paper is included in Online ressource 1. Data used for transcriptomic analyses are referenced on GEO database (accession numbers: GSE13990, GSM412653, GSE9673, GSE17223, GSE15242, GSE17226, GSE17230, GSE21171, GSE19297, and GSE13109).

References

Azaiez A, Boyle B, Levée V, Séguin A (2009) Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi. Mol Plant Microbe Interact 22:190–200

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble S (2009) MEME Suite: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res 37:202–208

Baluška F, Šamaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D (2003) Cytoskeleton–plasma membrane–cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. Plant Physiol 133:482–491

Ben Bâaziz K, Lopez D, Rabot A, Combes D, Gousset A, Bouzid S, Cochard H, Sakr S, Venisse JS (2012) Light-mediated K_{leaf} induction and contribution of both the PIP1s and PIP2s aquaporins in five tree species: walnut (*Juglans regia*) case study. Tree Physiol 32:423–434

Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proc Natl Acad Sci U S A 107:9452–9457

Calendini F, Martin JF (2005) PaupUP v1.0.3.1, A free graphical frontend for Paup* Dos software

Cohen D, Bogeat-Triboulot MB, Tisserant E et al (2010) Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. BMC Genomics 11:630

Decreux A, Messiaen J (2005) Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. Plant Cell Physiol 46:268–278

Decreux A, Thomas A, Spies B, Brasseur R, Van Cutsem P, Messiaen J (2006) *In vitro* characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. Phytochemistry 67:1068–1079

Dougherty DA (2012) The cation–π interaction. Acc Chem Res 46:885–893

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797

Freisinger E (2011) Structural features specific to plant metallothioneins. J Biol Inorg Chem 16:1035–1045

Goodstein DM, Shu S, Howson R et al (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Res 40:1178–1186

Grisel N, Zoller S, Künzli-Gontarczyk M, Lampart T, Münsterkötter M, Brunner I, Bovet L, Métraux JP, Sperisen C (2010) Transcriptome responses to aluminum stress in roots of aspen (*Populus tremula*). BMC Plant Biol 10:185

Hamanishi ET, Raj S, Wilkins O, Thomas BR, Mansfield SD, Plant AL, Campbell MM (2010) Intraspecific variation in the *Populus balsamifera* drought transcriptome. Plant Cell Environ 33:1742–1755

Hanada K, Zou C, Lehti-Shiu MD, Shinozaki K, Shiu SH (2008) Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. Plant Physiol 148:993–1003

He ZH, Fujiki M, Kohorn BD (1996) A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. J Biol Chem 271:19789–19793

He ZH, He D, Kohorn BD (1998) Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. Plant J 14:55–63

He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak*1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 39:1189–1196

Hou X, Tong H, Selby J, Dewitt J, Peng X, He ZH (2005) Involvement of a cell wall-associated kinase, WAKL4, in *Arabidopsis* mineral responses. Plant Physiol 139:1704–1716

Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. New Phytol 176:7–21

Johnson WE, Li C, Rabinovic A (2007) Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. Biostatistics 8:118–127

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444:323–329

Jourez B, Riboux A, Leclercq A (2001) Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'ghoy'). IAWA J 22:133–157

Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionnary tree topologies from DNA sequences data, and the branching order in Hmonoidea. J Mol Evol 29:170–179

Kohler A, Rinaldi C, Duplessis S, Baucher M, Geelen D, Duchaussoy F, Meyers BC, Boerjan W, Martin F (2008) Genome-wide identification of *NBS* resistance genes in *Populus trichocarpa*. Plant Mol Biol 66:619–636

Kohorn BD, Kobayashi M, Johansen S, Friedman HP, Fischer A, Byers N (2006) Wall-associated kinase 1 (WAK1) is crosslinked in endomembranes, and transport to the cell surface requires correct cell-wall synthesis. J Cell Sci 119:2282–2290

Kohorn BD, Johansen S, Shishido A, Todorova T, Martinez R, Defeo E, Obregon P (2009) Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. Plant J 60:974–982

Kohorn BD, Kohorn SL, Todorova T, Baptiste G, Stansky K, McCullough M (2012) A dominant allele of *Arabidopsis* pectin-binding wall-associated kinase induces a stress response suppressed by MPK6 but not MPK3 mutations. Mol Plant 5:841–851

Lally D, Ingmire P, Tong HY, He ZH (2001) Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. Plant Cell 13:1317–1331

Lan T, Yang ZL, Yang X, Liu YJ, Wang XR, Zeng QY (2009) Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. Plant Cell 21:3749–3766

Lehti-Shiu MD, Zou C, Hanada K, Shiu SH (2009) Evolutionary history and stress regulation of plant Receptor-Like Kinase/Pelle genes. Plant Physiol 150:12–26

Letunic I, Bork P (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. Nucleic Acids Res 39:475–478

Levée V, Major I, Levasseur C, Tremblay L, MacKay J, Séguin A (2009) Expression profiling and functional analysis of *Populus* WRKY23 reveals a regulatory role in defense. New Phytol 184:48–70

Li H, Zhou SY, Zhao WS, Su SC, Peng YL (2009) A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance. Plant Mol Biol 69:337–346

Lopez D, Bronner G, Brunel N et al (2012) Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. J Exp Bot 63:2217–2230

Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB et al (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. Nucleic Acids Res 39:225–229

Meier S, Ruzvidzo O, Morse M, Donaldson L, Kwezi L, Gehring C (2010) The *Arabidopsis wall associated kinase-like 10* gene encodes a functional guanylyl cyclase and is co-expressed with pathogen defense related genes. PLoS One 5:e8904

Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. Curr Opin Plant Biol 8:122–128

Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SEH, Uthaipibull C, Holder AA, Feeney J (1999) Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. J Mol Biol 289:113–122

Paterson AH, Freeling M, Tang H, Wang X (2010) Insights from the comparison of plant genome sequences. Annu Rev Plant Biol 61: 349–372

Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. BMC Plant Biol 11:33

Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY et al (2012) The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 40:290–301

R Development Core Team (2008). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org

Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG, Stuart D (1995) The structure of a Ca^{2+}-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. Cell 82:131–141

Saeed A, Sharov V, White J et al (2003) TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 34:374–378

Schug J, Schuller WP, Kappen C, Salbaum JM, Bucan M, Stoeckert CJ (2005) Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy. Genome Biol 6:R33

Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 98:10763–10768

Shiu SH, Bleecker AB (2003) Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle gene family and Receptor-Like Proteins in *Arabidopsis*. Plant Physiol 132:530–543

Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong H, Osawa H, Baluška F, Volkmann D, Matsumoto H (2003) Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. Plant Physiol 132:2256–2266

Sjödin A, Street NR, Sandberg G, Gustafsson P, Jansson S (2009) The *Populus* Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. New Phytol 182:1013–1025

Stenflo J, Stenberg Y, Muranyi A (2000) Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. Biochim Biophys Acta 1477:51–63

Swofford DL (2000) PAUP*: phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731–2739

Telewski FW (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants? Am J Bot 93:1466–1476

Tocquard K, Lopez D, Decourteix M, Thibaut B, Julien JL, Label P, Leblanc-Fournier N, Roeckel-Drevet P (2014) The molecular mechanisms of reaction wood induction. In: Gardiner B, Barnett J, Saranpää P, Gril J (eds) Biol. React. Wood, Springer, Berlin Heidelberg, pp 107–138

Tuskan GA, Difazio S, Jansson S et al (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science 313: 1596–1604

Verica JA, He ZH (2002) The cell Wall-Associated Kinase (*WAK*) and *WAK*-Like kinase gene family. Plant Physiol 129:455–459

Verica JA, Chae L, Tong H, Ingmire P, He ZH (2003) Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall- associated kinase-like kinase genes in *Arabidopsis*. Plant Physiol 133:1732–1746

Wagner TA, Kohorn BD (2001) Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. Plant Cell 13:303–318

Wilkins O, Nahal H, Foong J, Provart NJ, Campbell MM (2009a) Expansion and diversification of the R2R3-MYB family of transcription factors. Plant Physiol 149:981–993

Wilkins O, Waldron L, Nahal H, Provart NJ, Campbell MM (2009b) Genotype and time of day shape the *Populus* drought response. Plant J 60:703–715

Wolf S, Hématy K, Höfte H (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. Annu Rev Plant Biol 63:381–407

Wouters MA, Rigoutsos I, Chu CK, Feng LL, Sparrow DB, Dunwoodie SL (2005) Evolution of distinct EGF domains with specific functions. Protein Sci 14:1091–1103

Wrzaczek M, Brosché M, Salojärvi J, Kangasjärvi S, Idänheimo N, Mersmann S, Robatzek S, Karpiński S, Karpińska B, Kangasjärvi J (2010) Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. BMC Plant Biol 10:95

Yang X, Kalluri UC, DiFazio SP, Wullschleger SD, Tschaplinski TJ, Cheng ZM, Tuskan GA (2009) Poplar genomics: state of the science. Crit Rev Plant Sci 28:285–308

Zhang S, Chen C, Li L, Meng L, Singh J, Jiang N, Deng XW, He ZH, Lemaux P (2005) Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. Plant Physiol 139:1107–1124

Online resource 1.

P. trichocarpa WAKs. PtWAKs were classified based on their chromosomal location. Alias names of v1 and v2 of poplar genome annotation are indicated. Domain structure, EST names and numbers per sequence, and WAK genomic, transcript, CDS, and protein sequences are given.

Nomenclature v3.0	JGI v3.0		Position	Modified position	Alias v1	Alias v2	Structure WAK-RLK WAK-RLCK WAK-RLP	EST number	EST names
	Locus name	Transcript name							
*Pt*WAK1.1	Potri.001G038300	Potri.001G038300.1	Chr01: 2702187 - 2708972			POPTR_0001s07540	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK1.2		Potri.001G038300.2	Chr01: 2702187 - 2708972				TM-GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK1.3		Potri.001G038300.3	Chr01: 2702187 - 2708972				TM-GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK2	Potri.001G038600	Potri.001G038600.1	Chr01: 2716814 - 2717236			POPTR_0001s07690	WAK		
*Pt*WAK3	Potri.001G038700	Potri.001G038700.1	Chr01: 2744981 - 2746112			POPTR_0001s07560	GubWAK-WAK		
*Pt*WAK4	Potri.001G039100	Potri.001G039100.1	Chr01: 2821231 - 2822254				GubWAK-WAK		
*Pt*WAK5.1	Potri.001G039200	Potri.001G039200.1	Chr01: 2835064 - 2838974			POPTR_0001s07550	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK5.2		Potri.001G039200.2	Chr01: 2835064 - 2838974				TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK6	Potri.001G039300	Potri.001G039300.1	Chr01: 2840674 - 2841549				GubWAK-WAK		
*Pt*WAK7	Potri.001G039400	Potri.001G039400.1	Chr01: 2845651 - 2846076		eugene3.00010160	POPTR_1464s00200	Kinase		
*Pt*WAK8	Potri.001G039500	Potri.001G039500.1	Chr01: 2847273 - 2847642				Kinase		
*Pt*WAK9	Potri.001G039800	Potri.001G039800.1	Chr01: 2873456 - 2874345		eugene3.18010001	POPTR_0001s07590	GubWAK-WAK		
*Pt*WAK10	Potri.001G039900	Potri.001G039900.1	Chr01: 2882460 - 2885831			POPTR_1809s00200	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK11	Potri.001G040000	Potri.001G040000.1	Chr01: 2890450 - 2893035			POPTR_0001s03240	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK12	Potri.001G040500	Potri.001G040500.1	Chr01: 2917881 - 2921252	Chr01: 2917881 - 2921324	gw1.I.6812.1	POPTR_0001s03190	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK13	Potri.001G040600	Potri.001G040600.1	Chr01: 2947432 - 2948455				GubWAK-WAK		
*Pt*WAK14	Potri.001G040800	Potri.001G040800.1	Chr01: 2969090 - 2973330	Chr01: 2969090 - 2973321		POPTR_0001s07620	TM-GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK15	Potri.001G041000_Potri.001G040900	Potri.001G041000.1_Potri.001G040900.1	Chr01: 2976143 - 2983583	Chr01: 2976143 - 2983580		POPTR_0001s07640 POPTR_0001s07630	GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK16	Potri.001G041100	Potri.001G041100.1	Chr01: 2991802 - 2994397		eugene3.00010157	POPTR_0001s07650	GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK17	Potri.002G075900	Potri.002G075900.1	Chr02: 5242804 - 5246124		eugene3.00061997	POPTR_0002s07650	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK18	Potri.002G076000	Potri.002G076000.1	Chr02: 5250099 - 5253709		eugene3.00061998	POPTR_0002s07660	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK19	Potri.002G076100	Potri.002G076100.1	Chr02: 5265363 - 5268752			POPTR_0002s07670	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK20.1	Potri.002G130600	Potri.002G130600.1	Chr02: 9801086 - 9804205		eugene3.00021214	POPTR_0002s13210	GubWAK-EGF3-TM-Kinase	3	DT495071.1 / CV248064.1 / CV252204.1
*Pt*WAK20.2		Potri.002G130600.2	Chr02: 9801065 - 9804208				GubWAK-EGF3-TM-Kinase		
*Pt*WAK21	Potri.003G185700	Potri.003G185700.1	Chr03: 19159504 - 19162343			POPTR_0003s18440	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK22	Potri.003G185800	Potri.003G185800.1	Chr03: 19172767 - 19177083	Chr03: 19172767 - 19175543		POPTR_0075s00210	GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK23	Potri.003G185900	Potri.003G185900.1	Chr03: 19179435 - 19179981	Chr03: 19176189 - 19179981		POPTR_0075s00230	GubWAK-WAK		
*Pt*WAK24	Potri.003G186000	Potri.003G186000.1	Chr03: 19186929 - 19190924				GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK25	Potri.003G186100	Potri.003G186100.1	Chr03: 19228668 - 19231510		gw1.III.190.1	POPTR_0003s18490	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK26	Potri.003G186200	Potri.003G186200.1	Chr03: 19237820 - 19241505		eugene3.00031786	POPTR_0003s18500	GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK27	Potri.004G076100	Potri.004G076100.1	Chr04: 6350243 - 6353142				TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK28	Potri.004G076400_Potri.004G076500	Potri.004G076400.1_Potri.004G076500.1	Chr04: 6364110 - 6365004	Chr04: 6364110 - 6367167			TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK29	Potri.004G096500	Potri.004G096500.1	Chr04: 8322539 - 8325652	Chr04: 8322539 - 8323373			TM-WAKassoc		
*Pt*WAK30	Potri.004G096600	Potri.004G096600.1	Chr04: 8326783 - 8328270	Chr04: 8324791 - 8328270			TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK31	Potri.004G096700_Potri.004G096800	Potri.004G096700.1_Potri.004G096800.1	Chr04: 8329838 - 8330262	Chr04: 8329816 - 8334651		POPTR_0004s09590 POPTR_0004s09600	TM-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK32	Potri.004G096900	Potri.004G096900.1	Chr04: 8341471 - 8345071			POPTR_0004s09610	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK33	Potri.004G097000	Potri.004G097000.1	Chr04: 8348899 - 8353983			POPTR_0004s09620 POPTR_0004s09630	TM-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK34	Potri.004G097100	Potri.004G097100.1	Chr04: 8360765 - 8364004			POPTR_0004s09640	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK35	Potri.004G191400	Potri.004G191400.1	Chr04: 20582525 - 20585192			POPTR_0004s20290	cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK36	Potri.004G191500	Potri.004G191500.1	Chr04: 20590945 - 20593565	Chr04: 20590945 - 20593586		POPTR_0004s20300	TM-GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK37	Potri.004G191600	Potri.004G191600.1	Chr04: 20596354 - 20597681	Chr04: 20596354 - 20597809			GubWAK		
*Pt*WAK38	Potri.004G191800	Potri.004G191800.1	Chr04: 20600098 - 20603242		gw1.66.215.1	POPTR_0004s20330	TM-GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK39	Potri.004G191900	Potri.004G191900.1	Chr04: 20608562 - 20612217			POPTR_0004s20340	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK40	Potri.004G192000	Potri.004G192000.1	Chr04: 20625677 - 20629168		gw1.66.223.1	POPTR_0004s20350	TM-GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK41	Potri.004G192100	Potri.004G192100.1	Chr04: 20635946 - 20640018			POPTR_0004s20360	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK42	Potri.004G192300	Potri.004G192300.1	Chr04: 20666753 - 20668076			POPTR_0004s20360	TM-Kinase		
*Pt*WAK43	Potri.004G192400	Potri.004G192400.1	Chr04: 20670661 - 20675637			POPTR_0004s20390 POPTR_0004s20380	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK44.1	Potri.004G192500	Potri.004G192500.1	Chr04: 20700628 - 20704962		gw1.66.250.1	POPTR_0103s00200	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK44.2		Potri.004G192500.2	Chr04: 20700628 - 20704962				GubWAK-EGF3-EGFca-Kinase		
*Pt*WAK45	Potri.004G192700	Potri.004G192700.1	Chr04: 20718034 - 20721714			POPTR_0004s20400	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK46	Potri.004G192900	Potri.004G192900.1	Chr04: 20740483 - 20743972			POPTR_0004s20410	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK47	Potri.004G193000	Potri.004G193000.1	Chr04: 20757190 - 20763226				Kinase		
*Pt*WAK48	Potri.004G193100	Potri.004G193100.1	Chr04: 20781351 - 20785121			POPTR_0273s00200	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK49.1	Potri.004G193300	Potri.004G193300.1	Chr04: 20793595 - 20802379		eugene3.00660093	POPTR_0004s20430	Kinase		
*Pt*WAK49.2		Potri.004G193300.2	Chr04: 20793595 - 20802379				Kinase		
*Pt*WAK49.3		Potri.004G193300.3	Chr04: 20793595 - 20802379				Kinase		

*Pt*WAK50.1	Potri.005G130900	Potri.005G130900.1	Chr05: 10522883 - 10527222		gw1.V.3800.1	POPTR_0005s13920	TM-GubWAK-EGF3-TM-Kinase		
*Pt*WAK50.2		Potri.005G130900.2	Chr05: 10522883 - 10527222				TM-GubWAK-EGF3-TM-Kinase		
*Pt*WAK50.3		Potri.005G130900.3	Chr05: 10522891 - 10527079				TM-GubWAK-EGF3-TM-Kinase		
*Pt*WAK51.1	Potri.005G203300	Potri.005G203300.1	Chr05: 21807551 - 21811975		gw1.V.650.1	POPTR_0005s22490	TM-Kinase	1	DT482185.1
*Pt*WAK51.2		Potri.005G203300.2	Chr05: 21807551 - 21811975				TM-Kinase		
*Pt*WAK52	Potri.005G203400	Potri.005G203400.1	Chr05: 21817924 - 21822460			POPTR_0005s22500	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK53	Potri.006G090200	Potri.006G090200.1	Chr06: 6920833 - 6923155			POPTR_0006s09120	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK54	Potri.006G118500	Potri.006G118500.1	Chr06: 9364041 - 9365978			POPTR_0006s12000	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK55.1	Potri.007G034500	Potri.007G034500.1	Chr07: 2660850 - 2666270		fgenesh4_pg.C_LG_VII000984	POPTR_0007s11990	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK55.2		Potri.007G034500.2	Chr07: 2660850 - 2665989				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK56	Potri.007G117000_Potri.007G117100	Potri.007G117000.1_Potri.007G117100.1	Chr07: 13758538 - 13759685	Chr07: 13758538 - 13764327		POPTR_0007s03090	GubWAK-TM-Kinase	1	DT492066.1
*Pt*WAK57	Potri.007G125000	Potri.007G125000.1	Chr07: 14202458 - 14205003				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK58.1	Potri.007G125100	Potri.007G125100.1	Chr07: 14205667 - 14207557			POPTR_0007s02290	TM-Kinase		
*Pt*WAK58.2		Potri.007G125100.2	Chr07: 14205444 - 14207557				Kinase		
*Pt*WAK59	Potri.007G125200	Potri.007G125200.1	Chr07: 14208713 - 14212062	Chr07: 14208623 - 14212062			TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK60	Potri.007G125500_Potri.007G125400	Potri.007G125500.1_Potri.007G125400.1	Chr07: 14219357 - 14220709	Chr07: 14219357 - 14222469			GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK61	Potri.007G125600	Potri.007G125600.1	Chr07: 14223508 - 14225515			Potri.007G125400.1	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK62	Potri.007G125800	Potri.007G125800.1	Chr07: 14229770 - 14232627			POPTR_0007s02230	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK63.1	Potri.007G125900	Potri.007G125900.1	Chr07: 14233165 - 14235060			POPTR_0007s02220	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK63.2		Potri.007G125900.2	Chr07: 14233382 - 14234328				GubWAK		
*Pt*WAK64	Potri.007G126100	Potri.007G126100.1	Chr07: 14240070 - 14242795			POPTR_0007s02210	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK65	Potri.007G126200	Potri.007G126200.1	Chr07: 14244432 - 14247044			POPTR_0007s02200	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK66	Potri.007G140900_Potri.007G140800	Potri.007G140900.1_Potri.007G140800.1	Chr07: 15160115 - 15162536	Chr07: 15160115 - 15164125	fgenesh4_pg.C_LG_VII000062	POPTR_0007s00830	TM-GubWAK-TM-Kinase	1	DT486874.1
*Pt*WAK67.1	Potri.007G141100_Potri.007G141000	Potri.007G141100.1_Potri.007G141000.1	Chr07: 15168528 - 15171365	Chr07: 15168528 - 15175599		POPTR_0007s00810 POPTR_0007s00820	GubWAK-TM-Kinase	2	DN492188.1 / BU875235.1
*Pt*WAK67.2		Potri.007G141100.1_Potri.007G141000.2	Chr07: 15168567 - 15171811	Chr07: 15168567 - 15175599			GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK68	Potri.007G141200	Potri.007G141200.1	Chr07: 15178810 - 15179088	Chr07: 15178810 - 15179124		POPTR_0007s00800	GubWAK		
*Pt*WAK69	Potri.007G141500_Potri.007G141400	Potri.007G141500.1_Potri.007G141400.1	Chr07: 15182689 - 15185273	Chr07: 15182689 - 15189641		POPTR_0007s00780	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK70	Potri.008G059900	Potri.008G059900.1	Chr08: 3608119 - 3611960			POPTR_0008s06030	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK71.1	Potri.008G125500	Potri.008G125500.1	Chr08: 8181763 - 8184630			POPTR_0008s12440	TM-GubWAK-TM-Kinase	1	DT487676.1
*Pt*WAK71.2		Potri.008G125500.2	Chr08: 8181763 - 8184630				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK72	Potri.009G154100	Potri.009G154100.1	Chr09: 12046073 - 12049280			POPTR_0009s15610	TM-GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK73	Potri.009G154500_Potri.009G154300	Potri.009G154500.1_Potri.009G154300.1	Chr09: 12058476 - 12059442	Chr09: 12054133 - 12059442			TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK74	Potri.009G154600	Potri.009G154600.1	Chr09: 12064847 - 12067713			POPTR_0009s15650	TM-GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK75	Potri.009G155000	Potri.009G155000.1	Chr09: 12082726 - 12085781		eugene3.00090152	POPTR_0009s15690	TM-GubWAK-WAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK76	Potri.009G157200	Potri.009G157200.1	Chr09: 12206347 - 12210001				TM-GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK77	Potri.010G118300	Potri.010G118300.1	Chr10: 13583197 - 13585950			POPTR_0010s12830	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK78	Potri.010G120800	Potri.010G120800.1	Chr10: 13764470 - 13771997				TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase	1	DT487783.1
*Pt*WAK79	Potri.010G120900_Potri.010G121000	Potri.010G120900.1_Potri.010G121000.1	Chr10: 13775546 - 13776533	Chr10: 13775546 - 13783710		POPTR_0188s00230 POPTR_0188s00220	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK80	Potri.010G121100	Potri.010G121100.1	Chr10: 13786576 - 13789431			POPTR_0188s00210	TM-Kinase	1	CV231888.1
*Pt*WAK81	Potri.010G121200	Potri.010G121200.1	Chr10: 13793338 - 13796081				TM-Kinase		
*Pt*WAK82	Potri.012G002800	Potri.012G002800.1	Chr12: 251913 - 254266			POPTR_0012s01750	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK83	Potri.012G002900	Potri.012G002900.1	Chr12: 256145 - 257327			POPTR_0012s01755	No domain		
*Pt*WAK84	Potri.012G003000	Potri.012G003000.1	Chr12: 259027 - 261490	Chr12: 259027 - 261452		POPTR_0012s01760	TM-GubWAK-TM-Kinase	2	CV236228.1 / CV234902.1
*Pt*WAK85	Potri.012G003100	Potri.012G003100.1	Chr12: 262107 - 267598	Chr12: 262107 - 267682		POPTR_0012s01770	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK86	Potri.012G003200	Potri.012G003200.1	Chr12: 274497 - 275360			POPTR_0197s00240	Kinase		
*Pt*WAK87	Potri.012G003300	Potri.012G003300.1	Chr12: 295539 - 295919			POPTR_0197s00230	GubWAK		
*Pt*WAK88	Potri.012G003400	Potri.012G003400.1	Chr12: 297398 - 307378				Kinase		
*Pt*WAK89	Potri.012G003500	Potri.012G003500.1	Chr12: 309074 - 311809			POPTR_0197s00200	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK90.1	Potri.012G003700	Potri.012G003700.1	Chr12: 312350 - 318650		Pt-CDC2.6 eugene3.00120165	POPTR_0012s01820 POPTR_0012s01800	Kinase	1	DT488693.1
*Pt*WAK90.2		Potri.012G003700.2	Chr12: 312318 - 318650				Kinase		
*Pt*WAK91	Potri.012G054500	Potri.012G054500.1	Chr12: 5514161 - 5515072				WAKassoc		
*Pt*WAK92	Potri.012G054600	Potri.012G054600.1	Chr12: 5520929 - 5522030		gw1.XII.806.1	POPTR_0012s05080	Kinase		
*Pt*WAK93.1	Potri.012G054800_Potri.012G054700	Potri.012G054800.1_Potri.012G054700.1	Chr12: 5531491 - 5533297	Chr12: 5531491 - 5536440	fgenesh4_pg.C_LG_XII000451	POPTR_0012s05070 POPTR_0012s05090	TM-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK93.2		Potri.012G054800.1_Potri.012G054700.2	Chr12: 5531491 - 5533297	Chr12: 5531491 - 5536440			TM-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK94	Potri.014G038600	Potri.014G038600.1	Chr14: 3166307 - 3169659		eugene3.00400201	POPTR_0014s03810	TM-GubWAK-EGF3-TM-Kinase		
*Pt*WAK95	Potri.015G017900	Potri.015G017900.1	Chr15: 1291204 - 1291464				Kinase		
*Pt*WAK96	Potri.015G018000	Potri.015G018000.1	Chr15: 1294560 - 1297744				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK97	Potri.015G018100	Potri.015G018100.1	Chr15: 1298954 - 1306566			POPTR_0015s00220	TM-Kinase		
*Pt*WAK98	Potri.015G018200	Potri.015G018200.1	Chr15: 1308298 - 1311369				GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK99	Potri.015G018500	Potri.015G018500.1	Chr15: 1320519 - 1321614		fgenesh4_pg.C_LG_XV000179	POPTR_0015s02030	Kinase		
*Pt*WAK100	Potri.015G018600	Potri.015G018600.1	Chr15: 1322434 - 1325524			POPTR_0015s02040	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK101	Potri.015G044700_Potri.015G044800	Potri.015G044700.1_Potri.015G044800.1	Chr15: 4424100 - 4424918	Chr15: 4424100 - 4427946	eugene3.10440003	POPTR_0160s00220	WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK102.1	Potri.015G044900	Potri.015G044900.1	Chr15: 4428271 - 4433595			POPTR_0373s00200	Kinase		
*Pt*WAK102.2		Potri.015G044900.2	Chr15: 4428274 - 4433595				Kinase		
*Pt*WAK103	Potri.015G045000	Potri.015G045000.1	Chr15: 4443074 - 4443803			POPTR_0373s00200	No domain		
*Pt*WAK104	Potri.015G045100	Potri.015G045100.1	Chr15: 4448319 - 4451509				TM-Kinase		
*Pt*WAK105	Potri.015G045200	Potri.015G045200.1	Chr15: 4451929 - 4455571			POPTR_0015s03870	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK106	Potri.015G121900_Potri.015G122000	Potri.015G121900.1_Potri.015G122000.1	Chr15: 13604850 - 13605497	Chr15: 13604850 - 13606979			TM-GubWAK-TM-Kinase		

*Pt*WAK107	Potri.017G007900	Potri.017G007900.1	Chr17: 549615 - 552670			POPTR_0017s04130	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK108	Potri.017G008000	Potri.017G008000.1	Chr17: 566720 - 570079				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK109	Potri.017G008100	Potri.017G008100.1	Chr17: 583179 - 584266				Kinase		
*Pt*WAK110	Potri.017G008200	Potri.017G008200.1	Chr17: 594495 - 597429	Chr17: 594270 - 597429			TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK111	Potri.017G008400	Potri.017G008400.1	Chr17: 644640 - 647961				GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK112	Potri.017G008600	Potri.017G008600.1	Chr17: 672303 - 676389				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK113	Potri.017G008700	Potri.017G008700.1	Chr17: 680330 - 683701			POPTR_0017s04120	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK114	Potri.017G008800	Potri.017G008800.1	Chr17: 709834 - 712800				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK115	Potri.017G008900	Potri.017G008900.1	Chr17: 725990 - 726994				Kinase		
*Pt*WAK116	Potri.017G009000	Potri.017G009000.1	Chr17: 731715 - 732821			POPTR_0247s00220	Kinase		
*Pt*WAK117	Potri.017G009100	Potri.017G009100.1	Chr17: 736318 - 739867			POPTR_0247s00230	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK118	Potri.017G009200	Potri.017G009200.1	Chr17: 781505 - 784974	Chr17: 781505 - 785049		POPTR_0017s04190	Kinase		
*Pt*WAK119.1	Potri.017G009400	Potri.017G009400.1	Chr17: 790440 - 796277			POPTR_0017s04200	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK119.2		Potri.017G009400.2	Chr17: 790498 - 796232				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK119.3		Potri.017G009400.3	Chr17: 792120 - 794018				Kinase		
*Pt*WAK120	Potri.017G009500	Potri.017G009500.1	Chr17: 804971 - 809233				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK121	Potri.017G009600	Potri.017G009600.1	Chr17: 816820 - 825478				TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK122	Potri.017G034600_Potri.017G034500	Potri.017G034600.1_Potri.017G034500.1	Chr17: 2911144 - 2912886	Chr17: 2911144 - 2914845			GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK123.1	Potri.017G034700	Potri.017G034700.1	Chr17: 2931282 - 2933607			POPTR_0017s06330	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK123.2		Potri.017G034700.2	Chr17: 2931268 - 2933607				TM-GubWAK-TM-Kinase	2	DT479615.1 / DT484788.1
*Pt*WAK124	Potri.017G035400	Potri.017G035400.1	Chr17: 2980522 - 2983787			POPTR_0017s06310	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK125.1	Potri.017G035500	Potri.017G035500.1	Chr17: 3000793 - 3003187			POPTR_0017s09520	TM-Kinase		
*Pt*WAK125.2		Potri.017G035500.2	Chr17: 3000793 - 3003187				TM-Kinase		
*Pt*WAK125.3		Potri.017G035500.3	Chr17: 3000793 - 3003187				TM-Kinase		
*Pt*WAK126.1	Potri.017G116900	Potri.017G116900.1	Chr17: 13176769 - 13179690		gw1.123.295.1	POPTR_0005s15410	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK126.2		Potri.017G116900.2	Chr17: 13176769 - 13180151				TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK126.3		Potri.017G116900.3	Chr17: 13176769 - 13179690				TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK127	Potri.017G117200_Potri.017G117100	Potri.017G117200.1_Potri.017G117100.1	Chr17: 13189007 - 13190005	Chr17: 13185919 - 13190005		POPTR_0005s15380 POPTR_0005s15390	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK128	Potri.017G117300	Potri.017G117300.1	Chr17: 13194262 - 13197702				TM-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK129	Potri.017G117400	Potri.017G117400.1	Chr17: 13198458 - 13201095				TM-GubWAK-WAKassoc		
*Pt*WAK130	Potri.017G117500	Potri.017G117500.1	Chr17: 13216663 - 13219746			POPTR_0005s15340	TM-Kinase		
*Pt*WAK131	Potri.017G117600	Potri.017G117600.1	Chr17: 13221475 - 13222498			POPTR_0418s00200	TM-WAKassoc		
*Pt*WAK132	Potri.017G117700	Potri.017G117700.1	Chr17: 13229876 - 13231256	Chr17: 13229876 - 13235322		POPTR_0418s00210	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK133	Potri.017G117800	Potri.017G117800.1	Chr17: 13234204 - 13236269	Chr17: 13235498 - 13236269		POPTR_0418s00230 POPTR_0418s00220	TM-GubWAK-WAKassoc		
*Pt*WAK134	Potri.017G118100	Potri.017G118100.1	Chr17: 13250298 - 13254031	Chr17: 13250340 - 13254031			TM-WAKassoc-TM-Kinase	7	DT481998.1 / DT487395.1 / DT481066.1 / DT486374.1 / DT478641.1 / DN502230.1 / CK111990.1
*Pt*WAK135	Potri.017G118200	Potri.017G118200.1	Chr17: 13257522 - 13264037				TM-GubWAK-WAKassoc-TM-GubWAK-WAKassoc		
*Pt*WAK136	Potri.017G118400	Potri.017G118400.1	Chr17: 13275737 - 13280133			POPTR_0005s15240	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK137	Potri.017G118500	Potri.017G118500.1	Chr17: 13283276 - 13284109			POPTR_0005s15230	TM-WAKassoc	2	DN502061.1 / BU878512.1
*Pt*WAK138	Potri.018G000200	Potri.018G000200.1	Chr18: 12874 - 13629	Chr18: 12615 - 13629		POPTR_0018s04270	Kinase		
*Pt*WAK139	Potri.018G000300	Potri.018G000300.1	Chr18: 14416 - 16466	Chr18: 14416 - 16547		POPTR_0018s04260	TM-Kinase		
*Pt*WAK140	Potri.018G148300	Potri.018G148300.1	Chr18: 16680448 - 16684315			POPTR_0126s00200	GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK141	Potri.018G148400	Potri.018G148400.1	Chr18: 16687259 - 16688683	Chr18: 16687259 - 16688707		POPTR_0126s00210	TM-Kinase		

*Pt*WAK142	Potri.T063900	Potri.T063900.1	scaffold_67: 31100 - 32476				GubWAK-WAKassoc	2	CV235317.1 / DN492119.1
*Pt*WAK143	Potri.T064000	Potri.T064000.1	scaffold_67: 33861 - 38366				TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK144	Potri.T064100	Potri.T064100.1	scaffold_67: 63893 - 66800			POPTR_0005s15270	TM-WAKassoc-TM-Kinase	5	DT481998.1 / DT487395.1 / DT478641.1 / DN502230.1 / CK111990.1
*Pt*WAK145	Potri.T064400	Potri.T064400.1	scaffold_67: 82748 - 88444	scaffold_67: 82748 - 88486			TM-GubWAK-WAKassoc-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK146	Potri.T064500	Potri.T064500.1	scaffold_67: 92342 - 93321		fgenesh4_pg.C_scaffold_123000104	POPTR_0005s15320	TM-GubWAK-WAKassoc	1	CV235317.1
*Pt*WAK147	Potri.T064600	Potri.T064600.1	scaffold_67: 97704 - 98950				Kinase		
*Pt*WAK148	Potri.T064700	Potri.T064700.1	scaffold_67: 103131 - 103913	scaffold_67: 103131 - 103976		POPTR_0005s15350	WAKassoc		
*Pt*WAK149	Potri.T064800	Potri.T064800.1	scaffold_67: 110810 - 113478			POPTR_0005s15360	TM-WAKassoc		
*Pt*WAK150	Potri.T064900_Potri.T065000	Potri.T064900.1_Potri.T065000.1	scaffold_67: 114184 - 115532	scaffold_67: 114184 - 117997			TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK151	Potri.T065100	Potri.T065100.1	scaffold_67: 133526 - 141020	scaffold_67: 133472 - 141020			TM-WAKassoc-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK152	Potri.T065200	Potri.T065200.1	scaffold_67: 145046 - 148064				WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK153	Potri.T065400_Potri.T065500	Potri.T065400.1_Potri.T065500.1	scaffold_67: 153213 - 154090	scaffold_67: 153213 - 157688			TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase		

*Pt*WAK154	Potri.T080500	Potri.T080500.1	scaffold_92: 13985 - 16760			POPTR_0112s00230	GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK155	Potri.T080700_Potri.T080600	Potri.T080700.1_Potri.T080600.1	scaffold_92: 26649 - 29225	scaffold_92: 26649 - 33096	fgenesh4_pg.C_LG_III001576	POPTR_0112s00210 POPTR_0112s00220	TM-GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK156	Potri.T080900	Potri.T080900.1	scaffold_92: 51188 - 54904			POPTR_0112s00200	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK157	Potri.T112800	Potri.T112800.1	scaffold_178: 25959 - 29001				WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK158	Potri.T112900	Potri.T112900.1	scaffold_178: 29475 - 34805				WAKassoc-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK159	Potri.T113000	Potri.T113000.1	scaffold_178: 41783 - 44014			POPTR_0160s00270	Kinase		
*Pt*WAK160	Potri.T113200_Potri.T113100	Potri.T113200.1_Potri.T113100.1	scaffold_178: 44524 - 46402	scaffold_178: 44524 - 48509			TM-WAKassoc-TM-Kinase		
*Pt*WAK161	Potri.T126500	Potri.T126500.1	scaffold_226: 14676 - 17077			POPTR_0018s14520	TM-GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK162	Potri.T126600	Potri.T126600.1	scaffold_226: 19367 - 21725	scaffold_226: 19367 - 21791		POPTR_0126s00240	GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK163	Potri.T126700	Potri.T126700.1	scaffold_226: 51414 - 55069			POPTR_0126s00230	GubWAK-WAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK164	Potri.T132700	Potri.T132700.1	scaffold_264: 16051 - 18505				TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK165	Potri.T132800	Potri.T132800.1	scaffold_264: 19811 - 20924			POPTR_0001s03230	TM-Kinase		
*Pt*WAK166	Potri.T132900	Potri.T132900.1	scaffold_264: 40427 - 44719		eugene3.00010152	POPTR_0001s03210	TM-GubWAK-WAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK167	Potri.T136400	Potri.T136400.1	scaffold_291: 7605 - 10839			POPTR_0015s01990	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK168	Potri.T136500	Potri.T136500.1	scaffold_291: 12278 - 14546			POPTR_0015s02000	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK169.1	Potri.T136600	Potri.T136600.1	scaffold_291: 16822 - 19279			POPTR_0015s02010	GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK169.2		Potri.T136600.2	scaffold_291: 16822 - 19444				GubWAK-TM-Kinase		
*Pt*WAK170	Potri.T136700	Potri.T136700.1	scaffold_291: 23529 - 24407				Kinase		
*Pt*WAK171	Potri.T136800	Potri.T136800.1	scaffold_291: 25663 - 29010				TM-GubWAK-TM-Kinase	2	DT477300.1 / DT482339.1
*Pt*WAK172	Potri.T136900	Potri.T136900.1	scaffold_291: 29241 - 30768				TM-Kinase		
*Pt*WAK173	Potri.T166400	Potri.T166400.1	scaffold_883: 1253 - 1904	scaffold_883: 1253 - 2216			TM-GubWAK-WAK		
*Pt*WAK174.1	Potri.T166600	Potri.T166600.1	scaffold_883: 10248 - 13911				TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK174.2		Potri.T166600.2	scaffold_883: 10248 - 14064				TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase		
*Pt*WAK175	Potri.T167400	Potri.T167400.1	scaffold_918: 11530 - 14803			POPTR_0103s00220	GubWAK-EGFca-TM-Kinase		

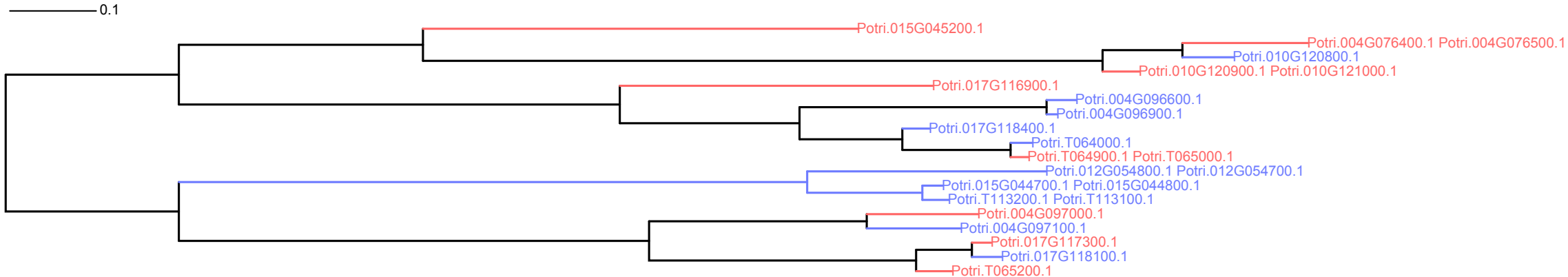
Online resource 2.

Alignment of EGF-Ca2+ domains.

```
>Potri.002G076100.1     DINECSDPKVARNCS---HNCIDTEGNYTCSCPK---GYHGDGRIDGERCIR
>Potri.002G075900.1     DINECSDPKVAHNCS---HTCIDTEGNYTCSCPK---GYHGDGRIDGERCIR
>Potri.002G076000.1     DINECSDPKVARNCS---HNCIDTEGNYTCSCPK---GYHGDGRIDGERCIR
>Potri.009G155000.1     DIDECKDAGKRYPCQ-G--KCHNTIGDYECKCPL---GMRGDGKRGCR----
>Potri.009G157200.1     DIDECKYP-ETYTCY-G--KCHNTIGDYECKCSL---GMHGDGKVGCS----
>Potri.004G191400.1     DIDECADR-QRYPCK-G--KCKNTPGNYTCSCPL---GMRGDGKTGCQ----
>Potri.004G191500.1     DIDECKYP-ERYPCE-G--KCKNTIGSYKCHCPF---GKYANSENGCQ----
>Potri.009G154100.1     DIDECKDP-KKYTCH-G--KCHNTIGDYECKCSL---GMHGDGKIGCQ----
>Potri.009G154600.1     DIDECKYP-ETYTCY-G--KCHNTIGDYECKCSL---GMHGDG---------
>Potri.004G191900.1     DIDECKVL--KNPCKEG--TCENVIGDYKCRCPR---GKYGDGKTGCEG---
>Potri.004G192100.1     DIDECKVL--KNPCKEG--TCENVIGDYKCRCPR---GKHGDGKTDCQR---
>Potri.004G192400.1     DIDECKVR-GKNPCQEG--TCENVNGDYKCRCPL---GKYGDGKTGCK----
>Potri.004G193100.1     DIDECKVR-GKNPCEEG--TCENVIGDYKCRCPV---GKYGDGKTGCK----
>Potri.T167400.1        DKDECKDP-GKNPCEEG--TCENVIGDYKCRCPL---GKYGDGKTGCK----
>Potri.004G192700.1     DMDECKVG-GKNACEEG--TCENVIGDYKCRCPL---GKYGDGKTGCK----
>Potri.004G192900.1     DIDECKDP-GKNACEEG--TCENVIGDYKCRCPA---GKYGDGKTGCK----
>Potri.004G191800.1     DIDECKNP-ESYPCQ-G--TCKNTMGNYKCRCPL---GMYGDGKKGCQ----
>Potri.004G192000.1     DIDECKDP-ERYPCH-G--RCKNTIGNYKCRCPL---GMYGDGKIGCQ----
>Potri.001G039900.1     DIDECKNP-NGNWCS-GMTKCVNVPGGYKCELDK------------------
>Potri.T166600.1        DIDECKIP-RVNWCS-GMTKCVNVPGRYKCELDK------------------
>Potri.T166600.2        DIDECKIP-RVNWCS-GMTKCVNVPGRYKCELDK------------------
>Potri.001G038300.1     DIDECKNT-GGNWCS-GMTKCVNVPGWYKCELDK------------------
>Potri.001G040500.1     DIDECKIP-RGNSCS-GMTKCVNVPGGFKCELDK------------------
>Potri.T132900.1        DIDECKIP-GENSCS-GMTKCVNRPGRYKCELDK------------------
>Potri.001G039200.1     DIDQCKIP-GLNLCS-GMTKCVNVPGLYKCELDK------------------
>Potri.001G039200.2     DIDQCKIP-GLNLCS-GMTKCVNVPGLYKCELDK------------------
>Potri.003G186100.1     DINECKDP-NRHSCL-GITKCVNTLGSYKCEVNK------------------
>Potri.004G192500.1     DIDECKVR-GKNACQEG--TCENVIGDYKCRCPR---GKYGDGKTGCKG---
>Potri.004G192500.2     DIDECKVR-GKNACQEG--TCENVIGDYKCRCPR---GKYGDG---------
>Potri.003G186200.1     DVDECKTP-EKNTCR-GMLKCMNTRGGYRCAINKIYIIIIGTQQTENLS---
>Potri.T132700.1        DVDECKES--KHSCR-GLLKCVNTRGYFNCEINK------------------
>Potri.001G040000.1     DVDECKES--KHSCR-GLLKCVNTRGYFNCEINK------------------
>Potri.001G041100.1     DVDECKES--KHSCR-GLLKCVNTRGYFNCEINK------------------
>Potri.T080900.1        DVDECKTP-EKNTCQ-GMLKCVNTRGDYRCTINK------------------
>Potri.003G185700.1     DVDECKTP-EKNTCR-GMLKCVNTRGGFRCAINK------------------
>Potri.T080500.1        DVDECKTP-EKNTCQ-GMLKCVNTRGGFRCGINK------------------
```

Online resource 3.

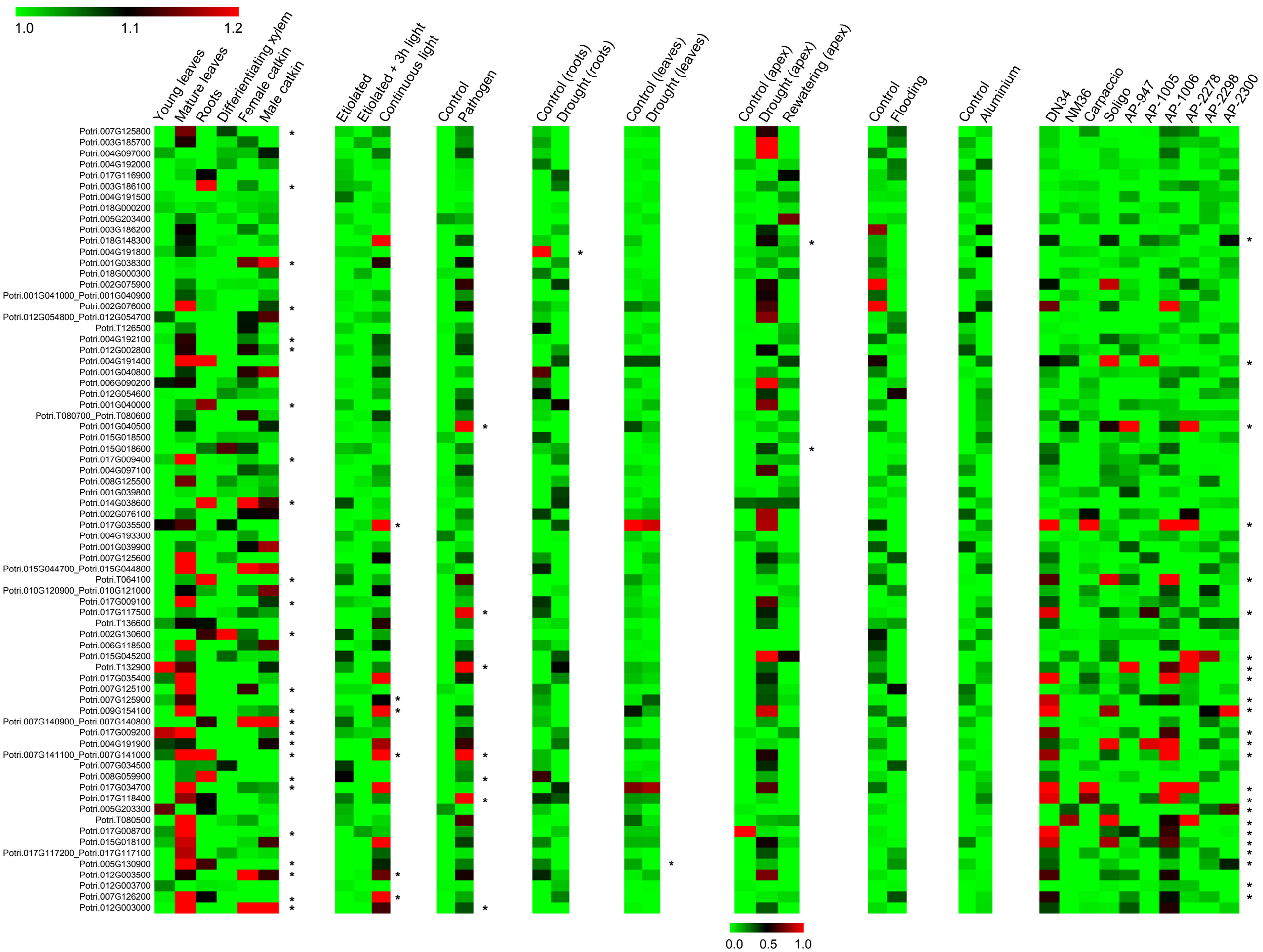
Phylogenetic tree of PtWAKs containing the WAKassoc domain. The phylogenetic tree of PtWAKs using conserved WAKassoc domain is represented. The tree obtained by the BI method is represented, and posterior probability and bootstrap values of >50 are indicated at nodes as BI/NJ/MP.



Sequences of the clade I in the Fig. 3 with the WAKassoc protein domain
Sequences of the clade II in the Fig. 3 with the WAKassoc protein domain

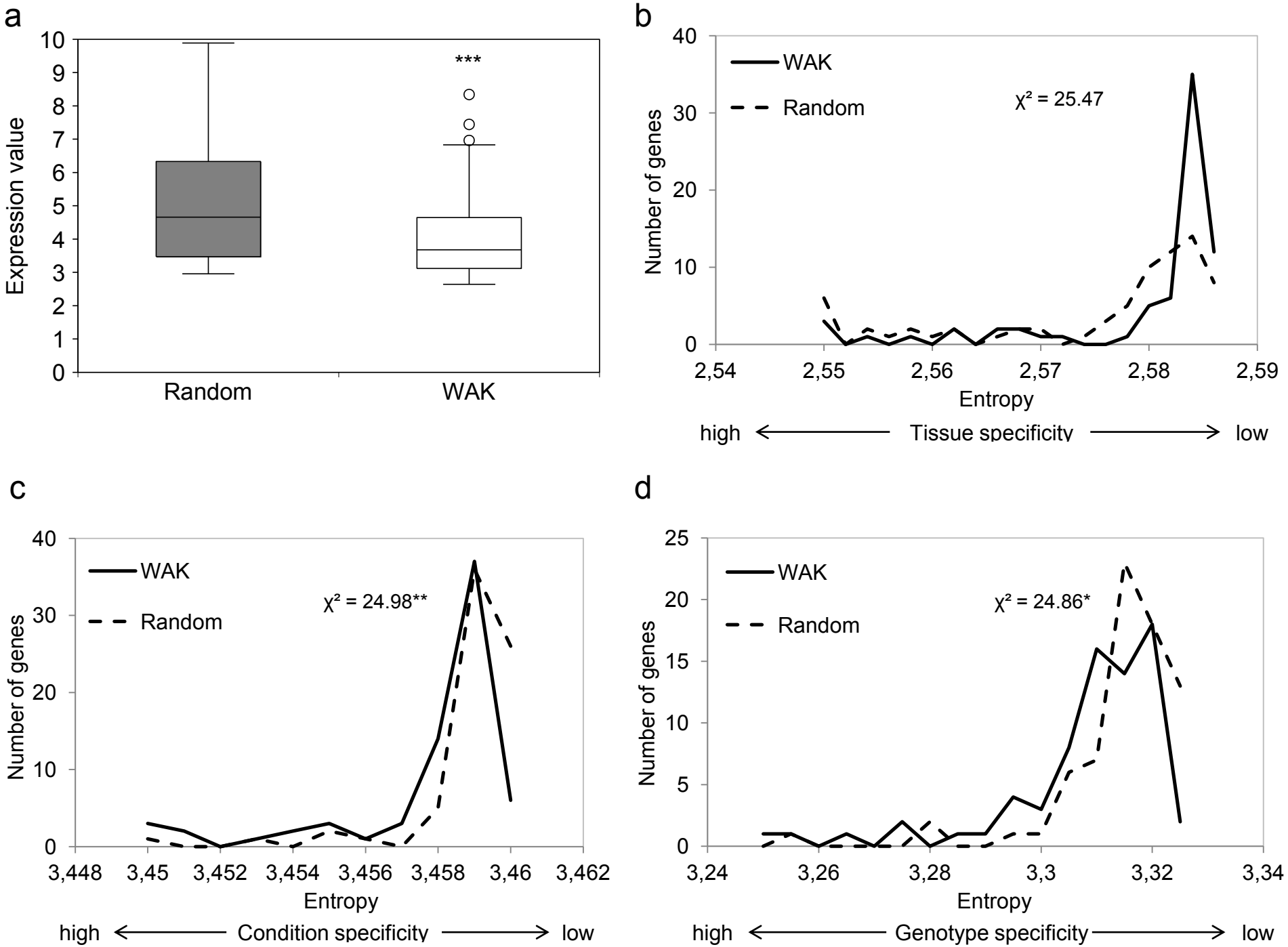
Online resource 4.

Heatmap representation of all *PtWAK* expression patterns among different poplar tissues/environmental conditions/genotypes. *PtWAK* v3.0 gene model names are indicated. For each tissue/environmental condition/genotype, mean relative expression values (three to four replicates) are displayed. Sample and WAK, relative expression value was calculated by dividing the absolute value (RMA normalized) by the median of absolute values of all samples, except for the apex assay. In this case, relative expression was obtained by dividing each array-normalized expression value by the median of absolute values of all samples, and was then log2-transformed. An asterisk indicates significant tissue/environmental condition/genotype effect on PtWAK expression according to Welch's t test/one-way ANOVA for two or more samples followed by adjusted Bonferroni correction (*$p < 0.05$). Blue-, red-, and green-shaded *PtWAK* names belong to *PtWAK-RLK*, *PtWAK-RLCK*, and *PtWAK-RLP* gene groups, respectively.


1.0
1.1
1.2
Young leaves
Mature leaves
Roots
Differentiating xylem
Female catkin
Male catkin
Etiolated
Etiolated + 3h light
Continuous light
Control
Pathogen
Control (roots)
Drought (roots)
Control (leaves)
Drought (leaves)
Control (apex)
Drought (apex)
Rewatering (apex)
Control
Flooding
Control
Aluminium
DN34
NM36
Carpaccio
Soligo
AP-947
AP-1005
AP-1006
AP-2278
AP-2298
AP-2300
Potri.007G125800
Potri.003G185700
Potri.004G097000
Potri.004G192000
Potri.017G116900
Potri.003G186100
Potri.004G191500
Potri.018G000200
Potri.005G203400
Potri.003G186200
Potri.018G148300
Potri.004G191800
Potri.001G038300
Potri.018G000300
Potri.002G075900
Potri.001G041000_Potri.001G040900
Potri.002G076000
Potri.012G054800_Potri.012G054700
Potri.T126500
Potri.004G192100
Potri.012G002800
Potri.004G191400
Potri.001G040800
Potri.006G090200
Potri.012G054600
Potri.001G040000
Potri.T080700_Potri.T080600
Potri.001G040500
Potri.015G018500
Potri.015G018600
Potri.017G009400
Potri.004G097100
Potri.008G125500
Potri.001G039800
Potri.014G038600
Potri.002G076100
Potri.017G035500
Potri.004G193300
Potri.001G039900
Potri.007G125600
Potri.015G044700_Potri.015G044800
Potri.T064100
Potri.010G120900_Potri.010G121000
Potri.017G009100
Potri.017G117500
Potri.T136600
Potri.002G130600
Potri.006G118500
Potri.015G045200
Potri.T132900
Potri.017G035400
Potri.007G125100
Potri.007G125900
Potri.009G154100
Potri.007G140900_Potri.007G140800
Potri.017G009200
Potri.004G191900
Potri.007G141100_Potri.007G141000
Potri.007G034500
Potri.008G059900
Potri.017G034700
Potri.017G118400
Potri.005G203300
Potri.T080500
Potri.017G008700
Potri.015G018100
Potri.017G117200_Potri.017G117100
Potri.005G130900
Potri.012G003500
Potri.012G003700
Potri.007G126200
Potri.012G003000
0.0
0.5
1.0

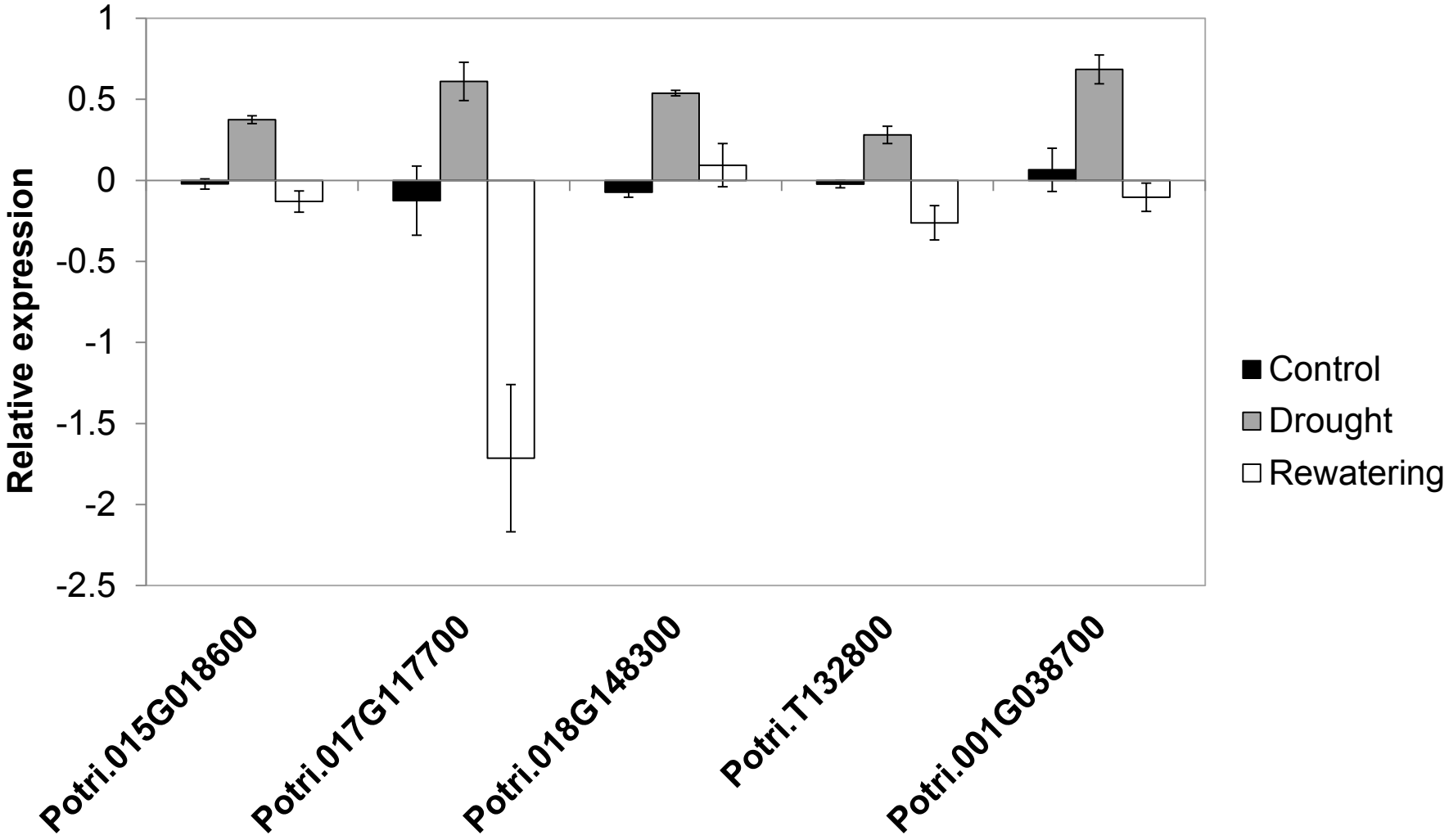
Online resource 5.

Expression pattern comparison of PtWAK and randomly selected genes. Seventy-two *PtWAK* genes or randomly selected genes were used for this analysis. a Box-plot representation of PtWAK and random gene expression level distribution. Expression values are RMA-normalized data from all experiments performed in this work (see "Methods"). The significant *PtWAK* effect on expression level was detected with Welch's t test (***$p < 0.001$). For the Shannon entropy calculation, see "Methods." b Tissue specificity of PtWAK and random genes as measured by Shannon entropy distribution. Low entropy values indicate high tissue specificity. $\chi 2$ value is given (not significant, $p = 0.064$). c Condition specificity of *PtWAK* and random genes as measured by Shannon entropy distribution. Low entropy values indicate high condition specificity. $\chi 2$ value is given (**$p < 0.01$). d Genotype specificity of *PtWAK* and random genes as measured by Shannon entropy distribution. Low entropy values indicate high genotype specificity. $\chi 2$ value is given (*$p < 0.05$).


a
Expression value
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
***
Random
WAK
b
Number of genes
40
30
20
10
0
WAK
Random
χ² = 25.47
2,54
2,55
2,56
2,57
2,58
2,59
Entropy
high
Tissue specificity
low
c
Number of genes
40
30
20
10
0
WAK
Random
χ² = 24.98**
3,448
3,45
3,452
3,454
3,456
3,458
3,46
3,462
Entropy
high
Condition specificity
low
d
Number of genes
25
20
15
10
5
0
WAK
Random
χ² = 24.86*
3,24
3,26
3,28
3,3
3,32
3,34
Entropy
high
Genotype specificity
low

Online resource 6.

PtWAKs whose apex expression is affected depending on water availability. The mean relative expression values (three samples per condition) and their standard errors shown here were significantly affected by water availability variations according to one-way ANOVA followed by adjusted Bonferroni correction (*$p < 0.05$). Relative expression was obtained by dividing each array-normalized expression value by the median of absolute values of all samples for the PtWAK, and was then log2-transformed. Values for control (black charts), drought (grey charts) and rewatering after drought (white charts) are given.


1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
Relative expression
Control
Drought
Rewatering
Potri.015G018600
Potri.017G117700
Potri.018G148300
Potri.T132800
Potri.001G038700

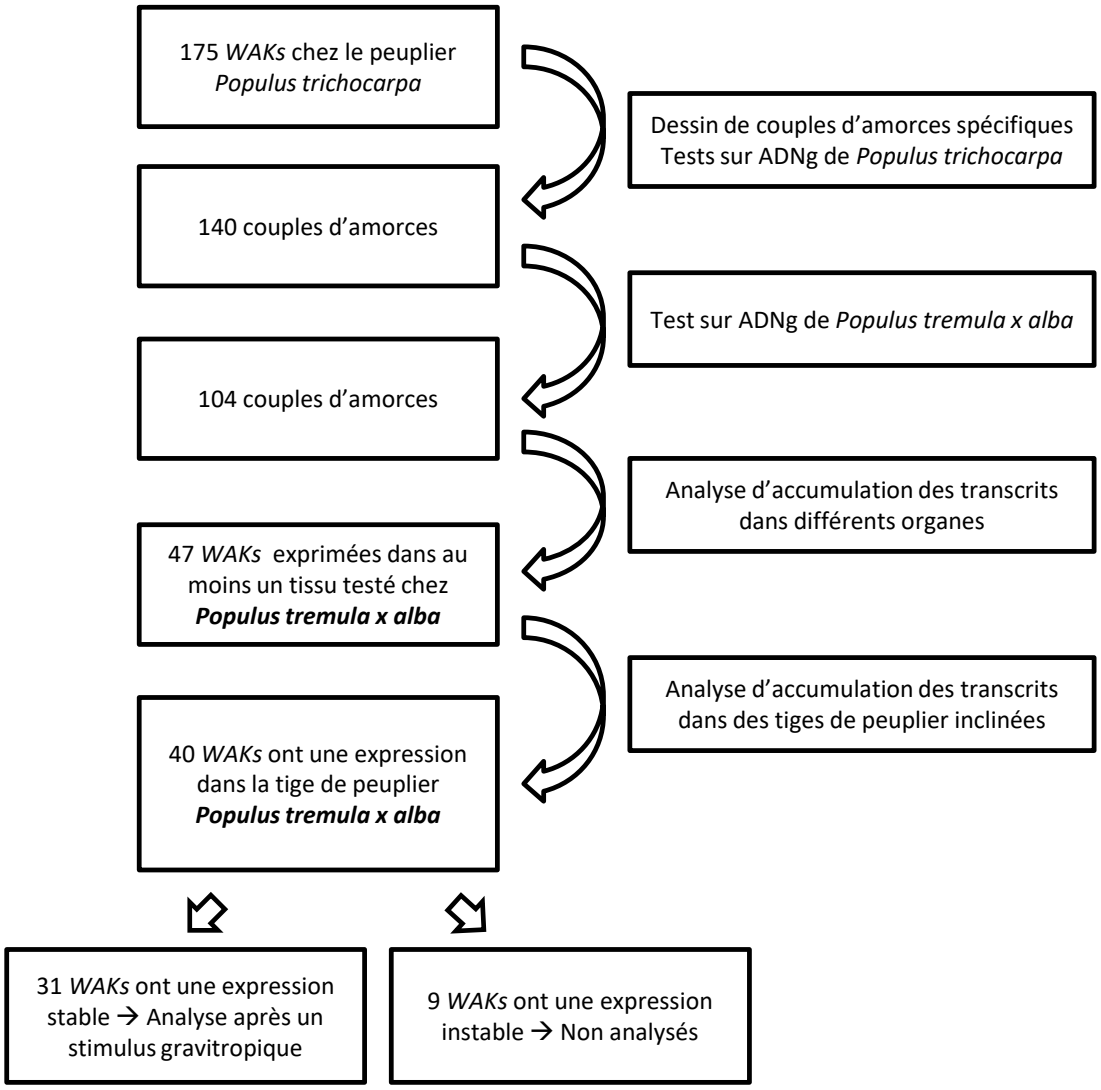


Figure 10. Schéma de la démarche expérimentale conduisant à l'identification des *WAKs* exprimés dans la tige de *Populus tremula x alba* et dont l'accumulation des transcrits est analysée dans des tiges de peuplier droites et après un stimulus gravitropique

2. CHAPITRE 2 Analyse de la quantité de transcrits des gènes WAKs chez le peuplier suite à un stimulus gravitropique

2.1. Introduction

Nous avons émis l'hypothèse que des WAKs interviendraient dans la réponse précoce à un stimulus gravitropique qui conduit à la formation du bois de tension. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si la stimulation gravitationnelle modifie le niveau de transcrits de gènes *WAK*, ce qui pourrait avoir un impact sur la mise en place des protéines correspondantes au niveau de la membrane plasmique. Dans un premier temps, l'analyse de l'accumulation des transcrits des membres de la famille *Pt*WAKs dans les différents organes chez le peuplier nous a permis d'identifier les PtWAKs qui s'expriment dans les tissus de la tige. Nous avons ensuite analysé le niveau de transcrits des PtWAKs dans les tiges inclinées de peuplier, et plus particulièrement entre les faces supérieure et inférieure des tiges inclinées pour identifier les transcrits qui s'expriment de manière différentielle après inclinaison.

2.2. Résultats

2.2.1. Expression des WAKs dans différents organes de peuplier

Parmi les 175 gènes *PtWAKs* actuellement identifiés dans le génome du peuplier (Tocquard *et al.*, 2014a), 140 couples d'amorces PCR permettent de suivre l'expression d'une séquence d'ADN génomique (ADNg) du peuplier *Populus trichocarpa* (Tableau 1 et Figure 10). Sur ces 140 couples d'amorces, 104 permettent d'amplifier une séquence d'ADNg du peuplier *Populus tremula x alba*, qui est l'espèce utilisée pour nos expérimentations (Tableau 1 et Figure 10).

Comme il s'agit de la première investigation menée sur les WAKs chez le peuplier, nous avons débuté par une analyse de l'accumulation des transcrits *WAKs* dans différents organes, afin d'obtenir à la fois un aperçu sur les niveaux d'expression de cette famille chez le peuplier, mais également de cibler les gènes qui s'expriment dans les tissus de la tige. L'expression a été analysée dans l'apex, les racines, les bourgeons, les pétioles et les feuilles développées et en cours de développement. Nous avons également suivi l'expression de ces gènes dans des tiges en croissance primaire et secondaire. Pour les tiges en croissance secondaire, nous avons mélangé des ADNc issus de plantes droites et inclinées pour les tissus du xylème et de l'écorce que nous avons séparés.

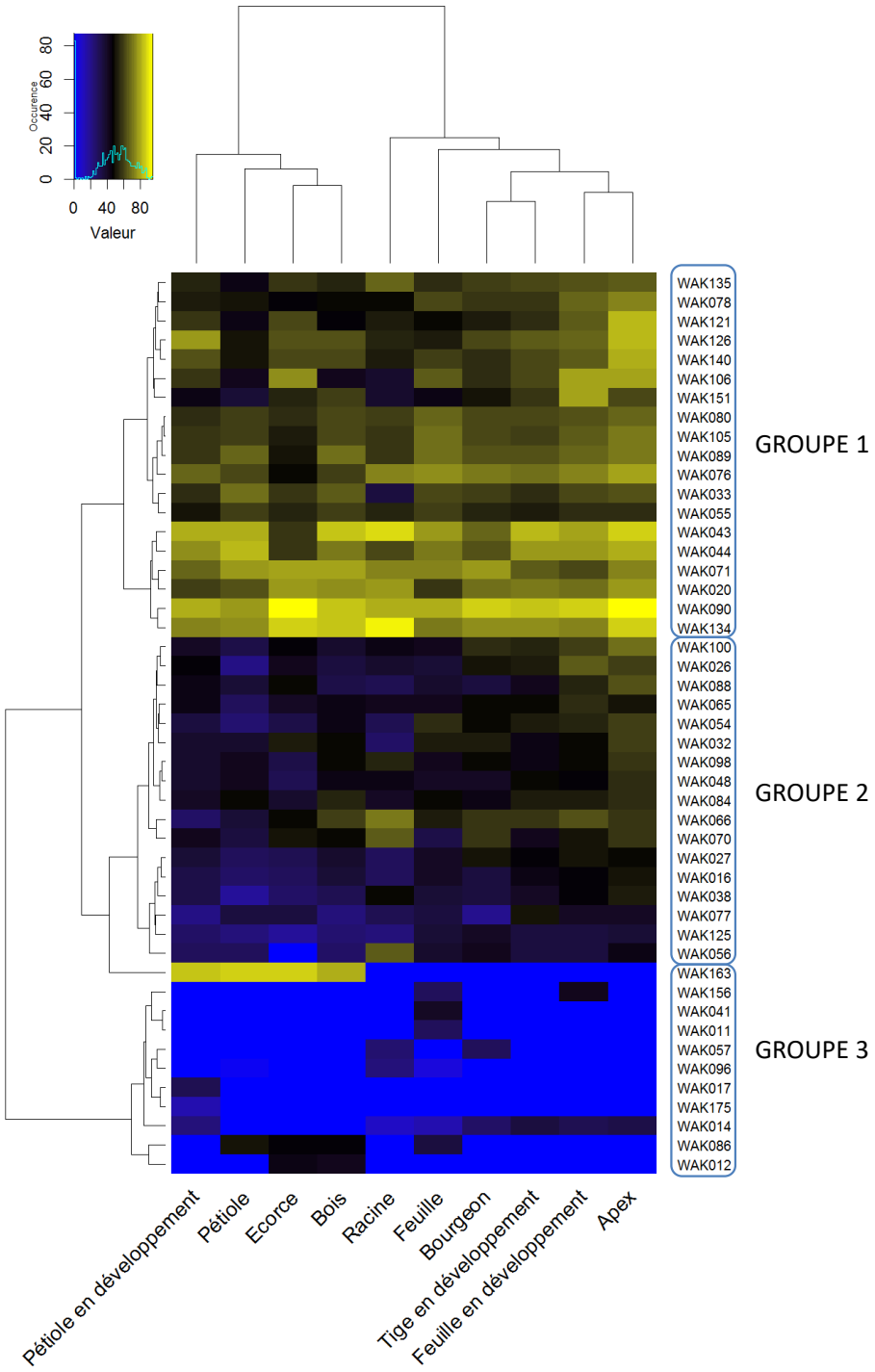


Figure 11. Heatmap du niveau d'expression des *PtWAKs* dans différents organes de peuplier *Populus tremula x alba*

Les *PtWAKs* faiblement transcrits sont représentés en bleu, ceux fortement transcrits en jaune. Les cellules en bleu intense correspondent à des *WAKs* pour lesquelles nous ne détectons pas de transcrits.

Parmi les 104 gènes étudiés, seulement 47 s'expriment dans au moins un des tissus testés (Figure 10). Les 57 autres gènes ne montrent aucune expression dans les tissus testés aux stades de développement analysés. Les gènes *PtWAKs* montrent une expression globalement faible, et ce quel que soit l'organe considéré. La plupart des gènes pour lesquels nous détectons une expression (36 *PtWAKs*) ont une expression constitutive dans l'ensemble des organes analysés. Pour les autres gènes, les *PtWAKs* peuvent être transcrites spécifiquement dans un organe, comme *PtWAK156* que l'on détecte seulement dans les feuilles en croissance et développées, ou alors spécifiquement à un stade développemental, comme *PtWAK086* qui s'exprime dans les tissus en croissance secondaire ainsi que les pétioles et feuilles matures mais dans aucun organe en développement.

La classification hiérarchique des *PtWAKs* en fonction de leur niveau d'expression dans les différents organes étudiés permet de distinguer 3 grands groupes (Figure 11). Le groupe I montre une forte expression dans les organes analysés. Au contraire, le groupe II montre un plus faible niveau d'expression dans les différents organes par rapport aux autres gènes. Enfin, le groupe 3 est composé des *PtWAKs* pour lesquelles nous détectons une expression spécifique à un ou plusieurs tissu(s)/organe(s).

Nous avons analysé les niveaux d'expression des gènes *PtWAKs* se rassemblant au sein des clusters génomiques identifiés (Tocquard *et al.*, 2014a). Il apparait que 4 gènes représentant d'un cluster génomique (*PtWAK011*, *012*, *014* et *016*) sont faiblement exprimés. Trois de ces gènes (*PtWAK011*, *012*, et *014*) ont une expression spécifique à certains organes. Les 3 gènes d'un autre cluster génomique (*PtWAK126*, *134* et *135*) sont fortement exprimés.

2.2.2. Identification des gènes WAKs dont la transcription est modulée dans les tiges inclinées en serre

Afin de vérifier l'implication des WAKs dans la réponse précoce à la stimulation gravitropique des tiges de peuplier, nous avons analysé l'expression de 40 *PtWAKs* pour lesquelles nous avons détecté une expression dans la tige, chez des peupliers cultivés et inclinés en serre (Figure 12). Nous présentons les résultats pour 31 des 40 *PtWAKs*, car pour 9 d'entre elles les résultats obtenus ne sont pas reproductibles entre les répétitions biologiques. Ces 31 gènes sont répartis sur 12 groupes de laison (LG correspondant aux chromosomes). Ils codent des WAKs de type RLK (transmembranaire), RLCK (seulement kinasique) et RLP (seulement extracellulaire) et on les retrouve répartis dans les clades I et II préalablement décrits (Tableau 3,Tocquard *et al.*, 2014a).

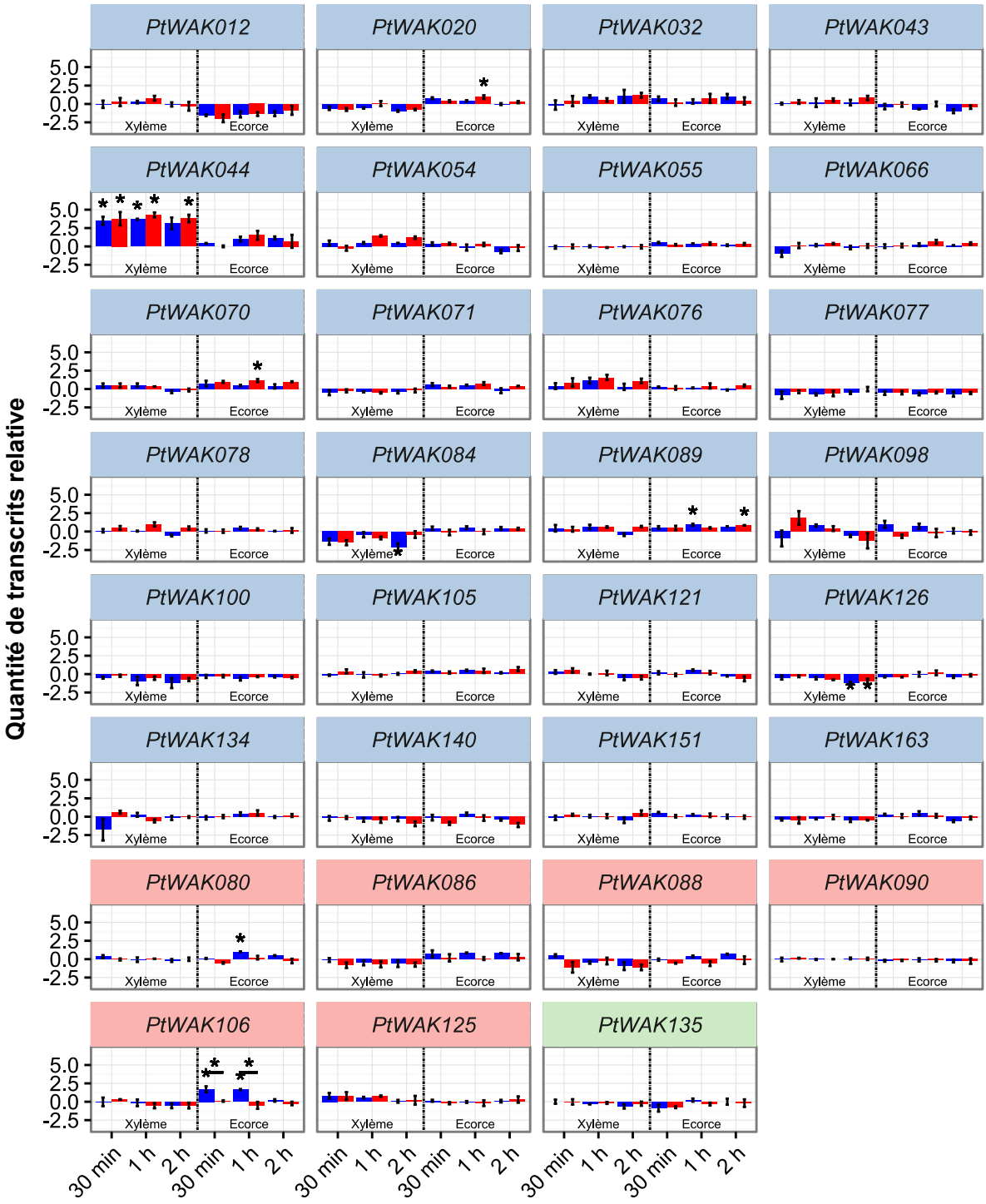


Figure 12. Etude de la quantité de transcrits de 31 *PtWAKs* chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique

Les plantes sont inclinées à 35° pendant 30 min, 1h et 2h. Les demi-cylindres supérieur (bleu) et inférieur (rouge) de la tige sont séparés. Pour chaque partie, le xylème et l'écorce sont individualisés. La quantité de transcrits des *PtWAKs* est calculée en fonction de la quantité de transcrits dans des plantes non inclinées, d'après la formule $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$. Les valeurs observées correspondent à la moyenne de 3 plantes ± l'erreur standard. Les données du xylème et de l'écorce sont analysées séparément à l'aide d'une ANOVA suivi d'un test de Tuckey (HSD test, α = 5%). Les niveaux de transcrits significativement différents du témoin dans le xylème ou dans l'écorce sont indiqués par le symbole '*'. Les niveaux de transcrits significativement différents entre les faces supérieure et inférieure à un moment de la cinétique sont indiqués par le symbole '*' sur une barre recouvrant les deux faces.

	LG	Type	Domaines
PtWAK012	1	RLK	GubWAK-WAK-EGFca-TM-Kinase
PtWAK020	2	RLK	GubWAK-EGF3-TM-Kinase
PtWAK032	4	RLK	GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK043	4	RLK	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase
PtWAK044	4	RLK	GubWAK-EGFca-TM-Kinase
PtWAK054	6	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK055	7	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK066	7	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK070	8	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK071	8	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK076	9	RLK	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-Kinase
PtWAK077	10	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK078	10	RLK	GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK084	12	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK089	12	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK098	15	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK100	15	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK105	15	RLK	GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK121	17	RLK	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK126	17	RLK	GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK134	17	RLK	WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK140	18	RLK	GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK151	67	RLK	WAKassoc-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK163	226	RLK	GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK080	10	RLCK	Kinase
PtWAK086	12	RLCK	Kinase
PtWAK088	12	RLCK	Kinase
PtWAK090	12	RLCK	Kinase
PtWAK106	15	RLCK	Kinase
PtWAK125	17	RLCK	Kinase
PtWAK135	17	RLP	GubWAK-WAKassoc-GubWAK-WAKassoc

Tableau 3. Localisation génomique, type protéique et domaines des 31 *PtWAKs* dont l'accumulation des transcrits est analysée dans les tiges de peupliers inclinés en serre

Le tableau présente la localisation génomique des 31 *PtWAKs* dont l'accumulation des transcrits est analysée dans des tiges de peupliers inclinés en serre (LG pour Linkage Group, les 19 premiers LGs correspondent aux chromosomes de peuplier, les autres sont des scaffolds d'assemblage encore non liés génétiquement aux chromosomes). Les types protéiques sont indiqués avec un code couleur : bleu pour les PtWAK-RLK (transmembranaire), rouge pour les PtWAK-RLCK (intracellulaire) et vert pour les PtWAK-RLP (apoplastique). Enfin, la composition en domaines protéiques prédits est décrite.

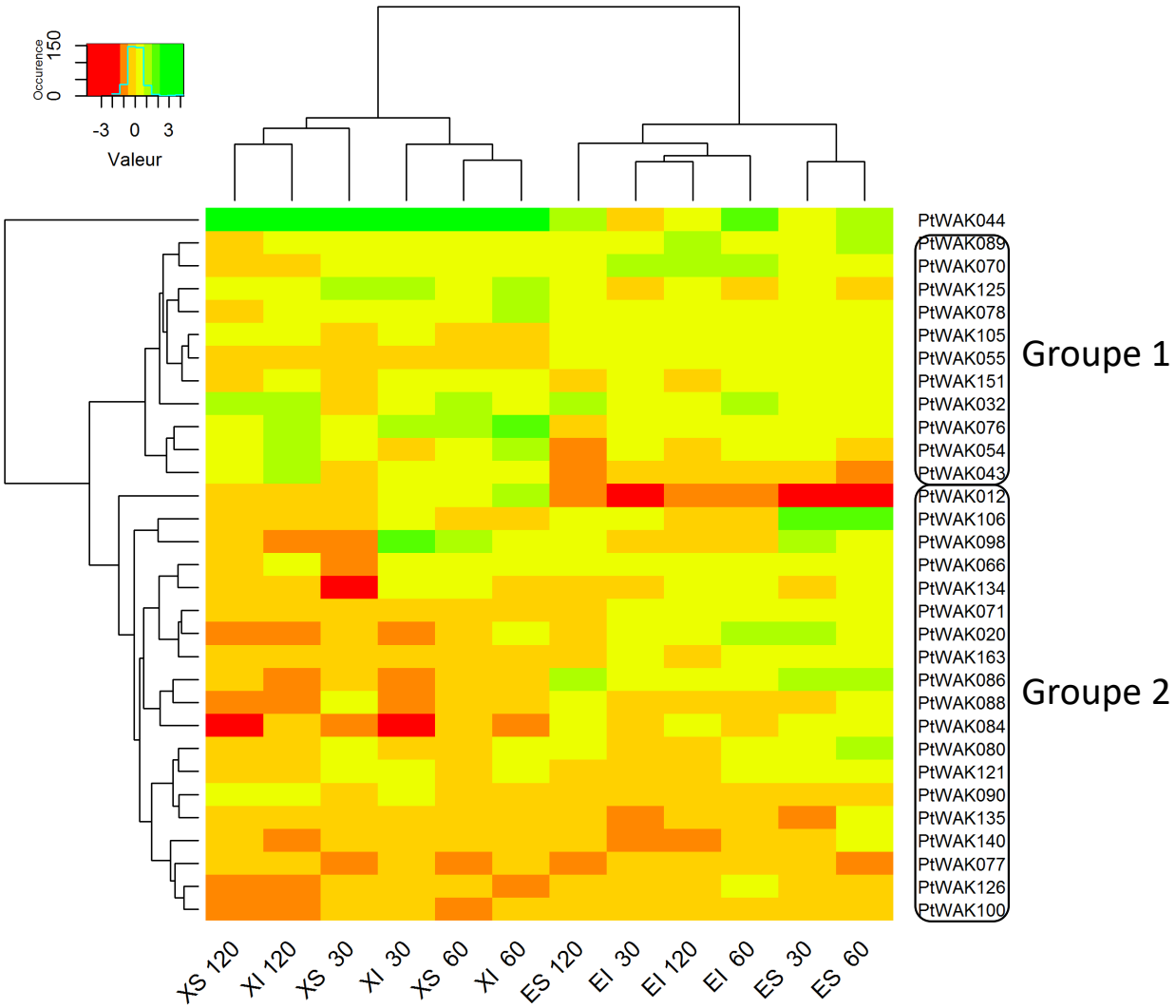


Figure 13. Heatmap du niveau de transcrits de 31 *PtWAKs* chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique

Les plantes sont inclinées à 35° pendant 30 min, 1h et 2h. Pour chaque partie, le xylème et l'écorce sont individualisés. Les *PtWAKs* significativement non modulées sont représentées en orange pâle, jaune et vert clair. La diminution et l'augmentation significative de l'accumulation des transcrits sont respectivement représentées en rouge et vert. E : Ecorce, X : Xylème, I : Face inférieure par rapport à l'axe d'inclinaison, S : Face supérieure par rapport à l'axe d'inclinaison. 30, 60 et 120 : durée d'inclinaison avant prélèvement.

Pour les 31 *WAKs* ciblés, les transcrits sont présents dans les tissus de la tige avant et après stimulation. Après 30 min, 1h et 2h d'inclinaison à 35°, les *PtWAKs* sont globalement peu modulés. En effet, l'accumulation des transcrits est significativement modulée pour seulement 25% des gènes suivis, et les modulations d'expression sont de l'ordre d'un facteur 4 maximum. La situation de *PtWAK044* est exceptionnelle car elle présente une forte accumulation de transcrits dans le xylème, comprise entre x8 et x19. Suite à l'inclinaison, 6 *PtWAKs*-RLK et 2 *PtWAKs*-RLCK sont modulés. Les 2 *PtWAK*-RLCK (*PtWAK080* et *PtWAK106*) sont surexprimés dans les tissus de l'écorce. Pour les *PtWAK*-RLK, 3 sont régulés dans les tissus du xylème (*PtWAK044*, *PtWAK084* et *PtWAK126*) et 3 autres dans les tissus de l'écorce (*PtWAK020*, *PtWAK070* et *PtWAK089*). Pour la plupart de ces gènes, la modification de l'accumulation de transcrits se fait uniquement dans un des deux tissus de la tige à un moment de la cinétique. Toutefois, un gène présente un intérêt particulier. En effet, la transcription de *PtWAK106* est différentiellement régulée entre les faces supérieure et inférieure dans les tissus de l'écorce.

Nous avons réalisé une classification hiérarchique ascendante sur les données afin de regrouper les *PtWAKs* par profil d'expression (Figure 13). Nous pouvons voir que les profils d'expression sont dépendants du tissu que nous analysons. En effet, pour l'ensemble des *WAKs*, les modulations d'accumulation des transcrits varient différemment entre les tissus de l'écorce et du xylème. Concernant la classification des gènes, en plus de *PtWAK044* qui présente une cinétique d'expression singulière, 2 groupes se distinguent. Dans le groupe 1 (Figure 13), la transcription est plutôt stimulée après gravistimulation alors que dans le groupe 2 (Figure 13) se trouvent les séquences dont l'accumulation des transcrits diminue après gravistimulation. Trois des gènes (*PtWAK032*, *043* et *044*) d'un même cluster génomique montrent une tendance à la surexpression. Parmi les 5 gènes (*PtWAK084*, *086*, *088*, *089* et *090*) d'un 2ème cluster génomique, seule l'expression de *PtWAK089* semble globalement activée alors que tous les autres gènes sont trouvés dans le second groupe.

2.2.3. Identification des gènes WAKs dont la transcription est modulée dans les tiges inclinées en condition de lumière isotrope

Nous avons également suivi l'expression de *WAKs* suite à l'inclinaison dans une autre condition de stimulation. Contrairement aux résultats précédents qui sont générés sur des plantes inclinés en serre, les résultats qui suivent ont été obtenus sur des plantes placées dans des sphères offrant une luminosité isotropique (Figure 6). Ces conditions d'inclinaison permettraient de s'affranchir de la mise en place de réponses moléculaires liées au phototropisme (Coutand *et al.*, 2015).

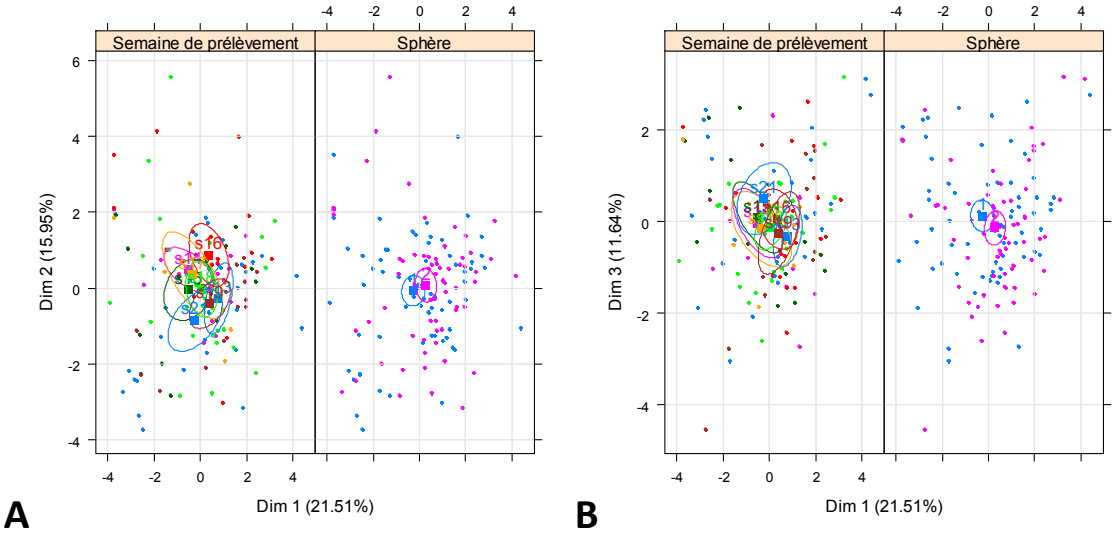


Figure 14. Ellipses de confiance de la distribution des facteurs expérimentaux

Les carrés représentent le barycentre de la distribution des échantillons de chaque facteur et sont encerclés par une ellipse de confiance à 95%. Les semaines sont abrégées ‘s’ suivies de leur numéro, les sphères sont identifiées par la numérotation 1 et 2. A : Représentation de la projection des résultats de l’ACP sur les axes 1 et 2. B : Représentation de la projection des résultats de l’ACP sur les axes 1 et 3.

L'expression de 16 des 40 *PtWAKs* exprimés dans les tiges de peuplier a été suivie après 30 min, 1h, 2h et 3h d'inclinaison selon des angles de 15° ou de 35°. Lors de cette expérimentation, l'expression est analysée seulement dans les tissus du xylème, mais les réponses transcriptionnelles dans les faces supérieure et inférieure de la tige par rapport à l'axe d'inclinaison sont discriminées. Ces expérimentations ont été réalisées dans 2 sphères. Les prélèvements ne pouvant alors s'effectuer que 2 par 2, différentes séries de plantes ont été nécessaires afin de produire 8 répétitions biologiques de chaque traitement. Ces conditions sont prises en compte pour notre analyse et nous avons vérifié qu'il n'y ait pas d'effet de ces facteurs expérimentaux sur la transcription globale des *PtWAKs*. Les barycentres des distributions des échantillons des différents facteurs encerclés par une ellipse représentant l'intervalle de confiance de la représentation de la distribution (α=5%) montrent que les différents lots de plantes ainsi que la date de prélèvement n'ont pas d'effet sur la variance de l'expression de nos variables. Il n'y a également pas d'effet de la sphère utilisée (Figure 14).

Afin d'analyser la structure de ce jeu de données, nous avons réalisé une analyse en composantes principales ainsi qu'une classification hiérarchique (Figure 15 à 18). L'histogramme des valeurs d'inertie montre que les 3 premières dimensions expliquent presque la moitié de la variance totale, soit 49.1% (Figure 15). Etonnamment, la première dimension ne correspond à aucun des différents facteurs que nous avons notés. Il semblerait que la variance transcrite sur l'axe 1 soit due à une grande variabilité d'expression entre les gènes. La variance expliquée par la deuxième dimension (15.95%) est due une différence globale d'expression des gènes *WAKs* entre les tissus de la face supérieure et ceux de la face inférieure (Figure 16). La variance représentée sur cet axe est structurée positivement par des échantillons de la face inférieure et les gènes *PtWAK076*, *PtWAK106*, *PtWAK125* et *PtWAK126* (Figure 17). Cela est confirmé lors d'une ANOVA (α=5%) sur les échantillons qui montrent que ces gènes sont significativement régulés dans certaines conditions d'angle/durée dans les tissus de la face inférieure de la tige (Figure 18 et Tableau 4). La troisième dimension représente 11.64% de la variance globale de notre jeu de données. Elle est structurée par les modulations d'expression des *WAKs* entre les individus droits et ceux inclinés, mais aucune différence significative n'est observable selon la durée d'inclinaison (Figure 16). Nous pouvons observer une différence significative seulement entre les plantes droites et inclinées à 35° (Figure 16).

La classification hiérarchique ascendante nous confirme une différence d'expression globale entre les tissus du xylème de la face supérieure et inférieure. Aucune sous-structuration globale des données selon la durée ou l'angle d'inclinaison n'est observable (Figure 18). On observe des variations d'expression de certains gènes *WAKs* (*PtWAK076*, *PtWAK084*, *PtWAK106*, *PtWAK125* et *PtWAK126*) dans les plantes inclinées par rapport aux plantes témoin non inclinées dans certaines conditions

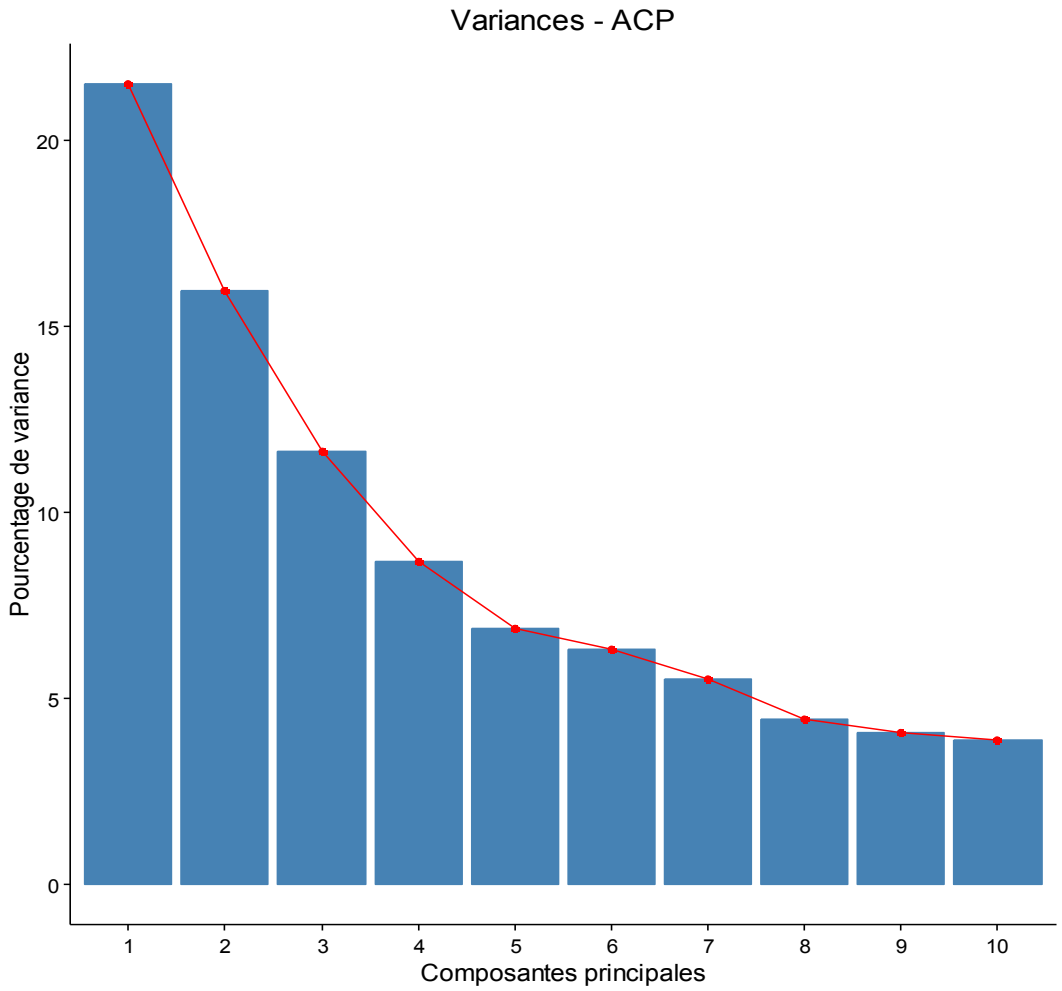


Figure 15. Représentation de la variance totale de l'ACP par chaque axe

L'histogramme représente le pourcentage de la variance totale que représente chaque axe de l'analyse en composante principale (ACP).

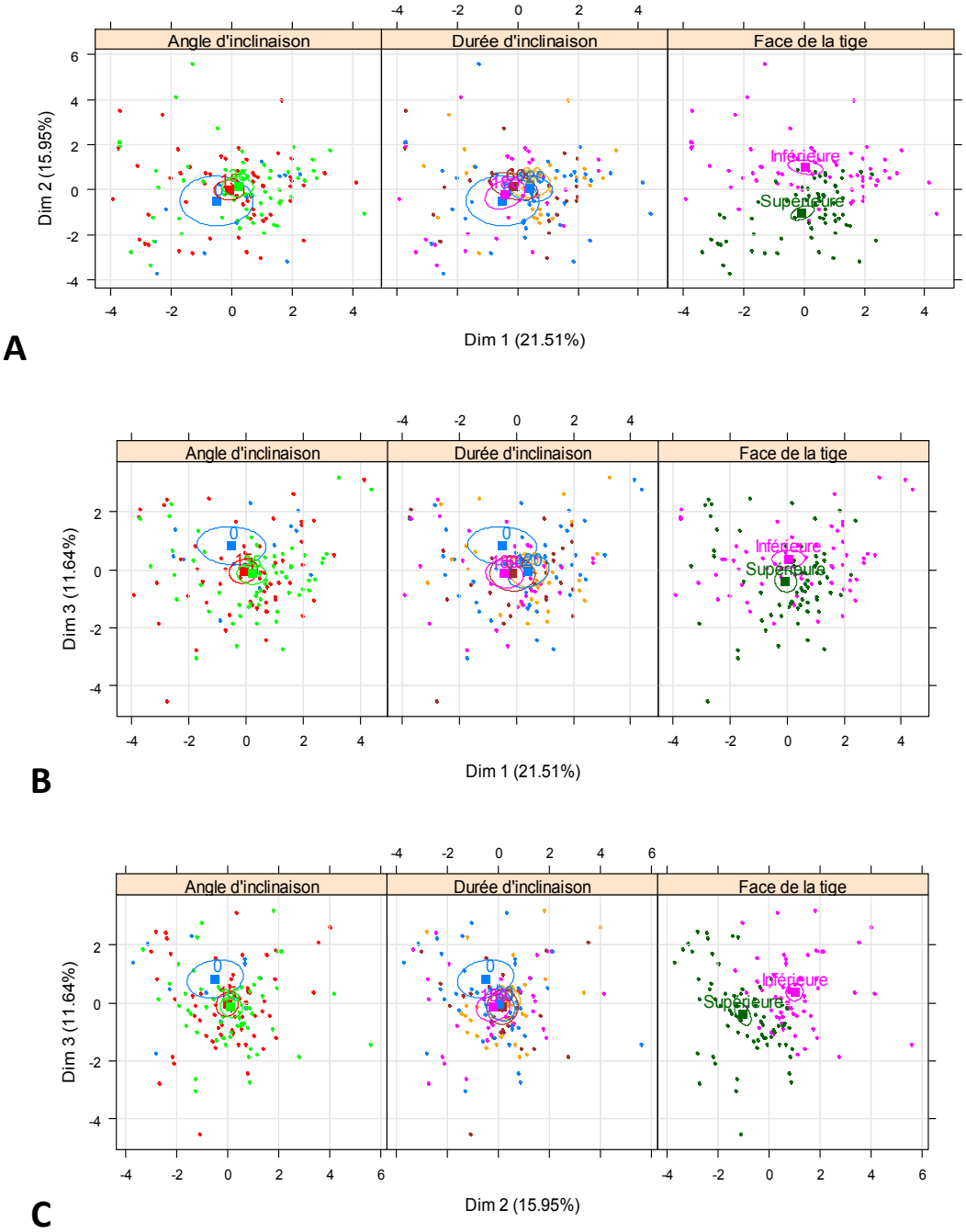


Figure 16. Ellipses de confiance de la distribution des facteurs expérimentaux

Les carrés représentent le barycentre de la distribution des échantillons de chaque facteur et sont encerclés par une ellipse de confiance à 95%. Les angles d'inclinaison sont notés 0 pour les plantes témoins droites, 15 et 35 pour les plantes inclinées respectivement à 15° et 35°. La durée d'inclinaison est notée en min, 0 pour les plantes témoins droites, 30, 60, 120 et 180 pour les plantes inclinées. Les deux faces de la tige par rapport à l'axe d'inclinaison sont notées supérieure et inférieure. A : Représentation de la projection des résultats de l'ACP sur les axes 1 et 2. B : Représentation de la projection des résultats de l'ACP sur les axes 1 et 3. C : Représentation de la projection des résultats de l'ACP sur les axes 2 et 3.

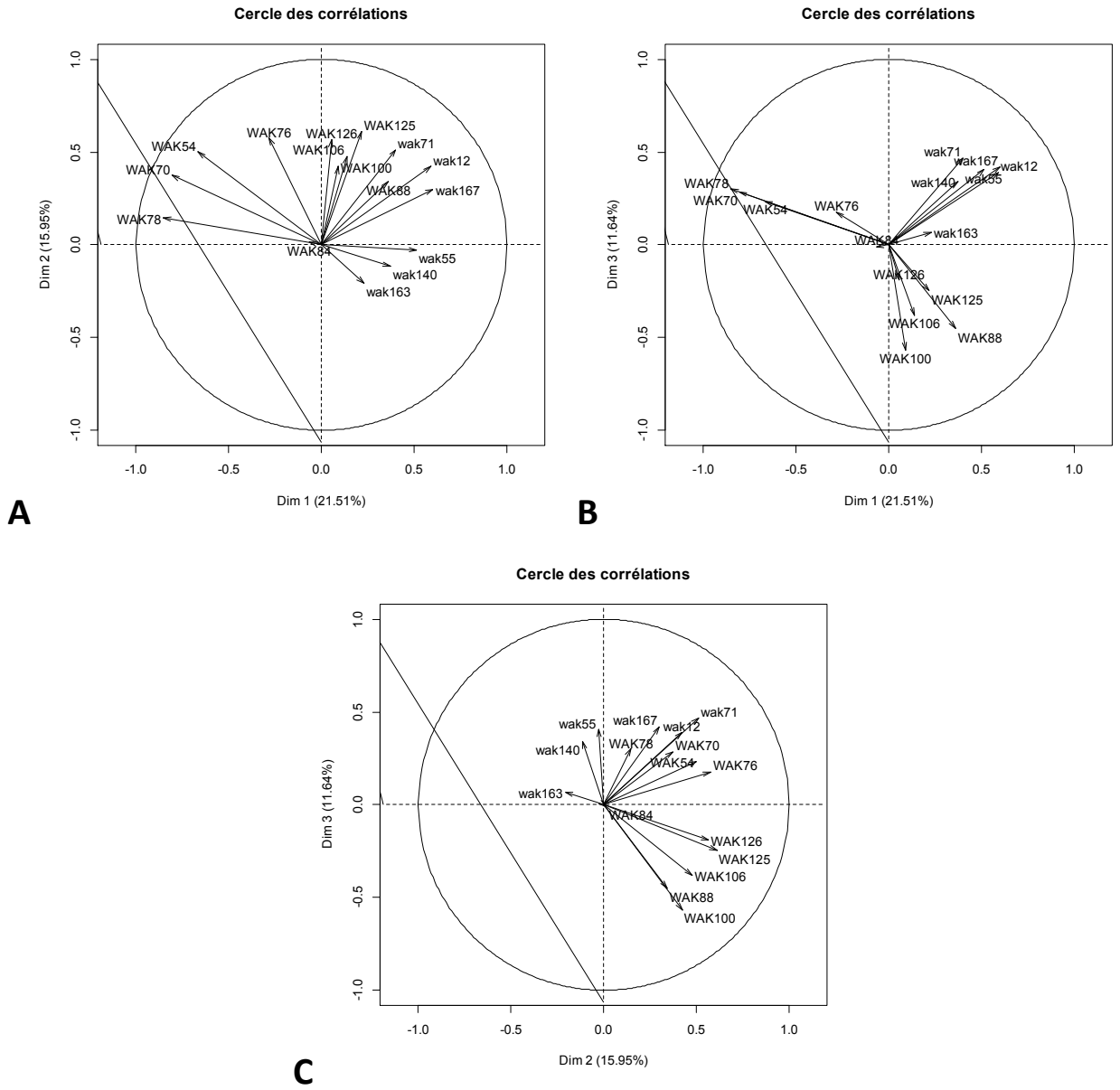


Figure 17. Cercles de corrélations des variables de l'ACP

Les cercles des corrélations représentent la distribution des variables (quantité de transcrits des gènes *WAKs* analysés) selon les axes 1 et 2 (A), 1 et 3 (B) et 2 et 3 (C).

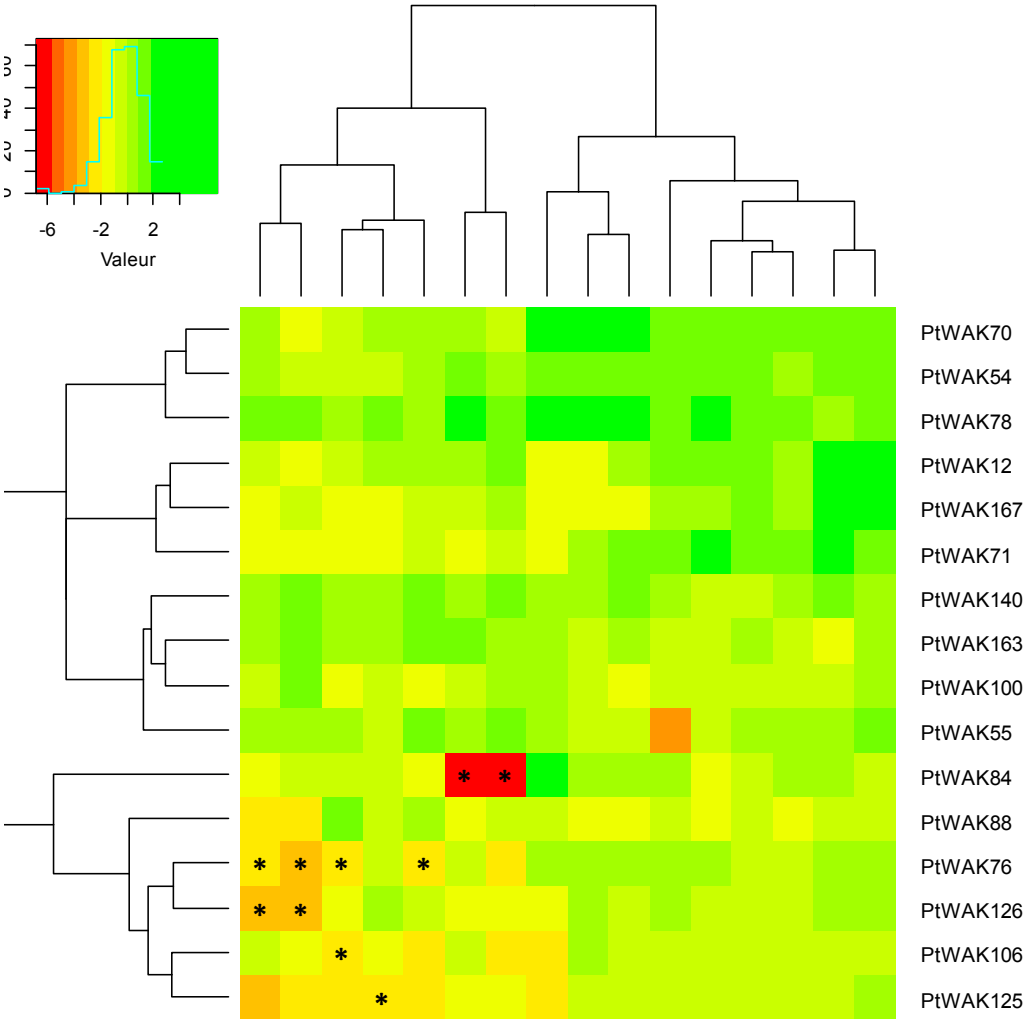


Figure 18. Heatmap du niveau de transcrits de 16 *PtWAKs* chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique en conditions de lumière isotropique

Les plantes sont inclinées à 15° ou 35° pendant 30 min, 1h, 2h et 3h. Le xylème des demi-cylindres supérieur et inférieur de la tige est prélevé. Les *PtWAKs* non modulées sont représentées en jaune et vert clair. La diminution et l'augmentation des niveaux de transcrits sont respectivement représentées en orange/rouge et vert. INF: Face inférieure par rapport à l'axe d'inclinaison, SUP : Face supérieure par rapport à l'axe d'inclinaison. 30min, 60min, 120min et 180min : durée d'inclinaison avant prélèvement. 15° et 35° : angle d'inclinaison de la plante. '*' : Différence significative entre cette condition angle/temps/face par rapport à des plantes non inclinées (ANOVA + Tuckey HSD, α = 5%).

Angle d'inclinaison	15 degrés								35 degrés							
Durée d'inclinaison	30 min		60 min		120 min		180 min		30 min		60 min		120 min		180 min	
Face	SUP	INF	SUP	INF	SUP	INF	SUP	INF	SUP	INF	SUP	INF	SUP	INF	SUP	INF
PtWAK12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK54	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK55	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK70	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK71	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK76	NS	**<0.05**	NS	**<0.05**	NS	NS	NS	**<0.05**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**<0.05**
PtWAK78	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK84	NS	NS	NS	NS	NS	**<0.05**	NS	NS	NS	NS	NS	**<0.05**	NS	NS	NS	NS
PtWAK88	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK100	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK106	NS	NS	NS	**<0.05**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK125	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**<0.05**	NS	NS
PtWAK126	NS	**<0.05**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**<0.05**
PtWAK140	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK163	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PtWAK167	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 4. Résultats des analyses des accumulations de transcrits entre des plantes droites et inclinées en condition de lumière isotropique

Le tableau représente l'analyse des quantités de transcrits des gènes *PtWAKs* dans différentes conditions angle/temps/face entre des plantes droites et inclinées. Les valeurs sont analysées à l'aide d'une ANOVA, suivi d'un test post-hoc HSD de Tuckey. SUP : tissus du xylème de la face supérieure par rapport à l'axe d'inclinaison. INF : tissus du xylème de la face inférieure par rapport à l'axe d'inclinaison. NS : non significatives. <0.05 : la différence est significative, $\alpha = 0.05$. Lorsque deux cases sont entourées en gras, cela signifie que l'accumulation des transcrits entre les faces supérieure et inférieure est significativement différente à une condition d'angle et de temps donné ($\alpha = 0.05$).

d'angle/durée (Tableau 4). On peut remarquer que les différences significatives que nous observons sont des diminutions de la quantité de transcrits dans les tissus du xylème de la face inférieure, quel que soit le gène modulé (Figure 18 et Tableau 4). Parmi les 5 gènes modulés, 2 sont communs avec l'analyse des plantes en serre (*PtWAK084* et *PtWAK126*). Ces gènes présentent également une diminution de la quantité de transcrits dans les tissus du xylème, mais à des moments différents de la cinétique. Il est également intéressant de noter que nous observons des différences significatives de modulation de transcrits pour *PtWAK071* entre les tissus du xylème supérieur et inférieur à tous les temps de la cinétique excepté à 60 min, quel que soit l'angle d'inclinaison.

2.3. Discussion

Dans la grande famille des kinases, les RLK/Pelle ont subi la plus grande expansion génomique chez les plantes (Lehti-Shiu and Shiu, 2012). Parmi les 1643 kinases (dont 1192 RLK/Pelles) identifiées chez le peuplier *Populus trichocarpa* (Lehti-Shiu *et al.*, 2009), les PtWAKs représentent une part significative avec 175 membres identifiés. Cette famille a particulièrement été étudiée chez *Arabidopsis* ou le riz, mais jamais chez une plante ligneuse. Le peuplier nous offre cette opportunité d'étude. Nous avons alors analysé l'accumulation des transcrits de gènes *WAKs* dans différents organes puis dans les tissus de la tige suite à un stimulus gravitropique chez le cultivar *Populus tremula x alba*.

Nous avons dessiné des couples d'amorces pour amplifier les séquences du génome de peuplier publiquement disponibles *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006). Nous avons amplifié 140 séquences d'ADNg chez cette espèce. En raison de la forte homologie de séquences entre les différents gènes de cette famille multigénique, il n'était pas possible d'obtenir des couples d'amorces suffisamment spécifiques pour les 36 autres gènes. Presque 75% des couples d'amorces dessinés amplifient également une séquence d'ADNg chez le peuplier hybride *Populus tremula x alba*, qui est l'espèce utilisée dans nos expérimentations. Il n'est pas surprenant d'observer cette différence car les espèces *Populus tremula* et *Populus alba* sont plutôt éloignées de *Populus trichocarpa* dans la phylogénie des *Salicaceae* (Wang *et al.*, 2014). Néanmoins, ce panel offre la première étude spécifique et approfondie de l'expression des gènes *WAKs* chez un arbre.

Nous avons montré que seulement la moitié des 104 *PtWAKs* analysés est exprimée dans les organes testés. Ce ratio correspond à celui obtenu lors de l'analyse d'un sous-groupe de la famille WAK du riz (*Oryza sativa* subsp *japonica*) localisés sur le chromosome 10 (Zhang *et al.*, 2005). Toutefois, cette valeur est inférieure aux 75% de gènes exprimés de ce même groupe chez la sous-espèce *japonica*

ainsi qu'aux données obtenues chez Arabidopsis où presque l'ensemble des *WAKs* est exprimé (He *et al.*, 1999; Verica *et al.*, 2003). Il est possible que certains gènes *WAK* ne soient pas transcrits chez le peuplier. Il est aussi possible que les transcrits ne soient pas détectés, soit parce que le niveau d'expression par cellule est trop faible, soit parce que les cellules qui transcrivent ces gènes sont rares dans les tissus/organes choisis. Cette dernière hypothèse peut être étayée par des données brutes issues de RNAseq qui suggèrent que l'ensemble des *WAKs* sont exprimées chez le peuplier (données non montrées, thèse Marie Garavillon-Tournayre UMR PIAF en cours), et qu'il n'y aurait pas de pseudogènes au sein de cette famille multigénique très étendue. Ces données sont en accord avec les prédictions chez le riz qui stipulent qu'il n'y a que 5 pseudogènes parmi les 125 gènes de cette famille multigénique (Zhang *et al.*, 2005). Toutefois, les techniques d'alignement des séquences issues de RNAseq présentent des limites pour les séquences de gènes de larges familles multigéniques avec de fortes similarités de séquences comme les *WAKs*. Si une séquence produite est présente sur plusieurs modèles de gènes, il est possible qu'elle soit alignée aléatoirement sur un de ces gènes. Ceci peut entrainer une mauvaise estimation de la prédiction du nombre de gènes transcrits. Le faible niveau de transcription était également évoqué dans le premier chapitre où les gènes *PtWAKs* présentaient un niveau d'expression globalement plus faible que celui de lots de gènes sélectionnés au hasard lors de l'analyse de puces à ADN (Tocquard *et al.*, 2014a). Des résultats similaires ont également été observés chez d'autres espèces. En effet, chez Arabidopsis, Sivaguru *et al.* (2003) ont montré que AtWAK1 présente une faible expression constitutive dans l'apex racinaire. De même, Kohorn *et al.* (2006a) reportent que la plupart des variétés de cellules végétatives présentent un faible niveau natif de protéines WAKs. Chez le riz, Gao et Xue (2012) ont montré que le niveau d'expression transcriptionnelle des *WAKs* est globalement plus faible que celui des autres RLK. L'ensemble de ces données, ajouté au fait que 36 gènes sur les 47 *Pt*WAKs transcrits semblent être transcrits de façon constitutive dans les différents organes analysés, suggère que la majorité des *PtWAKs* coderaient plutôt des protéines constitutives.

Nous avons montré que les 36 WAKs présentent des modulations d'intensité tout en étant transcrit de façon ubiquiste dans les tissus et organes testés (Figure 11, groupes 1 et 2). Ces données expérimentales sont en accord avec les données précédemment obtenues lors de l'exploration de données microarray de peuplier (Tocquard *et al.*, 2014a). Les résultats obtenus chez le peuplier diffèrent de ceux obtenus par Northern blot des différents membres *AtWAKs* dans le sens où ils semblaient plutôt être exprimés seulement dans certains organes ou tissus (He *et al.*, 1999; Verica *et al.*, 2003).

La classification hiérarchique ascendante des données obtenues nous montre que les différents gènes d'un cluster génomique ne sont globalement pas, à quelques exceptions près, transcrits de la

même manière. Cela est cohérent avec des données d'expression chez Arabidopsis où les 5 gènes du cluster *AtWAK1-5* présentent des modulations dans leur profil d'expression, à la fois dans les différents organes comme dit précédemment, mais également suite à un stimulus (He *et al.*, 1999). Les gènes *AtWAKL1*-7 localisés dans un même cluster génomique sur le chromosome 1 chez Arabidopsis, séparés de 650 à 2000 pb chacun, ont également des niveaux de transcrits différents dans les différents organes analysés (Verica *et al.*, 2003). Cela suggère que malgré l'importante expansion génomique par duplication en tandem de cette famille de récepteur kinase, les gènes *WAKs* proches génétiquement chez le peuplier ne semblent globalement pas co-régulés. Cela a déjà été observé chez Arabidopsis pour d'autres récepteurs kinases de type RLK-LRR (Ten Hove *et al.*, 2011). Ces auteurs ont montré par l'analyse de phénotypes de plantes mutantes dont la transcription est inactive que même si les gènes d'un cluster sont co-régulés au niveau transcriptomique chez des plantes sauvages, ils ne semblent pas forcément intervenir dans les mêmes processus physiologiques.

Les PtWAKs dont les gènes sont exprimés dans la tige sont susceptibles d'être impliquées dans la réponse à une stimulation gravitropique. Nous nous intéressons plus particulièrement à celles dont la transcription est modulée par la gravistimulation. Bien que la modulation du niveau de transcrits suite à un stimulus ne prouve pas qu'un gène soit directement impliqué dans la réponse à ce stimulus, cela reste néanmoins un bon indicateur, en particulier pour cette famille multigénique. En effet, chez Arabidopsis par exemple, de nombreuses études montrent que les WAKs qui interviennent dans des réponses à différents stress sont régulées transcriptionnellement (He *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2009; Sivaguru *et al.*, 2003; Verica *et al.*, 2003). Selon ce raisonnement, un rôle d'un membre WAK en réponse à l'inclinaison a été suggéré chez Arabidopsis : Correll *et al.* (2013) ont montré *qu'AtWAK3* présente une augmentation de son niveau de transcrits dans des conditions de microgravité. La transcription de 2 autres gènes *WAK*-like (*AtWAKL10* et *AtWAKL15*) est également activée après une stimulation gravitropique (Chae *et al.*, 2009). Toutefois dans ces deux exemples, seule la modification d'accumulation des transcrits a été analysée mais aucune étude des protéines n'a été réalisée. Actuellement, aucune donnée dans la littérature n'étudie la régulation des gènes *WAKs* chez le peuplier suite à une stimulation gravitropique. Nous avons alors analysé l'expression de 31 gènes *WAKs* dans les tissus de l'écorce et du xylème de tige de peuplier. Nous avons séparé ces tissus de la tige car cet organe très hétérogène comporte de nombreux types cellulaires. Cette séparation techniquement facile à réaliser permet de discriminer les réponses de ces deux tissus. Toutefois, il est nécessaire de garder à l'esprit que malgré cette séparation des tissus de la tige, l'étude reste réalisée sur des tissus complexes qui comportent de nombreux types cellulaires (fibres, vaisseaux et rayon ligneux dans le xylème, phloème, parenchyme cortical, ilots de sclérenchyme et

périderme dans l'écorce). De plus, différents processus physiologiques se déroulent dans ces tissus dont le contrôle de l'expansion cellulaire des cellules nouvellement formées, la déposition de paroi secondaire ainsi que de la mort cellulaire programmée (Plomion *et al.*, 2001). L'ensemble des *WAKs* que nous étudions sont transcrits avant et après inclinaison, et 25% des gènes étudiés présentent une modification d'accumulation des transcrits dans les étapes précoces suivant le stimulus gravitropique. Cela montre que la transcription de l'ensemble des *WAKs* n'est pas grandement affectée par la gravistimulation, et les réponses transcriptionnelles restent différentes selon les gènes. Pour les expériences en serre, 3 des 8 gènes transcriptionnellement régulés après gravistimulation le sont dans les tissus du xylème (*PtWAK044*, *PtWAK084* et *PtWAK126*, Figure 12). *PtWAK084* et *PtWAK126* (2 *PtWAK*-RLK) sont également régulés en condition de lumière isotrope après inclinaison. Le fait que ces 2 gènes soient régulés lors de 2 expériences indépendantes dont le point commun est la gravistimulation indique que ce stimulus est responsable de cette régulation. L'expression du gène *PtWAK044* n'a quant à elle pas été étudiée sur les plantes inclinées dans les sphères offrant des conditions de lumière isotropes. Trois autres gènes sont modulés dans les plantes inclinées en lumière isotrope (RLK : *PtWAK076*, RLCK : *PtWAK106* et *PtWAK125*, Tableau 4) alors qu'ils ne le sont pas dans les plantes cultivées en serre. Cette différence peut être due à l'interaction des voies de signalisation qui se mettent en place. En effet, dans les conditions lumineuses naturelles où la lumière n'est pas homogène autour de la plante, une inclinaison modifie théoriquement l'environnement lumineux. Ainsi la plante va mettre en place une réponse à ces 2 stimulations gravitropique et phototropique. L'interaction des 2 voies de signalisation pourrait également expliquer que les modulations de transcription n'interviennent pas aux mêmes moments de la cinétique d'inclinaison. Cela reste à être confirmer par des analyses fonctionnelles de ces différents gènes afin de démontrer leur rôle dans la réponse précoce à un stimulus gravitropique.

Par ailleurs, 5 *PtWAKs* de peupliers cultivés en serre présentent une modulation de la quantité de transcrits dans les tissus de l'écorce. Le fait que ce tissu puisse être impacté par l'inclinaison peut paraitre surprenant étant donné que la réponse anatomique des arbres à l'inclinaison est souvent analysée au travers de la production de bois de tension (Coutand *et al.*, 2007). En effet, les caractéristiques anatomiques de l'écorce après inclinaison n'ont pas été décrites dans la littérature. De plus, le ou les sites de perception de l'inclinaison dans les organes en croissance secondaire ne sont pas encore identifié(s) (Lopez *et al.*, 2014). On ne peut pas exclure un mécanisme de perception et de réponse à la stimulation gravitropique par les WAKs dans les tissus de l'écorce avant une transmission de l'information au cambium voire aux jeunes cellules xylémiennes en cours de différentiation. Cette différence entre les sites de perception et de réponse est commune aux mécanismes de réponse à l'inclinaison des organes aériens et souterrains en croissance primaire

(Morita, 2010). Dans les parties racinaires, la perception de l'inclinaison se produit dans les cellules de la columelle (Tsugeki and Fedoroff, 1999) alors que les mécanismes de réponse anatomique sont localisés dans la zone d'élongation distale où les cellules s'allongent différentiellement entre les faces supérieure et inférieure de la racine pour permettre le redressement (Mullen *et al.*, 1998). Dans les parties aériennes en croissance primaire, la gravité est perçue par les cellules de l'endoderme alors que la réponse anatomique se produit sur l'ensemble des tissus des tiges (Fukaki *et al.*, 1998). Les WAKs dont l'expression est modulée suite à l'inclinaison dans les tissus de l'écorce de peuplier pourraient alors être impliquées dans la perception et/ou la réponse précoce aux déformations du continuum CPMCW des cellules de l'écorce. La relocalisation de protéines PIN3 dans les cellules du phloème secondaire chez le peuplier après gravistimulation qui est un phénomène caractéristique de la réponse précoce à un stimulus gravitropique tend également à suggérer que des mécanismes actifs se mettent en place dans les tissus de l'écorce après inclinaison (Gerttula *et al.*, 2015).

Parmi les 5 PtWAKs dont l'accumulation des transcrits est régulée dans les tissus de l'écorce suite à l'inclinaison, nous notons 3 PtWAKs-RLK (*PtWAK020*, *PtWAK070* et *PtWAK089*) et 2 PtWAKs de type RLCK (*PtWAK080* et *PtWAK106*). Le gène *PtWAK106* présente un intérêt particulier car c'est le seul gène dont la transcription est modulée différentiellement entre les faces supérieure et inférieure à la fois 30 min et 1 h après inclinaison. Cela suggère un rôle de cette protéine dans une réponse différentielle entre les faces supérieure et inférieure dans les tissus de l'écorce. Comme ce gène code une protéine kinase intracellulaire, cela pourrait se faire par la régulation d'un signal au travers par exemple du mécanisme d'oligomérisation existant chez d'autres RLK (Cock *et al.*, 2002). Des expérimentations d'identification d'interacteurs pourraient apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

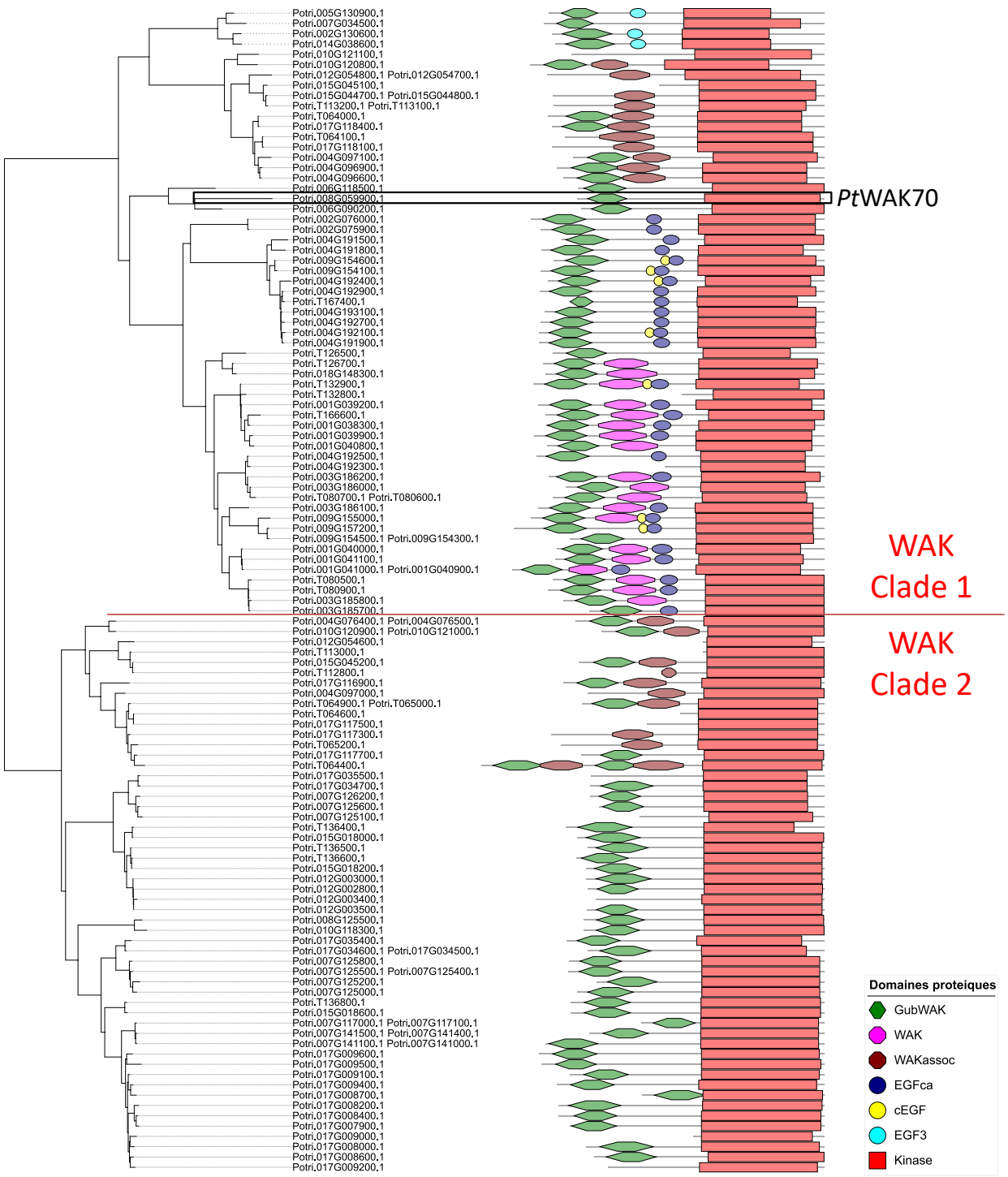


Figure 19. Arbre phylogénétique des PtWAKs

L'analyse phylogénétique est basée sur les séquences protéiques des domaines kinase. La composition en domaines protéiques est indiquée sur la droite. La longueur des barres grises et des formes colorées sont proportionnelles au nombre d'acides aminés de la protéine prédite et de la prédiction de localisation des domaines. L'arbre phylogénétique a été obtenu par inférence bayésienne à l'aide du programme MrBayes.

3. CHAPITRE 3 : Préparation d'outils pour localiser l'expression des WAKs et rechercher les interacteurs protéiques

3.1. Introduction

Nous faisons l'hypothèse que la stimulation gravitropique modifie des interactions entre la partie extracellulaire de WAKs et des protéines pariétales. Nous supposons aussi que ces modifications entraineraient la modulation de l'activité du domaine kinase intracellulaire. Etant donné la taille de cette famille multigénique chez le peuplier, nous ne pouvons pas travailler sur l'ensemble des membres de la famille. Nous devons alors sélectionner un gène codant une protéine de type RLK à partir duquel nous construirons différents outils moléculaires. Nous avons recherché notre gène candidat en nous basant sur les données d'expression les plus complètes, c'est-à-dire celles obtenues sur les plantes inclinées en serre. En effet, les études des gènes *WAKs* chez d'autres espèces montrent que les protéines qui ont un rôle dans la perception de l'attaque d'agents phytopathogènes ou dans le contrôle de l'élongation cellulaire présentent une modulation de leur accumulation de transcrits (Kohorn and Kohorn, 2012). Six gènes (*PtWAK020*, *PtWAK044*, *PtWAK070*, *PtWAK084*, *PtWAK089* et *PtWAK126*) codant des PtWAKs de type RLK répondent à ce critère, c'est-à-dire qu'ils présentent une accumulation des transcrits modulée après l'inclinaison (Figure 12). Du fait que la réponse physiologique de production de bois de tension est différente entre les faces supérieure et inférieure, il aurait été intéressant de pouvoir se concentrer sur des gènes de type RLK dont la modulation d'accumulation des transcrits est significativement différente entre les deux faces du tronc par rapport à l'axe d'inclinaison. Or, seulement *PtWAK106*, qui ne code pas une RLK mais une *Pt*WAK de type RLCK (kinase intracellulaire), présente ce profil d'accumulation des transcrits dans les tissus de l'écorce après 30 min et 1h d'inclinaison. L'étude de cette protéine dans la formation de complexes RLK/RLCK, à l'image des protéines CLAVATA (Jeong *et al.*, 1999; Trotochaud *et al.*, 1999) ou du complexe BRI1/BAK1 dans la voie de signalisation aux brassinostéroides (Guo *et al.*, 2013) est une piste intéressante. En effet, en l'absence de brassinostéroïdes, BRI1 (BRassinosteroid Insensitive 1) qui est un récepteur kinase de type LRR (Leucine-Rich Repeat) est inhibé par la protéine kinase BK1 (BRI1 Kinase Inhibitor 1). Lorsque des brassinostéroïdes se lient à BRI1, la kinase BKI1 est phosphorylée et se dissocie de BRI1 ce qui rend possible l'interaction de cette dernière avec une autre protéine kinase, BAK1 (BRI1 Associated Kinase). Lorsque BAK1 est liée à BRI1, elle s'autophosphoryle puis transphosphoryle BRI1 ce qui permet l'activation d'une cascade de signalisation. On ignore cependant l'existence à l'heure actuelle de ce type de complexe pour les WAKs.

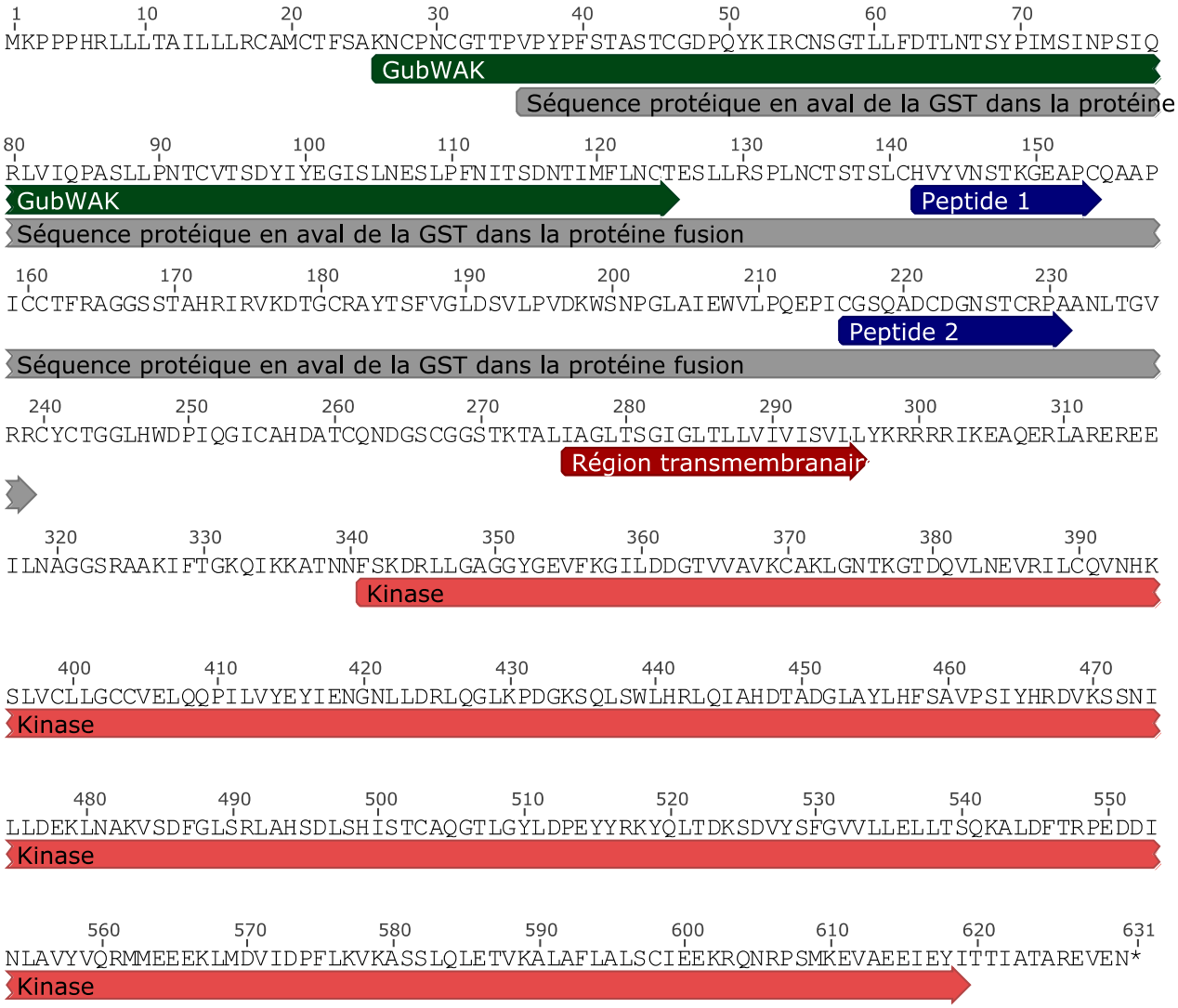


Figure 20. Représentation de la séquence protéique de WAK70

Ce schéma représente la séquence protéique de PtWAK70. Les domaines protéiques prédits (GubWAK, transmembranaire et kinase) sont indiqués. La localisation des peptides utilisés pour synthétiser les anticorps polyclonaux sont représentés sur la séquence protéique, ainsi que la localisation de la séquence protéique en aval de la GST dans la protéine fusion.

Ainsi, les 6 gènes dont l'expression est modulée suite à un stimulus gravitropique et codant pour des protéines de type RLK sont *PtWAK020*, *PtWAK044*, *PtWAK070*, *PtWAK084*, *PtWAK089* et *PtWAK126*. Nous avons alors exclu les gènes qui sont localisés au sein de clusters génomiques (*PtWAK044* dans un cluster de 15 gènes, *PtWAK084* et *PtWAK089* dans un cluster de 9 gènes et *PtWAK126* dans un cluster de 12 gènes) dans le but à la fois de pouvoir choisir un épitope pour la production d'un anticorps spécifique, mais également afin de s'affranchir de possibles redondances fonctionnelles entre les différents membres d'un cluster. Dès lors, *PtWAK020* et *PtWAK070* correspondent à nos critères de sélection. Nous avons choisi de nous concentrer sur *PtWAK070* (nommé ensuite *PtWAK70*) qui présente la mesure d'accumulation des transcrits la moins variable et la plus forte entre les différents individus analysés. De plus, PtWAK70 est localisée dans le clade phylogénétique I décrit auparavant dont les gènes présentent une modulation d'expression plutôt lors de processus développementaux (Figure 19, Tocquard *et al.*, 2014a).

Dans le cadre de la thèse, nous avons initié l'étude à l'échelle des protéines de la famille WAKs chez le peuplier. Dans un premier temps, nous avons voulu identifier dans quelles cellules de la tige une protéine WAK étudiée est exprimée par immunolocalisation *in situ*, ce qui a nécessité un anticorps spécifique. Nous avons également souhaité déterminer s'il existe ou non des interacteurs protéiques de la partie extracellulaire. Pour cela, nous avons choisi de créer une protéine fusion GST afin d'identifier ces interacteurs par la technique de pull-down.

3.2. Résultats

3.2.1. Création d'un outil moléculaire pour identifier de potentiels interacteurs apoplastiques de PtWAK70

A la lecture de sa prédiction transmembranaire, nous émettons l'hypothèse que PtWAK70 est capable d'interagir avec d'autres protéines au niveau apoplastique. Nous avons choisi d'isoler la partie extracellulaire de PtWAK70 pour créer une protéine fusion qui nous permettra d'effectuer des tests d'interaction pour identifier de potentiels interacteurs apoplastiques. Nous avons amplifié une séquence nucléotidique codant les acides aminés 36 à 239 de PtWAK70 qui correspond au domaine GubWAK (90 acides aminés) et au reste de la partie extracellulaire (114 acides aminés). Cette séquence ne comporte pas la partie codant le peptide signal et s'arrête en amont du domaine transmembranaire (Figure 20). La séquence nucléotidique est clonée dans le vecteur pGEX-4T-1 qui est un vecteur permettant une résistance à l'ampicilline et contenant une séquence codant la GST (Glutathion S-transférase). Au niveau de la partie 3' de cette séquence se trouvent les sites de

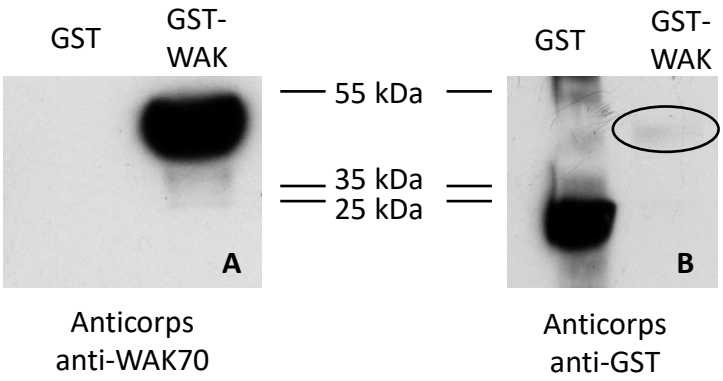


Figure 21. Western blot sur protéines totales d'*Escherichia coli* après induction de GST ou GST-WAK

Après migration de 10 µg de protéines sur gel d'acrylamide 10% puis transfert sur membrane de nitrocellulose, la présence des protéines GST et GST-WAK dans les 2 échantillons est révélée par western blot avec l'anticorps purifié anti-WAK70 dilué au 1/1500ème (A) ou avec l'anticorps commercial anti-GST (B).

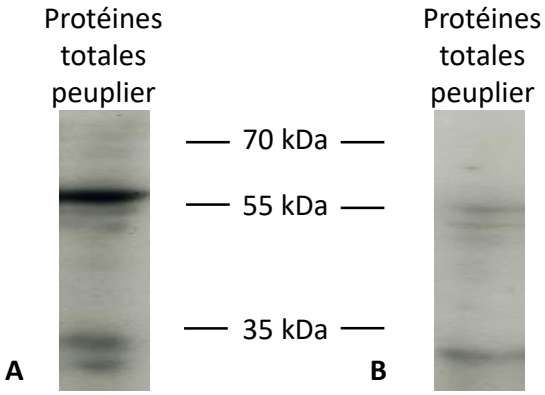


Figure 22. Western blot sur protéines totales de peuplier (*Populus tremula x alba*)

Après migration de 10 µg de protéines sur gel d'acrylamide 10% puis transfert sur membrane de nitrocellulose, la présence de PtWAK70 est révélée par western blot avec l'anticorps purifié anti-WAK70 dilué au 1/1000ème (A) ou avec l'anticorps anti-WAK70 au 1/1000ème bloqué par incubation avec 10 fois plus de peptide immunogène dilué (B).

plusieurs enzymes de restrictions permettant de créer une protéine fusion avec la GST en N-terminale et la séquence d'intérêt (ici la partie extracellulaire de PTWAK70) en C-terminale. Le clonage réalisé permet donc de synthétiser une protéine fusion GST-WAK70 en système bactérien grâce à un promoteur inductible par l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside pour les purifier ensuite par affinité. Ces protéines purifiées pourront être utilisées pour réaliser des tests d'interaction *in vitro*.

3.2.2. Création d'un anticorps anti-WAK70

Afin de suivre l'accumulation de PtWAK70 dans les tissus par western blot, mais également pour étudier sa localisation dans les tissus de la tige, des anticorps polyclonaux dirigés contre deux peptides de synthèse ont été produits chez le lapin (Eurogentec, speedy antipeptides program, Angers, France). Afin que cet anticorps soit le plus spécifique possible, nous avons sélectionné deux épitopes parmi ceux proposés par Eurogentec comme potentiellement immunogènes. La spécificité a été vérifiée par BLASTp et tBLASTx sur l'ensemble du génome de peuplier (*Populus trichocarpa*, assemblage v3, Phytozome). Nous avons choisi de sélectionner des peptides sur la partie N-terminale de la protéine prédite pour être apoplastique (Figure 20). En effet, au vu du très grand nombre de séquences kinases chez le peuplier (1289 kinases dont 839 récepteurs, Lehti-Shiu *et al.*, 2009), choisir un épitope sur la partie C-terminale intracellulaire était difficile. De plus, cet anticorps doit permettre également de cibler la protéine fusion GST construite avec la partie extracellulaire de WAK70. Les anticorps anti-PtWAK70 ont ensuite été purifiés du sérum de lapin par chromatographie d'affinité en utilisant les peptides de synthèse.

Afin de vérifier la spécificité de l'anticorps, nous avons dans un premier temps observé s'il pouvait cibler les protéines fusion GST-WAK70 par western blot (Figure 21A). Dans ces deux échantillons, l'anticorps anti-WAK70 produit un marquage seulement sur les échantillons GST-WAK70 aux alentours des 50 kDa, ce qui correspond à la taille prédite bioinformatiquement de la protéine fusion GST-WAK70. L'anticorps commercial anti-GST reconnait une bande dans les échantillons issus de bactéries transformées avec le vecteur vide à la taille attendue de 26 kDa, ainsi que la même bande que l'anticorps anti-WAK70 dans les échantillons GST-WAK (Figure 21B). Cela nous permet de conclure que l'anticorps devrait être capable de reconnaitre la protéine WAK70 dans les tissus de la tige.

Toutefois, cette expérimentation ne permet pas d'apporter d'éléments de réponse quant à la spécificité de l'anticorps pour PtWAK70. En effet, être capable de reconnaitre la séquence dans un

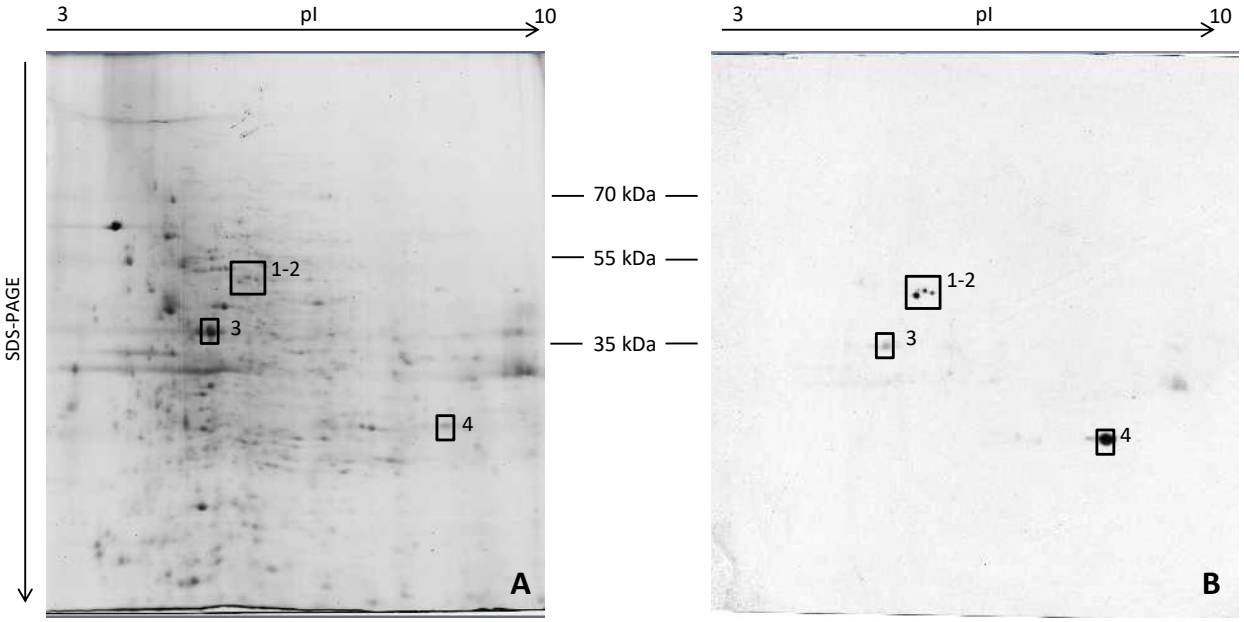


Figure 23. Gel après électrophorèse bidimensionnelle (A) et western blot anti-WAK70 (B)

Après migration dans une première dimension de 300 µg de protéines totales de tige de peuplier sur des bandes de gradient de pH 3-10, les protéines migrent dans une seconde dimension par électrophorèse sur gel de polyacrilamide 10%. Le gel est soit coloré au bleu de coomassie (A) soit utilisé pour un transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose. La présence de PtWAK70 est révélée par western blot avec l'anticorps purifié anti-WAK70 dilué au 1/1000ème. Les encadrés sur le gel (A) et sur le western blot (B) correspondent aux 4 spots identifiés par western blot et analysés en spectrométrie de masse. Dans le premier cadre, seul les deux spots aux points isoélectriques (pI) les plus acides ont été analysés.

échantillon de protéines bactériennes ne signifie pas que l'anticorps cible préférentiellement voire spécifiquement PtWAK70 dans un échantillon protéique ou sur un tissu de peuplier. Nous avons alors analysé la reconnaissance de l'anticorps sur des échantillons protéiques totaux de peuplier (Figure 22A). Après avoir réalisé différents tests pour optimiser les conditions d'immunodétection, l'anticorps reconnait plusieurs bandes dont une majoritaire aux alentours des 57 kDa. Si on utilise pour le western blot un anticorps qui a été bloqué après incubation avec le peptide de synthèse qui a servi à la purifier, la bande majoritaire n'est plus révélée (Figure 22B). Les bandes minoritaires restent, ce qui suggère qu'il s'agit de marquages aspécifiques. Cette expérimentation tend à montrer que l'anticorps cible majoritairement cette protéine. Toutefois, la taille marquée ne correspond pas à la taille de prédiction bioinformatique de PtWAK70. Des expérimentations d'identification par spectrométrie de masse des protéines végétales reconnues par l'anticorps après une séparation sur un gel 2D (Figure 23) n'ont pas été concluantes. En effet, 2 spots protéiques identifiés par western blots, bien que proches l'un de l'autre, se situent à un poids moléculaire inférieur à celui détecté après électrophorèse monodimensionnelle (aux alentours de 57 kDa après électrophorèse monodimensionnelle, environ 50 kDa après électrophorèse bidimensionnelle). Les deux autres marquages (spot 3 et 4, Figure 23) aux poids moléculaires inférieurs ont également été analysés. Les peptides identifiés dans ces spots protéiques ont permis d'identifier plusieurs protéines par spot (Tableau 5) mais aucune ne correspond à une séquence de WAK. De nouvelles expérimentations d'identification suite à une immunoprécipitation sont actuellement en cours au laboratoire pour confirmer que l'anticorps reconnait PtWAK70.

3.2.3. Localisation de la protéine WAK70 dans des tiges de peuplier en croissance secondaire par immunolocalisation in situ.

Afin de savoir dans quels cellules ou tissus de la tige PtWAK70 est exprimée, nous avons choisi de réaliser une immunolocalisation *in situ* à l'aide de l'anticorps anti-WAK70 sur des tiges inclinées pendant 30 min, 1h et 2h. Ces durées d'inclinaison correspondent à la cinétique d'inclinaison utilisée lors des analyses transcriptomiques.

Nous avons alors localisé la protéine WAK70 dans des tiges de peuplier (Figure 24). Nous pouvons voir un marquage dans le xylème et dans l'écorce. Dans le xylème, un marquage est observé au niveau des cellules du jeune xylème secondaire (fibre et rayon ligneux). Dans l'écorce, nous observons une coloration intense au niveau du phloème secondaire mais pas dans toutes les cellules. Nous ne pouvons pas distinguer quel(s) type(s) de cellules du phloème secondaire sont marqués. Il y

Spot	Protéine identifiée	Nom du locus	Source	Score Mascot v2.3	Nombre de peptides	Pourcentage de couverture	Taille prédite (kDa)	pI prédit	Modifications
1	similar to Adenosylhomocysteinase	Potri.017G059400	Phytozome v3	1066.70	16	38.80%	53.20	5.74	Carbamidomethyl, Oxidation
	C-x8-C-x5-C-x3-H type Zn-finger, partial	190895776	NCBI *Populus tremula*	167.20	2	15.80%	18.30	5.45	Oxidation
	similar to peroxidase precursor	Potri.005G195700	Phytozome v3	79.03	2	5.70%	38.70	5.39	Non
2	similar to Adenosylhomocysteinase	Potri.017G059400	Phytozome v3	849.14	14	32.00%	53.20	5.74	Carbamidomethyl, Oxidation
	UDP- GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE	Potri.017G144700	Phytozome v3	534.69	6	19.20%	51.60	5.78	Carbamidomethyl, Oxidation
	UDP- GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE	Potri.004G074400	Phytozome v3	447.15	4	13.40%	43.50	6.68	Carbamidomethyl, Oxidation
	similar to 3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2	Potri.006G113300	Phytozome v3	161.39	2	4.50%	61.00	5.37	Non
3	ZINC FINGER FYVE DOMAIN CONTAINING PROTEIN	Potri.006G166800	Phytozome v3	285.82	4	14.00%	42.30	5.09	Carbamidomethyl, Oxidation
	bark storage protein 1+2, partial	284519844	NCBI *Populus tremula x alba*	234.42	4	14.60%	35.80	6.88	Oxidation
	similar to Magnesium-chelatase subunit chlI; similar to chloroplast precursor	Potri.004G053400	Phytozome v3	213.34	3	7.00%	45.20	5.50	Carbamidomethyl, Oxidation
	similar to pyruvate dehydrogenase (lipoamide)	Potri.001G061400	Phytozome v3	82.08	2	6.10%	38.60	5.87	Non
	unknown protein	Potri.001G021500	Phytozome v3	73.13	2	4.80%	35.70	5.70	Carbamidomethyl, Oxidation
4	similar to heat shock protein 70 cognate	Potri.008G054700	Phytozome v3	360.51	6	12.80%	67.30	5.07	Oxidation
	similar to tropinone reductase; putative; similar to tropine dehydrogenase; putative	Potri.010G142600	Phytozome v3	243.53	4	22.10%	22.40	8.53	Carbamidomethyl
	similar to Adenosylhomocysteinase	Potri.017G059400	Phytozome v3	234.24	4	8.00%	53.20	5.74	Carbamidomethyl

Tableau 5. Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans des spots protéiques prélevés sur gel

Les spots identifiés Figure 23 ont été soumis à une LC/MSMS. L'identification des protéines correspondant aux peptides identifiés a été réalisée à l'aide du logiciel MASCOT. Pour chaque spot, le score des protéines identifiées, la source d'identification, le nombre de peptides assignés, le pourcentage de couverture, la taille moléculaire et le point isoélectrique prédits ainsi que les modifications post traductionnelles sont indiqués.

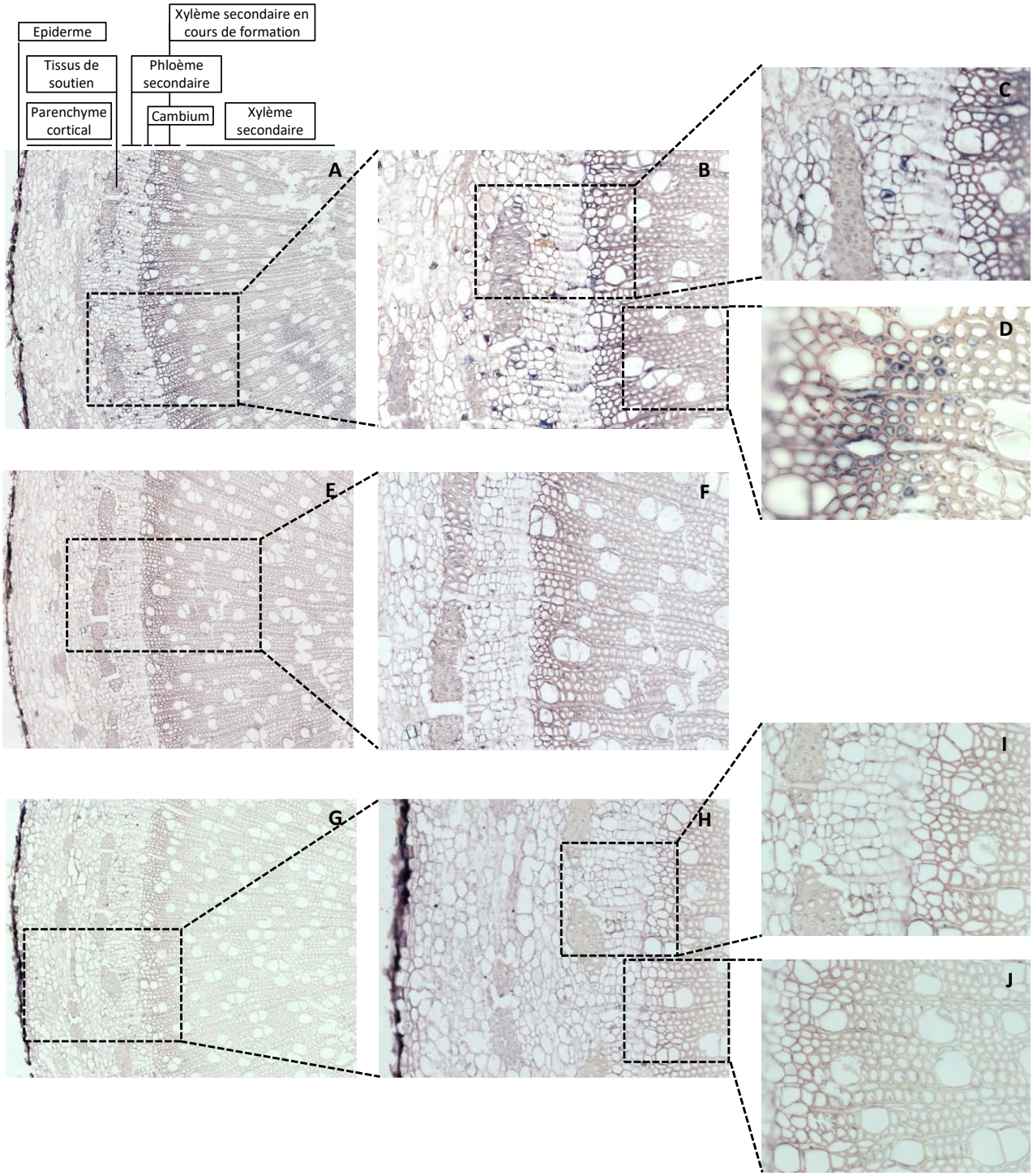


Figure 24. Immunolocalisation de PtWAK70 sur des sections de tiges de peuplier *Populus tremula x alba*

Les tiges de peuplier ont été prélevées puis fixées par du formaldéhyde. Après inclusion en paraffine, des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées. Les immunodétections ont été effectuées avec l'anticorps anti-WAK70 purifié dilué au 1/50ème (A-D), avec l'anticorps bloqué (E-F) et seulement avec l'anticorps secondaire (G-J). Après 10 minutes de révélation, les observations sont réalisées sous microscope optique.

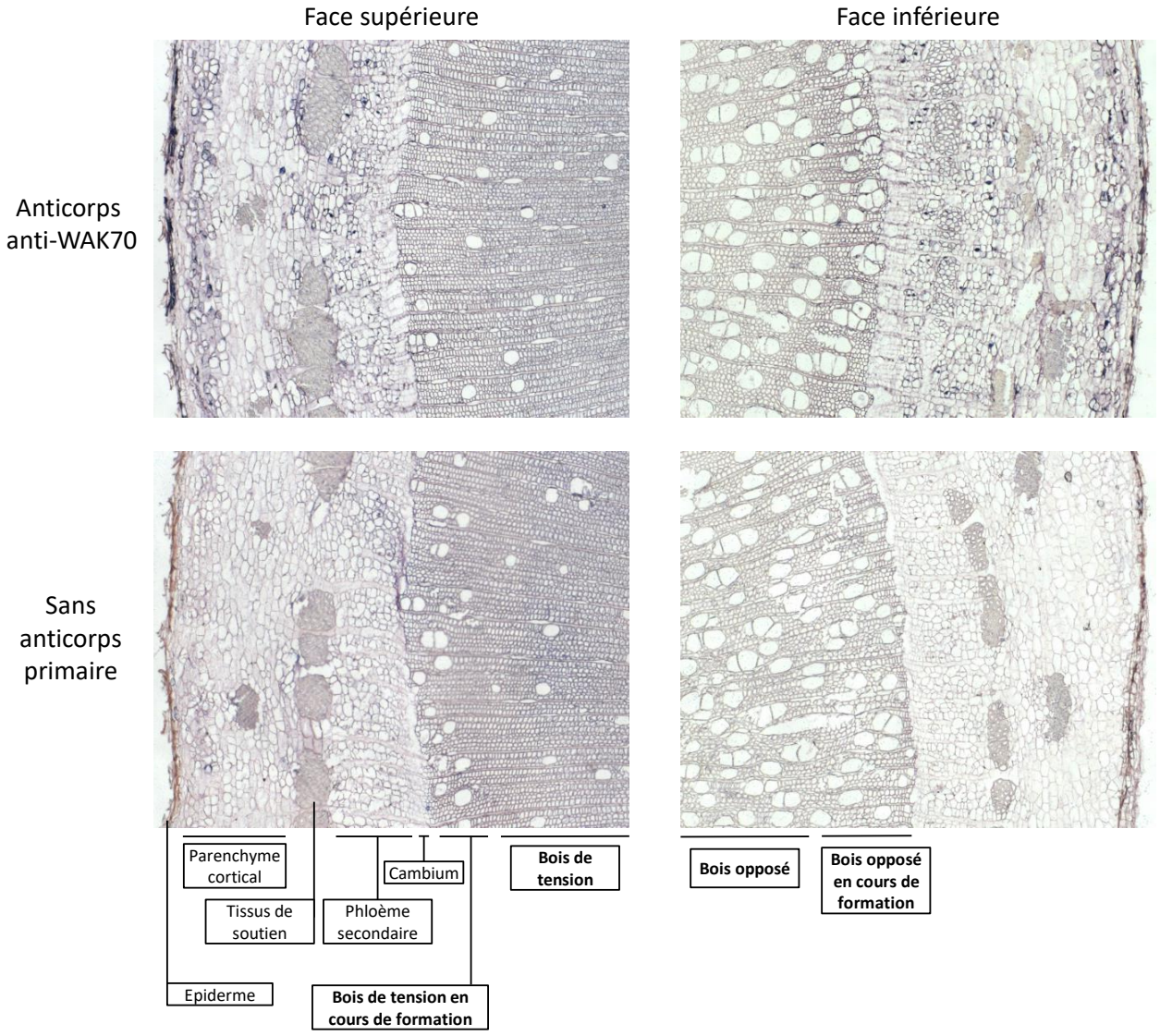


Figure 25. Immunolocalisation de PtWAK70 sur des sections de tiges de peuplier *Populus tremula x alba* inclinés plusieurs jours

Les tiges de peuplier ont été prélevées après 14 jours d'inclinaison puis fixées par du formaldéhyde. Après inclusion en paraffine, des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées. Les immunodétections ont été effectuées avec l'anticorps anti-WAK70 purifié dilué au 1/50ème ou sans anticorps primaire. Après 10 minutes de révélation, les observations sont réalisées sous microscope optique.

a également une coloration au niveau de la face interne des parois des tissus de soutien de l'écorce. Dans certaines expérimentations, un marquage au niveau du parenchyme cortical sous l'épiderme est observé mais n'est pas systématique. Aucune différence de marquage n'a été observée entre des arbres non inclinés et des arbres inclinés pendant 30 min, 1h ou 2h, ni entre les faces supérieure et inférieure par rapport à l'axe d'inclinaison dans les arbres inclinés. Aucune coloration n'est observée lorsque les coupes sont incubées seulement avec de l'anticorps secondaire ce qui signifie que la coloration observée avant n'est pas due à une hybridation aspécifique de l'anticorps secondaire. Après incubation de l'anticorps anti-WAK70 avec le peptide de synthèse ayant servi à le purifier, l'anticorps bloqué ne donne pas non plus de signal sur la lame, ce qui signifie que le signal observé correspond aux zones d'hybridation de l'anticorps primaire sur la lame.

Nous avons également analysé la localisation de WAK70 dans des tiges de peuplier inclinées pendant 3, 7 et 14 jours. Sur ces échantillons, le bois de tension nouvellement formé est visible à partir du 7ème jour. Il comporte très peu de vaisseaux et de nombreuses fibres. Aucun marquage de WAK70 n'est visible dans ce bois de tension en formation (Figure 25). On retrouve comme précédemment la protéine WAK70 localisée au niveau de l'écorce, plus précisément au niveau du parenchyme cortical juste sous l'épiderme et au niveau de cellules éparses dans le phloème secondaire. La protéine WAK70 est également localisée au niveau du jeune xylème (dans les rayons ligneux principalement) et dans la zone de transition entre le bois normal et le bois de tension.

3.3. Discussion

Nous émettons l'hypothèse que PtWAK70 jouerait un rôle dans la perception/réponse précoce à l'inclinaison dans des tiges de peuplier en croissance secondaire. En effet, nous détectons une accumulation de transcrits dans les tissus de l'écorce et du xylème, qui est modifiée suite à l'inclinaison. Toutefois, ce résultat ne démontre pas si *PtWAK70* est exprimé dans l'ensemble des types cellulaires de ce tissu hétérogène ou seulement dans quelques types cellulaires particuliers. Nous avons alors souhaité analyser sa localisation tissulaire. Différents essais de localisation de *PtWAK70* par hybridation *in situ* ont été réalisés mais ils n'ont pas été concluants. En effet, après clonage d'une séquence spécifique de *PtWAK70* (Tableau 2), des signaux étaient détectés à la fois avec la sonde sens et la sonde antisens. La séquence de la sonde *WAK70* était clonée dans le vecteur pGEM-T-easy. La sonde sens était obtenue par transcription *in vitro* à l'aide de la polymérase SP6 et la sonde antisens par la polymérase T7. Or, il semblerait que la polymérase SP6 puisse mal fonctionner lorsqu'il faut inclure des nucléotides UTP marqués à la digoxygénine (DIG) (Thisse and

Thisse, 2008), ce qui pouvait expliquer un marquage avec la sonde sens. Nous avons alors cloné cette séquence dans un autre vecteur (pBlueScript) qui comporte les promoteurs pour les polymérases T7 et T3 mais le problème persiste. Des hybridations ont également été réalisées avec une sonde antisens correspondant à la séquence de la GFP (Green Fluorescent Protein) mais ces essais ont également donné un signal. Les résultats de cette technique n'étant pas exploitables, une solution alternative serait de produire des peupliers transformés avec le promoteur de *PtWAK70* couplé à un gène rapporteur (GUS ou GFP).

Nous nous sommes alors concentrés sur une localisation de la protéine WAK70. A notre connaissance, aucune donnée de localisation de protéine WAK n'est disponible chez le peuplier. Chez Arabidopsis, les WAKs s'expriment dans des tissus différents selon les membres de la famille, bien que certains tissus comme les feuilles en développement soient un lieu d'expression commun à plusieurs membres (Anderson *et al.*, 2001; Wagner and Kohorn, 2001). Les données existantes ont toutes été obtenues sur des organes en croissance primaire. Nous avons localisé la protéine WAK70 dans les tissus de la tige en croissance secondaire. Nous avons montré que PtWAK70 est localisée au niveau du xylème secondaire en formation, ainsi qu'au niveau du phloème secondaire dans certaines cellules, dans les tissus de soutien de l'écorce et parfois dans le parenchyme cortical juste sous l'épiderme. Dans le xylème secondaire en cours de formation, les cellules n'ont qu'une paroi primaire riche en pectine et sont en cours d'élongation puis de maturation (Déjardin *et al.*, 2010). Chez Arabidopsis, AtWAK1 et AtWAK2 sont capables de se lier aux pectines pariétales (Kohorn *et al.*, 2009) et sont impliquées dans le contrôle de l'élongation cellulaire (Kohorn *et al.*, 2006b; Lally *et al.*, 2001). PtWAK70 pourrait alors jouer un rôle dans ce mécanisme au niveau du xylème secondaire en formation. Dans des arbres qui ont été inclinés pendant plusieurs jours, une nouvelle couche de bois de tension apparait au niveau du xylème de la face supérieure dans nos conditions. Sur des coupes au niveau de la face supérieure, nous n'observons pas d'expression de PtWAK70 dans ce tissu en formation alors que nous détectons une expression sur des coupes de la face inférieure où se forme le bois opposé, ainsi que dans le xylème secondaire jeune de plantes droites. Ces données suggèrent que PtWAK70 n'intervient pas activement dans la formation de bois de tension. Dans le phloème secondaire, nous ne pouvons pas dire dans quelle(s) type(s) cellulaire(s) PtWAK70 est exprimée. Nous pouvons observer une expression dans les cellules qui sont dans la continuité des rayons ligneux, ainsi qu'au niveau d'autres cellules éparses qui pourraient être les cellules compagnes. On ne peut toutefois pas colorer les échantillons ayant servi à l'immunolocalisation *in situ* ce qui rend difficile l'identification des cellules marquées. Il serait intéressant de réaliser des coupes successives d'une même tige, certaines pour immunolocaliser PtWAK70 et d'autres pour colorer les tissus au lugol par exemple. Cela permettrait de voir si l'expression de PtWAK70 se fait dans des cellules riches

en amidon qui pourraient être le lieu de perception de la gravité. Même si on ne peut pas préciser le type cellulaire marqué, il est intéressant de noter que PtWAK70 semble être localisée au niveau du phloème secondaire, comme c'est le cas pour le transporteur d'auxine PIN3 dans des arbres de peuplier après inclinaison (Gerttula *et al.*, 2015). Les auteurs de cette étude suggèrent que dans des tiges en croissance secondaire ayant perdu leur endoderme, des cellules du phloème secondaire pourraient être le lieu de la graviperception. PtWAK70 pourrait alors intervenir dans ces mécanismes.

Toutefois, les résultats obtenus avec l'anticorps anti-WAK70 sont à prendre avec précaution. En effet, nous n'avons pas encore identifié quelle(s) protéine(s) est reconnue par l'anticorps. Nous avons effectué des analyses par LCMS/MS de 3 spots protéiques après électrophorèse bidimensionnelle reconnus en western blot. Ces analyses n'ont pas permis d'identifier de WAKs dans les échantillons. Si on considère l'anticorps comme capable de reconnaitre PtWAK70 au vu des résultats de western blot sur la protéine fusion et avec l'anticorps bloqué par un peptide spécifique de PtWAK70 (Figure 21et 22), on peut supposer soit que la protéine PtWAK70 n'est pas présente dans les spots identifiés en western blot, soit qu'elle est présente dans ces spots mais en quantité insuffisante pour être identifiée par LCMS/MS. De plus, les résultats indiquent que les spots contiennent plusieurs protéines. Si la protéine PtWAK70 est également présente, il est possible qu'elle le soit en faible quantité et que la détection par MS cible préférentiellement les autres protéines qui pourraient être majoritaires. Enfin, les protéines détectées par spectrométrie ne présentent pas dans leur séquence protéique de zone semblable au peptide contre lequel l'anticorps a été produit ce qui diminue la probabilité d'une hybridation aspécifique. Afin d'augmenter la résolution de notre analyse, nous pouvons alors préparer un échantillon enrichi en PtWAK70 par expression exogène par exemple, et l'analyser par spectrométrie de masse. Cela permettrait de détecter les peptides protéotypiques de PtWAK70 (peptides les plus solubles et les plus facilement ionisables qui représentent alors le plus la protéine lors d'une analyse par spectrométrie de masse). Une nouvelle analyse de spots issus d'une séparation par électrophorèse bidimensionnelle serait alors effectuée en ciblant les peptides dans un spectre proche des peptides protéotypiques de PtWAK70. Sinon, l'identification de la (des) cible(s) de l'anticorps anti-WAK70 peut être réalisée par une analyses des produits immunoprécipités par l'anticorps. Cette seconde technique est actuellement en cours de réalisation au laboratoire pour valider l'hybridation de PtWAK70 par l'anticorps.

L'anticorps détecte une protéine d'environ 57 kDA alors que la prédiction bioinformatique du poids moléculaire de PtWAK70 par l'outil Tag-Ident (Artimo *et al.*, 2012) est de 69 kDa. Chez Arabidopsis, un anticorps anti-AtWAK1 détecte une bande à 68 kDa alors que son poids moléculaire prédit est de 81 kDA. La détection par western blot d'une séquence tronquée à laquelle il manque les 137 premiers résidus (Kohorn *et al.*, 1992) correspond à cette taille. Ces résidus correspondent à la partie

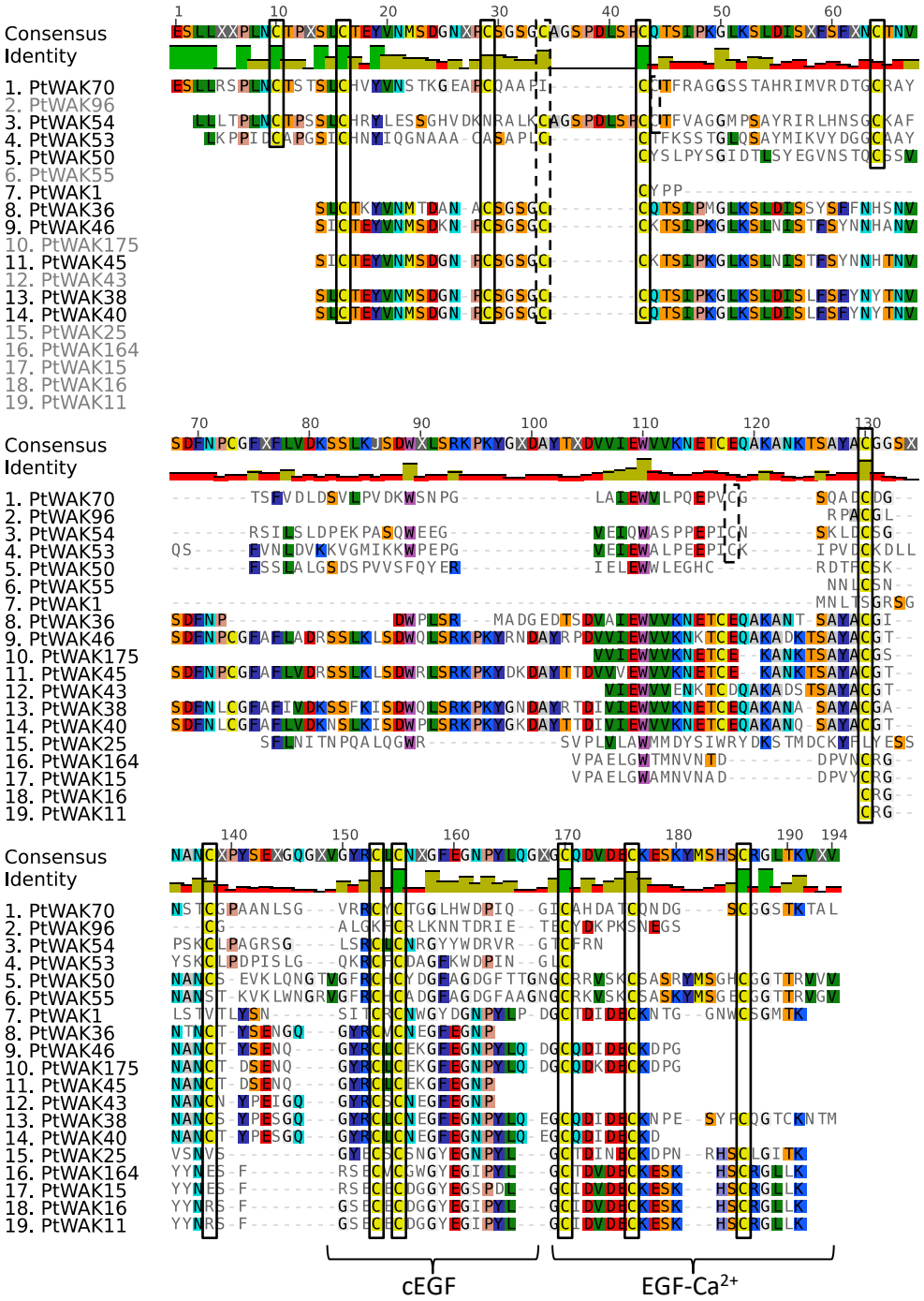


Figure 26. Alignement des 150 acides aminés extracellulaires de PtWAK70 avec la séquence correspondante d'autres WAKs

L'alignement réalisé sous le logiciel MUSCLE est composé les 150 acides aminés de la partie extracellulaire de PtWAK70 non annotée avec la séquence correspondante d'autres WAKs. Les 12 cystéines conservées sont encadrées par un trait plein alors que les 2 cystéines spécifiques de PtWAK70 et la cystéine manquante sont encadrées par un trait pointillé. Les régions codant les domaines cEGF et EGFCa^{2+} d'autres séquences sont annotées.

N-terminale de la protéine qui contient le domaine GubWAK. Chez le peuplier, la taille obtenue d'environ 57 kDa correspond à la prédiction lorsque l'on retire la partie N-terminale de PtWAK70 jusqu'à la fin du domaine GubWAK. Nous pouvons alors nous demander si cette partie de la protéine serait cassée mécaniquement lors du broyage. L'identification par spectrométrie de masse des peptides correspondant au début de la protéine immunoprécipitée permettrait d'invalider cette hypothèse.

Nous émettons l'hypothèse que PtWAK70 pourrait être impliquée dans les mécanismes de perception de l'inclinaison suite à des modifications d'interactions avec des protéines apoplastiques. En effet, un exemple d'interaction entre la protéine AtWAK1 et une protéine apoplastique AtGRP3 a été démontrée chez Arabidopsis (Park *et al.*, 2001). Bien que PtWAK70 ne comporte pas de domaine EGF-like, sa séquence protéique comporte 14 cystéines sur les 150 acides aminés entre le domaine GubWAK et la région transmembranaire. Les cystéines conservées correspondent aux cystéines des domaines EGF d'autres protéines WAKs de peuplier (Figure 26). Les acides aminés entre ces cystéines varient pour PtWAK70 par rapport aux autres séquences ce qui explique qu'aucun domaine EGF-like ne soit détecté par analyses bioinformatiques. Toutefois, la conservation des résidus cystéine laisse penser que PtWAK70 présente un autre type de domaine EGF-like qui pourrait intervenir dans des interactions avec des protéines apoplastiques. Pour effectuer la recherche d'interacteurs cellulaires, nous avons choisi de réaliser une construction fusion GST-WAK. Par la technique du « pull-down », il devrait être possible d'isoler des interacteurs potentiels de PtWAK70. Ces protéines identifiées pourront être identifiées par spectrométrie de masse. Parmi les différentes techniques existantes, celle-ci offre un bon compromis entre rapidité d'exécution et coût. Par exemple, une technique *in vivo* comme le double hybride est beaucoup plus longue à mettre en place. De plus, les techniques *in vitro* permettent d'ajuster le pH réactionnel et donc de mimer les conditions apoplastiques acides (Grignon and Sentenac, 1991). Des méthodes alternatives comme le Blue Native PAGE (Wittig *et al.*, 2006) développée pour l'identification de complexe protéiques membranaires pourront être utilisées pour vérifier l'existence des interactions.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nos études ont porté sur l'analyse de la perception et/ou réponse précoce à l'inclinaison. Ces phénomènes principalement étudiés chez des plantes annuelles (Toyota and Gilroy, 2013) ont encore été peu identifiés chez des plantes vivaces et chez les arbres. Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans ce contexte biologique chez l'arbre modèle peuplier. Nous avons supposé que les WAKs pourraient avoir un rôle dans la perception/réponse précoce à l'inclinaison dans les tiges en croissance secondaire. Toutefois, aucune étude spécifique des WAKs chez le peuplier n'avait été réalisée. Seule une étude globale d'analyse de l'évolution de récepteurs kinases chez différentes espèces mentionnait la présence de WAKs chez le peuplier et ne dénombre que 68 gènes (Lehti-Shiu *et al.*, 2009). Nous avons alors caractérisé les membres de la famille multigénique WAK chez le peuplier afin d'estimer l'ampleur de cette famille qui est très inégale entre différentes espèces (He *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005). Cette étude nous a permis d'identifier 175 membres WAKs chez le peuplier. Nous avons alors souhaité identifier parmi ceux-ci des gènes qui pourraient être impliqués dans la perception de l'inclinaison et/ou dans la réponse précoce.

1. Implication dans la réponse précoce à un stimulus gravitropique

Nous avons émis l'hypothèse que les WAKs seraient impliquées dans la réponse précoce à un stimulus gravitropique. Comme les WAKs chez Arabidopsis interviennent dans le contrôle de l'élongation cellulaire (Kohorn *et al.*, 2006b), nous avons supposé qu'une expression différentielle d'un ou plusieurs gènes WAKs entre les faces supérieure et inférieure de la tige suite à un stimulus gravitropique suggèrerait un rôle dans le contrôle de l'élongation cellulaire des nouvelles cellules qui après maturation composeront les tissus de tension et opposés. En effet, des plants de peuplier en croissance secondaire inclinés vont produire pour se redresser du bois de tension (Coutand *et al.*, 2014). Le bois de tension mis en place est produit à partir du méristème secondaire qu'est le cambium et des cellules de ce bois (fibres et vaisseaux) sont plus longues que celles dans le bois opposé (Jourez *et al.*, 2001). Dans des plantes inclinées en condition de lumière isotropique, PtWAK71 présente une différence d'accumulation dans les tissus du xylème entre les faces supérieure et inférieure de la tige. PtWAK71 pourrait alors avoir un rôle dans le contrôle de l'élongation des cellules des bois de tension et opposés. L'analyse anatomique des cellules de ces bois suite à l'inclinaison de plants de peuplier mutés pour ce gène pourrait apporter des éléments de réponse, bien que l'absence de PtWAK71 puisse être masquée par une redondance fonctionnelle d'un autre membre de la famille multigénique. L'expression différentielle entre les faces supérieure et inférieure est également observée pour PtWAK106 qui a une accumulation des transcrits modulée

dans les tissus de l'écorce. L'étude fonctionnelle de ce gène qui code une protéine kinase cytoplasmique pourrait être le point de départ de l'identification de voies de phosphorylation dans des cellules de l'écorce qui pourraient être modulées suite à l'inclinaison.

Lors de la réponse précoce à l'inclinaison, il pourrait également se produire une modification des interactions entre la partie extracellulaire des WAKs et les sucres pariétaux. En effet, parmi les 8 gènes dont l'accumulation des transcrits est régulée dans les tissus de la tige après une stimulation gravitropique de plants cultivés en serre, 6 codent des PtWAK-RLK (*PtWAK020*, *PtWAK044*, *PtWAK070*, *PtWAK084*, *PtWAK089* et *PtWAK126*). Les 6 protéines transmembranaires sont potentiellement capables de se lier à la paroi cellulaire (Kohorn *et al.*, 2009) car elles contiennent le domaine GubWAK qui permet l'interaction avec les pectines dans une conformation dépendante du calcium (Decreux and Messiaen, 2005; Decreux *et al.*, 2006). Cependant, cette capacité d'interaction reste à être démontrée chez le peuplier. Les modifications de liaison des WAKs à la paroi pourraient se faire suite aux flux de calcium engendrés par un stimulus gravitropique (Gehring *et al.*, 1990) ce qui pourrait modifier l'activité du domaine kinase intracellulaire lors de la réponse cellulaire à la gravistimulation. En effet, même s'il n'y a pas de travaux montrant directement le rôle du calcium dans la réponse à la stimulation gravitropique chez les arbres, des études menées sur des plantes herbacées tendent à montrer un rôle de ce messager secondaire dans la signalisation précoce suite à l'inclinaison (Plieth and Trewavas, 2002). Azri *et al.* (2009) suggèrent indirectement un rôle du calcium chez le peuplier dans une analyse globale du protéome au travers la régulation de la quantité d'une protéine de stockage du calcium (calreticuline1) après gravistimulation.

2. Implication dans la perception d'un stimulus gravitropique

Nous faisons aussi l'hypothèse que les WAKs seraient impliquées dans la perception de l'inclinaison selon le modèle de pression gravitaire (Baluška and Volkmann, 2011). Dans ce cas, l'inclinaison appliquée à un organe modifierait les contraintes mécaniques entre la membrane plasmique et la paroi des cellules. Les WAKs sont des protéines transmembranaires capables de se lier aux pectines de la paroi chez Arabidopsis (Decreux and Messiaen, 2005; Kohorn *et al.*, 2009) et donc potentiellement des senseurs des modulations de ces contraintes appliquées au continuum CPMCW. L'étirement, la torsion ou la compression de la protéine pourraient modifier (i) la conformation tridimensionnelle de cette protéine de type RLK (transmembranaire), (ii) des interactions de la partie extracellulaire avec des protéines apoplastiques ou (iii) des interactions avec des sucres pariétaux. Ces modifications pourraient potentiellement provoquer la modulation de l'activité kinase de la

partie intracellulaire de la protéine. Ces hypothèses impliquent que les WAKs seraient des protéines constitutives du continuum CPMCW, ce que nos données suggèrent chez le peuplier. En effet, parmi les 47 WAKs exprimées dans la tige, 36 sont transcrites aussi bien dans les plantes droites et inclinées. Nous avons étudié plus spécifiquement au sein de la famille multigénique PtWAK70 (qui est une PtWAK-RLK) qui semble localisée au niveau de cellules du phloème secondaire ainsi que du xylème secondaire en formation dans des plantes droites et inclinées cultivées en serre. Nous avons construit une protéine fusion afin d'identifier ses potentiels interacteurs protéiques apoplastiques. Pour étayer ces hypothèses, l'activité kinasique pourrait être analysée avant et après inclinaison de l'arbre, soit à l'aide d'anticorps spécifique d'une protéine WAK dans un état phosphorylée, soit à l'aide d'un anticorps anti-acide aminé phosphorylé après immunoprécipitation de protéines WAKs (Scacco *et al.*, 2000).

Une des limites à l'identification d'interacteurs réside dans l'extraction des protéines apoplastiques. En effet, aucun protocole ne permet d'extraire l'ensemble des protéines de ce compartiment cellulaire. Pour cela, le couplage de différents protocoles d'extraction semble nécessaire. Des méthodes d'infiltration de tiges de peuplier (Pechanova *et al.*, 2010) permettraient d'extraire les protéines solubles de l'apoplasme. Des protocoles plus destructifs, où après un broyage du végétal la paroi serait purifiée et les protéines de cette paroi extraites (Feiz *et al.*, 2006), pourraient être nécessaires pour obtenir des protéines plutôt liées à la paroi.

3. Les WAKs pourraient avoir des rôles dans d'autres conditions physiologiques

Nous avons supposé que les WAKs participeraient à la perception des déformations mécaniques entre la paroi et la membrane plasmique dues à une inclinaison des tiges. D'autres signaux peuvent potentiellement agir sur la mécanique du continuum CPMCW comme des contraintes extérieures à la plantes (flexion d'organes) ou internes causant des variations de la taille cellulaire (croissance des cellules environnantes, stress salin, froid ou hydrique). En effet, Haswell et Verslues (2015) proposent que des récepteurs kinases puissent percevoir des contraintes mécaniques entre le protoplaste et la paroi causées par des variations de la pression de turgescence. Certaines données de la littérature tendent à soutenir notre hypothèse.

La plante *Craterostigma plantagineum* est une plante très utilisée pour les études de la réponse au stress hydrique car elle peut survivre à de forts niveaux de déshydratation (Bartels and Salamini, 2001). Giarola *et al.* (2016) proposent que les modifications des pectines induites par la

déshydratation de la paroi de *C. plantagineum* auraient un rôle dans l'activité du complexe formé par une WAK (CpWAK1) et une protéine riche en glycine (CpGRP1). De Oliveira *et al.* (2014) montrent que l'accumulation des transcrits *WAK* chez le riz est modulée suite à un stress froid. De plus, après 28h de froid, la concentration en saccharose augmente et l'activité d'une pectine methyl-estérase est augmentée ce qui diminue la quantité de pectines des parois des cellules de feuilles de maïs (Bilska-Kos *et al.*, 2016). Les auteurs suggèrent que les WAKs pourraient intervenir dans ces mécanismes. Toutefois, il serait intéressant de déterminer si des membres différents de la famille multigénique sont spécifiquement impliqués dans l'un ou l'autre de ces processus ou si un ou plusieurs membres de la famille sont spécialisés dans la réponse à la déformation du continuum CPMCW quelle qu'en soit l'origine.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont permis la caractérisation de la famille WAK chez le peuplier qui est la plus grande jamais identifiée. Ils montrent également que certains gènes *PtWAKs* présentent une modification de l'accumulation des transcrits suite à une gravistimulation ce qui sous-entendrait qu'ils pourraient jouer un rôle dans la réponse précoce qui suit ce stimulus. Nous avons également initié l'étude à l'échelle protéique où nous avons localisé la protéine PtWAK70 dans les tissus de la tige de peuplier en croissance secondaire, si les études visant à valider l'anticorps anti-WAK70 sont concluantes. Nous avons enfin créé une protéine fusion GST avec la partie extracellulaire de PtWAK70 afin d'identifier de potentiels interacteurs apoplastiques qui pourraient être impliqués dans l'initiation de voies de signalisation suite à un stimulus gravitropique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anderson, C., Wagner, T., Perret, M., He, Z.-H., He, D., and Kohorn, B. (2001). WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. Plant Mol Biol *47*, 197-206.

Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E.*, et al.* (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic Acids Research *40*, W597-W603.

Azri, W., Chambon, C., Herbette, S., Brunel, N., Coutand, C., Leplé, J.-C., Ben Rejeb, I., Ammar, S., Julien, J.-L., and Roeckel-Drevet, P. (2009). Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation. Physiologia Plantarum *136*, 193-208.

Baluška, F., Šamaj, J., Wojtaszek, P., Volkmann, D., and Menzel, D. (2003). Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall Continuum in Plants. Emerging Links Revisited. Plant Physiology *133*, 482-491.

Baluška, F., and Volkmann, D. (2011). Mechanical Aspects of Gravity-Controlled Growth, Development and Morphogenesis. In Mechanical Integration of Plant Cells and Plants, P. Wojtaszek, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 195-223.

Bartels, D., and Salamini, F. (2001). Desiccation Tolerance in the Resurrection PlantCraterostigma plantagineum. A Contribution to the Study of Drought Tolerance at the Molecular Level. Plant Physiology *127*, 1346-1353.

Bilska-Kos, A., Solecka, D., Dziewulska, A., Ochodzki, P., Jończyk, M., Bilski, H., and Sowiński, P. (2016). Low temperature caused modifications in the arrangement of cell wall pectins due to changes of osmotic potential of cells of maize leaves (Zea mays L.). Protoplasma, 1-12.

Blancaflor, E.B. (2013). Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton. American Journal of Botany *100*, 143-152.

Boonsirichai, K., Sedbrook, J.C., Chen, R., Gilroy, S., and Masson, P.H. (2003). ALTERED RESPONSE TO GRAVITY Is a Peripheral Membrane Protein That Modulates Gravity-Induced Cytoplasmic Alkalinization and Lateral Auxin Transport in Plant Statocytes. The Plant Cell *15*, 2612-2625.

Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 9452-9457.

Caffall, K.H., and Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydrate Research *344*, 1879-1900.

Chae, L., Sudat, S., Dudoit, S., Zhu, T., and Luan, S. (2009). Diverse Transcriptional Programs Associated with Environmental Stress and Hormones in the Arabidopsis Receptor-Like Kinase Gene Family. Molecular Plant *2*, 84-107.

Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol Biol Rep *11*, 113-116.

Cock, J.M., Vanoosthuyse, V., and Gaude, T. (2002). Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. Current Opinion in Cell Biology *14*, 230-236.

Correll, M., Pyle, T., Millar, K.L., Sun, Y., Yao, J., Edelmann, R., and Kiss, J. (2013). Transcriptome analyses of Arabidopsis thaliana seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes. Planta *238*, 519-533.

Coutand, C., Adam, B., Ploquin, S., Lopez, D., and Moulia, B. (2015). Quantification and comparison of phototropic and gravitropic sensitivities of three hardwood species by original isotropic light devices and model-assisted phenotyping. Paper presented at: 8th Plant Biomechanics International Conference (Nagoya, Japan, Nagoya University).

Coutand, C., Fournier, M., and Moulia, B. (2007). The Gravitropic Response of Poplar Trunks: Key Roles of Prestressed Wood Regulation and the Relative Kinetics of Cambial Growth versus Wood Maturation. Plant Physiology *144*, 1166-1180.

Coutand, C., Pot, G., and Badel, E. (2014). Mechanosensing is involved in the regulation of autostress levels in tension wood. Trees *28*, 687-697.

Czapek, F. (1898). Weitere beiträge zur kenntniss der geotropischen reizbewegungen. Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik *32*, 175-308.

De Oliveira, L.F.V., Christoff, A.P., de Lima, J.C., de Ross, B.C.F., Sachetto-Martins, G., Margis-Pinheiro, M., and Margis, R. (2014). The Wall-associated Kinase gene family in rice genomes. Plant Science *229*, 181-192.

Decreux, A., and Messiaen, J. (2005). Wall-associated Kinase WAK1 Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-induced Conformation. Plant and Cell Physiology *46*, 268-278.

Decreux, A., Thomas, A., Spies, B., Brasseur, R., Cutsem, P.V., and Messiaen, J. (2006). In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. Phytochemistry *67*, 1068-1079.

Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate, G., and Leplé, J.-C. (2010). Wood formation in Angiosperms. Comptes Rendus Biologies *333*, 325-334.

Diener, A.C., and Ausubel, F.M. (2005). RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1, a Dominant Arabidopsis Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific. Genetics *171*, 305-321.

Feiz, L., Irshad, M., F Pont-Lezica, R., Canut, H., and Jamet, E. (2006). Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from Arabidopsis hypocotyls. Plant Methods *2*, 1-13.

Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P.N., and Tasaka, M. (1998). Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal *14*, 425-430.

Gao, L.-L., and Xue, H.-W. (2012). Global Analysis of Expression Profiles of Rice Receptor-Like Kinase Genes. Molecular Plant *5*, 143-153.

Gehring, C.A., Williams, D.A., Cody, S.H., and Parish, R.W. (1990). Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. Nature *345*, 528-530.

Gerttula, S., Zinkgraf, M., Muday, G.K., Lewis, D.R., Ibatullin, F.M., Brumer, H., Hart, F., Mansfield, S.D., Filkov, V., and Groover, A. (2015). Transcriptional and Hormonal Regulation of Gravitropism of Woody Stems in Populus. The Plant Cell *27*, 2800-2813.

Giarola, V., Krey, S., Driesch, B., and Bartels, D. (2016). The Craterostigma plantagineum glycine-rich protein CpGRP1 interacts with a cell wall-associated protein kinase 1 (CpWAK1) and accumulates in leaf cell walls during dehydration. New Phytologist *210*, 535-550.

Grignon, C., and Sentenac, H. (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. Annual Review of Plant Biology *42*, 103-128.

Guo, H., Li, L., Aluru, M., Aluru, S., and Yin, Y. (2013). Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. Current Opinion in Plant Biology *16*, 545-553.

Harholt, J., Suttangkakul, A., and Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of Pectin. Plant Physiology *153*, 384-395.

Haswell, Elizabeth S., Phillips, R., and Rees, Douglas C. (2011). Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It? Structure *19*, 1356-1369.

Haswell, E.S., and Verslues, P.E. (2015). The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. The Journal of General Physiology *145*, 389-394.

He, Z.-H., Cheeseman, I., He, D., and Kohorn, B. (1999). A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1–5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. Plant Mol Biol *39*, 1189-1196.

He, Z.-H., Fujiki, M., and Kohorn, B.D. (1996). A Cell Wall-associated, Receptor-like Protein Kinase. Journal of Biological Chemistry *271*, 19789-19793.

He, Z.-H., He, D., and Kohorn, B.D. (1998). Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. The Plant Journal *14*, 55-63.

Hou, X., Tong, H., Selby, J., DeWitt, J., Peng, X., and He, Z.-H. (2005). Involvement of a Cell Wall-Associated Kinase, WAKL4, in Arabidopsis Mineral Responses. Plant Physiology *139*, 1704-1716.

Hu, W., Lv, Y., Lei, W., Li, X., Chen, Y., Zheng, L., Xia, Y., and Shen, Z. (2014). Cloning and characterization of the Oryza sativa wall-associated kinase gene OsWAK11 and its transcriptional response to abiotic stresses. Plant Soil *384*, 335-346.

Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z., and Cai, W. (2005). Nitric Oxide Mediates Gravitropic Bending in Soybean Roots. Plant Physiology *137*, 663-670.

Hurni, S., Scheuermann, D., Krattinger, S.G., Kessel, B., Wicker, T., Herren, G., Fitze, M.N., Breen, J., Presterl, T., and Ouzunova, M. (2015). The maize disease resistance gene Htn1 against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences *112*, 8780-8785.

Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E. (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the CLAVATA1 Receptor-like Kinase. The Plant Cell *11*, 1925-1933.

Jourez, B., Riboux, A., and Leclercq, A. (2001). Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (Populus euramericana cv 'Ghoy'). IAWA Journal *22*, 133-157.

Kanneganti, V., and Gupta, A. (2011). RNAi mediated silencing of a wall associated kinase, OsiWAK1 in Oryza sativa results in impaired root development and sterility due to anther indehiscence. Physiol Mol Biol Plants *17*, 65-77.

Kasprowicz, A., Smolarkiewicz, M., Wierzchowiecka, M., Michalak, M., and Wojtaszek, P. (2011). Introduction: Tensegral World of Plants. In Mechanical Integration of Plant Cells and Plants, P. Wojtaszek, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-25.

Kaur, R., Singh, K., and Singh, J. (2013). A root-specific wall-associated kinase gene, HvWAK1, regulates root growth and is highly divergent in barley and other cereals. Funct Integr Genomics *13*, 167-177.

Kohorn, B.D. (2016). Cell wall-associated kinases and pectin perception. Journal of Experimental Botany *67*, 489-494.

Kohorn, B.D., Johansen, S., Shishido, A., Todorova, T., Martinez, R., Defeo, E., and Obregon, P. (2009). Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. The Plant Journal *60*, 974-982.

Kohorn, B.D., Kobayashi, M., Johansen, S., Friedman, H.P., Fischer, A., and Byers, N. (2006a). Wall-associated kinase 1 (WAK1) is crosslinked in endomembranes, and transport to the cell surface requires correct cell-wall synthesis. Journal of Cell Science *119*, 2282-2290.

Kohorn, B.D., Kobayashi, M., Johansen, S., Riese, J., Huang, L.-F., Koch, K., Fu, S., Dotson, A., and Byers, N. (2006b). An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. The Plant Journal *46*, 307-316.

Kohorn, B.D., and Kohorn, S.L. (2012). The Cell Wall Associated Kinases, WAKs, As Pectin Receptors. Frontiers in Plant Science *3*, 88.

Kohorn, B.D., Kohorn, S.L., Saba, N.J., and Martinez, V.M. (2014). Requirement for Pectin Methyl Esterase and Preference for Fragmented over Native Pectins for Wall-associated Kinase-activated, EDS1/PAD4-dependent Stress Response in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry *289*, 18978-18986.

Kohorn, B.D., Kohorn, S.L., Todorova, T., Baptiste, G., Stansky, K., and McCullough, M. (2012). A Dominant Allele of Arabidopsis Pectin-Binding Wall-Associated Kinase Induces a Stress Response Suppressed by MPK6 but Not MPK3 Mutations. Molecular Plant *5*, 841-851.

Kohorn, B.D., Lane, S., and Smith, T.A. (1992). An Arabidopsis serine/threonine kinase homologue with an epidermal growth factor repeat selected in yeast for its specificity for a thylakoid membrane protein. Proceedings of the National Academy of Sciences *89*, 10989-10992.

Kojika, S., and Griffin, J.D. (2001). Notch receptors and hematopoiesis. Experimental Hematology *29*, 1041-1052.

Konlasuk, S., Xing, Y., Zhang, N., Zuo, W., Zhang, B., Tan, G., and Xu, M. (2015). ZmWAK, a quantitative resistance gene to head smut in maize, improves yield performance by reducing the endophytic pathogen Sporisorium reiliana. Mol Breeding *35*, 1-10.

Lally, D., Ingmire, P., Tong, H.-Y., and He, Z.-H. (2001). Antisense Expression of a Cell Wall–Associated Protein Kinase, WAK4, Inhibits Cell Elongation and Alters Morphology. The Plant Cell *13*, 1317-1332.

Lehti-Shiu, M.D., and Shiu, S.-H. (2012). Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences *367*, 2619-2639.

Lehti-Shiu, M.D., Zou, C., Hanada, K., and Shiu, S.-H. (2009). Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Genes. Plant Physiology *150*, 12-26.

Li, H., Zhou, S.-Y., Zhao, W.-S., Su, S.-C., and Peng, Y.-L. (2009). A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, OsWAK1, plays important roles in rice blast disease resistance. Plant Mol Biol *69*, 337-346.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods *25*, 402-408.

Lopez, D., Bronner, G., Brunel, N., Auguin, D., Bourgerie, S., Brignolas, F., Carpin, S., Tournaire-Roux, C., Maurel, C., Fumanal, B*., et al.* (2012). Insights into Populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. Journal of Experimental Botany *63*, 2217-2230.

Lopez, D., Tocquard, K., Venisse, J.-S., Legué, V., and Roeckel-Drevet, P. (2014). Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. Frontiers in Plant Science *5*, 610.

Mayer, U., Nischt, R., Pöschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y., and Timpl, R. (1993). A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. The EMBO Journal *12*, 1879-1885.

Meier, S., Ruzvidzo, O., Morse, M., Donaldson, L., Kwezi, L., and Gehring, C. (2010). The Arabidopsis <italic>Wall Associated Kinase-Like 10</italic> Gene Encodes a Functional Guanylyl Cyclase and Is Co-Expressed with Pathogen Defense Related Genes. PLoS ONE *5*, e8904.

Monshausen, G.B., and Gilroy, S. (2009). Feeling green: mechanosensing in plants. Trends in Cell Biology *19*, 228-235.

Monshausen, G.B., and Haswell, E.S. (2013). A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. Journal of Experimental Botany *64*, 4663-4680.

Morita, M.T. (2010). Directional Gravity Sensing in Gravitropism. Annual Review of Plant Biology *61*, 705-720.

Morita, M.T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., Nakano, A., and Tasaka, M. (2002). Involvement of the Vacuoles of the Endodermis in the Early Process of Shoot Gravitropism in Arabidopsis. The Plant Cell *14*, 47-56.

Morizet, J., and Mingeau, M. (1976). Influence des facteurs de milieu sur l'absorption hydrique. Etude effectuee sur tomate decapitee en exsudation. i. facteurs nutritionnels. Paper presented at: Annales agronomiques.

Mullen, J.L., Ishikawa, H., and Evans, M.L. (1998). Analysis of changes in relative elemental growth rate patterns in the elongation zone of Arabidopsis roots upon gravistimulation. Planta *206*, 598-603.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum *15*, 473-497.

Novaes, R., Rodrigues, J., and Lovato, M. (2009). An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. Genet Mol Res *8*, 86-96.

Park, A.R., Cho, S.K., Yun, U.J., Jin, M.Y., Lee, S.H., Sachetto-Martins, G., and Park, O.K. (2001). Interaction of the Arabidopsis Receptor Protein Kinase Wak1 with a Glycine-rich Protein, AtGRP-3. Journal of Biological Chemistry *276*, 26688-26693.

Pechanova, O., Hsu, C.-Y., Adams, J.P., Pechan, T., Vandervelde, L., Drnevich, J., Jawdy, S., Adeli, A., Suttle, J.C., Lawrence, A.M.*, et al.* (2010). Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. BMC Genomics *11*, 1-22.

Perbal, G., and Driss-Ecole, D. (2003). Mechanotransduction in gravisensing cells. Trends in Plant Science *8*, 498-504.

Perera, I.Y., Heilmann, I., and Boss, W.F. (1999). Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 5838-5843.

Perera, I.Y., Heilmann, I., Chang, S.C., Boss, W.F., and Kaufman, P.B. (2001). A Role for Inositol 1,4,5-Trisphosphate in Gravitropic Signaling and the Retention of Cold-Perceived Gravistimulation of Oat Shoot Pulvini. Plant Physiology *125*, 1499-1507.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research *29*, e45.

Pfeffer, W. (1894). Geotropic Sensitiveness of the Root-tip. Annals of Botany *os-8*, 317-320.

Pickard, B., and Ding, J. (1993). The Mechanosensory Calcium-Selective Ion Channel: Key Component of a Plasmalemmal Control Centre? Functional Plant Biology *20*, 439-459.

Pickard, B.G. (2007). Delivering Force and Amplifying Signals in Plant Mechanosensing. In Current Topics in Membranes (Academic Press), pp. 361-392.

Pilate, G., Déjardin, A., Laurans, F., and Leplé, J.-C. (2004). Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. New Phytologist *164*, 63-72.

Plieth, C., and Trewavas, A.J. (2002). Reorientation of Seedlings in the Earth's Gravitational Field Induces Cytosolic Calcium Transients. Plant Physiology *129*, 786-796.

Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001). Wood Formation in Trees. Plant Physiology *127*, 1513-1523.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing).

Rosli, H., Zheng, Y., Pombo, M., Zhong, S., Bombarely, A., Fei, Z., Collmer, A., and Martin, G. (2013). Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity. Genome Biology *14*, R139.

Sack, F.D. (1997). Plastids and gravitropic sensing. Planta *203*, S63-S68.

Sasaki, M., Kleinman, H.K., Huber, H., Deutzmann, R., and Yamada, Y. (1988). Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. Journal of Biological Chemistry *263*, 16536-16544.

Scacco, S., Vergari, R., Scarpulla, R.C., Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A., Lambo, R., Lorusso, V., and Papa, S. (2000). cAMP-dependent Phosphorylation of the Nuclear Encoded 18-kDa (IP) Subunit of Respiratory Complex I and Activation of the Complex in Serum-starved Mouse Fibroblast Cultures. Journal of Biological Chemistry *275*, 17578-17582.

Sedbrook, J.C., Chen, R., and Masson, P.H. (1999). ARG1 (Altered Response to Gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 1140-1145.

Shiu, S.-H., and Bleecker, A.B. (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. Science Signaling *2001*, re22-re22.

Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.-H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F., Volkmann, D., and Matsumoto, H. (2003). Aluminum-Induced Gene Expression and Protein Localization of a Cell Wall-Associated Receptor Kinase in Arabidopsis. Plant Physiology *132*, 2256-2266.

Stanga, J.P., Boonsirichai, K., Sedbrook, J.C., Otegui, M.S., and Masson, P.H. (2009). A Role for the TOC Complex in Arabidopsis Root Gravitropism. Plant Physiology *149*, 1896-1905.

Stenflo, J., Stenberg, Y., and Muranyi, A. (2000). Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology *1477*, 51-63.

Strohm, A.K., Barrett-Wilt, G.A., and Masson, P.H. (2014). A functional TOC complex contributes to gravity signal transduction in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science *5*, 148.

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

Ten Hove, C.A., Bochdanovits, Z., Jansweijer, V.M., Koning, F.G., Berke, L., Sanchez-Perez, G.F., Scheres, B., and Heidstra, R. (2011). Probing the roles of LRR RLK genes in Arabidopsis thaliana roots using a custom T-DNA insertion set. Plant Mol Biol *76*, 69-83.

Thisse, C., and Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. Nature protocols *3*, 59-69.

Tocquard, K., Lafon-Placette, C., Auguin, D., Muries, B., Bronner, G., Lopez, D., Fumanal, B., Franchel, J., Bourgerie, S., Maury, S.*, et al.* (2014a). In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale genomic expansion potentially connected with functional diversification in Populus. Tree Genetics & Genomes *10*, 1135-1147.

Tocquard, K., Lopez, D., Decourteix, M., Thibaut, B., Julien, J.-L., Label, P., Leblanc-Fournier, N., and Roeckel-Drevet, P. (2014b). The Molecular Mechanisms of Reaction Wood Induction. In The Biology of Reaction Wood, B. Gardiner, J. Barnett, P. Saranpää, and J. Gril, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 107-138.

Toyota, M., Furuichi, T., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2008). Cytoplasmic Calcium Increases in Response to Changes in the Gravity Vector in Hypocotyls and Petioles of Arabidopsis Seedlings. Plant Physiology *146*, 505-514.

Toyota, M., and Gilroy, S. (2013). Gravitropism and mechanical signaling in plants. American Journal of Botany *100*, 111-125.

Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., and Clark, S.E. (1999). The CLAVATA1 Receptor-like Kinase Requires CLAVATA3 for Its Assembly into a Signaling Complex That Includes KAPP and a Rho-Related Protein. The Plant Cell *11*, 393-405.

Tsugeki, R., and Fedoroff, N.V. (1999). Genetic ablation of root cap cells in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences *96*, 12941-12946.

Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A.*, et al.* (2006). The Genome of Black Cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray). Science *313*, 1596-1604.

Verica, J.A., Chae, L., Tong, H., Ingmire, P., and He, Z.-H. (2003). Tissue-Specific and Developmentally Regulated Expression of a Cluster of Tandemly Arrayed Cell Wall-Associated Kinase-Like Kinase Genes in Arabidopsis. Plant Physiology *133*, 1732-1746.

Verica, J.A., and He, Z. (2002). The Cell Wall-Associated Kinase (WAK) and WAK-Like Kinase Gene Family. Plant Physiology *129*, 455-459.

Wagner, T.A., and Kohorn, B.D. (2001). Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion. The Plant Cell *13*, 303-318.

Wang, Z., Du, S., Dayanandan, S., Wang, D., Zeng, Y., and Zhang, J. (2014). Phylogeny Reconstruction and Hybrid Analysis of <italic>Populus</italic> (Salicaceae) Based on Nucleotide Sequences of Multiple Single-Copy Nuclear Genes and Plastid Fragments. PLoS ONE *9*, e103645.

Wittig, I., Braun, H.-P., and Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. Nat Protocols *1*, 418-428.

Wouters, M.A., Rigoutsos, I., Chu, C.K., Feng, L.L., Sparrow, D.B., and Dunwoodie, S.L. (2005). Evolution of distinct EGF domains with specific functions. Protein Science *14*, 1091-1103.

Yang, E.J., Oh, Y.A., Lee, E.S., Park, A.R., Cho, S.K., Yoo, Y.J., and Park, O.K. (2003). Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in Arabidopsis. Biochemical and Biophysical Research Communications *305*, 862-868.

Yang, K., Qi, L., and Zhang, Z. (2014). Isolation and characterization of a novel wall-associated kinase gene TaWAK5 in wheat (Triticum aestivum). The Crop Journal *2*, 255-266.

Zhang, S., Chen, C., Li, L., Meng, L., Singh, J., Jiang, N., Deng, X.-W., He, Z.-H., and Lemaux, P.G. (2005). Evolutionary Expansion, Gene Structure, and Expression of the Rice Wall-Associated Kinase Gene Family. Plant Physiology *139*, 1107-1124.

Zhou, S., Zhao, W., Li, H., Guo, Z., and Peng, Y.-L. (2008). Characterization of a Novel RING Finger Gene OsRFP1, which is Induced by Ethylene, Salicylic Acid and Blast Fungus Infection in Rice. Journal of Phytopathology *156*, 396-402.

Zuo, W., Chao, Q., Zhang, N., Ye, J., Tan, G., Li, B., Xing, Y., Zhang, B., Liu, H., Fengler, K.A.*, et al.* (2015). A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. Nat Genet *47*, 151-157.

Liste des communications

Communications orales à des congrès avec comité de lecture

10th congrès du réseau francais des parois, Amiens, France – 2014

« Caractérisation des WAKs (Wall associated Kinase) chez Populus et implication dans la réponse gravitropique »

- *Prix de la meilleure communication orale*

Les interactions entre la paroi cellulaire, la membrane plasmique et le cytoplasme sont primordiales pour le bon fonctionnement cellulaire. Différentes molécules assurent la communication au niveau de ce continuum, dont les récepteurs kinases. Parmi ces récepteurs, les protéines WAKs (Wall-Associated Kinases) peuvent être liées de façon covalente aux pectines de la paroi. Chez les espèces ligneuses, les WAKs joueraient un rôle décisif lors de la croissance et du développement de l'arbre. Une des principales caractéristiques des arbres est leur pérennité et la production de bois via le méristème secondaire. Cela implique des réponses de croissance à long-terme dans des conditions environnementales fluctuantes. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse in silico des WAKs chez Populus trichocarpa qui a révélé 175 membres réunis majoritairement en clusters génomiques. C'est la plus grande famille multigénique WAK décrite jusqu'à présent. Nous avons mis en évidence l'existence de nouveaux domaines nommés GubWAK, WAK et WAKassoc. Associés aux domaines déjà connus (EGF et kinase), ils ont permis de classer les WAKs en 119 PtWAK-RLK (Receptor-Like Kinase), 32 PtWAK-RCLK (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase), 22 PtWAK-RLP (Receptor-Like Protein) et 2 PtWAK-gènes courts. Ensuite, nous avons analysé l'expression des WAKs chez Populus tremula x alba notre matériel d'étude expérimentale suite à un stimulus gravitropique. L'expression différentielle de certaines WAKs suggère leur implication dans la réponse précoce à un stimulus gravitropique, qui entraine de profondes modifications du processus de maturation des parois de cellules du bois. Ces modifications microstructurales des parois génèrent une contrainte périphérique asymétrique qui permet le redressement de l'arbre.

Communications affichées

17ème Journée de l'école doctorale des sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, Clermont Ferrand, France – 2014

« Une analyse in silico des WAKs (Wall Associated Kinases) révèle une large expansion génomique potentiellement connectée avec de la divergence fonctionnelle chez le peuplier »

Tocquard K, Venisse JS, Roeckel-Drevet P

Les kinases associées à la paroi végétale (WAKs, Wall-Associated Kinases) forment une famille de protéines impliquées dans les réponses aux pathogènes et dans l'élongation cellulaire chez Arabidopsis thaliana. Elles appartiennent à la grande famille des récepteurs kinases (RLK, Receptor-Like Kinase) des plantes. Grâce à leur architecture transmembranaires et à leur connexion à la paroi cellulaire, les WAKs sont des candidats à la perception et à la propagation de signaux extracellulaires.

Notre étude est la première caractérisation de cette famille WAKs chez une espèce ligneuse, le peuplier Populus trichocarpa. Une analyse in silico révèle 175 gènes PtWAKs classifiés en 4 groupes en fonction de la composition en domaines protéiques. Il s'agit de la plus grande famille WAK montrée à l'heure actuelle chez les plantes. Parmi ses membres, 91,5% des WAKs sont regroupés en clusters génomiques, formés par des duplications en tandem, ce qui a contribué à l'expansion de cette famille chez le peuplier. Une recherche des données de puces microarray et d'ESTs (Expressed Sequence Tag) révèle des groupes d'expressions contrastés des membres de la famille WAKs. La combinaison d'analyse phylogénétique et d'expression montre que les membres répartis indépendamment sur le génome semblent principalement régulés lors de processus de développement tandis que les membres regroupés en clusters semblent impliqués dans des phénomènes de résistance. Cette analyse offre une vue d'ensemble de la structure de la famille WAK chez Populus trichocarpa qui peut être utile pour des analyses fonctionnels des différents membres.

Gordon Research Seminar and Conference, Bentley University, Waltham, MA, USA – 2015

« Study of a Wall Associated Kinase in the response to gravistimulation in poplar stems »

Tocquard K, Lopez D, Brunel-Michac N, Franchel J, Bronner G, Label P, Fumanal B, Venisse JS, Roeckel-Drevet P

Interactions between cell wall, plasma membrane and cytoplasm are essential for plant cell functions. It has been suggested that molecular actors at the interface of this continuum could be involved in gravity sensing, as described in the gravitational pressure model (Baluška and Volkmann, 2011). A change in the gravity vector would modify plasma membrane-cell wall mechanical relations with a tension between this two cell compartments at the upper side of the cell and a compression at the lower side. At the interface of the continuum, Wall-Associated Kinases (WAKs) appears as good molecular candidates. WAKs are receptor-like kinases that are able to link the pectins of the wall and a cytoplasmic protein kinase domain.

To highlight and understand the role of WAKs in woody plant graviresponse, we used in silico approaches and showed the most expanded WAK family never identified to date with 175 members

(Tocquard et al., 2014). We analyzed gene expression of the WAK family members in various organs and tissues of poplar tree and showed that WAKs were weakly expressed. Only 28 PtWAKs were expressed in the stem. One WAK is of particular interest showing differential expression after tilting of the poplar stem. The protein was localized in young xylem and bark cells devoid of amyloplasts. These data suggest that a WAK could be involved in the sensing/response to gravistimulation in a manner independent of the displacement of amyloplasts which is behind the starch-statolith hypothesis.

3rd International Symposium on Plant Signaling & Behavior, Paris, France – 2015

« The involvement of a Wall Associated Kinase in the response to gravistimulation in poplar stems »

Tocquard K, Brunel-Michac N, Venisse JS, Roeckel-Drevet P

Plants are able to sense organ tilt and reorient their growth according to the gravity vector. In angiosperm woody species, the motor for the stem straightening in parts undergoing cambial growth is differential maturation between the two sides of the stem. The dynamics of the gravitropic response involved the sensing of the local inclination angle (gravisensing) as well as the sensing of the local curvature which progressively takes place in the straightening process (Bastien, et al. 2013). If one wants to specifically address the question of the gravisensing / graviresponse in plants undergoing secondary growth, the gravistimulation should not induce organ deformation. This is why we chose to tilt staked poplar trees in our experimental design.

From this, one challenging research question is the identification of molecular actors specifically involved in gravisensing / graviresponse. Since it has been proposed that plant cells could sense gravity through the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum, wall associated kinases (WAK) with an extracellular part that can bind to pectins localized in the cell wall, appear as molecular candidates. Using in silico approaches, we showed that the WAK family in poplar is the largest characterized to date with 175 sequences. Gene expression was analyzed in various organs and tissues. Most WAKs were weakly expressed. Only 28 WAKs were expressed in the stem. One WAK is of particular interest showing differential expression after tilting of the stem. The protein was localized in young xylem and bark cells devoid of amyloplasts. These data suggest that a WAK could be involved in the sensing/response to gravistimulation in a manner independent of the displacement of amyloplats which is behind the starch-statolith hypothesis (Sack, 1997).

<u>References</u>

Bastien et al (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1&0, 755-760
Sack (1997) Planta 203, S63-S68

8th Plant Biomechanics International Conference (PBM2015), Nagoya, Japan. - 2015

“Involvement of a Wall Associated Kinase after gravistimulation in poplar stems”

Tocquard K, Brunel-Michac N, Franchel J, Fournier-Leblanc N, Venisse JS, Roeckel-Drevet P

Plants can re-orientate themselves according to the gravity vector. Response to gravistimulation is an essential mechanism whereby plants adapt to their environment. In angiosperm woody plants, reorientation of aerial parts involves the formation of tension wood which differs from normal wood by physiochemical and mechanical characteristics. Understanding the early processes leading to this wood formation is a challenging research question. Our working hypothesis is that molecular actors involved in gravisensing and/or graviresponse could be localized at a continuum between cytoskeleton-plasma membrane-cell wall as described in the gravitational pressure model (Baluška and Volkmann, 2011). A change in the gravity vector would modify plasma membrane-cell wall mechanical relations with a tension between this two cell compartments at the upper side of the cell and a compression at the lower side. At the interface of this continuum, wall associated kinases (WAKs) could be good candidates as sensors and/or actors of the cell mechanical deformation. Indeed, WAKs have an extracellular part that can bind to the pectins of the cell wall, a single transmembrane region and an intracellular kinase domain which could signal deformations between membrane and wall to the cytoplasm. Using in silico approaches, we showed in poplar the most expanded WAK family never identified to date with 175 members (Tocquard et al., 2014). We analyzed gene expression of the WAK family members in various organs and tissues of poplar tree and showed that WAKs were weakly expressed. Only 28 PtWAKs were expressed in the stem. One WAK is of particular interest showing differential expression after tilting of the poplar stem. The protein was localized in young xylem and bark cells devoid of amyloplasts. These data suggest that a WAK could be involved in the sensing/response to gravistimulation in a manner independent of the displacement of amyloplasts which is behind the starch-statolith hypothesis (Sack, 1997)

References

Baluška F., Volkmann D. (2011) Mechanical aspects of gravity-controlled growth, development and morphogenesis, in Mechanical integration of plant cells and plants, Springer Berlin Heidelberg, pp 195-223.

Sack F.D. (1997) Plastids and gravitropic sensing, Planta, 203, S63-S68.

Tocquard K., Lafon-Placette C., Auguin D., Muries B., Bronner G., Lopez D., Fumanal B., Franchel J., Bourgerie S., Maury S., Label P., Julien J.L., Roeckel-Drevet P., Venisse J.S. (2014) In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale genomic expansion potentially connected with functional diversification in Populus, Tree genetic and genomes, 10, 1135-1147.

Titre de la thèse

Gravitropisme chez le peuplier : Implication des kinases associées à la paroi (WAK) dans les événements précoces après inclinaison

Résumé

Les plantes adaptent leur croissance en fonction des facteurs environnementaux dont la gravité qui est un facteur constant. Une modification de l'orientation de la plante par rapport à l'axe de la gravité, *i.e.* une inclinaison induit une réponse de redressement : le gravitropisme. Pour les parties aériennes le gravitropisme est négatif, c'est-à-dire que les plantes vont adapter leur croissance dans la direction opposée à la gravité. Chez les arbres, le redressement est assuré par à la formation asymétrique d'un bois aux propriétés physico-chimiques particulières appelé le bois de réaction. Des récepteurs kinases pourraient participer à la perception et à la réponse précoce au stimulus gravitropique qu'est l'inclinaison. Parmi ces familles protéiques, les kinases associées à la paroi (WAK) sont des candidats intéressants. La liaison de ces protéines à la paroi permettrait de percevoir les déformations qui sont supposées se produire par l'inclinaison de la tige. Nous avons alors identifié et caractérisé pour la première fois la famille WAKs chez une espèce ligneuse, le peuplier, qui est composée de 175 membres. L'étude d'accumulation des transcrits WAKs a permis d'identifier les gènes WAKs qui s'expriment dans la tige puis l'expression de ces gènes a été suivie lors d'une cinétique après inclinaison. Il s'avère que les gènes WAKs sont faiblement exprimés et que 25% des gènes présentent une expression différentielle après inclinaison. Ces données transcriptomiques suggèrent que les WAKs participeraient aux événements cellulaires précoces après l'inclinaison de tiges chez le peuplier. Enfin, une étude plus approfondie a été initiée sur PtWAK70 qui est localisée dans le jeune xylème et le phloème secondaire. Nous avons également généré des outils moléculaires dont l'objectif est d'identifier les interacteurs potentiels de la partie apoplastique de PtWAK70.

Mots-clés

Gravitropisme, Peuplier, *Populus*, Wall Associated Kinase, WAK

Title of the manuscript

Poplar gravitropism: Implication of Wall Associated Kinase (WAK) in early events after tilting

Abstract

Plants adapt their growth to environmental factors whose gravity is a continuous one. A modification of plant orientation by tilting leads to a straightening response: gravitropism. For aerial parts, plants will adapt their growth upward (negative gravitropism). In trees, straightening is accomplished through asymmetric formation of reaction wood which exhibits modifications in its physicochemical properties. Receptors-like kinases could play a role in both perception and early response to a gravitropic stimulus. Among them, Wall-Associated Kinases (WAKs) are interesting candidates because they are bind to the cell wall. They could detect wall deformations that are supposed to occur after tilting of the stem. We identified and characterized for the first time in a woody species (poplar) the largest WAKs family with 175 members. An extensive study of WAKs transcripts accumulation was carried out to identify genes expressed in woody stem. These genes expressions were analyzed during a kinetic after tilting. WAKs genes were overall weakly expressed but 25% of analyzed genes showed a modulation in their transcript accumulation after tilting. This suggests they could play a role in early events after tilting of poplar stems. Lastly, a deeper study was initiated on PtWAK70 which is localized in young xylem and secondary phloem. We generated molecular tools to identify potentials interactors of PtWAK70 apoplastic part.

Keywords

Gravitropism, Poplar, *Populus*, Wall Associated Kinase, WAK