



HAL
open science

Biologie de développement du bois en réponse à des sollicitations mécaniques environnementales

Jeanne Roignant

► **To cite this version:**

Jeanne Roignant. Biologie de développement du bois en réponse à des sollicitations mécaniques environnementales. Biologie végétale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC032 . tel-02004248

HAL Id: tel-02004248

<https://theses.hal.science/tel-02004248>

Submitted on 1 Feb 2019

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.

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires

Soutenue le 21 juin 2018

Jeanne ROIGNANT

**Biologie du développement du bois en réponse à des
sollicitations mécaniques environnementales**

- Rapporteurs :** **Jacqueline GRIMA-PETTENATI**, Directrice de Recherche, CNRS, Toulouse
Nicholas ROWE, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier
- Examineur :** **Gilles PILATE**, Directeur de Recherche, INRA, Val de Loire
- Directeurs de thèse :** **Nathalie LEBLANC-FOURNIER**, Maître de conférences, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand
Bruno MOULIA, Directeur de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand
- Co-encadrants :** **Mélanie DECOURTEIX**, Maître de conférences, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand
Éric BADEL, Chargé de recherche, INRA, Clermont-Ferrand

Remerciement

Je souhaite remercier en premier lieu mon encadrante de thèse Madame Mélanie DECOURTEIX pour la confiance qu'elle m'a accordé dans ce projet. Merci Mélanie pour ta disponibilité tout au long de ces années, pour tes conseils avisés, pour ton soutien permanent et surtout pour ta sympathie, ton humour et tous ces moments que nous avons partagés. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je t'adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-encadrant, Monsieur Éric BADEL (MatchesMan) ainsi qu'à mes directeurs de thèse, Monsieur Bruno MOULIA et Madame Nathalie LEBLANC-FOURNIER, pour leur grande générosité scientifique et humaine. Merci pour votre professionnalisme, vos encouragements et aussi pour le dynamisme et l'enthousiasme apportés à ce projet, si précieux pour mener à bien ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude aux membres de mon jury de soutenance de thèse. Merci à Madame Jacqueline GRIMA-PETTENATI et Monsieur Nicholas ROWE pour avoir accepté de juger avec attention en tant que rapporteurs mon travail de thèse et Monsieur Gilles PILATE pour avoir accepté de prendre part à ce jury. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour les discussions constructives et enrichissantes qui en ont découlé.

Je voudrais également remercier Madame Anabelle DEJARDIN, Monsieur Gilles PILATE, Monsieur Bruno CLAIR et Monsieur Olivier HAMANT pour leur participation à mon comité de suivi de thèse et pour leurs suggestions toujours avisées. Je remercie également l'ensemble des personnes qui ont pris part aux discussions sur ce projet de recherche et qui l'ont fait évoluer.

Je remercie le soutien financier du conseil régional d'Auvergne, qui m'a permis de réaliser ce projet de recherche grâce au « Programme Nouveau Chercheur de la Région 2014 ».

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du laboratoire PIAF, et particulièrement à Jean-Louis JULIEN, l'éternel Chef, pour son accueil au sein du laboratoire, son humour décalé et sa passion de l'ASM. J'adresse un grand merci à l'ensemble des personnes qui ont participé à ce travail et qui m'ont permis d'évoluer dans les meilleures conditions durant ces quatre années : merci à Caroline SAVEL, Christelle BOISSELET, Nicole BRUNEL-MICHAC, Brigitte GIRARD, Jérôme FRANCHEL, Déborah COTTAIS, Stéphane PLOQUIN, Patrice CHALEIL, Aline FAURE, Romain SOUCHAL, Pascal WALSER, Céline SAC, Norbert FRIZOT, Dominique MARCON, Dominique TIZIANI, Sylvie VAYSSIE et Sandrine MEYNIEL. Je remercie plus particulièrement ChriChri pour son éternel bonne humeur et ses M&Ms ; Brigitte qui m'a permis d'apprécier des heures et des heures de coupes/colorations en sa compagnie ; Nicocole pour sa gentillesse et son amour du travail bien fait ; Jérôme pour sa capacité à détendre l'atmosphère dans n'importe quelles situations et Caro pour son amitié et son soutien indéfectible qui m'ont permis de garder le cap durant toutes ces années. Je remercie

également toutes les copines du GDEC, Jane, Momo, Céline, Aurélie et Claire pour tous ces midis passés en votre compagnie et je me vois obligé de remercier La Montagne pour ses mots fléchés. Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est, alors encore une fois MERCI !

Je tiens également à remercier l'ensemble de mes collègues doctorants, post-doctorants et stagiaires qui m'ont accompagné durant cette aventure et plus particulièrement ceux avec qui j'ai eu la chance de partager d'inoubliables moments, que ce soit des moments de doute que seuls les doctorants connaissent ou des moments de joie et d'allégresse, et surtout d'allégresse... Merci à machine Kévin, au bûcheron Ludo, au portugais Seb, aux girls Lise, Claire-Sophie et Juliette, merci à Momo, Lulu, Titi, Florent, Antoine, Lucie, Barbichou, Elodie, Gaga et Moumou (enfin we did it !).

Je remercie profondément ma Famille pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour avoir toujours cru en moi et pour avoir fait ces kilomètres qui nous séparent pour me soutenir dans ce dernier chapitre de La Thèse ; Merci à ma sista Hélène, à mon père Daniel, à Mamie Thérèse, Titi Evelyne, Tata Sylvie, Cousins et Cousines Paul, Thomas, Camille et Marie-Charlotte, Copain François et Copines Coralie et Vaihere. J'ai également une pensée spéciale à Papi René et à ma mère Stanislawa qui, je pense, auraient été fiers de moi...

Enfin que dire à ces personnes qui partagent ma vie au quotidien, qui ont toujours cru en moi, qui m'ont soutenu dans les périodes difficiles et qui protègent mon foie... Merci à mes Amis de grande date Chouch, Nino, Ze et Benoît ; merci à Bobinou, Papa, Flo, Yanou, Martiou, Annette, Myrtille, Ivet, Jess et Kindy ; un énorme merci à la team Vagin : Moumou, Blonde, Alice, Gégé, Nina et Gatoune ! Merci à tous d'être aussi passionnés, sensibles et complètement déjantés !

Pour terminer je souhaite te remercier Juju, pour ton soutien et ta patience tout au long de cette thèse et pour tout ce que tu m'apportes jour après jour.

Merci.

*Tout seul,
Que le berce l'été, que l'agite l'hiver,
Que son tronc soit givré ou son branchage vert,
Toujours, au long des jours de tendresse ou de haine,
Il impose sa vie énorme et souveraine
Aux plaines.*

— **Emile Verhaeren**, *L'arbre*

Résumé

Les arbres ont la capacité de percevoir des sollicitations mécaniques quotidiennes dues au vent et d'acclimater leur croissance et leur développement en conséquence. Ce stress mécanique se traduit essentiellement par des flexions des organes, en particulier des branches et de la tige. Des études antérieures ont montré que la croissance en diamètre du peuplier était stimulée en réponse aux flexions mimant l'effet du vent. Cette augmentation de la croissance s'accompagne d'une modification de la nature du bois mis en place, qui a pu être observé chez quelques conifères et angiospermes, et nommé « bois de flexion ». Mais la caractérisation anatomique de ce bois a été peu approfondie, et les acteurs moléculaires de sa formation n'ont jamais été recherchés. De plus, dans la plupart de ces études les sollicitations mécaniques appliquées à la tige sont des flexions multidirectionnelles et d'intensité non contrôlée. Or, la déformation étant la variable physique perçue par la plante, il est nécessaire de contrôler l'amplitude de la flexion appliquée à la tige. Grâce à un dispositif expérimental original, nous avons appliqué des flexions unidirectionnelles sur de jeunes tiges de peupliers tout en contrôlant l'intensité des déformations appliquées. Cette étude a montré que la perception des déformations s'effectuait à une échelle locale, conduisant à une ovalisation de la tige. Nous avons pu également différencier le bois formé sous des déformations en tension, que nous avons nommé *Tensile Flexure Wood*, du bois formé sous des déformations en compression, que nous avons nommé *Compressive Flexure Wood*. Les analyses anatomiques et moléculaires montrent que l'intensité des déformations en valeur absolue ne suffit pas à expliquer toutes les réponses et que le signe (tension ou compression) de ces déformations joue également un rôle. Chez des arbres stimulés par des flexions unidirectionnelles plus fréquentes, la croissance et la différenciation cellulaire sont modulés encore différemment, notamment dans la zone en compression, apportant à la tige un bénéfice adaptatif face aux sollicitations suivantes. Le gène *CLE12.2* appartenant à la famille des gènes *CLAVATA*, gènes impliqués dans les régulations méristématiques, a été montré mécanosensible. Une approche de génomique fonctionnelle du gène *CLE12.2* par l'utilisation de plants transgéniques présentant une sous- ou une surexpression du gène nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une implication du peptide CLE12.2 dans la régulation des voies de biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette étude a permis de mettre en avant la complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du bois et apporte de nouvelles connaissances pour la poursuite des études sur l'acclimatation des arbres au vent.

Abstract

Trees have the ability to perceive daily mechanical stresses related to wind and to acclimate their growth and development accordingly. Wind essentially results in organs bending, in particular in branches and stem. Previous studies have shown that growth diameter of poplar stem increased in response to bending; mimicking wind mechanical effect. This growth increment goes along with a change in the structure of the wood formed under bending stimulation. This type of reaction wood has been described for some conifers and angiosperms species, and was called "flexure wood". Until now, its anatomical characteristics have been poorly described, and the molecular actors of its formation have never been investigated. In addition, in most of these previous studies the mechanical stresses applied to the stem were bidirectional bendings with an uncontrolled intensity. Because mechanical strains constitute the physical variable perceived by the plant, it appeared necessary to carefully control the bending amplitude applied to the stem. Thanks to an original experimental setup, we applied unidirectional bendings on young poplar stems, while controlling its intensity. This study showed that the strains are perceived at a local scale and that the secondary growth response was also local, leading to stem ovalization. We also distinguished the wood formed under tension we named "Tensile Flexure Wood" from the wood formed under compression we named "Compressive Flexure Wood". The anatomical and molecular analyzes show that the strain intensity in absolute value is not enough to explain all the answers and that the sign (tension or compression) of these strains also plays a role. In trees stimulated by more frequent unidirectional bendings, growth and cell differentiation are modulated even differently, especially in the area under compression, bringing to the stem an adaptive benefit to the following solicitations. The *CLE12.2* gene, which belongs to the *CLAVATA* gene family involved in meristematic regulation, has been shown to be mechanosensitive. Functional analysis of the *CLE12.2* gene in transgenic plants with under- or overexpression of the gene allowed us to hypothesize that the *CLE12.2* peptide is involved in the regulation of the cell-wall biosynthesis pathways. This work highlighted the complexity of the molecular mechanisms involved in wood formation and brings new knowledge for further studies on trees acclimation to wind.

Table des matières

Index des figures
Index de tableaux
Liste des abréviations

Introduction générale..... 1

Synthèse Bibliographique 5

I. Les plantes face aux sollicitations mécaniques 7

I.1 Nature des signaux mécaniques perçus par la plante 7

I.1.1 Signaux mécaniques internes 7

I.1.2 Signaux mécaniques externes..... 9

I.2 Bilan sur les réponses thigmomorphogénétiques des végétaux 10

I.2.1 Réponses de la croissance longitudinale 10

I.2.2 Réponses de la croissance radiale 11

I.2.3 Réponses du système racinaire..... 12

I.2.4 Autres réponses physiologiques 13

I.3 Perception et transduction du signal mécanique 13

I.3.1 La perception du signal mécanique 14

I.3.1.1 Variable physique mécanoperçue..... 14

I.3.1.2 Modèle intégratif de la mécanoperception : le modèle S³m..... 16

I.3.1.3 Accommodation de la sensibilité des arbres à des flexions répétées 17

I.3.2 Sensibilité à l'échelle cellulaire..... 20

I.3.2.1 Mécanoperception : le rôle des canaux mécanosensibles 20

I.3.2.2 Capteurs d'intégrité de la paroi cellulaire..... 22

I.3.3 Les acteurs moléculaires précoces de la voie de signalisation du signal mécanique
25

I.3.3.1 L'intervention du calcium 25

I.3.3.2 La production des espèces réactives de l'oxygène..... 26

I.3.3.3 L'implication des hormones..... 27

I.3.3.4 Les gènes mécanosensibles 29

II. Le bois : de l'origine biologique au support mécanique de l'arbre ... 32

II.1 Anatomie du bois 32

II.2 Formation du bois, la xylogénèse 33

II.2.1 Le cambium : tissu méristématique..... 34

II.2.2 Expansion cellulaire et paroi primaire 35

II.2.3 Mise en place de la paroi secondaire..... 36

II.2.3.1 Constituants de la paroi 38

II.2.3.1.1 Les celluloses 38

II.2.3.1.2 Les hémicelluloses 40

II.2.3.1.3	La lignine	41
II.2.4	Mort cellulaire programmée.....	43
II.3	Régulateurs de la formation du bois.....	43
II.3.1	Régulation de l'activité cambiale et de la prolifération cellulaire	43
II.3.1.1	Rôle des protéines régulatrices.....	44
II.3.1.2	Implication des phytohormones	45
II.3.2	Régulation de l'expansion cellulaire et de la spécification du xylème	45
II.3.2.1	Rôle des protéines régulatrices.....	45
II.3.2.2	Rôle des phytohormones	46
II.3.3	Régulation transcriptionnelle de la synthèse de la paroi secondaire et de la mort cellulaire programmée.....	47
II.4	Modification de la structure anatomique du bois sous contraintes	
	mécaniques.....	48
II.4.1	Les contraintes de maturation	48
II.4.2	Formation des bois de réaction.....	48
II.4.3	Caractéristiques du bois de tension	50
II.4.4	Mécanismes impliqués dans la perception de la gravité et dans la formation du bois de tension.....	52
II.4.4.1	Perception du stimulus gravitationnel	52
II.4.4.2	Transmission du signal pour la formation du bois de tension.....	53
II.4.4.2.1	Rôle des hormones dans l'induction et la régulation du bois de tension...	53
II.4.4.2.2	Régulation transcriptionnelle du bois de tension	54
II.4.5	Le bois de flexion.....	55
II.4.5.1	Réponse en croissance.....	55
II.4.5.2	Réponses anatomiques	56
II.4.5.3	Autres modifications	56
III.	Les peptides CLE	57
III.1	Structure des peptides CLE	58
III.2	Implication des protéines CLE dans les régulations méristématiques ..	60
III.2.1	Régulation du méristème apical : la boucle de régulation CLV3/WUS	60
III.2.2	Régulation du méristème cambial : le couple TDIF/PXY	61
III.3	Le gène <i>PtCLE12.2</i>	62
	Objectifs de thèse.....	63
	Résultats	67
	Chapitre I: Feeling stretched or compressed? The multiple	
	mechanosensitive responses of wood formation to bending	69
	CHAPITRE II : Effet du régime de flexions sur la production du	
	bois de flexion.....	73

I. Réponses morphologiques	77
II. Réponses anatomiques.....	77
III. Réponses moléculaires	81
IV. Composition biochimique.....	81
V. Discussion.....	82
V.1 Modifications de croissance à la suite de différents régimes de flexion	
82	
V.1.1 Croissance en hauteur.....	82
V.1.2 Croissance en diamètre.....	82
V.2 Modulation des réponses anatomiques à la suite de différents régimes	
de flexion.....	84
V.2.1 Anatomie des vaisseaux	84
V.2.2 Anatomie des fibres.....	85
V.3 Régulation transcriptionnelle des gènes liés aux parois cellulaires par	
différents régimes de flexion	86
 Chapitre III : Analyse fonctionnelle du gène CLE12.2.....	89
I. Expression du gène <i>CLE12.2</i> chez <i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i>	93
II. Effet de flexions répétées sur l'hybride <i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i> ..	93
II.1 Réponses morphologiques.....	94
II.2 Réponses anatomiques.....	95
II.3 Réponses moléculaires	96
III. Caractérisation préliminaire des niveaux d'expression du gène	
<i>PttCLE12.2</i> dans les peupliers transgéniques présentant une sous- et	
surexpression du gène <i>PttCLE12.2</i>.....	97
III.1 Réponses morphologiques.....	99
III.2 Réponses anatomiques.....	100
III.2.1 Diamètre et densité de vaisseaux	101
III.2.2 Epaisseur de la paroi S et diamètre de fibres	104
III.2.2.1 Epaisseur de la paroi S.....	104
III.2.2.1 Diamètre des fibres.....	107
III.3 Réponses moléculaires	108
IV. Discussion.....	110
IV.1 Comparaison de la réponse thigmomorphogénétique des peupliers	
hybrides <i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i> et <i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	110

IV.2	Rôle du gène <i>PttCLE12.2</i>	111
IV.2.1	Rôle de CLE12.2 en absence de flexion	111
IV.2.1.1	Réponses en croissance	111
IV.2.1.2	Réponses anatomiques-anatomie des fibres	112
IV.2.1.3	Réponses sur la formation des vaisseaux	115
IV.2.2	Rôle de CLE12.2 dans la mise en place de la réponse thigmomorphogénétique 115	
Discussion générale.....		119
I.	Réponses thigmomorphogénétiques : un mécanisme adaptatif.....	121
II.	La perception des déformations permet la mise en place du TFW et du CFW	123
III.	Complexité du contrôle moléculaire en réponse à la flexion	124
IV.	Les peptides CLAVATA : régulateurs de l'activité méristématique 126	
Références bibliographiques.....		131
Annexes.....		155

Index des figures

Figure 1 : Rôle des microtubules dans la régulation morphogénétique par les signaux mécaniques.....	8
Figure 2 : Modification de la croissance en hauteur de plantes suite à des sollicitations mécaniques.....	11
Figure 3 : Exemple représentatif de l'effet d'une flexion unique et transitoire sur la croissance journalière en diamètre de la tige.....	11
Figure 4 : Modélisation d'une flexion de poutre encastree.....	15
Figure 5 : Déformations et contraintes longitudinales agissant sur une section transversale de poutre sous l'effet d'une flexion.....	16
Figure 6 : Evaluation expérimentale du modèle S3m.....	16
Figure 7 : Comparaison de l'effet d'une flexion transitoire unique et de flexions transitoires répétées sur la croissance en diamètre chez le peuplier.....	18
Figure 8 : Phénomène d'accommodation : effet des flexions répétées.....	20
Figure 9 : Schéma des différents récepteurs potentiels des sollicitations mécaniques.....	24
Figure 10 : L'application d'une flexion sur la racine d' <i>A. thaliana</i> entraîne une augmentation du calcium cytosolique du côté en tension des racines mais pas du côté en compression.....	25
Figure 11 : Cinétique des réponses physiologiques et moléculaires observées suite à une sollicitation mécanique.....	31
Figure 12 : Structure d'un tronc d'arbre.....	32
Figure 13 : Plan ligneux d'un bois homoxylé de gymnosperme (A) et hétéroxylé d'angiosperme (B).....	33
Figure 14 : Description des étapes de la formation du xylème.....	34
Figure 15 : Représentation de la paroi primaire composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines.....	35
Figure 16 : Représentation graphique des différentes couches de la paroi cellulaire.....	37
Figure 17 : Modèle schématique de la composition de la paroi.....	37
Figure 18 : Schéma des interactions entre les chaînes moléculaires de la cellulose dans la région cristalline des microfibrilles de cellulose.....	39
Figure 19 : Le complexe de synthèse de cellulose (CSC).....	39
Figure 20 : Biosynthèse des monolignols <i>via</i> la voie des phenylpropanoïdes.....	42

Figure 21 : Diagramme de la régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de la paroi secondaire chez <i>Arabidopsis</i>	47
Figure 22 : Bois de réaction chez les conifères : le bois de compression.	49
Figure 23 : Bois de réaction chez les feuillus : le bois de tension.....	51
Figure 24 : Ovalisation du tronc des tiges fléchis d' <i>Abies fraseri</i> par rapport aux troncs non sollicités.....	55
Figure 25 : Classification structurale des peptides sécrétés.	58
Figure 26 : Représentation de la structure d'un peptide CLE.....	59
Figure 27 : Vue d'ensemble de la signalisation et de l'activité des peptides.	59
Figure 28 : Régulation de la prolifération cellulaire par la boucle de régulation WUS-CLV3.	60
Figure 29 : Modulation de la formation du bois chez les arbres en régulant la voie de signalisation CLE/PXY.	61
Figure 30: Dispositif expérimental.....	70
Figure 31 : Coupes transversales représentatives des peupliers <i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i> sans stimulation mécanique (A) et après 8 semaines de flexions selon les régimes 1F (B) ou 3F (C).	76
Figure 32 : Coupes transversales du xylème des arbres 1F et 3F, et des arbres non fléchis....	78
Figure 33 : Expression relative des gènes <i>POPFLA6</i> , <i>PtaFLA14.9</i> , <i>PtaMYB69</i> et <i>PtaMAP70-5</i> dans le xylème soumis à différents types de déformations longitudinales, après les régimes 1F ou 3F.....	80
Figure 34: Poirisation de la tige des arbres 3F.	84
Figure 35 : Expression relative du gène <i>PtaCLE12.2</i> dans le xylème soumis à différents types de déformations, chez les arbres 1F ou 3F.	93
Figure 36 : Expression relative des gènes <i>CLE12.2</i> , <i>MYB69</i> , <i>MAP70-5</i> et <i>POPFLA6</i> chez <i>P. tremula</i> x <i>alba</i> (Pta) et <i>P. tremula</i> x <i>tremuloides</i> (Ptt) dans le xylème soumis à différents types de déformations.	96
Figure 37: Expression relative du gène <i>PttCLE12.2</i> dans le xylème des peupliers sauvages et des lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis.	97
Figure 38: Expression relative du gène <i>PttCLE12.2</i> chez les peupliers sauvages (S), RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et dans le xylème soumis à différents types de déformations.....	98
Figure 39 : Coupes transversales représentatives des peupliers <i>Ptt</i> sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.	100

Figure 40 : Coupes transversales du xylème des peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.	101
Figure 41 : Variation du diamètre des vaisseaux entre les peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et entre les zones du xylème soumis à différentes déformations.	103
Figure 42 : Variation de l'épaisseur de la paroi des fibres entre les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et entre les zones du xylème soumis à différentes déformations.	104
Figure 43: Variation de l'épaisseur de la paroi et de la couche G des peupliers sauvages fléchis et des lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.	105
Figure 44 : Anatomie des fibres des peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 à la suite du traitement 1F.	106
Figure 45 : Modification du diamètre des fibres entre les peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et entre les zones du xylème soumis à différentes déformations.	107
Figure 46: Expression relative du gène <i>POPFLA6</i> chez les peupliers sauvages (S), RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et dans le xylème soumis à différents types de déformations.	108
Figure 47: Niveau d'expression du gène <i>PttMYB69</i> (A) et <i>PttMAP70-5</i> (B) chez les peupliers sauvages (S), RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et dans le xylème soumis à différents types de déformations.	109
Figure 48 : Modélisation du champ de déformation (ϵ) au sein d'une section de tige lors d'une flexion.	111
Figure 49 : Régulation de la biosynthèse de la paroi par la régulation du peptide CLE12.2.	114
Figure 50 : Schéma du réseau transcriptionnel régulant la biosynthèse des parois secondaires.	125
Figure 51 : La structure cristalline du complexe PXY-TDIF révèle un mécanisme de reconnaissance conservé entre les paires peptide-récepteurs CLE.	127

Index des tableaux

Tableau 1: Réponses de croissance des arbres 1F et 3F.....	76
Tableau 2: Mesures anatomiques dans différentes zones de la section des tiges des arbres 1F et 3F.....	79
Tableau 3: Teneur en lignine dans le bois des arbres témoins et dans les différentes zones (tension, neutre et comprimée) des arbres 1F et 3F en pourcentage de matière sèche.	81
Tableau 4 : Réponses de croissance de <i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	94
Tableau 5: Mesures anatomiques dans les différentes zones de bois des arbres fléchis <i>P. tremula</i> x <i>P.tremuloides</i>	95
Tableau 6: Réponses de croissance des peupliers sauvages et des lignées transgéniques non fléchies et fléchies.	99
Tableau 7 : Modifications de la fréquence des vaisseaux en réponse aux flexions chez les lignées de peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.	103
Tableau 8 : Récapitulatif des différences observées sur l'épaisseur de parois des fibres et de leur diamètre entre les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.....	112
Tableau 9 : Récapitulatif des différences observées dans le diamètre des vaisseaux et de leur nombre chez les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.	115
Tableau 10 : Récapitulatif des résultats sur l'épaisseur de la paroi des fibres et de leur diamètre chez les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.	116

Abréviations

ABA	Acide ABscissique	CPMCW	Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall
ACC	acide 1- AminoCyclopropane-1- Carboxylique	CSC	Cellulose Synthase Complex
ACO	ACC oxydase	DSNC	domaine de séquences non conservées
ADN/DNA	Acide DésoxyriboNucléique	EF1α	Elongation Factor 1 α
ADNc	ADN complémentaire	ER	ERECTA
AGP	ArabinoGalactan Protein	ERF	Ethylene Response Factor
AMF	Angle des microfibrilles de cellulose	ESR	ENDOSPERM SURROUNDING REGION
ARN	Acide RiboNucléique	EST	Expressed Sequence Tag
ARNm	ARN messenger	FER	FERONIA
ANOVA	ANalysis Of VAriance	FLA	Fasciclin-Like Arabinogalactan
BC	Bois comprimé	GA	Gibberellic Acid
BO	Bois opposé	IAA	Indole Acetic Acid
BT	Bois de tension	JA	Jasmonic Acid
C2H2	Cysteine2/Histidine2	LBD	Lateral organ Boundaries Domain
Ca²⁺	ion calcium	LeRLK	Lectine-like RLK
CAD	Cinnemyl Alcool Déshydrogénase	LRR	Leucine Rich Receptor
CaM	CalModuline	MAP70	MICROTUBULES- ASSOCIATED PROTEIN70
CAN	CORONA	MCA	Mid1-Complementing Activity
CBL	Calcineurin B-Like	MOL1	MORE LATERAL GROWTH1
CesA	Cellulose synthase	MS	Murashige et Skoog
CDPK	Calcium-Dependant Protein Kinase		
Cl⁻	ion chlorure		
CLE	CLV3/ESR		
CLV	CLaVata		
CML	CalModuline Like		

MscS	MechanoSensisitive Channel of Small conductance	TDIF	Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor
MSL	MscS-like	TDR/PXY	TDif Receptor/Phloem intercalated with Xylem
MT	MicroTubules	THE1	THEseus1
NST	Nac Secondary cell wall Thickening	VND	Vascular-related Nac-Domain
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase	WAK	Wall Associated Kinase
PEG	PolyEthylène Glycol	WOX	Wuschel like homeobOX
PCN	PopCoroNa	WUS	Wuschel
PHB	PHaBulosa	XET	Xyloglucan EndoTransglycolase
PHV	PHaVoluta	XTH	XET hydrolase
Pta	<i>Populus tremula x alba</i>	ZFP	Zinc Finger Protein
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>		
Ptt	<i>Populus tremula x tremuloides</i>		
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction		
REV/IFL1	REVoluta/ Interfascicular FiberLess1		
RLK	Receptor Like Kinase		
RNAi	RNA interference		
ROS	Reactive Oxygene Species		
RT	Reverse Transcriptase		
RUL1	RedUCed in Lateral growth1		
S³m	S ³ model, Sum-of-Strain-Sensing model		
SAM	Shoot Apical Meristem		
SND	Secondary wall-associated Nac Domain protein		
SuSy	Sucrose synthase		
TCH	TouCH		

Introduction générale

Tout au long de leur existence, les plantes sont soumises à des sollicitations mécaniques qui peuvent être d'origine interne comme celles liées à la croissance et à la différenciation cellulaire, ou externe comme celles exercées par le vent ou encore le toucher. La capacité à percevoir et à répondre à ces sollicitations est essentielle pour leur permettre de survivre dans leur environnement. Dans le contexte de changement climatique actuel, l'étude des mécanismes de perception et de réponses des espèces végétales à des sollicitations environnementales extrêmes est devenue un enjeu agronomique majeur. En effet, la compréhension de tels mécanismes pourrait permettre la sélection de variétés végétales capables de mieux résister à ces changements climatiques tout en maintenant un niveau de production élevé.

Dans la littérature, les recherches sur l'effet du vent chez de nombreuses espèces montrent que c'est un facteur impactant la croissance en hauteur, la croissance en diamètre ainsi que le développement du système racinaire. L'anatomie du bois formé sous sollicitations mécaniques montre la formation d'un bois particulier, appelé « bois de flexion » (Telewski, 1989). Quelques études mimant l'effet du vent par des flexions décrivent l'anatomie de ce bois, mais ces études ne tiennent pas compte de la variable physique perçue par les organes lors de la flexion (flexions d'intensité non contrôlée), et les caractéristiques à l'échelle pariétale et moléculaire n'ont jamais été étudiées.

Ma thèse s'inscrit dans ce contexte puisqu'elle vise à étudier le rôle des sollicitations mécaniques, et plus particulièrement l'effet des déformations induites par la flexion, sur la croissance de jeunes peupliers et sur le bois formé. Elle a pour but de mieux caractériser l'anatomie du bois de flexion et les régulateurs moléculaires impliqués dans sa formation. Pour cela, ce travail de thèse a été réalisé en utilisant à la fois une approche histologique et une approche moléculaire. Cette étude a débuté grâce à la connaissance de (i) la variable mécanique perçue lors d'une flexion de tige, (ii) du phénomène d'accommodation à la flexion et (iii) de candidats moléculaires identifiés grâce à une étude transcriptomique réalisée au laboratoire sur l'effet d'une flexion unique sur une tige entière. Ce travail de thèse apporte des connaissances sur l'anatomie du bois formé suite à des flexions répétées d'intensité contrôlée et entame la caractérisation au niveau moléculaire de ce bois, notamment par l'étude de plants transgéniques présentant une sous- ou une surexpression du gène *CLE12.2*.

Nous avons travaillé essentiellement avec un hybride de peuplier (*Populus tremula* x *Populus alba*). Dans le cadre de notre étude, c'est un arbre qui présente de nombreux avantages techniques, comme la possibilité d'utiliser la multiplication *in vitro* et qui fait preuve d'une croissance rapide. De plus, d'un point de vue moléculaire, de nombreux outils sont disponibles,

dont la séquence génomique complète de l'une des espèces de peuplier, *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) et plus récemment la première annotation du génome de *P. tremula* x *P. alba* (Mader *et al.*, 2016). Dans notre étude, nous avons choisi d'appliquer une flexion par jour pendant 3 jours (Martin *et al.*, 2010) avec une déformation de $\varepsilon = 1\%$, correspondant à des sollicitations mécaniques dans le domaine élastique, car des déformations plastiques engendreraient des réponses de type blessures.

Ce manuscrit de thèse est organisé autour de trois parties. La première partie est une synthèse bibliographique qui dresse l'état des connaissances actuelles relatives à notre sujet d'étude. Cette synthèse commence par décrire la nature et l'impact des sollicitations mécaniques sur le développement des plantes. Ensuite un état des connaissances sur le phénomène de la mécanoperception, à travers la présentation de la variable mécanique perçue ainsi que la description des différents acteurs précoces sont présentés. Puis la formation, la structure du bois, ainsi que les molécules impliquées dans sa formation sont décrites. Enfin, une analyse détaillée est présentée sur la famille des gènes codant les peptides CLAVATA, gènes ciblés dans ce travail pour leurs rôles potentiels dans les régulations du fonctionnement des méristèmes.

La deuxième partie du manuscrit consacrée aux résultats se compose de trois chapitres. Le 1^{er} chapitre présente les caractéristiques anatomiques et moléculaires du bois de flexion mis en place suite à des flexions, en distinguant les tissus du bois formés sous différents types de déformations. Ces résultats sont présentés en anglais et font l'objet d'une publication dans le journal *Annals of Botany*. Le 2^{ème} chapitre des résultats présente l'impact d'une modification du régime de flexions sur l'anatomie de ce bois de flexion ainsi que sur les réponses moléculaires associées et permet d'aborder la question de l'accommodation à la flexion. Dans le dernier chapitre, une analyse fonctionnelle du rôle du gène CLAVATA : *CLE12.2* est présentée à travers la caractérisation anatomique et moléculaire du bois de flexion dans des peupliers transgéniques sous- ou surexprimant ce gène. Enfin les mécanismes de la formation du bois de flexion, ainsi que les limites et les améliorations pouvant être apportées à ce projet sont discutées dans la dernière partie de ce manuscrit.

Synthèse Bibliographique

I. Les plantes face aux sollicitations mécaniques

I.1 Nature des signaux mécaniques perçus par la plante

Dans leur environnement naturel, les plantes sont soumises à deux types de signaux mécaniques : des signaux mécaniques internes (pression de turgescence, poids propre d'un organe...) et externes (vent, animaux, nature du sol, présence d'un obstacle). La capacité des plantes à percevoir et à répondre à ces stimuli est primordiale, afin de modifier de manière appropriée leur physiologie et leur développement.

I.1.1 Signaux mécaniques internes

Lors de leur croissance, les plantes font face à des sollicitations mécaniques internes, qui sont perçues à différents niveaux d'organisation. Dans un état physiologique normal, les cellules se trouvent en état de turgescence constant. La pression de turgescence exerce une force homogène et multidirectionnelle sur les parois cellulaires et est le moteur de la croissance cellulaire (Schopfer, 2006). Toutefois, les forces générées par cette pression de turgescence diffèrent suivant la forme et la structure de ces parois. Si on considère une paroi structurellement homogène, sans contraintes extérieures, la croissance sous la pression de turgescence devrait se faire de manière isotrope et entraîner la formation d'une sphère. Les propriétés mécaniques de la paroi peuvent varier au sein d'une cellule et sont principalement déterminées par l'arrangement spatial des microfibrilles de cellulose qui lui confèrent une forte résistance à la déformation dans des directions privilégiées. Typiquement, dans les couches récemment déposées des parois primaires d'une cellule en élongation, les microfibrilles de cellulose sont orientées perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule. Cette orientation particulière détermine le sens de la croissance cellulaire, dans ce cas, selon l'axe longitudinal. Les propriétés mécaniques internes de la paroi contribuent donc à l'orientation de la croissance cellulaire.

Au sein d'un tissu organisé, les cellules, étroitement liées entre elles, interagissent mécaniquement avec les cellules avoisinantes (Schopfer, 2006). Ces contraintes, produites par un différentiel de croissance des cellules sont appelées autocontraintes (Fournier *et al.*, 1994; Moulia, 2000). Des études suggèrent que la mécanoperception de ces sollicitations internes au sein d'un tissu jouerait un rôle clé pour la synchronisation de la morphogénèse (Moulia *et al.*, 2011; Moulia *et al.*, 2015). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, il a été démontré que l'orientation

des microtubules¹ était parallèle à l'orientation des autocontraintes maximales rencontrées au sein du méristème apical caulinaire (Figure 1 A) (Hamant *et al.*, 2008). En modifiant ces signaux mécaniques par ablation de cellules internes du méristème primaire, les auteurs ont observé une réorientation des microtubules parallèlement à la direction des signaux. Plus récemment, il a été montré que les cellules pouvaient également ressentir les signaux mécaniques générés par leur propre forme. Ainsi, la forme des cellules en puzzle crée un modèle de contraintes qui contrôle l'orientation des microtubules, guidant le renforcement de la paroi cellulaire (Figure 1 B) (Sampathkumar *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que les signaux mécaniques internes régulent la morphogenèse en coordonnant l'orientation des constituants du cytosquelette.

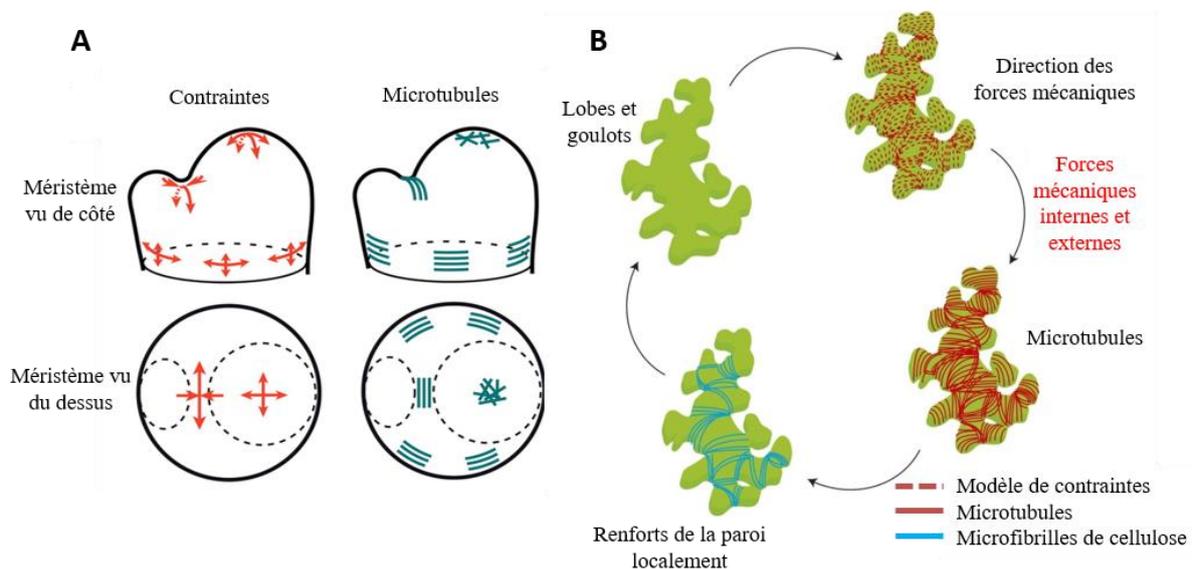


Figure 1 : Rôle des microtubules dans la régulation morphogénétique par les signaux mécaniques. (A) Relation entre l'orientation des contraintes les plus fortes et la direction des microfibrilles dans le méristème d'*Arabidopsis thaliana*. D'après Hamant *et al.* (2008). (B) Les forces mécaniques régulent la forme des cellules en puzzle de l'épithélium des cotylédons d'*A. thaliana*, en contrôlant l'organisation des microtubules et le dépôt de cellulose. D'après Sampathkumar *et al.* (2014).

Enfin, à l'échelle de l'organisme entier, les plantes sont soumises en permanence à la gravité terrestre. Ainsi, les variations du poids propre des organes de la plante au cours de sa croissance engendrent des contraintes au sein des tissus sous l'effet de la gravité. Par exemple, la croissance des branches est modifiée par le poids des fruits (Alméras *et al.*, 2004). Si leurs tiges sont inclinées, les plantes sont capables de se redresser en fonction du signal gravitationnel perçu. En combinant des approches de cinématique du redressement et de modélisation

¹ Les microtubules, constituants principaux du cytosquelette, sont notamment impliqués dans l'organisation du dépôt des microfibrilles de cellulose dans la paroi, et plus particulièrement dans la localisation et le guidage de la cellulose synthase, site de la synthèse de la cellulose.

mathématique, Bastien *et al.* (2013) ont démontré que la graviperception n'était pas le seul facteur influençant ce redressement. En effet, si l'on ne prend en compte que l'effet de la gravité, c'est-à-dire l'angle d'inclinaison de l'organe par rapport à la verticale, pour modéliser la cinématique complète du redressement d'une tige, le modèle mathématique montre que la tige n'atteindrait pas d'état stationnaire et oscillerait à l'infini autour de la verticale. Pour rendre compte du comportement réel d'une tige, il faut donc rajouter une autre perception, la proprioception, c'est-à-dire la capacité à percevoir sa propre forme (courbure) dans l'espace. Ainsi le modèle prédit que la relation décrivant le mieux la dynamique du mouvement et la forme finale de la plante dépend d'un ratio entre sa sensibilité à la gravité et sa sensibilité proprioceptive, appelée loi graviproceptives. La plante réajuste donc sa posture en permanence. Dans des axes en croissance primaire, ce contrôle postural est essentiellement dû à un différentiel de croissance longitudinale. Au niveau des tiges en croissance secondaire, la réorientation de l'organe implique la mise en place d'un bois de réaction, phénomène qui sera développé dans la suite de ce manuscrit.

L'ensemble de ces expériences souligne l'importance des signaux mécaniques internes au sein d'une cellule mais également au sein d'un tissu au cours du développement de la plante.

I.1.2 Signaux mécaniques externes

Dans la nature, les plantes sont sans cesse soumises à des sollicitations mécaniques externes très variées qui peuvent être dynamiques (le passage d'animaux, l'impact de la pluie, le vent) ou statiques (présence d'un obstacle, arcure). Les réponses physiologiques et de croissance engendrées par ces sollicitations sont rassemblées sous le terme de thigmomorphogénèse (Jaffe, 1973). Dans la littérature, la blessure est également considérée comme une sollicitation mécanique. Cependant, elle implique une lésion et la mort de certaines cellules. Dans la suite de ce manuscrit, nous décrirons uniquement l'impact de sollicitations mécaniques non lésantes, telles que l'effet du vent.

Le vent est un élément majeur de l'environnement des plantes. Ses caractéristiques spatiales et temporelles diffèrent selon les situations envisagées. Au cours d'une année, on peut distinguer trois types de vent : (1) des vents de faible intensité avec un temps de retour d'une dizaine de minutes, (2) des vents dits thermiques, liés aux variations de température entre le jour et la nuit, entraînant des fluctuations à l'échelle de la journée, (3) des vents de plus forte intensité, liés à des phénomènes météorologiques dynamiques à plus grande échelle, avec un temps de retour de 4 jours en moyenne. Par ailleurs, en plus de ces variations intra-annuelles,

le vent suit également une dynamique interannuelle avec des épisodes de tempêtes se produisant généralement en hiver en Europe (Stull, 1988). Par leurs structures, les plantes ont une prise au vent qui charge mécaniquement les organes (effet de traînée), impliquant ainsi des déformations et des déplacements.

I.2 Bilan sur les réponses thigmomorphogénétiques des végétaux

I.2.1 Réponses de la croissance longitudinale

De nombreuses études ont mis en relation l'effet mécanique du vent et la croissance en hauteur des plantes. En 1954, Jacobs observait déjà sur *Pinus radiata* une augmentation de la croissance longitudinale d'arbres tuteurés par rapport à des plants soumis aux oscillations dues au vent. Plus récemment, le tuteurage de pins (*Pinus contorta*) pendant six ans, a induit une augmentation de leur croissance longitudinale de 40 % comparée à celle observée avant la mise en place des tuteurs. Par opposition, les plants témoins non tuteurés ont tendance à diminuer leur croissance de 20 % pendant cette période (Meng *et al.*, 2006). Chez les angiospermes ligneuses, Coutand *et al.* (2008) ont mis en évidence que des tiges de merisier (*Prunus avium*) protégées du vent par un tubex présentaient une croissance primaire annuelle deux à trois fois plus importante que les arbres non protégés. L'application de flexions répétées et quotidiennes, mimant l'effet du vent, sur la tige d'Orme d'Amérique (*Ulmus americana*) ont entraîné une diminution de leur croissance primaire (Telewski et Pruyn, 1998). Chez le peuplier, une étude visant à comparer deux hybrides de *Populus trichocarpa x deltoides*, a montré toutefois que la réponse pouvait varier en fonction du génotype. En effet, suite à vingt flexions quotidiennes pendant deux mois, l'un des hybrides répondait aux sollicitations mécaniques en diminuant sa croissance longitudinale (hybride 11-11) alors que le second l'augmentait (hybride 47-174) (Pruyn *et al.*, 2000). Dans l'étude de Kern *et al.* (2005), en utilisant un traitement de sollicitations mécaniques identique, les auteurs ont montré une diminution de la hauteur de l'hybride 47-174. Des résultats similaires ont également été obtenus chez des angiospermes herbacées. Les travaux de Moulia et Combes (2004) ont montré que des plants de luzerne (*Medicago sativa*) en plein champ et protégés par un grillage limitant les déplacements et donc les déformations dues au vent, présentaient une augmentation de croissance en hauteur par rapport à des plants laissés libres dans leurs mouvements (Figure 2).



Figure 2 : Modification de la croissance en hauteur de plantes suite à des sollicitations mécaniques. Les plants de luzerne non protégés des déformations imposées par le vent ont une hauteur diminuée par rapport à ceux protégés par un grillage (Mouliat et Combes, 2004).

Ces résultats démontrent l'importance des sollicitations mécaniques sur la croissance en hauteur des plantes. Cependant, les résultats contradictoires obtenus dans certaines études démontrent bien la nécessité de quantifier le stimulus appliqué afin d'appliquer à chaque expérimentation et à chaque arbre, le même niveau de stimulation mécanique. Ces résultats démontrent l'importance des sollicitations mécaniques sur la croissance en hauteur des plantes.

I.2.2 Réponses de la croissance radiale

En laboratoire, l'application d'une flexion unique entraîne une augmentation du diamètre de la tige (Coutand *et al.*, 2009). Pour la première fois, la cinétique de réponse à court terme de la croissance secondaire de peupliers (*Populus tremula x alba*) à la suite d'une flexion unique, unidirectionnelle et transitoire a été suivie dans cette étude. Les auteurs ont montré qu'une flexion unique entraînait un arrêt de croissance de 4 h, puis une augmentation rapide de croissance secondaire avec une croissance maximale atteinte au 3^{ème} jour (Figure 3).

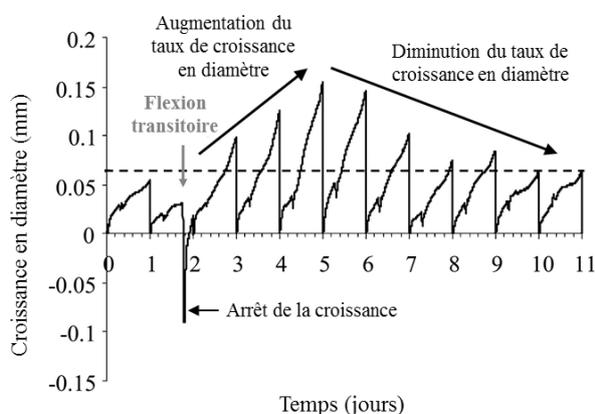


Figure 3 : Exemple représentatif de l'effet d'une flexion unique et transitoire sur la croissance journalière en diamètre de la tige.

Avant l'application d'une flexion transitoire, le taux de croissance en diamètre est stable. L'application d'une flexion transitoire (flèche grise) a conduit à une augmentation de la croissance en diamètre. Le taux de croissance journalier a augmenté pendant 3 jours puis a diminué pendant plusieurs jours avant de revenir à sa valeur avant flexion. D'après Coutand *et al.* (2009).

Toujours chez le peuplier, l'application de vingt flexions bidirectionnelles journalières pendant deux mois, a également induit une augmentation significative du diamètre de la tige par rapport aux témoins non sollicités (+26 % pour l'hybride 11-11 et +42 % pour l'hybride 47-174 dans le sens de flexion) (Pruyn *et al.*, 2000). Chez l'Orme d'Amérique (*Ulmus Americana*), l'application de flexions multiples sur la tige (de 5 à 80 flexions par jour pendant trois semaines), a montré une augmentation du diamètre significative des arbres fléchis par rapport aux arbres témoins (Telewski et Pruyn, 1998). Ces résultats sont également cohérents avec ceux obtenus en forêt. Des expériences *in situ* consistaient à comparer la croissance en diamètre d'arbres haubanés par rapport à des arbres laissés libres de déformation au vent. Ces études ont montré que les arbres laissés libres au vent avaient un diamètre de tige accru par rapport aux arbres tuteurés (Jacobs, 1954; Meng *et al.*, 2006). Plus récemment, un dispositif installé en forêt a permis de comparer la croissance en continu de hêtres laissés libres de leur mouvement à celle de hêtres dont le tronc a été soumis à une flexion (Bonnesoeur *et al.*, 2016). Chez les arbres où le tronc a été fléchi artificiellement, une augmentation de 80 % du taux de croissance radiale journalier a été enregistrée.

I.2.3 Réponses du système racinaire

En plus de leur effet sur la dimension de la tige, les sollicitations mécaniques externes de la partie aérienne semblent également modifier la croissance du système racinaire.

Chez les espèces ligneuses, une étude menée sur *Picea sitchensis* et *Larix decidua* a montré que le vent stimule la croissance en diamètre des racines. L'étude de la répartition des racines latérales en fonction du côté des sollicitations mécaniques a montré une augmentation de leur nombre du côté du vent (Stokes *et al.*, 1995). Le développement asymétrique de ce système racinaire a également été observé chez des plants de chêne (*Quercus robur* L.) stimulés par un ventilateur électrique pendant 30 s chaque heure (Tamasi *et al.*, 2005). L'augmentation de la biomasse racinaire, notamment les racines latérales ainsi que l'augmentation de la longueur des racines dans la direction du vent permettraient à la plante d'augmenter son ancrage dans le sol et de contrer les effets du vent.

Dans la plupart des études effectuées, les sollicitations mécaniques de la tige entraînaient une modification de la répartition de la biomasse entre les tiges et les racines, au profit du système racinaire (Coutand *et al.*, 2008). Les plants de merisier protégés des effets du vent par les tubex ont montré une fraction racinaire significativement réduite par rapport à des plants stimulés mécaniquement. L'application d'une stimulation mécanique réalisée à l'intérieur du tubex augmentait significativement l'allocation de biomasse en direction des racines (Coutand

et al., 2008). Mais ceci n'est pas vrai pour toutes les espèces. Des sollicitations mécaniques effectuées sur des plants de *Medicago truncatula* ont montré une forte augmentation de la biomasse aérienne malgré une réduction de leur croissance en hauteur, et au contraire aucune variation de la biomasse racinaire (Tretner *et al.*, 2008), ce qui pourrait supposer que chez les herbacées la biomasse aérienne est privilégiée au détriment de l'ancrage.

L'origine de la réponse en croissance des racines à la suite d'une stimulation mécanique de la partie aérienne (signal longue distance, trade-off ou stimulation mécanique des racines) reste une question scientifique.

I.2.4 Autres réponses physiologiques

Bien que moins fréquemment étudiés, d'autres processus physiologiques peuvent être également modifiés en réponse à un stress mécanique. Les réponses que l'on peut observer sont une réduction de la surface foliaire, une altération du contenu en chlorophylle, une variation du niveau d'hormones (auxine, jasmonates...), une diminution de la résistance à d'autres stress biotiques ou abiotiques, une augmentation de la sénescence, mais également une modification de l'ouverture des stomates et une date de floraison retardée (Biddington, 1986; Braam, 2005; Chehab *et al.*, 2009; Gardiner *et al.*, 2016).

La croissance radiale des tiges est généralement accompagnée d'une modification des propriétés mécaniques des tissus (Telewski, 2012). Ces variations des propriétés mécaniques des tiges peuvent s'expliquer par des modifications anatomiques du bois mis en place au cours de l'augmentation de la croissance radiale. Telewski a montré qu'un arbre soumis à des flexions produisait un bois particulier, nommé « bois de flexion » (Telewski, 1989), lui permettant de se prémunir de la casse par augmentation de sa rigidité de flexion (Badel *et al.*, 2015). La description de ce bois de flexion sera détaillée dans la suite de ce manuscrit.

L'ensemble de ces études suggèrent que les changements anatomiques, morphologiques et biomécaniques de la plante qui se produisent en réponse à des sollicitations mécaniques semblent favoriser le maintien mécanique de l'arbre dans son environnement. Ces changements constitueraient une acclimatation conférant une meilleure résistance aux futures sollicitations.

I.3 Perception et transduction du signal mécanique

Les réponses des plantes aux sollicitations mécaniques peuvent être très variables et sont dépendantes de l'espèce mais également du type de sollicitations mécaniques. Dans la plupart des cas, l'expérimentateur ne contrôle pas précisément la sollicitation appliquée. En effet, le

toucher ou la flexion sont difficilement quantifiables et leur intensité peut varier en fonction de l'expérimentateur et de la forme ou de la taille de la plante. Pour prendre en compte cela, il faut définir la variable mécanique perçue par la plante.

I.3.1 La perception du signal mécanique

I.3.1.1 Variable physique mécanoperçue

Le comportement biomécanique d'une tige d'arbre peut être assimilé à celui d'une poutre encastrée (Figure 4 A). Sous l'effet du vent, la tige de l'arbre subit un moment fléchissant \widehat{M} , égal au produit de la force appliquée² \vec{F} par le bras de levier³, qui se traduit par une flexion. Si on considère que cette poutre est constituée d'un empilement longitudinal de segments d'épaisseur dS , un changement du moment fléchissant \widehat{M} induit une rotation relative d'un angle $d\theta$ des sections transversales les unes par rapport aux autres selon l'axe x , appelé axe neutre (Figure 4 B) (Timoshenko et Goodier, 1951). Pour tous ces segments, il est alors possible de calculer la courbure C , associée à la flexion, qui est définie comme la variation d'angle suivante :

$$C = \frac{d\theta}{dS} \quad (1)$$

La rotation d'une section par rapport à l'axe de la tige entraîne des déformations dans la direction longitudinale de la tige. On définit alors la déformation ε comme « l'allongement relatif » des tissus du côté convexe ou leur « raccourcissement relatif » du côté concave (Figure 5 A). Ces déformations longitudinales (grandeur sans dimension) peuvent être calculées par la relation suivante :

$$\varepsilon = \frac{dl}{dS} \quad (2)$$

Avec dS la longueur initiale du segment considéré, et dl la variation de longueur de ce segment. Les déformations à un point situé à une distance y du centre de la section peuvent être calculées par le produit du changement de courbure C et la distance y de la ligne centrale de la tige (ligne neutre) :

$$\varepsilon = y \times C \quad (3)$$

² F : la force résultant de l'action du vent présente une composante horizontale appelée Force de traînée.

³ Le bras de levier caractérise la distance du point d'application de la force à tout autre point de la structure.

La valeur de la déformation longitudinale varie ainsi avec la position le long d'un rayon de la poutre, atteignant sa valeur maximale à la périphérie de la tige ($y = R$) le long d'un rayon aligné avec la direction de la sollicitation \vec{F} , formant un champ de déformations.

A ces déformations s'associent des contraintes longitudinales σ , c'est-à-dire des efforts internes permettant d'équilibrer l'effet des forces externes. Ces contraintes (force/unité de surface) correspondent à des contraintes de tension du côté convexe et des contraintes de compression du côté concave (Figure 5 B). En fonction de l'intensité des déformations, le comportement du matériau comprend généralement deux phases. La première est la phase élastique, dans laquelle toutes les déformations subies sont réversibles, c'est-à-dire que le matériau retrouve sa forme initiale si l'on supprime la sollicitation. Le matériau ne subit pas d'endommagement pendant cette phase élastique. Si les déformations sont plus importantes, le comportement du matériau entre dans une phase plastique c'est-à-dire une phase d'endommagement. Le matériau ne retrouve alors plus sa forme et ses dimensions initiales si l'on supprime la sollicitation. Dans le domaine élastique, la contrainte est calculée comme le produit de la déformation par le module de rigidité, ou « module d'Young » E du matériau :

$$\sigma = E \times \varepsilon \quad (4)$$

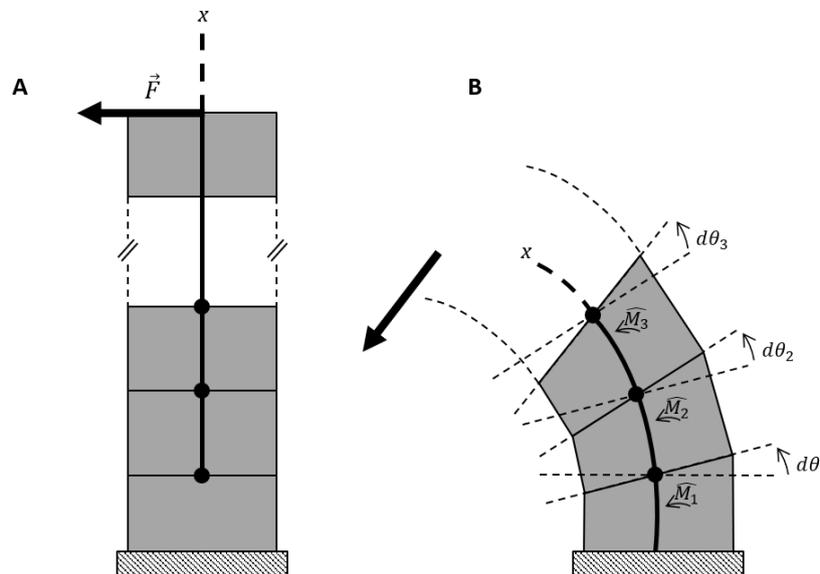


Figure 4 : Modélisation d'une flexion de poutre encadrée.

La force de flexion appliquée sur une poutre initialement verticale (A) entraîne un moment fléchissant \vec{M} et une rotation $d\theta$ autour de l'axe x (neutre) (B). D'après Moulia *et al.* (2015).

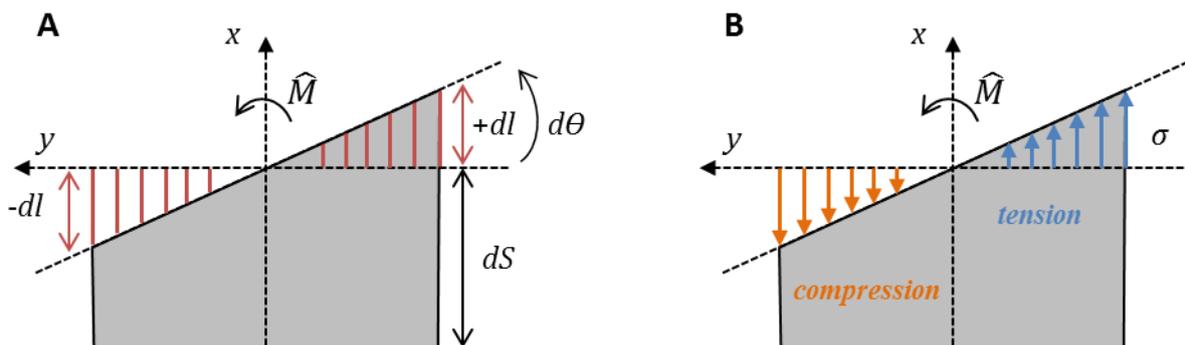


Figure 5 : Déformations et contraintes longitudinales agissant sur une section transversale de poutre sous l'effet d'une flexion.

(A) Les déformations induites par le moment de flexion sont une élongation du côté convexe avec un signe de déformation positif ($\varepsilon = dl/dS$) et à un raccourcissement du côté concave avec un signe de déformation négatif ($\varepsilon = -dl/dS$). (B) Les contraintes (σ) associées à ces déformations sont des pressions internes (force/unité de surface) correspondant à des tensions du côté convexe et à des compressions du côté concave. D'après Moulia *et al.* (2015).

I.3.1.2 Modèle intégratif de la mécanoperception : le modèle S³m

La sollicitation mécanique peut être décrite en termes de déformations ou de contraintes. Afin de déterminer parmi ces variables mécaniques, laquelle est perçue par la plante, une étude biomécanique quantitative de l'effet d'une flexion contrôlée sur la croissance longitudinale de la tige de tomate a été réalisée par Coutand et Moulia (2000). Ces travaux ont recherché une relation quantitative entre le stimulus mécanique appliqué et la réponse de croissance de la plante. En testant différents scénarii, les auteurs ont mis en évidence la corrélation la plus forte entre la durée de la réponse de croissance et la somme des déformations longitudinales subies par la tige

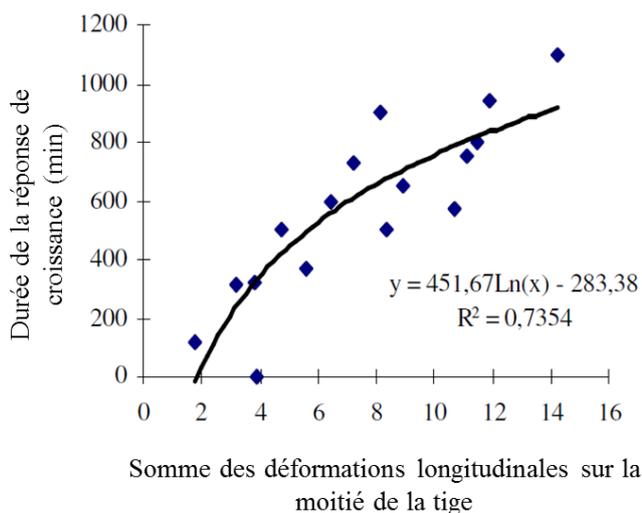


Figure 6 : Evaluation expérimentale du modèle S³m. On observe une relation logarithmique entre la durée de réponse de croissance et la somme des déformations longitudinales. La courbe noire représente la prédiction du modèle S³m ; les points sont les résultats. D'après Coutand et Moulia (2000).

(Figure 6). Ils n'ont mis en évidence aucune relation entre la force appliquée

ou les contraintes et la réponse de croissance. Il apparaît donc que la déformation induite par la stimulation mécanique est la variable pertinente pour expliquer les réponses en élongation observées sur les tiges de tomates. Ces résultats ont permis de développer un modèle nommé S³m pour « *Sum of Strain-Sensing model* » (Moulia *et al.*, 2011). Ce modèle S³m suppose que

(i) toutes les cellules vivantes déformées émettent un signal dS dont l'intensité est proportionnelle à la déformation perçue et que (ii) ces signaux se somment pour donner un signal S qui conduit à une réponse thigmomorphogénétique observable à l'échelle de la plante. Le modèle S³m a également été testé à une échelle locale sur les réponses en croissance secondaire chez le peuplier. Au sein d'une zone fléchie, une corrélation positive a été observée entre la somme des déformations longitudinales sur un volume de tige fléchie et la réponse en croissance radiale (Coutand *et al.*, 2009).

Ce modèle de perception a également été validé au niveau des premières étapes moléculaires de la transduction du signal. Une étude menée par une approche de type AFLP-cDNA a permis d'isoler chez le noyer un gène nommé *JrZFP2*, codant un facteur de transcription à deux doigts de zinc de la famille des protéines Cys2/His2 (C2H2-ZFP). L'expression de ce gène est induite fortement et rapidement (30 minutes) après une flexion contrôlée de la tige (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Son homologue (*PtaZFP2* pour *Populus tremula x alba ZFP2*) a été identifié chez le peuplier, et son expression est induite dès cinq minutes après la flexion, avec des pics d'expression 10 à 30 min après la flexion. L'accumulation des transcrits est localisée au niveau de la zone fléchie puisque l'induction du gène n'est pas détectée dans les autres organes de la plante. De plus, la régulation de son expression semble plus sensible à une flexion qu'à d'autres stress abiotiques de type froid ou salin (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008). Par exemple, l'expression de *PtaZFP2* 30 min après l'inclinaison de la plante est 25 fois inférieure à celle observée 30 min après une flexion (Martin *et al.*, 2009). A la suite d'une flexion contrôlée, il a été montré que la quantité relative de transcrits de *PtaZFP2* était fortement augmentée et linéairement corrélée à la somme des déformations appliquées, ce qui en fait un excellent marqueur de la mécanoperception (Coutand *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces études a permis d'identifier la variable mécanique perçue lors d'une flexion comme étant la déformation longitudinale. Ces connaissances nous permettent désormais de quantifier le stimulus appliqué en termes de déformations.

1.3.1.3 Accommodation de la sensibilité des arbres à des flexions répétées

Nous avons vu précédemment que la perception des sollicitations mécaniques était intégrée par la plante pour conduire à une réponse phénotypique. Or, dans la nature, les plantes sont continuellement soumises au vent. D'après les résultats précédents, l'application de flexions quotidiennes induites par le vent entraînerait une accumulation de réponses

thigmomorphogénétiques menant à des paysages constitués uniquement d'arbres de petites tailles. Or, ce n'est évidemment pas le cas, ce qui suggère l'existence d'un processus d'accommodation aux sollicitations multiples permettant aux plantes de croître malgré un environnement mécanique fluctuant. Dans leur étude sur l'Orme d'Amérique, Telewski et Pruyn (1998) se sont intéressés à l'effet de différents régimes de flexions sur la réponse en croissance radiale. En mesurant la réponse en croissance secondaire des arbres suite à cinq flexions par jour, ou 80 flexions par jour pendant trois semaines, les auteurs n'ont montré aucune différence significative entre les deux traitements, suggérant une désensibilisation de la plante aux flexions multiples. Pour mieux caractériser ce mécanisme, des travaux ont été réalisés sur l'impact de flexions répétées sur la croissance du peuplier (Martin *et al.*, 2010). Après avoir mesuré l'impact d'une flexion unique ou de flexions répétées (une flexion par jour pendant neuf jours) sur la croissance secondaire de la tige, les auteurs ont comparé ces réponses avec les résultats de modèles intégrant l'effet additif des flexions (Figure 7). Si les plantes réagissaient avec la même intensité à toutes les flexions, la courbe de croissance en diamètre d'une tige subissant neuf flexions en neuf jours devrait décrire la courbe du modèle 9 x 1F (courbe rouge) avec une croissance radiale maximale 10 jours après la première flexion. Or, les données expérimentales obtenues sur des plantes traitées avec un régime de flexions répétées (courbe noire) montrent un pic de croissance en diamètre dès le troisième jour après le début du traitement, puis la croissance en diamètre journalière diminue après la quatrième flexion malgré l'application d'autres flexions. Les auteurs ont donc modélisé une courbe d'augmentation de croissance en diamètre en ne prenant en compte que l'effet additif des trois premières flexions

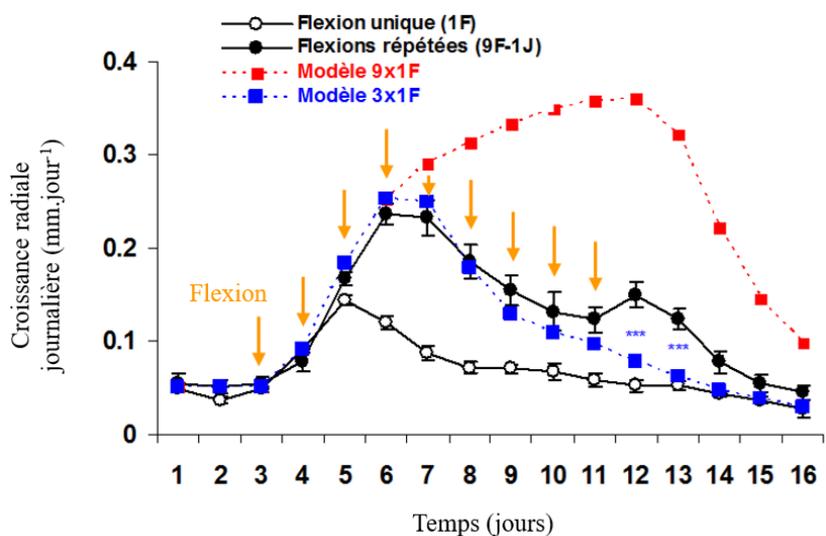


Figure 7 : Comparaison de l'effet d'une flexion transitoire unique et de flexions transitoires répétées sur la croissance en diamètre chez le peuplier.

Chaque flèche représente une flexion. Réponses de croissance observées suite à 9 flexions chacune séparée de 24h (rond noir) et une flexion unique (rond vide). Les lignes en pointillés représentent des courbes théoriques calculées en additionnant 9 fois (rouge) ou 3 fois (bleu) l'effet d'une flexion. Le modèle permettant de reproduire l'évolution de la réponse à 9 flexions est celui supposant que seuls les effets des 3 premières flexions s'ajoutent. D'après Martin *et al.* (2010).

(courbe bleue). Cette courbe correspond à l'effet observé expérimentalement. Il semble donc que les plantes ne réagissent qu'aux trois premières flexions et qu'une désensibilisation à la stimulation mécanique s'installe ensuite.

Dans un environnement forestier, Bonnesoeur *et al.* (2016) ont montré que les arbres ne percevaient pas les différents types de vent de la même façon. Cette étude a étudié la thigmomorphogénèse dans une forêt acclimatée (Hêtraie), en combinant la charge naturelle du vent et des flexions contrôlées ajustées à partir du régime de déformation naturel des arbres. En plus des déformations naturelles induites par le vent, les auteurs ont imposé aux arbres des déformations artificielles de l'ordre de $\varepsilon = 0.015\%$ correspondant au pic de vitesse des vents journaliers, des déformations de $\varepsilon = 0.04\%$ correspondant au pic de vitesse de vents dépressionnaires moyens (retour hebdomadaire) et des déformations de $\varepsilon = 0.15\%$ correspondant au pic de vitesse de vents dépressionnaires intenses (retour annuel). Les auteurs ont observé une augmentation de croissance en diamètre seulement chez les arbres subissant une déformation de l'ordre de $\varepsilon = 0.15\%$. Cela suggère que les arbres sont capables de filtrer les déformations ressenties, grâce à un seuil minimum de perception, point clé de leur acclimatation (Mouliat *et al.*, 2011). En effet, répondre trop souvent ou trop fortement aux signaux mécaniques est coûteux en énergie pour la plante, et pourrait conduire à négliger d'autres signaux environnementaux, comme par exemple la lumière. Et à l'inverse, ne pas répondre suffisamment, fait prendre un risque mécanique à la plante. Pour le peuplement de hêtres de cette étude, étant donné que seules les déformations $\varepsilon = 0.15\%$ ont déclenché une réponse de croissance radiale thigmomorphogénétique alors que les déformations $\varepsilon = 0.04\%$ ne l'ont pas fait, le seuil de perception minimale se situerait donc entre $0,04\%$ et $0,15\%$ (Bonnesoeur *et al.*, 2016).

Comme discuté précédemment, le gène *PtaZFP2* est considéré comme un marqueur moléculaire précoce de la réponse à la flexion. Ce gène a été très utile pour tester l'impact de flexions répétées de la tige sur les réponses moléculaires. Lors d'une flexion de la tige avec une déformation moyenne de 1% , l'accumulation des transcrits 30 min après la flexion est en moyenne 320 fois supérieure à celle observée dans les plants non fléchis (Martin *et al.*, 2010). Cependant, en réponse à des flexions répétées espacées de 24h, l'accumulation des transcrits à partir de la deuxième flexion est très faible par rapport à celle observée lors de la première flexion (Figure 8 A). Il faut entre 3 et 5 jours entre deux flexions pour observer une accumulation des transcrits (en réponse à la deuxième flexion) qui soit semblable à celle observée après une flexion unique (Figure 8 B).

Une analyse transcriptomique a été effectuée sur des tiges de peuplier soumises à une ou deux flexions espacées de 24 h, l'accumulation de transcrits étant observée 30 minutes après chaque flexion (Pomiès *et al.*, 2017). Les résultats ont montré l'étendue du phénomène au niveau moléculaire puisque 96 % des gènes régulés 30 minutes après la première flexion ne l'étaient pas après la seconde flexion. A l'inverse, des gènes ne présentant pas de modification d'expression en réponse à la première flexion, étaient modulés à la suite de la seconde et d'autres sont régulés de manière identique entre la première et la deuxième flexion.

Les arbres sont donc capables d'ajuster leur sensibilité aux sollicitations mécaniques répétées, et ce phénomène d'acclimatation de la sensibilité du peuplier à la flexion a été nommé accommodation à la flexion. Toutefois, les mécanismes sous-jacents à ce phénomène ne sont pas élucidés.

I.3.2 Sensibilité à l'échelle cellulaire

La déformation étant la variable mécanique perçue, la question est maintenant de comprendre comment la cellule est capable de transformer ce signal mécanique en un signal chimique ou électrique interne. Quels sont les capteurs de déformations dont l'activation déclenche une réponse biologique ? Un certain nombre de capteurs ont été proposés et seront présentés ci-dessous.

I.3.2.1 Mécanoperception : le rôle des canaux mécanosensibles

Les canaux mécanosensibles sont des canaux ioniques capables de s'ouvrir en réponse à une tension mécanique subie par la membrane dans laquelle ils sont insérés. Cette tension peut être induite par des stimuli mécaniques, comme le toucher, le vent, la pression de turgescence et également par un stimulus gravitationnel. L'état ouvert-fermé de ces canaux permet des

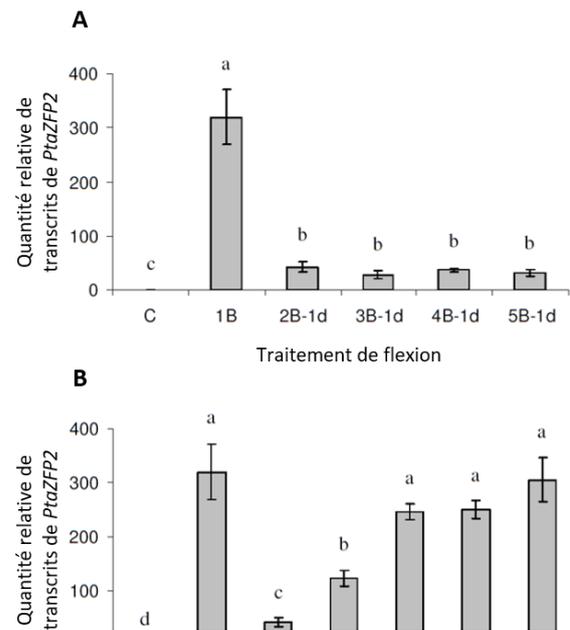


Figure 8 : Phénomène d'accommodation : effet des flexions répétées.

(A) Accumulation des transcrits de *PtaZFP2* en réponse à une ou plusieurs flexions de la tige. (B) Effet du délai entre deux flexions successives sur l'accumulation des transcrits de *PtaZFP2*. C : plantes contrôles non fléchies, B : traitements de 1, 2, 3, 4, 5 flexions, d : délais de 1, 3, 5, 7 et 10 entre les deux flexions. D'après Martin *et al.* (2010).

mouvements d'ions (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ ...) dans la cellule, transformant ainsi le signal mécanique en signal électrochimique.

L'activité de tels canaux a été décrite pour la première fois il y a plus de 30 ans dans des cellules animales (Guharay et Sachs, 1984) par la méthode du patch-clamp (Hamill *et al.*, 1981). Chez les plantes, les deux familles de canaux mécanosensibles les plus étudiées à ce jour sont la famille des MSL (MscS-Like, *MechanoSensitive Channel of Small conductance-Like*) et la famille des MCA (*Mid1-Complementing Activity*) (Peyronnet *et al.*, 2014).

Dans le génome d'*Arabidopsis* on retrouve 10 protéines MSL avec diverses expressions et différents profils de localisation cellulaire (Pivetti *et al.*, 2003; Haswell, 2007). Sur la base des régions conservées, les MSLs peuvent être groupés en deux classes, la classe I et la classe II (Haswell, 2007). Les MSLs de classe I (*AtMSL1-3*) contiennent des peptides signaux vers les plastes ou les mitochondries, contrairement à ceux de la classe II (*AtMSL4-10*) qui ne contiennent pas de peptide signal et se situent sur les membranes plasmique et vacuolaire (Haswell et Meyerowitz, 2006; Haswell *et al.*, 2008). *AtMSL2* et *AtMSL3* seraient impliqués dans le contrôle de la taille et de la forme du chloroplaste (Haswell et Meyerowitz, 2006). Le double mutant *atmsl2;atmsl3* possède des feuilles avec des zones chlorotiques, une organisation tissulaire perturbée et des chloroplastes considérablement agrandis (Haswell et Meyerowitz, 2006). La modification de l'osmolarité cytoplasmique des doubles mutants *atmsl2;atmsl3* restaure un phénotype de plastes de type sauvage, indiquant l'importance de MSL2 et 3 dans la perception des stress osmotiques (Veley *et al.*, 2012). *AtMSL9* et *AtMSL10* sont préférentiellement localisés dans les pointes racinaires, les tissus vasculaires racinaires ou aériens (Haswell *et al.*, 2008). Ils présentent également un adressage à la membrane plasmique, mais aussi dans une moindre mesure à des endomembranes (Hamilton *et al.*, 2015). L'utilisation de lignées mutantes *msl9* et *msl10* a montré une activité canal mécano-dépendante avec une sélectivité plus importante aux ions Cl^- qu'aux ions Ca^{2+} au niveau des racines d'*A. thaliana* (Haswell *et al.*, 2008), alors qu'aucune sélectivité par rapport aux ions n'a été établie pour MSL2. Plus récemment, MSL10 a été montré impliqué dans le processus de mort cellulaire, ce qui indiquerait l'importance des canaux MSL dans plusieurs activités biologiques (Veley *et al.*, 2014).

Plus récemment, un autre type de canaux mécanosensibles a été mis en évidence sur la racine d'*A. thaliana* : les canaux calciques MCA1 et MCA2 (*mid1-Complementing Activity*) (Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010). Comme leur nom l'indique, ces protéines ont la capacité de compléter le phénotype létal du mutant *mid1* de *Saccharomyces cerevisiae*, défectueux pour de canaux calciques mécanosensibles (Nakagawa *et al.*, 2007). Ils sont

responsables de l'augmentation de calcium cytosolique en réponse à un stress hypo-osmotique (Iida *et al.*, 2014). Si le mutant *Atmca2* ne présente pas de phénotype particulier, le mutant *Atmca1* et le double mutant *Atmca1;Atmca2* présentent des retards dans le développement de la rosette et de la hampe forale, et leurs racines ne sont pas capables de percevoir un changement de rigidité du milieu d'agar (Yamanaka *et al.*, 2010). En effet, *AtMCA1* exprimé à l'extrémité de la racine est montré nécessaire pour détecter la dureté du milieu gélosé (Iida *et al.*, 2014). Ce phénotype évoque donc une sensibilité accrue au toucher du mutant *Atmca1*.

Chez les animaux, la caractérisation des canaux mécanosensibles perméables aux cations Piezo1 et Piezo2 a révélé de nouveaux rôles de la mécanoperception dans le développement et la physiologie (Koser *et al.*, 2016; Nonomura *et al.*, 2017). Bien qu'un et deux homologues de ces canaux existent respectivement chez *A. thaliana* et *M. truncatula*, aucune étude à ce jour n'a été réalisée pour élucider leurs rôles chez les plantes (Coste *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2016).

Récemment, une étude a montré que la protéine DEK1 serait également associée à une activité de canal mécanosensible calcique (Tran *et al.*, 2017). Cette protéine est composée d'une boucle extracellulaire, de plusieurs domaines transmembranaires, et d'un domaine intracellulaire qui possède une activité protéolytique de type calpaïne, connue pour dépendre des ions calcium Ca^{2+} . Des études transcriptionnelles suggèrent que l'activation du domaine intracellulaire de DEK1 régule l'expression de gènes impliqués dans la formation de la paroi (Johnson *et al.*, 2008; Demko *et al.*, 2014). Cependant il reste à déterminer si la partie transmembranaire forme un canal aux ions Ca^{2+} activé mécaniquement ou si c'est un mécanocapteur associé à d'autres canaux calciques. Le domaine transmembranaire de DEK1 pourrait être alors activé par le niveau de calcium intracellulaire régulé par les autres canaux mécanosensibles calciques, comme MCA1, MCA2 ou potentiellement Piezo.

I.3.2.2 Capteurs d'intégrité de la paroi cellulaire

Chez les animaux, des études indiquent que la perception et la transduction des signaux mécaniques impliquent un couplage physique entre le cytosquelette et la membrane plasmique, par le biais de protéines appelées intégrines. Ces dernières se fixent sur des protéines de la matrice extracellulaire contenant le motif RGD (Arg-Gly-Asp) et forment un lien entre l'actine du cytosquelette et le cytoplasme (Hynes, 2002). Ainsi une déformation du milieu externe se traduit par une déformation du cytosquelette perçue à l'intérieur de la cellule : les stimuli externes sont transformés en stimuli internes.

Chez les plantes, on suppose l'existence d'un réseau similaire, le continuum CPMCW (*Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall*), où des protéines participeraient à la mise en place d'un lien physique entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Jaffe *et al.*, 2002). Il existerait chez les plantes des protéines qualifiées d'« *integrin-like* » reconnaissant également des motifs RGD qui permettraient de relier les microtubules à la membrane plasmique, ce qui faciliterait l'ouverture et la fermeture des canaux mécanosensibles. Parmi ces protéines, une famille de protéines RLK (*Receptor Like Kinase*) reconnaissant le motif RGD a été identifiée, la famille des L-type LeRLK (*Lectin-like RLK*) (Gouget *et al.*, 2006; Bellande *et al.*, 2017). Les domaines de lectine sont connus pour se lier aux glucides, et chez le peuplier une liaison avec des hydrates de carbone, comme l' α -rhamnose a également été démontrée (André *et al.*, 2005). Des modifications de l'état de la paroi cellulaire suite à des sollicitations mécaniques permettraient d'activer le domaine kinase cytosolique de ces protéines et engendrer une cascade de transduction. D'autres protéines RLK situées à l'interface du continuum CPMCW pourraient être également impliquées dans ce processus d'échange entre la paroi et l'espace intracellulaire (Baluška *et al.*, 2003; Monshausen et Haswell, 2013). Des membres de la famille *Catharanthus roseus* RLK (CrRLK1-Like) ont récemment été proposés comme capteurs de l'intégrité de la paroi cellulaire. THESEUS1 (THE1) a été identifié comme un suppresseur du phénotype du mutant *cesA6*, mutant déficient en cellulose (Hématy *et al.*, 2007). Le double mutant *the1-cesA6* restaure partiellement la diminution de l'élongation de l'hypocotyle du mutant *cesA6*. Cependant, les mutations ou la surexpression du gène THE1 n'ont montré aucun effet chez les plants sauvages d'*Arabidopsis*. Par conséquent, THE1 a été proposé comme senseur de l'état de la paroi cellulaire et comme modulateur de l'élongation cellulaire lorsque la synthèse de la cellulose est perturbée. Récemment, une étude sur deux mutants d'*A. thaliana* mutés pour le gène *FERONIA* (*fer-2* et *fer-4*) a montré l'importance de ces RLK dans la perception du signal mécanique par les racines. En effet, lors du contournement d'un obstacle, la racine d'une plante sauvage présente deux courbures. Chez les mutants *fer-2* et *fer-4*, une seule courbure se forme, montrant l'incapacité des mutants à percevoir complètement la sollicitation mécanique (Shih *et al.*, 2014). Des études ont montré que les WAKs (*Wall-Associated Kinases*) formaient une liaison avec les pectines de la paroi (Kohorn et Kohorn, 2012). L'affinité pour les pectines est fortement améliorée en présence de calcium, fournissant ainsi un mécanisme potentiel pour surveiller l'intégrité de la paroi cellulaire (Decreux et Messiaen, 2005). L'expression des WAKs dans la perception de sollicitations mécaniques a également été démontré, notamment lors d'une stimulation gravitationnelle (Tocquard *et al.*, 2014; Azri *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces résultats montrent que ces différents acteurs seraient de bons candidats intervenant dans la mécanoperception (Figure 9).

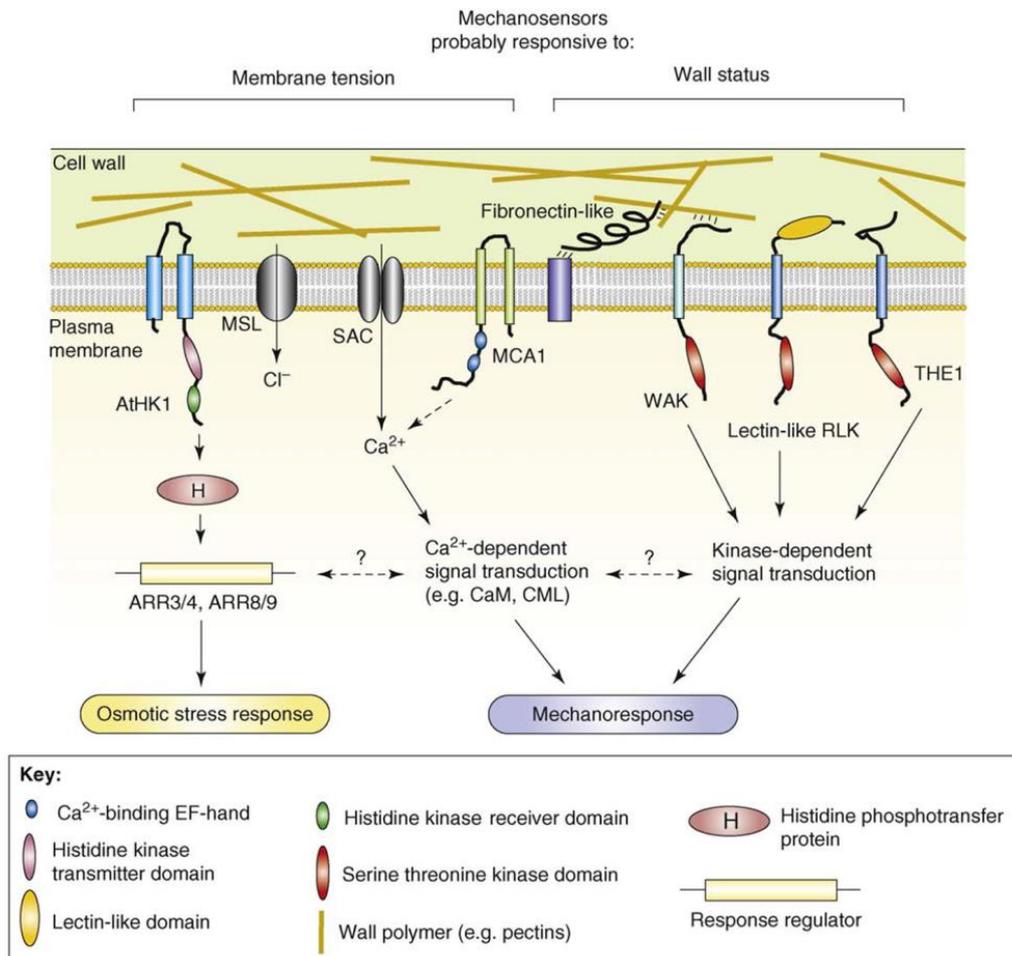


Figure 9 : Schéma des différents récepteurs potentiels des sollicitations mécaniques.

Les mécanosenseurs appartiennent probablement à deux catégories : ceux activés par la tension de la membrane comme les canaux mécanosensibles (MSL, MCA) entraînant un flux d'ions dans la cellule et ceux impliqués dans le continuum CPMCW comme les protéines RLK (WAK, Lectine-like RLK, THE1) entraînant une cascade de phosphorylation. (Monshausen et Gilroy, 2009).

Il serait également intéressant d'étudier si ces protéines mécanoperceptives se retrouvent sur des organes spécifiques (tige, racine, feuille...) ou sur des structures cellulaires différentes (stomates, fibres, vaisseaux...).

I.3.3 Les acteurs moléculaires précoces de la voie de signalisation du signal mécanique

I.3.3.1 L'intervention du calcium

Le calcium est reconnu comme un messager secondaire majeur des voies de transduction chez les animaux et chez les plantes (Berridge *et al.*, 2000; Stael *et al.*, 2012). Il est maintenu en faible concentration dans le cytosol, impliquant un transport actif vers les espaces extracellulaires et également un stockage dans les organites intracellulaires. Cette compartimentation du calcium permet la formation de signaux calciques, c'est-à-dire une variation spatio-temporelle de la concentration en calcium cytosolique, notamment grâce aux canaux calciques présents dans la membrane plasmique (Monshausen *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2009; Kurusu *et al.*, 2012). La mobilisation du calcium intracellulaire pourrait également jouer un rôle dans l'amplification de ce signal calcique (Chehab *et al.*, 2009; Toyota et Gilroy, 2013).

Ces signaux sont capables d'induire des réponses cellulaires telles que la modification d'activités enzymatiques ou la régulation de l'expression de gènes (McAinsh et Pittman, 2009). Chez les plantes, des augmentations rapides et transitoires de la concentration en calcium cytosolique ont été observées en réponse à des stimuli développementaux et environnementaux (Trewavas et Knight, 1994; White et Broadley, 2003). Chez des plants de tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*) génétiquement modifiés pour exprimer l'aequorine (molécule luminescente en présence de calcium), l'application de vent sur l'hypocotyle (produit par l'expulsion d'air d'une seringue à travers une aiguille) induit une augmentation rapide, transitoire et dose-dépendante de la concentration en calcium cytosolique (Knight *et al.*, 1992). De même, l'application d'une flexion sur une racine d'*A. thaliana* entraîne une augmentation rapide du $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ du côté en tension de la racine (Figure 10) (Monshausen *et al.*, 2009; Monshausen et Haswell, 2013).

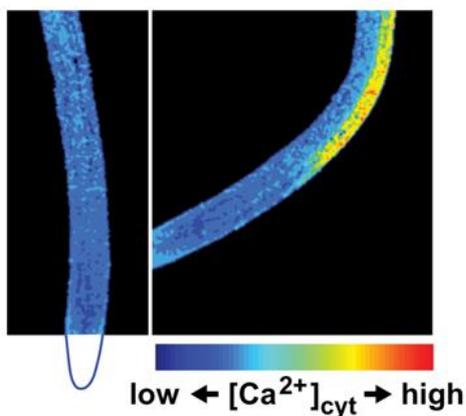


Figure 10 : L'application d'une flexion sur la racine d'*A. thaliana* entraîne une augmentation du calcium cytosolique du côté en tension des racines mais pas du côté en compression.

L'étude a utilisée des plants d'*A. thaliana* transformées et exprimant la construction 35S:YC3.6 permettant la visualisation par fluorescence du calcium cytosolique. A gauche, une racine en position verticale et à droite la racine fléchie à l'aide d'un capillaire de verre. L'augmentation de la concentration de $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, est observée grâce à l'augmentation du signal lumineux représenté par les couleurs jaune et rouge sur l'échelle. (Monshausen *et al.*, 2009).

Ces signaux calciques doivent être décodés par des protéines senseurs pour les transformer en réponses biochimiques. Chez les plantes, on regroupe trois familles majeures de senseurs de calcium : les calmodulines (CaM) et les calmoduline-like (CML), les protéines CBLs (*Calcineurin B-like*) et les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs) (Bouché *et al.*, 2005; Das et Pandey, 2010; Asai *et al.*, 2013). Ces protéines diffèrent par leur affinité pour le calcium, leur expression et leur localisation, ce qui contribue à la spécificité de la signalisation calcique. A la suite d'une flexion unique de tige de peupliers, plusieurs gènes codant des CaM (CAMTA3, CAM5) et des CDPK (CDPK32 ; CDPK3, présentent une augmentation de leur expression dans les 30 minutes suivant la flexion (Pomiès *et al.*, 2017).

I.3.3.2 La production des espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène est à l'origine des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) formées par sa réduction séquentielle, incluant principalement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH°). Les ROS sont produites en faible quantité au cours du métabolisme normal, par la photosynthèse, la respiration ou par des processus enzymatiques. Lors d'un déséquilibre entre la production et l'élimination de ces radicaux libres, il se produit alors un stress oxydatif dans la cellule. Bien que ce stress oxydatif représente une menace pour la cellule, il peut également participer aux voies de réponses précoces aux stress biotiques et abiotiques et modifier l'expression de gènes. De la même façon que pour le calcium, c'est l'aspect spatio-temporel de la production de ROS qui détermine la spécificité de la réponse de la plante (Møller et Sweetlove, 2010). Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), la stimulation mécanique par frottement des entre-nœuds, induit une augmentation rapide du peroxyde d'hydrogène (Depège *et al.*, 2000). De même une stimulation mécanique blessante de feuilles de *Mesembryanthemum crystallinum* (ou ficoïde glaciale) induit une augmentation des niveaux de H_2O_2 avec un pic quinze minutes après la blessure (Ślesak *et al.*, 2008). Généralement, la production ne se limite pas au site de blessure mais est en partie systémique. Enfin, les ROS semblent jouer un rôle dans l'activation de canaux calciques de la membrane plasmique, suggérant leur intervention dans l'influx du calcium dans le cytosol. Cette relation pourrait impliquer un fonctionnement commun dans la réponse des plantes aux signaux mécaniques (Mori et Schroeder, 2004; Chehab *et al.*, 2009).

I.3.3.3 L'implication des hormones

- L'éthylène

L'éthylène est une phytohormone gazeuse qui régule une multitude de processus végétaux, allant de la germination à la sénescence (Bleecker et Kende, 2000). Des études ont également montré l'implication de l'éthylène dans la réponse à des stress mécaniques. Par exemple, la flexion de feuilles de *Vigna radiata* entraîne une accumulation rapide des ARNm de l'ACC synthase, enzyme clé de la production d'éthylène (Botella *et al.*, 1995). L'augmentation de l'expression des gènes de cette voie de biosynthèse a également été montrée à la suite de stress mécanique chez *Arabidopsis*, le peuplier ou la tomate (Tatsuki et Mori, 1999; Lee *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2009; Pomiès *et al.*, 2017). Love *et al.* (2009) ont montré l'implication de l'éthylène dans l'augmentation de la croissance radiale en réponse à un stress gravitropique.

Toutes ces études suggèrent que l'éthylène pourrait être impliqué dans les réponses de croissance au stress mécanique. Cependant, des mutants d'*A. thaliana* insensibles à l'éthylène, *etr1-3* et *ein2-1*, présentent une réponse thigmomorphogénétique (diminution des inflorescences et retard de floraison) identique aux plantes sauvages soumises à une sollicitation mécanique (Johnson *et al.*, 1998). Une étude effectuée sur des tabacs a montré au contraire que des plants insensibles à l'éthylène ne présentaient pas la même réponse thigmomorphogénétique au niveau de la biomasse aérienne que des plants sauvages (Anten *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que même si certains aspects de la thigmomorphogénèse peuvent être régulés par l'éthylène, d'autres aspects semblent être indépendants de cette voie de régulation.

- Les jasmonates

Les jasmonates font également partie du groupe des phytohormones et le terme « jasmonate » fait en général référence à l'acide jasmonique et ses esters, comme le méthyl jasmonate. Ils sont ubiquitaires chez les plantes supérieures et présentent un large spectre d'activités biologiques, dans la reproduction, la germination, la sénescence et également dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques des plantes (Wasternack, 2007). Leur rôle a également été démontré dans la réponse à la blessure (*wounding*) (Koo et Howe, 2009) et dans l'enroulement des vrilles de la bryone (Falkenstein *et al.*, 1991). Puisque ces événements ont une composante mécanique, les jasmonates pourraient donc jouer un rôle dans la mécanoperception.

Tretner *et al.* (2008) ont montré chez la luzerne (*Medicago truncatula*), que des sollicitations mécaniques de type toucher, sur les tiges et les racines, entraînaient une augmentation du taux relatif de transcrits du gène *MtAOC1*, gène catalysant une étape clé dans la biosynthèse des jasmonates. Chez *A. thaliana*, des mutants du gène *JAR1* requis pour générer la forme active de l'hormone ne montrent aucune réponse thigmomorphogénétique à la suite de sollicitations mécaniques de type toucher (Chehab *et al.*, 2012). Chez le peuplier, l'accumulation des transcrits d'enzymes de la voie des jasmonates a également été montrée en réponse à une flexion contrôlée de la tige (Lakhal, 2010; Pomiès *et al.*, 2017). L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que les jasmonates joueraient un rôle dans la mécanoperception.

- **Autres hormones**

L'acide abscissique (ABA) joue un rôle dans la dormance et l'abscission foliaire, mais cette hormone s'accumule également chez les plantes suite à un stress hydrique et entraînerait la fermeture des stomates des feuilles (Taiz et Zeiger, 2006). Une faible augmentation d'ABA est observée suite à une blessure de la feuille de tomate, mais les auteurs interprètent ce résultat comme une réponse au stress hydrique « imposé » par l'entrée d'air dans la plante (Birkenmeier et Ryan, 1998). La fermeture des stomates a été observée dans certains cas sur des plantes soumises à un stress mécanique, ce qui pourrait éventuellement être attribué à l'ABA (Biddington, 1986).

L'auxine, de par son rôle dans la régulation de la division et de la différenciation cellulaire, pourrait potentiellement jouer un rôle dans les modifications de croissance observées en réponse au stress mécanique. A la suite d'une stimulation mécanique, il a été mis en évidence une augmentation globale de l'activité peroxydase, impliquée dans la dégradation de l'auxine, après 1 h chez la tomate (Lefèvre *et al.*, 1993). L'induction par l'auxine de l'expression du gène *TCH4*, codant une xyloglucan endotransglycolase (XET) impliquée dans le stress mécanique, a été observée chez *A. thaliana* (Xu *et al.*, 1995). Chez le peuplier, plusieurs gènes *IAA* sont régulés après une flexion unique (Pomiès *et al.*, 2017).

Les brassinostéroïdes ont des effets pléiotropiques sur les systèmes végétaux, avec des effets sur la mitose, l'élongation cellulaire et la différenciation des tissus vasculaires. Comme pour l'auxine, l'induction de l'expression du gène *TCH4* a été observée suite à un traitement de la plante aux brassinostéroïdes (Xu *et al.*, 1995), suggérant une possible implication dans la réponse au stress mécanique.

Les phytohormones sont généralement connues pour intervenir dans la réponse aux stress biotiques, mais l'éthylène et les jasmonates semblent également jouer un rôle dans les réponses thigmomorphogénétiques.

I.3.3.4 Les gènes mécanosensibles

Par des approches « gène candidat », plusieurs études ont identifié de nombreux gènes impliqués dans la réponse aux sollicitations mécaniques : les gènes *TOUCH (TCH)* qui codent des calmodulines ou CML et des Xyloglucan endo-Transglycosylase/Hydrolase (XTH) (Braam et Davis, 1990) ; des gènes codant des protéines kinases (Mizoguchi *et al.*, 1996; Botella *et al.*, 1996) ; des facteurs de transcription (Gilmour *et al.*, 1998) ; des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène et des jasmonates (Mauch *et al.*, 1997; Arteca et Arteca, 1999) ; et des gènes impliqués dans les réponses antioxydatives (Gadea *et al.*, 1999).

Le développement des analyses transcriptomiques a permis une vision plus globale des fonctions moléculaires modifiées à la suite d'un stress mécanique. Ainsi en 2005, une analyse globale réalisée sur des plantules d'*A. thaliana* a montré que l'expression de plus de 2,5 % des gènes était modifiée 30 minutes après une sollicitation mécanique de type toucher (Lee *et al.*, 2005). Parmi les gènes mis en évidence dans cette analyse, trois gènes *XTH*, dont *TCH4*, présentent une induction de leur expression d'un facteur deux par rapport à un témoin non sollicité. Cette protéine est une enzyme capable de modifier la structure des xyloglucanes, composants de la paroi des cellules végétales, indiquant une intervention des sollicitations mécaniques dans la modification des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire.

Concernant les facteurs de transcription, l'étude montre que 66 des 1601 gènes codant des facteurs de transcription présentent une induction de leur expression 30 minutes après la sollicitation mécanique, 33 autres sont inhibés (Lee *et al.*, 2005). Parmi les gènes dont l'expression est la plus modifiée en réponse au toucher, on retrouve deux gènes, *ZAT10* et *ZAT12*, codant des protéines à doigts de zinc de type C2H2. L'homologue de ces gènes a été identifié chez le noyer (*JrZFP2*) (Leblanc-Fournier *et al.*, 2008) et chez le peuplier (*PtaZFP2*) et présente une augmentation rapide et locale de leur expression après une flexion contrôlée de la tige, comme indiqué dans le paragraphe I.3.1.3 (Martin *et al.*, 2009).

Plus récemment, une analyse génomique et temporelle de la réponse transcriptionnelle sur le peuplier suite à une flexion transitoire et d'intensité contrôlée a montré que 6 % du génome (2663 gènes) était différentiellement exprimé (Pomiès *et al.*, 2017). Cette étude a révélé la diversité des processus biologiques affectés par la flexion de la tige et a mis en évidence un nombre élevé de gènes précocement induits puis inhibés à des temps tardifs, suggérant un

mécanisme de rétrocontrôle négatif. Parmi les gènes précocement induits (30 minutes après la flexion), on retrouve le facteur de transcription *PtaZFP2*, des gènes codant des protéines XTH ainsi que des gènes intervenant dans les voies de signalisation en réponse à des stress abiotiques, des gènes intervenant dans l'élimination des ROS (*PtaGrx3*) et des facteurs de transcription activant les voies de signalisation de l'éthylène et des jasmonates. Les réponses tardives affectent les gènes impliqués dans l'organisation des parois cellulaires et le développement du bois. On retrouve par exemple la modulation de l'expression de gènes *MYB*, avec une sous-expression 30 minutes après la flexion et une surexpression 72 h après la flexion. Parmi ces gènes se trouvent des orthologues de *MYB103*, *MYB69* et *MYB46* d'*A. thaliana*, connus pour être impliqués dans la régulation de la synthèse de la paroi secondaire (Ambawat *et al.*, 2013). Des gènes *FLA* (*Fasciclin-Like Arabinogalactan*) connus pour être impliqués dans la formation du bois et dans la biomécanique de la tige (modification de la paroi et dépôt de couche G) (MacMillan *et al.*, 2010; MacMillan *et al.*, 2015) montrent une surexpression à 2 h et 72 h après la flexion. Ces résultats peuvent indiquer l'existence de deux phases dans la réponse aux stress mécaniques par les plantes :

- une réponse rapide des voies de signalisation impliquées dans la défense des plantes aux stress abiotiques et dans la croissance, qui pourrait être interprétée comme un moyen pour les plantes de moduler leur croissance ;
- une réponse plus tardive qui permettrait une modulation de la différenciation tissulaire et des changements de propriétés mécaniques de la tige permettant l'acclimatation des arbres aux stress mécaniques.

L'ensemble de ces résultats nous permet de dresser un premier bilan des acteurs précoces de la mécanoperception et de proposer une possible chronologie de la réponse des plantes à une sollicitation mécanique (Figure 11). Cependant les interactions possibles entre l'ensemble de ces différents partenaires moléculaires restent à identifier.

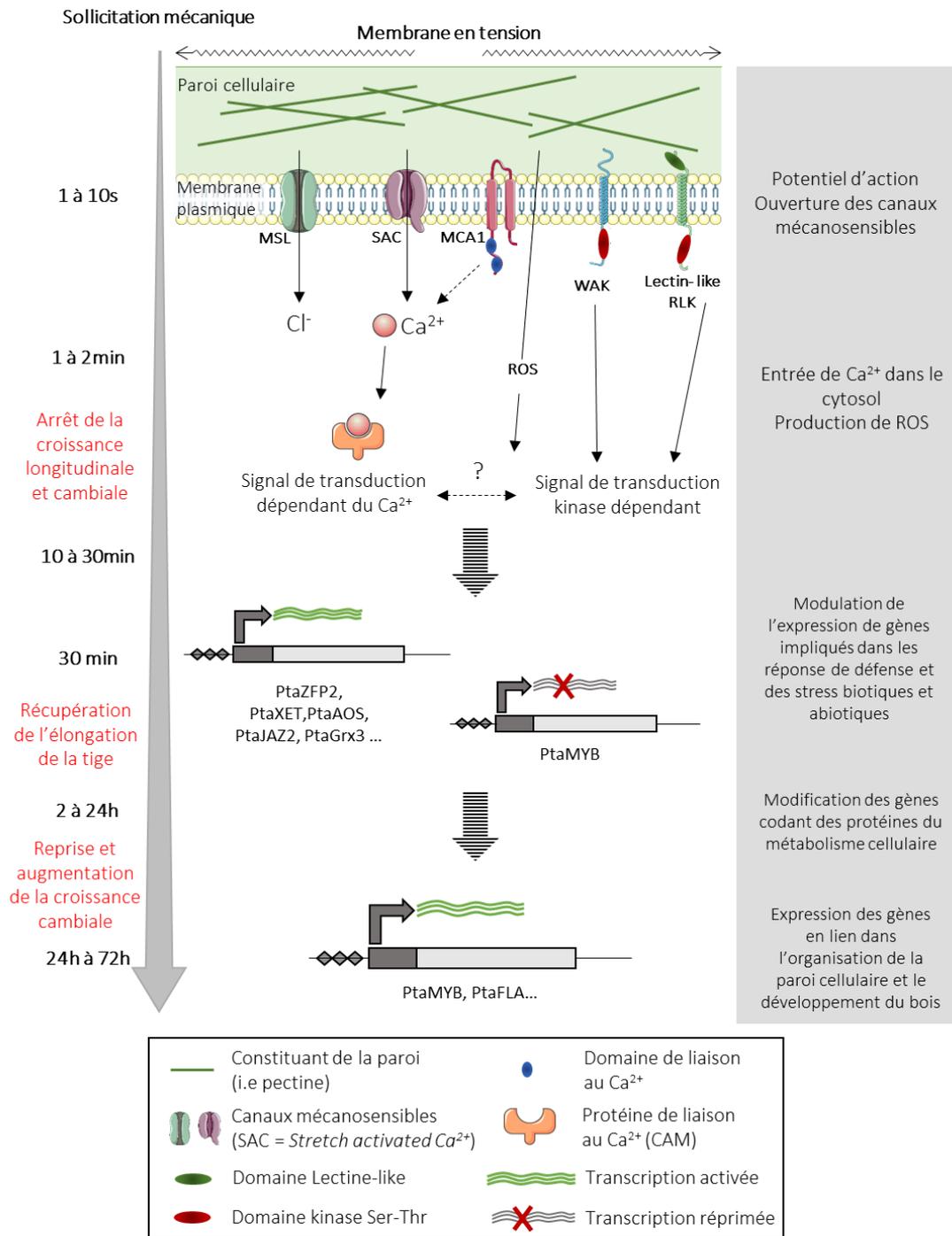


Figure 11 : Cinétique des réponses physiologiques et moléculaires observées suite à une sollicitation mécanique.

La perception d'un stimulus mécanique implique probablement la déformation des senseurs membranaires (canaux mécanosensibles et RLK) et induit un signal à l'intérieur des cellules. La transmission des signaux *via* des voies dépendantes ou indépendantes du Ca²⁺ provoque la modulation de l'expression des gènes qui vont à plus ou moins courts termes modifier la croissance et l'anatomie de la plante. D'après Telewski (2006) ; Monshausen *et al.*, (2009) ; Martin *et al.* (2010) ; Pomiès *et al.* (2017).

II. Le bois : de l'origine biologique au support mécanique de l'arbre

II.1 Anatomie du bois

Le bois est un tissu constitué d'un ensemble de types cellulaires différents qui assurent diverses fonctions dans l'arbre ; de la conduction de la sève au soutien mécanique en passant par le stockage de réserves, l'élaboration et la transformation chimique de substances. Les cellules qui constituent le bois sont formées au niveau de l'assise génératrice libéro-ligneuse appelée cambium qui se situe entre l'écorce et le bois. On distingue l'aubier, zone fonctionnelle du bois, du duramen (bois de cœur) (Figure 12).

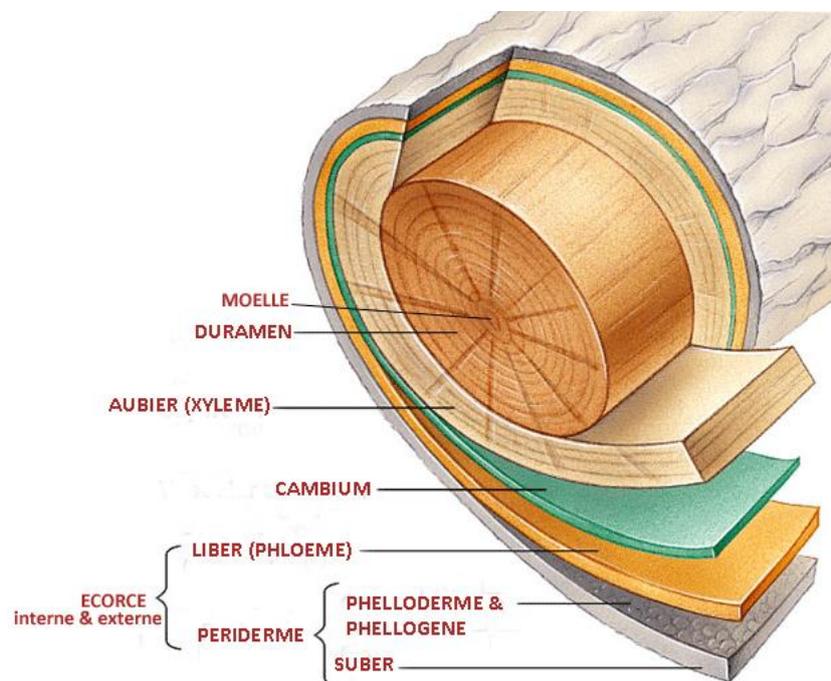


Figure 12 : Structure d'un tronc d'arbre.

Le duramen, partie centrale de l'arbre, est composé de cellules mortes, lignifiées et imprégnées de tanins ou de colorants suivant les espèces. Il sert de squelette rigide à l'arbre. L'aubier, est constitué de cellules servant au transport de la sève brute dans l'arbre. Le cambium est l'assise génératrice des cellules du bois et de l'écorce. L'écorce est constituée du liber à l'intérieur, servant à la circulation de la sève élaborée, et du périderme à l'extérieur, constitué du phelloderme, phellogène et du suber, imprégné de subérine, substance imperméable, servant à protéger les couches internes.

Il est commun d'étudier l'anatomie du bois à partir de trois plans de coupes qui donnent une vue d'ensemble de la structure et qui font ressortir les caractères morphologiques de l'espèce. Ces trois plans perpendiculaires permettent de caractériser ce qu'on appelle le plan ligneux. Il s'agit des plans (i) transversal, perpendiculaire à l'axe de la tige, (ii) longitudinal-radial, dans un plan passant par la moelle, (iii) longitudinal-tangentiel, dans un plan excentré et parallèle à l'axe de la tige. Le plan ligneux des gymnospermes (résineux) est fondamentalement

différent de celui des angiospermes (feuillus). Chez les gymnospermes, le bois est constitué de deux principaux types de cellules : les cellules de parenchyme et les trachéides. Les trachéides assurent à la fois le rôle de soutien mécanique et de conduction de la sève. On parle de bois homoxylé (Figure 13 A). Chez les angiospermes, le bois est plus hétérogène, composé par des types cellulaires jouant chacun un rôle différent : les vaisseaux assurent la conduction de sève, les rayons de cellules de parenchyme servent de réserve et permettent le transport de nutriments et les fibres assurent le rôle de soutien. On parle de bois hétéroxylé (Figure 13 B).

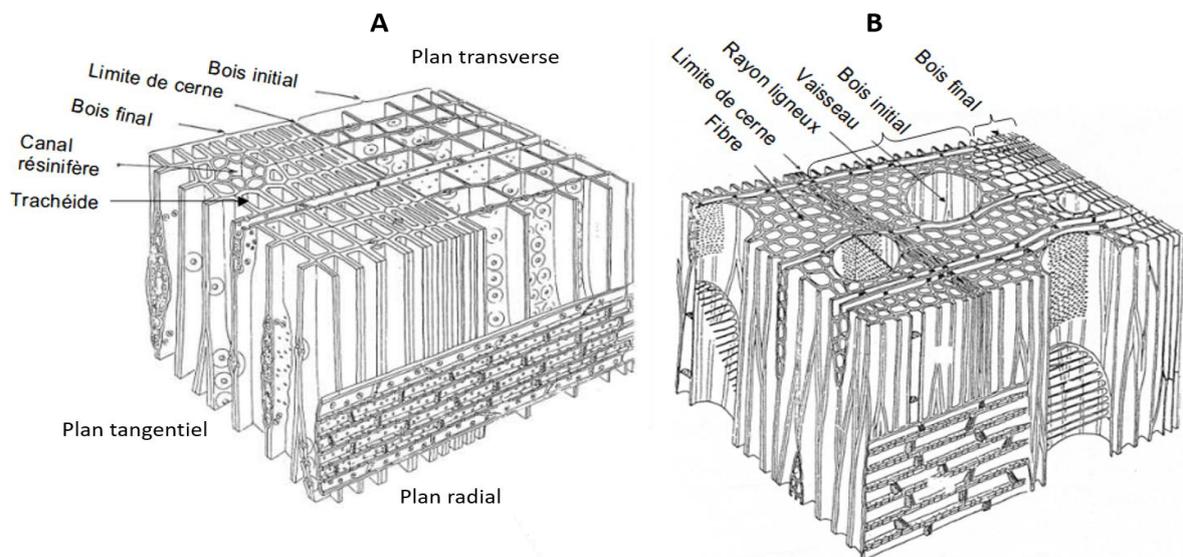


Figure 13 : Plan ligneux d'un bois homoxylé de gymnosperme (A) et hétéroxylé d'angiosperme (B).

Le bois homoxylé est constitué essentiellement d'un seul type cellulaire assurant à la fois soutien et conduction : les trachéides. Le bois hétéroxylé présente une spécialisation des types cellulaires pour les deux fonctions : des éléments perforés (les éléments de vaisseaux), placés longitudinalement bout à bout forment des vaisseaux du xylème et réalisent la conduction de la sève brute, des fibres assurant le soutien. Un troisième type cellulaire, le parenchyme, assure principalement la fonction de réserve (parenchyme axial, rayons ligneux) (Schweingruber, 1996).

II.2 Formation du bois, la xylogénèse

La variabilité du bois est issue de variations dans le processus de xylogénèse, divisé en quatre étapes principales, incluant : 1- la division des initiales du cambium, 2- l'élongation des nouvelles cellules, 3- la mise en place d'une paroi secondaire lignifiée et 4- la mort cellulaire programmée (Plomion *et al.*, 2001) (Figure 14).

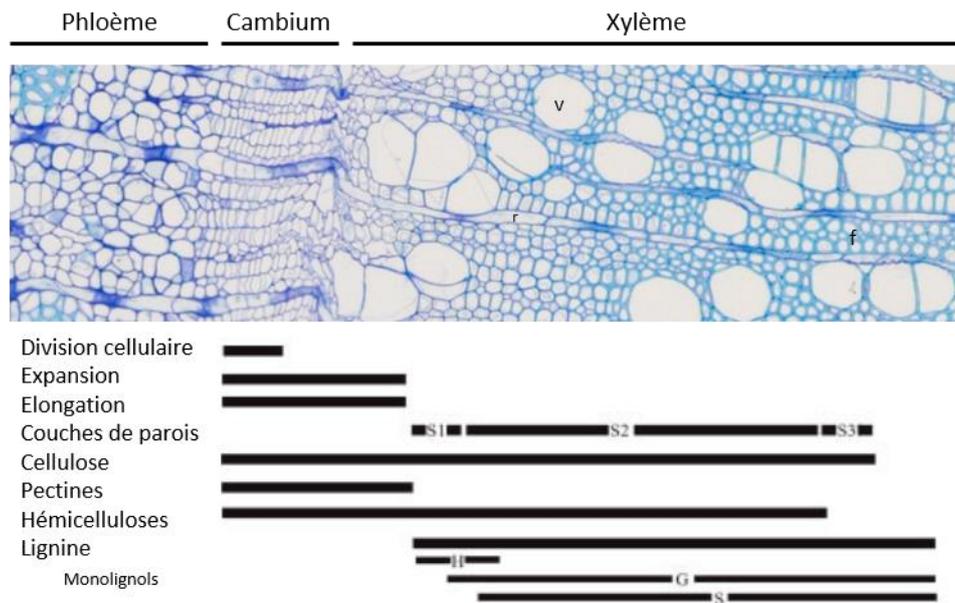


Figure 14 : Description des étapes de la formation du xylème.

Section transversale de tige de *Populus tremula x alba* coloré au bleu de toluidine. V : vaisseaux, r : rayons, f : fibres. D'après Hertzberg *et al.* (2001).

II.2.1 Le cambium : tissu méristématique

Les cellules du bois sont produites par une assise génératrice appelée cambium vasculaire ou assise génératrice libéro-ligneuse. Le cambium est composé de deux types de cellules méristématiques indifférenciées, appelées initiales, qui sont hautement vacuolisées, organisées en files radiales, et qui peuvent se distinguer par leur taille et leur forme (Larson, 1994; Lachaud *et al.*, 1999) :

- 1) Les initiales fusiformes, longues (200 μm à plusieurs mm de longueur, 5-10 μm de diamètre), majoritaires et à l'origine des éléments verticaux du xylème et du phloème (cellules conductrices, fibres, cellules du parenchyme axial) ;
- 2) Les initiales radiales, courtes, de forme cubique ($\approx 40 \mu\text{m}$ de longueur et de diamètre), minoritaires, et à l'origine des éléments horizontaux du xylème et du phloème (parenchyme des rayons).

La majorité des divisions se fait selon un plan tangentiel (divisions périclines). Ces divisions conservent l'alignement en files radiales et sont à l'origine de l'activité histogène du cambium en produisant les cellules du xylème secondaire dans la direction centripète (du côté de la moelle) et du phloème dans la direction centrifuge (du côté de l'écorce). Ces divisions sont dites asymétriques car elles sont plus nombreuses du côté du xylème que du côté du phloème, ce qui produit une croissance radiale plus rapide du côté du xylème. Quelques divisions suivent un plan radial (divisions anticlines), initiant les nouvelles files radiales

nécessaires pour suivre l'augmentation du périmètre des axes. Mais le cambium n'est pas qu'un simple réservoir à cellules souches, les initiales radiales servent également au transport horizontal de nutriments et de molécules signales entre le xylème et le phloème, facilité par les plasmodesmes (Lachaud *et al.*, 1999).

II.2.2 Expansion cellulaire et paroi primaire

Suite à leur division, les cellules passent par une phase d'expansion longitudinale et radiale pour atteindre leurs dimensions définitives. Les vaisseaux subissent une forte expansion radiale, mais une expansion longitudinale modérée, alors qu'au contraire, les fibres s'allongent fortement dans la direction axiale et conservent une expansion radiale faible. Durant cette phase d'expansion, la paroi primaire est mise en place. La paroi primaire est par définition la paroi des cellules en croissance, qui sert à la fois au maintien de la forme de la cellule et permet dans un même temps sa croissance. La paroi primaire est composée principalement d'un réseau complexe de polysaccharides (~90 %) et de certaines protéines (~10 %). Les trois constituants principaux, cellulose, hémicellulose et pectine, sont en quantités à peu près égales. Les hémicelluloses forment des interactions avec les microfibrilles de cellulose et les composés pectiques constituent un gel occupant le reste de l'espace (Figure 15) (Doblin *et al.*, 2010). L'organisation et la régulation de la mise en place de la paroi primaire contribuent au contrôle de l'expansion des cellules. Son relâchement est opéré *via* la production d'enzymes telles que les xyloglucan-endotransglycosylases, endoglucanases, expansines, pectinases et pectines méthylestérases (Cosgrove et Jarvis, 2012). La zone de contact entre deux cellules est appelée la lamelle moyenne. Cette lamelle moyenne assure à la fois la séparation et l'adhésion entre les cellules, et elle est principalement constituée de matières pectiques.

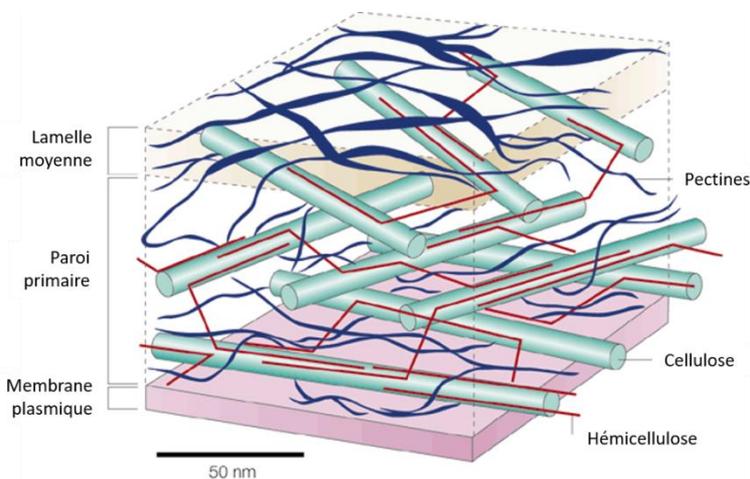


Figure 15 : Représentation de la paroi primaire composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines.
D'après Smith (2001).

II.2.3 Mise en place de la paroi secondaire

La formation de la paroi secondaire débute dès que s'achève l'élargissement de la cellule. Elle est formée par le dépôt de trois couches successives de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Ces couches se différencient principalement par leur épaisseur, leur teneur en cellulose mais surtout par l'angle des microfibrilles de cellulose par rapport à l'axe de la cellule (AMF) (Figure 16) (Mellerowicz et Sundberg, 2008). La couche S1 est la première à être mise en place, elle fait le lien avec la paroi primaire. Les microfibrilles de cellulose qui la composent sont disposées en hélices avec un AMF très important de l'ordre de 60 à 80°, formant ainsi un réseau croisé contribuant à la résistance mécanique dans le plan transverse. La couche S2, qui représente la partie la plus volumineuse de la paroi cellulaire (entre 75 % et 85 % de l'épaisseur totale de la paroi) est constituée principalement de microfibrilles de cellulose présentant un AMF d'environ 30°. Elle représente la principale contribution au comportement mécanique longitudinal du bois. Enfin, la couche S3, dernière à être produite lors du dépôt de paroi secondaire, est composée comme pour la couche S1 de microfibrilles de celluloses formant un angle presque perpendiculaire à l'axe longitudinal. L'alternance des angles de ces microfibrilles de celluloses confère de nombreuses propriétés mécaniques à la cellule, comme sa résistance à la compression/tension longitudinale ou à la torsion. Les variations macroscopiques des propriétés mécaniques du bois ont d'ailleurs été mises en lien avec l'angle des microfibrilles de cellulose ainsi que son degré de cristallinité (Fournier *et al.*, 1994). La composition de la paroi secondaire diverge de la paroi primaire par la présence de lignine à la place des pectines (Figure 17). La lignification de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et de la paroi secondaire correspond au dépôt de la lignine dans les espaces encore vides de la paroi cellulaire. Les polymères de lignine se déposent ainsi sur le réseau constitué par l'association des microfibrilles de cellulose et de la matrice de polysaccharides. Ceci a pour effet d'augmenter considérablement la rigidité de la paroi et son imperméabilisation (Vanholme *et al.*, 2010).

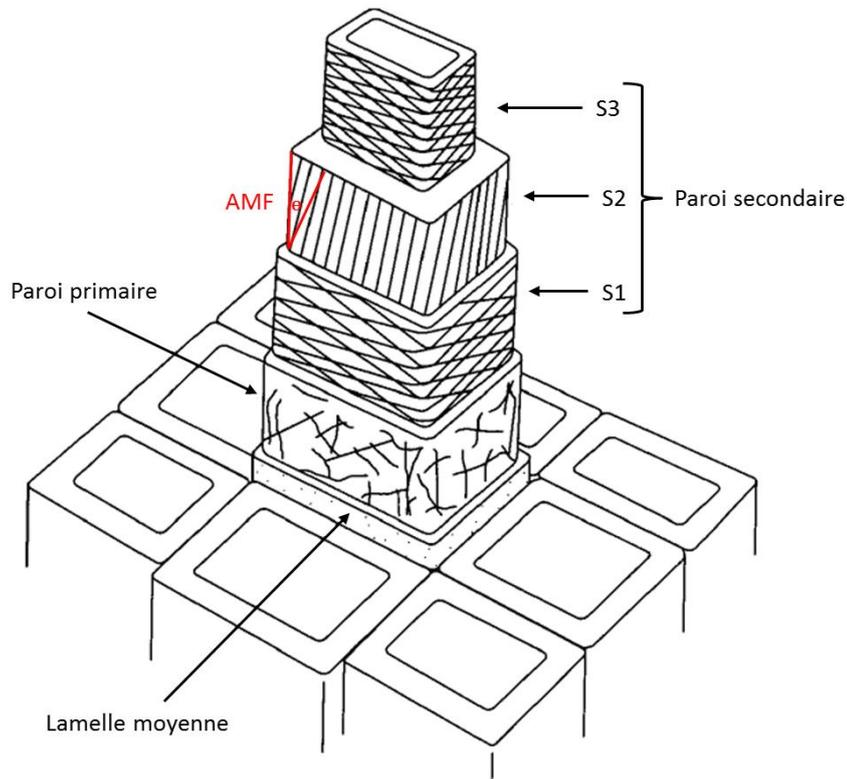


Figure 16 : Représentation graphique des différentes couches de la paroi cellulaire.

La cellule est composée de plusieurs couches : la paroi primaire, la paroi secondaire comprenant les trois couches S1, S2 et S3, et la lamelle moyenne servant de jonction entre les cellules. D'après Dinwoodie, 1989.

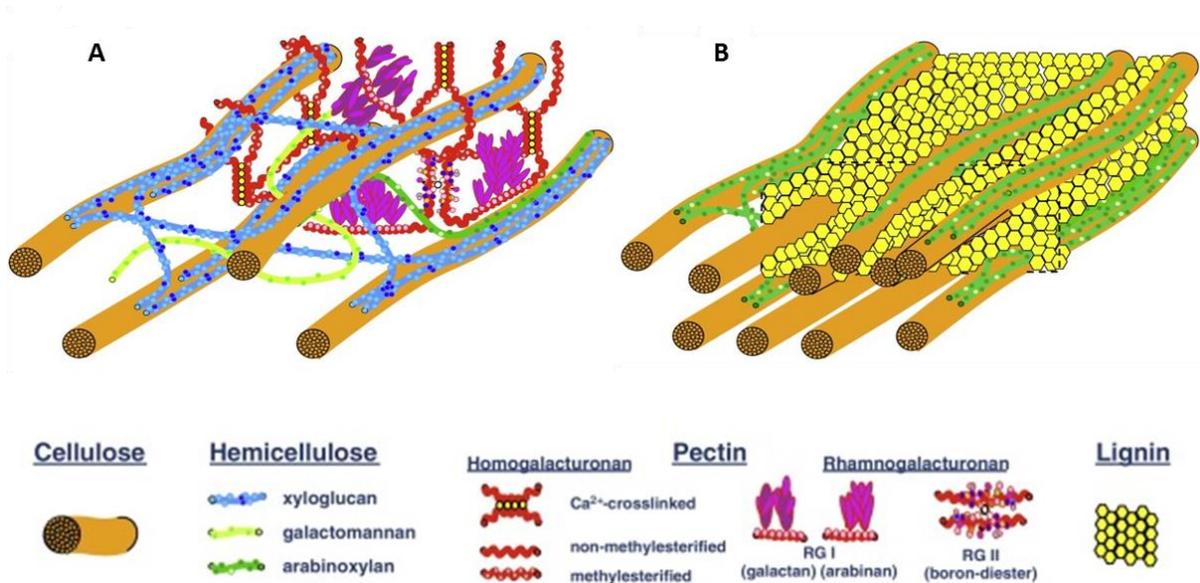


Figure 17 : Modèle schématique de la composition de la paroi.

(A) Paroi primaire. (B) Paroi secondaire lignifiée. (Loqué *et al.*, 2015).

II.2.3.1 Constituants de la paroi

On distingue trois types de constituants de la paroi secondaire : la cellulose (40-50 % de la masse sèche), les hémicelluloses (15-35 %), les lignines (15-35 %). Les paragraphes suivants décrivent plus en détail leur structure et leur rôle.

II.2.3.1.1 Les celluloses

La cellulose est le constituant principal de la paroi cellulaire à qui elle confère sa structure et ses propriétés mécaniques. La cellulose est un polysaccharide linéaire dont le motif répétitif est la cellobiose, constituée de deux molécules de glucoses liées par une liaison osidique en β -1,4. Les liaisons des chaînes de cellulose entre elles par des liaisons hydrogènes inter- et intramoléculaires entraînent la formation d'agrégats et le durcissement du système cellulosique. Dans les zones fortement agrégées, la cellulose est sous forme cristalline, et dans les parties où les liaisons hydrogènes sont moins nombreuses, elle est amorphe (Figure 18). Le degré de cristallinité de la cellulose dans le bois est de l'ordre de 60 à 70 %. Cette cristallinité confère à la cellulose une forte résistance mécanique, chimique et enzymatique. La synthèse de la cellulose s'effectue au niveau de la membrane plasmique et est assurée par des cellulose synthases (CesA) regroupées en complexes CSC (*Cellulose Synthase Complex*) (Somerville, 2006). Ces complexes sont organisés en rosette à six lobes, comprenant chacun six sous-unités individuelles de CesA (Figure 19) (Doblin *et al.*, 2002). En supposant que chaque protéine CesA soit activée enzymatiquement et synthétise une seule chaîne de cellulose, cela suggère que chaque CSC pourrait synthétiser une microfibrille composée de 36 chaînes de cellulose (Reiter, 2002). Cependant les études sur la taille des microfibrilles et sur la stœchiométrie des CesA dans le complexe ont montré que seulement 18 à 24 chaînes constituaient les microfibrilles (Thomas *et al.*, 2013 ; Hill *et al.*, 2014 ; Wang et Hong, 2016). Ceci indique qu'il pourrait y avoir moins de CesA dans les complexes ou bien qu'elles ne soient pas toutes actives.

Des études ont montré qu'il existait au moins deux types de complexes CSC spécifiques de la biosynthèse de la paroi primaire ou de celle de la paroi secondaire. Chez *Arabidopsis*, *AtCesA1*, *AtCesA3* et *AtCesA6* forment le complexe CSC impliqué dans la synthèse de la paroi primaire et *AtCesA4*, *AtCesA7* et *AtCesA8* le complexe requis pour la synthèse de la paroi secondaire (Desprez *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2003). Ceci pourrait expliquer les différences de propriétés entre la cellulose de la paroi secondaire et celle de la paroi primaire (McFarlane *et al.*, 2014). Cependant chez le peuplier, une étude récente a montré que la synthèse de la paroi secondaire impliquait deux types de complexes

CSC, remettant en cause l'implication de CesA spécifiques pour la synthèse de la paroi primaire ou secondaire (Xi *et al.*, 2017).

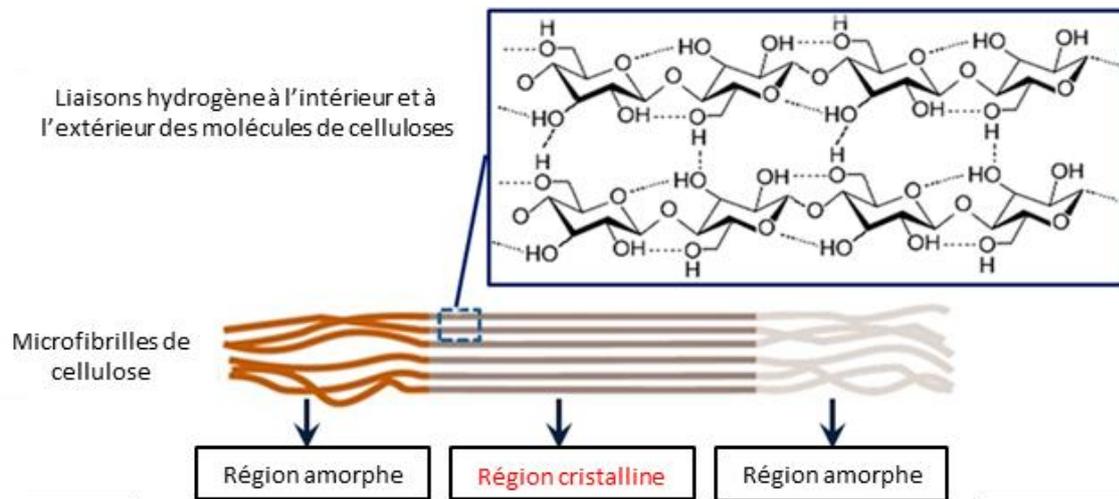


Figure 18 : Schéma des interactions entre les chaînes moléculaires de la cellulose dans la région cristalline des microfibrilles de cellulose.

Dans les régions cristallines, les chaînes de cellulose sont étroitement groupées par un réseau de liaison hydrogène intra- et intermoléculaire. Ces régions cristallines sont entourées de régions de cellulose amorphe. D'après Zhou et Wu (2012).

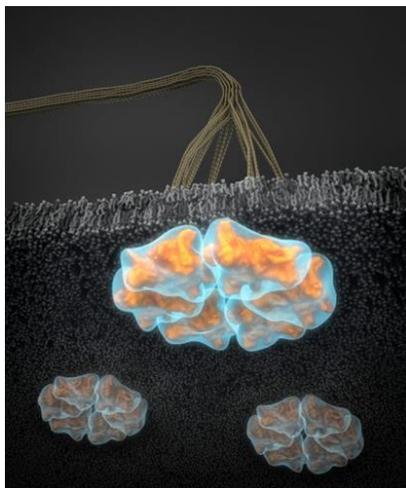


Figure 19 : Le complexe de synthèse de cellulose (CSC).

Le CSC est un complexe protéique transmembranaire composé de plusieurs sous-unités de CesA qui est responsable de la synthèse de chaînes de cellulose et de leur assemblage en microfibrilles. (Vandavasi *et al.*, 2016).

Une autre protéine semble interagir avec ces complexes, il s'agit d'une β -1,4-endoglucanase nommée KORRIGAN1. Cette protéine fait partie intégrante du CSC et elle joue un rôle dans la synthèse de la cellulose ainsi que dans le trafic intracellulaire du CSC (Vain *et al.*, 2014). Enfin, les microfibrilles extrudées par les complexes enzymatiques sont déposées dans une orientation définie, contrôlée par l'orientation des microtubules (Paredez *et al.*, 2006). L'interaction CSC-microtubules est au moins contrôlée par la protéine POMPOM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIN1, qui se lie à la fois au CesA et aux microtubules (Bringmann *et al.*, 2012). L'organisation spatiale, en particulier l'orientation des

microfibrilles est importante car elle impacte fortement l'anisotropie mécanique de la paroi cellulaire en la rigidifiant suivant des directions préférentielles.

II.2.3.1.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent le deuxième type de polysaccharides les plus abondants chez les plantes. Au sein de la paroi, les hémicelluloses assurent le renfort mécanique de la cellule en créant un lien entre la lignine et la cellulose. Ainsi, d'une part les hémicelluloses et la cellulose sont liées par le biais de liaisons de type hydrogène et Van der Waals, et d'autre part, plusieurs études ont montré l'existence de liaisons covalentes (esther et éther) entre la lignine et les hémicelluloses (Takahashi et Koshijima, 1988; You *et al.*, 2015). Le terme hémicellulose regroupe un ensemble de polysaccharides dont la composition et la structure dépendent de l'espèce, des types cellulaires et des types de paroi (Scheller et Ulvskov, 2010). Ils peuvent être distingués suivant le résidu qui compose leur squelette.

- Les xyloglucanes

Les xyloglucanes ont un squelette de résidus glucose sur lequel se greffent des résidus xylose, galactose et fucose. Chez les dicotylédones, les hémicelluloses sont les plus abondantes dans la paroi primaire (Zhou *et al.*, 2007). Les xyloglucanes peuvent avoir un rôle de polysaccharides structuraux ou de réserve (Cosgrove, 2005). Ils sont essentiels dans l'expansion cellulaire et ils contribueraient également à renforcer les liens entre la paroi primaire et la paroi secondaire (Park et Cosgrove, 2012). En effet, l'activité des xyloglucan endotransférases/hydrolases et des xyloglucan transglycosylases est essentielle dans la restructuration des parois primaires au moment du dépôt de la paroi secondaire, créant et renforçant les liens entre ces deux couches (Bourquin *et al.*, 2002; Cosgrove, 2005).

- Les xylanes

Les xylanes sont les hémicelluloses majoritaires de la paroi secondaire des plantes terrestres et sont nécessaires à leur croissance et à leur développement (York et O'Neill, 2008; Gorshkova *et al.*, 2010). Il s'agit d'une famille de polysaccharides qui se composent de résidus xylose. Dans la plupart des cas, les parois secondaires sont constituées d'hétéroxylanes, où le squelette est substitué par différent résidus. Les substitutions les plus courantes chez les xylanes sont des glucoses (glucuronoxylanes), des arabinoses (arabinoxylanes) ou une combinaison de sucres acides et neutres (glucuronoarabinoxylanes ou arabinoglucuronoxylanes) (York et O'Neill, 2008). La distribution des substituants chez les xylanes ne semble pas être aléatoire et

peut expliquer leur diversité fonctionnelle (Rennie et Scheller, 2014). Par exemple, les glucuronoxylanes sont plus courants dans le bois des angiospermes, les glucuronoarabinoxylanes chez les gymnospermes et les arabinoxylanes dans l'endosperme des graines de céréales (Ebringerová et Heinze, 2000). Le rôle exact des xylanes n'est pas encore déterminé mais il a été montré qu'ils interviendraient dans le renforcement de la paroi secondaire soit en se liant aux microfibrilles de cellulose pendant leur formation, soit en interagissant avec la lignine plus tardivement (Gorshkova *et al.*, 2010).

- **Les mannanes**

Un autre type d'hémicelluloses que l'on trouve dans les parois primaires sont les mannanes. Les mannanes ont un squelette de résidus mannose et on peut également en retrouver avec des résidus mannose et glucose, appelés glucomannanes. Ces deux types de mannanes peuvent être substitués par des résidus de galactose, on parle alors de galactomannanes ou galactoglucomannanes. Les mannanes ont été beaucoup étudiés pour leur rôle de composés de stockage dans les graines, mais on les retrouve en quantités variables dans toutes les parois secondaires (Hoch, 2007; Scheller et Ulvskov, 2010). Chez les gymnospermes, les galactoglucomannanes sont des composés majeurs des parois secondaires (Ebringerová *et al.*, 2005). On retrouve une quantité moindre de mannanes chez les angiospermes, mais les glucomannanes sont associés à la cellulose et aux xylanes et se retrouvent orientés de façon parallèle aux microfibrilles de cellulose (Moreira et Filho, 2008; Olsson *et al.*, 2011).

II.2.3.1.3 La lignine

La lignine est un polymère aromatique provenant de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Comme pour les hémicelluloses, la lignine présente une grande diversité de structures et de fonctions dépendant notamment de la plante considérée. Ainsi la lignine forme une classe de composés hétérogènes et il serait plus juste de parler « des lignines » bien que le terme soit peu employé. La lignine est formée par la polymérisation de trois monolignols : les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique qui donneront les trois unités : *p*-hydroxyphényle (H), guaïacyle (G) et syringyle (S) (Vanholme *et al.*, 2010). La lignine a une composition très variable en fonction des espèces, des contraintes environnementales et des types cellulaires (Donaldson, 2001). Par exemple, les unités G et S sont les unités retrouvées majoritairement dans la lignine des angiospermes, tandis que la lignine des gymnospermes est constituée majoritairement d'unité G et minoritairement des unités S et H (Vanholme *et al.*, 2012).

L'hétérogénéité de la teneur et la composition des lignines dans la plante est probablement due à des différences dans la régulation spatiotemporelle de l'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des lignines (Boerjan *et al.*, 2003). La biosynthèse des trois monolignols se produit à travers différentes étapes enzymatiques en commençant par la voie des phénylpropanoïdes. Le métabolisme des phénylpropanoïdes débute avec la désamination de la phénylalanine par la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL) pour donner l'acide cinnamique. A partir de ce dernier, des hydroxylations, des transferts de méthyles et de coenzymeA, et des réductions sur le noyau aromatique amènent à la formation des aldéhydes cinnamiques. Ceux-ci sont réduits en alcool par l'enzyme cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) qui est la dernière enzyme de la voie de biosynthèse des monolignols (Figure 20).

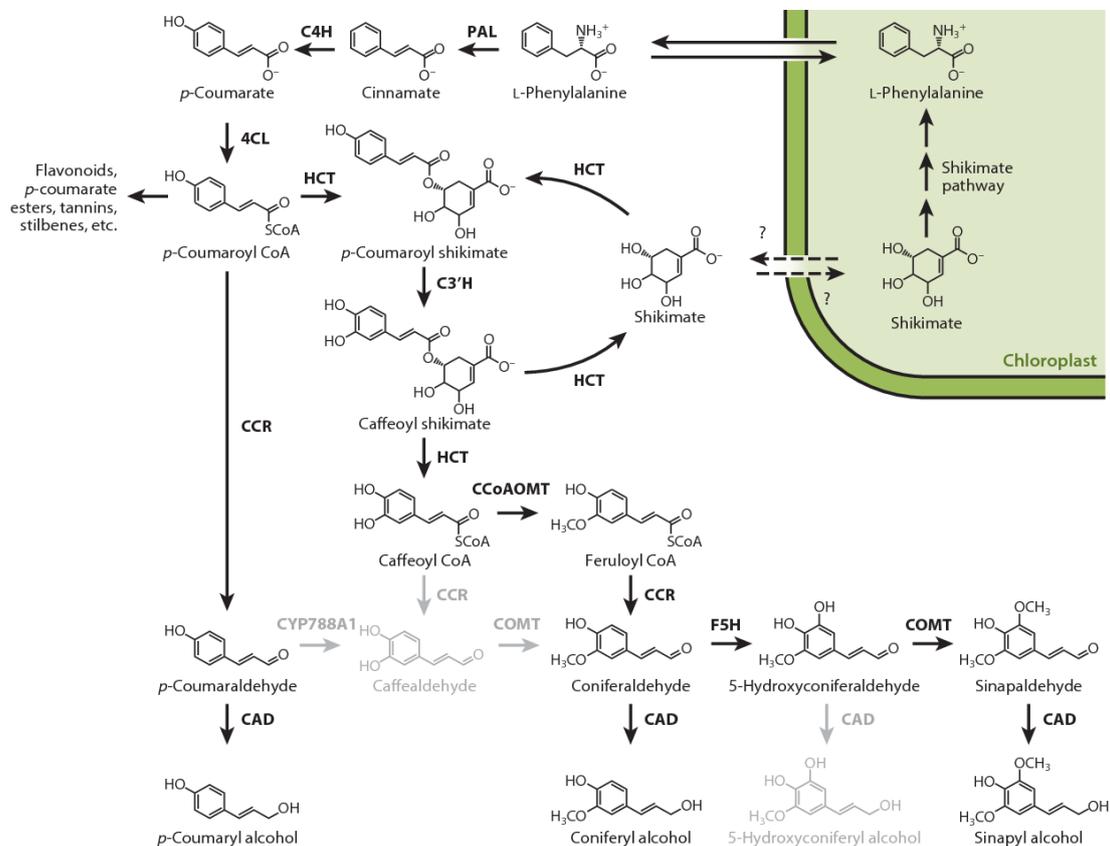


Figure 20 : Biosynthèse des monolignols via la voie des phénylpropanoïdes.

Sont indiqués les enzymes et les intermédiaires de biosynthèse des monolignols. Chaque flèche correspond à une réaction dans cette voie et à côté de chaque flèche se trouve le nom de l'enzyme qui catalyse la réaction en question. Les flèches et les intermédiaires gris clair indiquent des voies biochimiques qui ne sont probablement pas impliquées de façon significative dans la biosynthèse des lignines chez des plantes sauvages (Bonawitz et Chapple, 2010).

La lignine sert de liaison entre les différents constituants de la paroi secondaire et joue plusieurs rôles importants chez les plantes. En apportant de la rigidité à la paroi cellulaire, elle

contribue au port érigé des végétaux supérieurs terrestres (Trouy, 2015). De plus, elle imperméabilise les cellules conductrices de sève et leur permet de résister aux fortes différences de pressions nécessaires au transport de l'eau des racines jusqu'aux feuilles (Reina *et al.*, 2001). Enfin, la lignine est également essentielle dans la réponse à la blessure et à l'infection par les pathogènes. En effet, de par sa nature chimique, la lignine est un composé difficilement dégradable par les microorganismes et constitue ainsi une barrière de protection physique (Moura *et al.*, 2010).

II.2.4 Mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée marque la fin de la différenciation des éléments conducteurs et de soutien du xylème et leur entrée dans leur forme mature et fonctionnelle. Alors que les éléments vasculaires se différencient rapidement et meurent en quelques jours après leur spécification, les fibres et les trachéides restent en vie sensiblement plus longtemps (Bollhöner *et al.*, 2012). Le déclencheur principal de la mort cellulaire programmée est un influx régulé d'ions calcium (Ca^{2+}), qui déclenche alors rapidement un éclatement de la vacuole et la cessation immédiate des mouvements cytoplasmiques. L'éclatement de la vacuole libère des hydrolases qui attaquent et dégradent les organelles, vidant ainsi la cellule de son contenu cellulaire. Seules les cellules des rayons, bien que possédant une paroi secondaire lignifiée, restent vivantes assurant une fonction de stockage. Cette mort cellulaire programmée semble donc être régulée indépendamment de la formation de la paroi secondaire et de sa lignification (Mellerowicz *et al.*, 2001).

II.3 Régulateurs de la formation du bois

Les différentes étapes de la formation du bois, de la division cambiale jusqu'à la mort cellulaire programmée, sont contrôlées par différents régulateurs. On peut distinguer des régulateurs de croissance, tels que les phytohormones, et des régulateurs génétiques, comme des facteurs de transcription ou encore des peptides.

II.3.1 Régulation de l'activité cambiale et de la prolifération cellulaire

L'activité méristématique est un élément essentiel pour la production de cellules xylémiennes et phloémiennes. La production des cellules dépend du taux de divisions cellulaires dans le cambium et est contrôlée par des facteurs génétiques et environnementaux (Miyashima *et al.*, 2012; Ursache *et al.*, 2013).

II.3.1.1 Rôle des protéines régulatrices

Chez *A. thaliana*, des études ont montré que l'interaction ligand/récepteur TDIF/CLE41/CLE44-TDR/PXY jouait un rôle crucial dans le maintien de l'organisation du méristème vasculaire au cours de la croissance secondaire (Fisher et Turner, 2007; Hirakawa *et al.*, 2008). Le peptide TDIF (*Tracheary element Differentiation Inhibitory factor*) issu de la traduction de *CLE41/CLE44*, est produit dans le phloème et interagit avec le récepteur kinase TDR/PXY (*TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM*) exprimé dans le cambium. L'interaction entre TDIF et son récepteur TDR induit l'expression de *WOX4*, appartenant à la famille de facteur de transcription *WUSCHEL HOMEODOMAIN RELATED*, favorise la prolifération des initiales cambiales et inhibe leur différenciation en cellules du xylème, ce qui participe à maintenir leur caractère pluripotent (Hirakawa *et al.*, 2010). Un autre gène de la famille des WOX, *WOX14* semble également agir de manière redondante avec *WOX4* dans le contrôle de la prolifération cellulaire, et semble également régulé par *CLE41/PXY* (Etchells *et al.*, 2013). Cependant Denis *et al.* (2017) ont montré que *WOX14* serait impliqué dans la différenciation cellulaire plutôt que dans la prolifération. Chez le peuplier, ce processus de régulation de l'activité cambiale par *PttWOX4* et des gènes proches de *PttCLE41* est identique et montre une conservation évolutive du système *CLE-WOX* entre les angiospermes et les gymnospermes (Kucukoglu *et al.*, 2017).

D'autres acteurs moléculaires semblent également interagir dans cette voie de signalisation, comme les gènes codant des récepteurs-like kinases *ERECTA* (ER) *ER-LIKE1*, dont la mutation entraînent un phénotype *tdr/pxy* (Etchells *et al.*, 2013; Uchida et Tasaka, 2013). De plus, deux autres RLKs, *MOL1* (*MORE LATERAL GROWTH1*) et *RUL1* (*REDUCED IN LATERAL GROWTH1*) agiraient en tant que régulateurs négatifs de l'activité cambiale (Agusti *et al.*, 2011).

D'autres facteurs de transcription, comme ceux de type *KNOX* classe I ont été montrés exprimés dans le cambium durant la formation du bois chez *Populus* (Schrader *et al.*, 2004). Lorsque *ARBORKNOX2* (*ARK2*) est surexprimé, une expansion de la zone cambiale est associée à une inhibition de la production de nouvelles assises cellulaires dans le xylème et dans le phloème, ainsi qu'une régulation négative des gènes liés à la synthèse de la paroi (Du *et al.*, 2009). Ce facteur de transcription semble donc maintenir l'activité cambiale et agirait également dans la régulation du développement des fibres (Gerttula *et al.*, 2015).

II.3.1.2 Implication des phytohormones

Les phytohormones modulent également le développement du bois en fonction de leur abondance relative et de leur interaction (Ursache *et al.*, 2013; Sorce *et al.*, 2013; Didi *et al.*, 2015).

L'analyse de la distribution d'auxine au niveau de la région cambiale chez des peupliers hybrides a montré un gradient de concentration radial atteignant un niveau maximal dans la zone cambiale ou à la limite entre la zone cambiale et la zone d'expansion (Uggla *et al.*, 1996; Tuominen *et al.*, 1997). La perturbation de la signalisation de l'auxine, par la mutation d'un régulateur de la dégradation d'auxine (*PttIAA3*), entraîne une réduction de la division cellulaire, et par conséquent de la croissance radiale, mais également une réduction de la longueur des fibres et vaisseaux (Nilsson *et al.*, 2008). Le facteur de transcription *WOX4* a également été montré nécessaire dans la stimulation de l'activité cambiale auxine-dépendante (Suer *et al.*, 2011).

Chez *Arabidopsis* et *Populus*, les cytokinines semblent également jouer un rôle crucial dans la régulation de l'activité cambiale (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2008). Chez le peuplier, la réduction du taux de cytokinine par l'expression d'un gène catabolique de la cytokinine (*CYTOKININ OXIDASE 2*), altère l'activité cambiale aboutissant à la production de tiges de diamètre plus petit (Nieminen *et al.*, 2008).

L'éthylène représente un acteur positif de la formation du bois. Chez *Populus*, il a été montré qu'un traitement par l'éthylène stimulait la croissance du xylème par augmentation des divisions cellulaires du cambium (Love *et al.*, 2009) et que des gènes *ERF* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) étaient également impliqués dans la régulation et le contrôle de la croissance secondaire et les propriétés du bois (Vahala *et al.*, 2013).

II.3.2 Régulation de l'expansion cellulaire et de la spécification du xylème

II.3.2.1 Rôle des protéines régulatrices

Les facteurs moléculaires *HD-ZIP III* (*CLASS III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER*) sont importants dans la différenciation du xylème aussi bien chez *Arabidopsis* que chez *Populus*. Dans la racine de l'arabette, la réduction de l'expression des cinq gènes *HD-ZIP III REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS1 (REV/IFL1)*, *PHABULOSA (PHB)*, *PHAVOLUTA (PHV)*, *CORONA (CAN/AtHB15)* et *AtHB8* entraîne une non différenciation des cellules du procambium (Carlsbecker *et al.*, 2010). Chez *Populus*, le gène *POPCORONA (PCN)* présente une plus forte expression dans les fibres de phloème, la zone cambiale, le xylème en

développement et potentiellement la moelle. En effet, l'atténuation de son expression par l'expression de miARNs (miARN 165/166) sous un promoteur constitutif entraîne une lignification anormale de la moelle, tandis que sa surexpression entraîne la lignification retardée des fibres de xylème et de phloème au cours de la croissance secondaire (Du *et al.*, 2011). Ce phénotype est également retrouvé chez *A. thaliana* où la réduction de l'expression d'*ATHB15* entraîne une réduction drastique de la production de xylème et des tissus interfasciculaires lignifiés (Kim *et al.*, 2005).

Les facteurs de transcription possédant un domaine NAC, incluant les VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND), NAC SECONDARY CELL WALL THICKENING (NST), et SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN (SND) ont été identifiés comme des régulateurs clés de la différenciation du xylème. L'expression ectopique de *VND6* et *VND7* dans les feuilles d'*Arabidopsis* et de *Populus* peut induire la formation d'éléments vasculaires de type métaxylème et protoxylème respectivement, indiquant que le mécanisme moléculaire de la différenciation des vaisseaux est partiellement conservé entre *Arabidopsis* et *Populus* (Kubo *et al.*, 2005).

II.3.2.2 Rôle des phytohormones

Il a été montré que l'auxine et les brassinostéroïdes régulaient l'expression des gènes *HD-ZIP III* et activaient donc la différenciation du xylème (Baima *et al.*, 1995; Baima *et al.*, 2001; Ohashi-Ito et Fukuda, 2003). Contrairement à l'auxine, retrouvée principalement dans le cambium, l'acide gibbérellique (GA) est observé dans les cellules du xylème en différenciation chez *Populus tremula* (Israelsson *et al.*, 2005). Les gibbérellines sont des régulateurs importants de la formation du bois et sont considérées comme le signal entraînant la transition de la croissance primaire à la croissance secondaire (Mauriat et Moritz, 2009; Ragni *et al.*, 2011; Dayan *et al.*, 2012). Chez *Populus tremula* x *P. tremula*, les GAs sont nécessaires à la xylogénèse *via* leur signal dans le cambium, et à l'allongement des fibres dans le xylème en développement (Mauriat et Moritz, 2009). Il existe aussi une probable interaction entre les GAs et l'auxine, puisqu'il a été montré que les GAs stimulaient l'activité cambiale en induisant l'expression d'un transporteur d'auxine *PINI* (Björklund *et al.*, 2007). Une étude a également mis en évidence un lien entre *WOX14* et la biosynthèse des GAs. En effet, les mutants *wox14* présentent des phénotypes similaires à une altération de la voie de biosynthèse des GAs. De plus, les lignées sur-exprimant *WOX14* augmentent la production de GAs, et induisent une croissance radiale accrue avec une forte lignification des tissus vasculaires (Denis *et al.*, 2017).

II.3.3 Régulation transcriptionnelle de la synthèse de la paroi secondaire et de la mort cellulaire programmée

Les régulateurs transcriptionnels à domaine NAC, évoqués précédemment, jouent également un rôle dans la différenciation du xylème *via* la régulation directe des facteurs de transcription de classe MYB qui régulent à leur tour l'expression de la différenciation cellulaire et des gènes associés à la paroi cellulaire (Zhong et Ye, 2009). Les gènes régulateurs clés NAC (*NST1/2*, *SND1*, *VND6/7*) induisent l'expression de deux MYB (*MYB46* et *MYB83*) activant à leur tour des facteurs de transcription (*e.g.* *MYB69*, *MYB103*) et des enzymes directement impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire, dans la production de la cellulose (*e.g.* *CESA3*, *CESA4*), d'hémicellulose (*e.g.* *GUX1*, *GUX2*) et de lignine (*e.g.* *PAL1*) (Zhong *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 2009; Zhong et Ye, 2015; Zinkgraf *et al.*, 2017). Les NAC et MYB jouent donc le rôle de *masters* régulateurs dans la formation de la paroi secondaire, et ce mécanisme semble conservé de façon évolutive entre les espèces herbacées et ligneuses (Zhong *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2013).

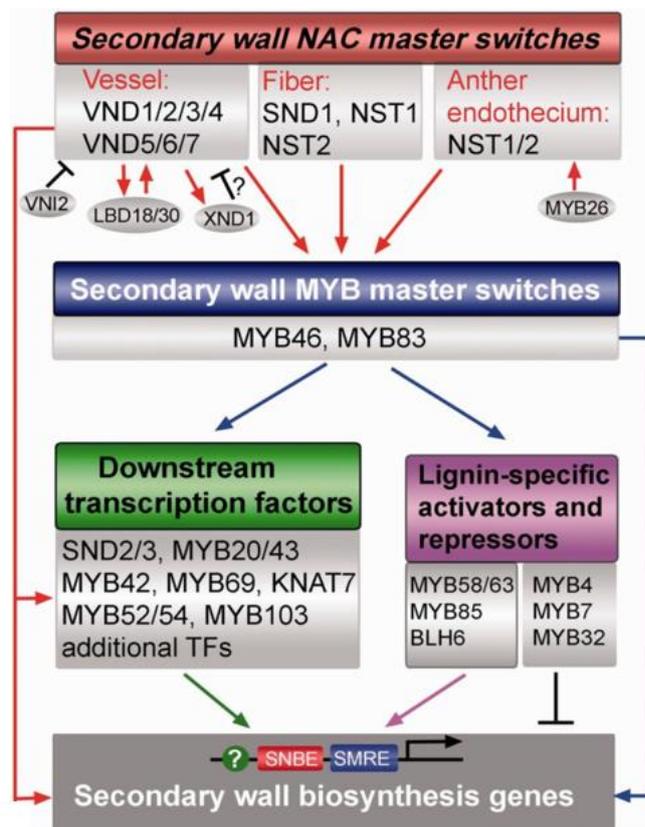


Figure 21 : Diagramme de la régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de la paroi secondaire chez *Arabidopsis*.

Les facteurs de transcription NAC et MYB, activés par des gènes régulateurs clés se lient aux sites SNBE et SMRE respectivement des promoteurs de leurs gènes cibles, activant l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des parois secondaires. (Zhong et Ye, 2014).

La synthèse de la paroi secondaire est déterminée par les microtubules qui dirigent les complexes de cellulose synthase (Paredez *et al.*, 2006). Les deux gènes *AtMAP70-5* et *AtMAP70-1* (*MICROTUBULES-ASSOCIATED PROTEIN 70*) seraient essentiels pour définir

où les polymères de paroi secondaire sont appliqués au niveau du cortex cellulaire des cellules du xylème (Pesquet *et al.*, 2010).

Chez le peuplier le gène *PtaLBD1* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN*) code un facteur de transcription principalement exprimé dans le phloème. D'autres gènes comme *PtaLBD15* et *PtaLBD18* s'expriment principalement à la limite cambium/xylème suggérant un rôle de cette famille de facteurs de transcription dans le développement du xylème secondaire chez le peuplier (Yordanov *et al.*, 2010; Bdeir *et al.*, 2016).

D'autres facteurs de transcription de la famille LIM (LIN11/ISL-1/MEC-3) jouent un rôle dans des processus biologiques fondamentaux comme par exemple l'organisation du cytosquelette ou le développement des organes, et seraient impliqués dans la régulation de la biosynthèse des lignines (Arnaud *et al.*, 2012).

II.4 Modification de la structure anatomique du bois sous contraintes mécaniques

II.4.1 Les contraintes de maturation

Que ce soit pour les feuillus ou pour les conifères, lors de leur maturation, les cellules du bois nouvellement formées ont tendance à se rétrécir longitudinalement. L'adhésion de cette nouvelle couche cellulaire à la couche préexistante gêne cette rétraction et les nouvelles cellules se retrouvent dans un état de tension. Par réaction, les cellules plus anciennes qui étaient initialement en tension se retrouvent moins tendues, et ce phénomène entraîne dans l'arbre un champ de contraintes mécaniques (autocontraintes). Ces contraintes de croissance permettent à l'arbre de contrôler sa posture. Si un événement extérieur (ex : inclinaison) vient à perturber cette posture, une asymétrie des contraintes de part et d'autre de la tige est mise en place dans l'arbre pour lui permettre de revenir vers une position optimale. Ce bois nouvellement formé s'appelle : le bois de réaction. Les propriétés du bois de réaction sont différentes entre feuillus et conifères et correspondent à deux stratégies de contraintes de croissance, permettant la réorientation des axes.

II.4.2 Formation des bois de réaction

Le bois de compression est présent essentiellement chez les résineux et se retrouve sur la face inférieure du tronc incliné. La maturation des cellules du bois de compression produit une élongation de la cellule. Cette élongation étant empêchée par l'adhérence aux cellules voisines, la cellule ainsi bloquée agit comme un ressort sur lequel on appuie et qui cherche à s'allonger, contrairement au bois opposé. L'arbre instaure ainsi une asymétrie de déformation de maturation de chaque côté de la tige lui permettant de se redresser (Figure 22).

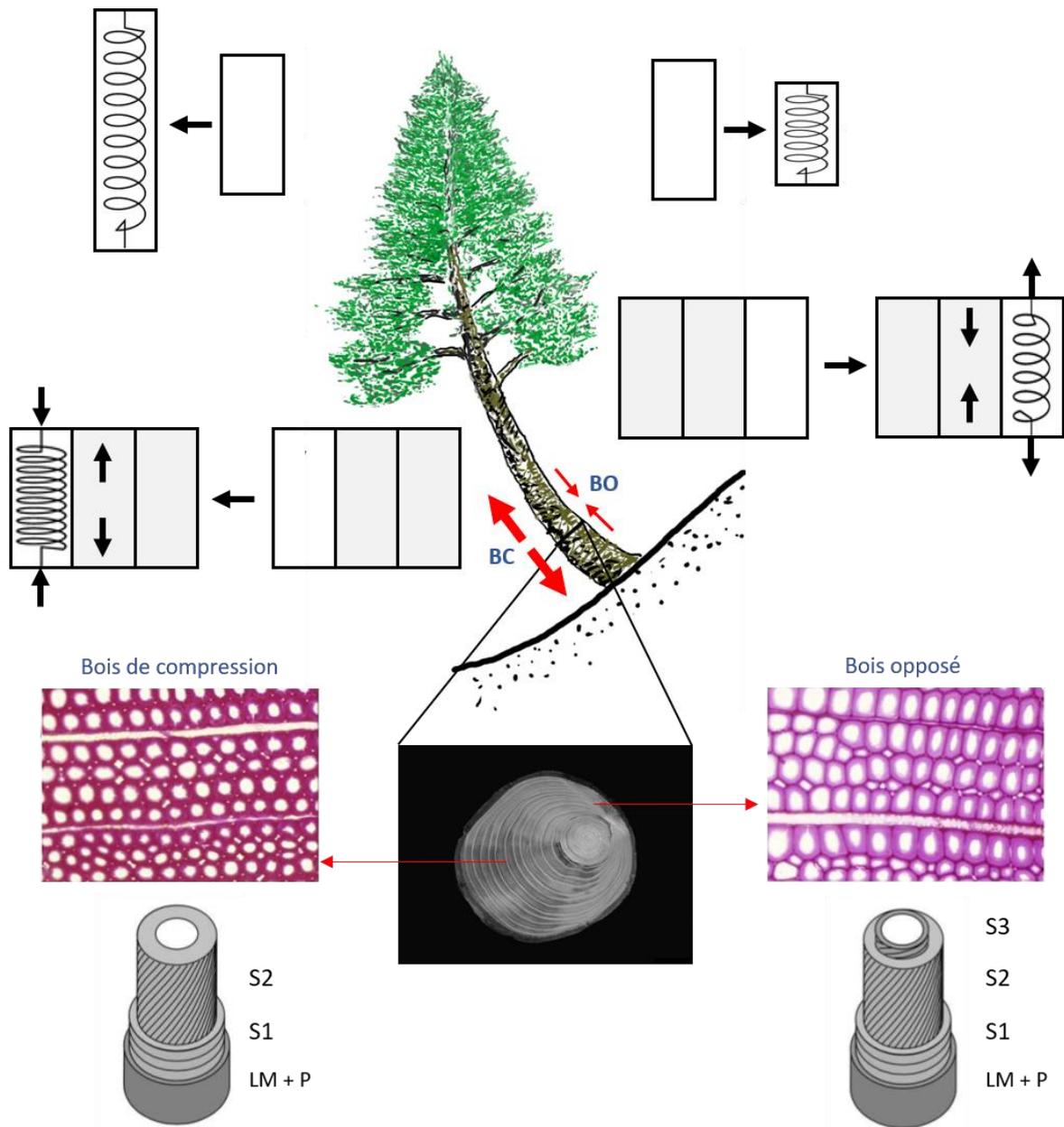


Figure 22 : Bois de réaction chez les conifères : le bois de compression.

Schématisation des contraintes de maturation dans le bois de compression (BC) et dans le bois opposé (BO). La paroi secondaire des cellules de la couche nouvellement formée (cellule isolée en haut à droite) tend naturellement à se rétracter longitudinalement lors de sa maturation. Ici, la formation du bois de compression entraîne une élongation de la cellule (cellule isolée en haut à gauche). L'adhésion de cette nouvelle couche de cellules à la couche préexistante empêche cette élongation, et la nouvelle couche de cellules se retrouve en état de compression longitudinale (flèches externes). Les couches précédentes subissent un incrément de compression (flèches internes). L'asymétrie de retrait longitudinal, entre le bois de compression et le bois opposé, provoque une courbure, et ainsi le redressement de l'arbre. Dans le bois compression, les trachéides sont plus arrondies et possèdent une paroi S2 plus importante que celle retrouvée dans le bois opposé.

Le bois de tension est, quant à lui, présent chez les feuillus et se retrouve sur la face supérieure du tronc incliné. La maturation des fibres se traduit dans ce cas par une contraction longitudinale plus grande que dans le bois opposé. L'asymétrie de tension provoque la courbure de l'axe et le redressement de l'arbre (Figure 23).

Dans les deux cas, on observe une excentricité de la moelle, due à une croissance radiale asymétrique, plus forte du côté en tension ou en compression. Au niveau anatomique, le bois de compression est composé de trachéides plus courtes et arrondies séparées par des méats intercellulaires. Au niveau de la paroi, la couche S3 est absente et la paroi S2 est plus épaisse, comportant un angle de microfibrilles plus important (Timell, 1986; Gardiner *et al.*, 2014). Par la suite, nous nous concentrerons essentiellement sur la description du bois de tension.

II.4.3 Caractéristiques du bois de tension

Les propriétés mécaniques du bois de tension sont dues à la constitution particulière de ses cellules, qui diffère en plusieurs points de celles du bois opposé. Chez le peuplier, le bois de tension, par rapport au bois opposé, présente un ratio fibres/vaisseaux plus élevé avec un diamètre de vaisseaux plus faible, ainsi qu'une augmentation du nombre de rayons ligneux (Jourez *et al.*, 2001; Ruelle, 2014). Le bois de tension diffère principalement du bois opposé au niveau des fibres. En effet, ces fibres présentent des modifications structurales et chimiques qui confèrent au bois de tension des propriétés mécaniques particulières.

Les fibres du bois de tension sont plus longues que celles du bois opposé, la paroi secondaire présente une très forte teneur en cellulose et l'angle des microfibrilles de la couche S2 est inférieur à celui trouvé dans le bois opposé. Pour environ la moitié des espèces feuillues, la distinction la plus notable du bois de tension est la présence d'une couche interne gélatineuse dans la lumière des fibres, la couche G (Dadswell et Wardrop, 1955). Suivant les espèces, cette couche G peut être déposée à l'intérieur de la couche S2, remplacer la couche S3, voir remplacer les deux couches S2 et S3 (Dadswell et Wardrop, 1955; Abedini *et al.*, 2015). Elle est composée d'une grande quantité de cellulose cristalline, organisée en microfibrilles orientées parallèlement à l'axe de la fibre (Daniel *et al.*, 2006). Bien qu'elle ait souvent été considérée comme exclusivement constituée de cellulose, des études récentes ont montré la présence de protéines et de polysaccharides, comme des xylanes ou des glucomannanes dans sa composition (Kim et Daniel, 2012; Guedes *et al.*, 2017).

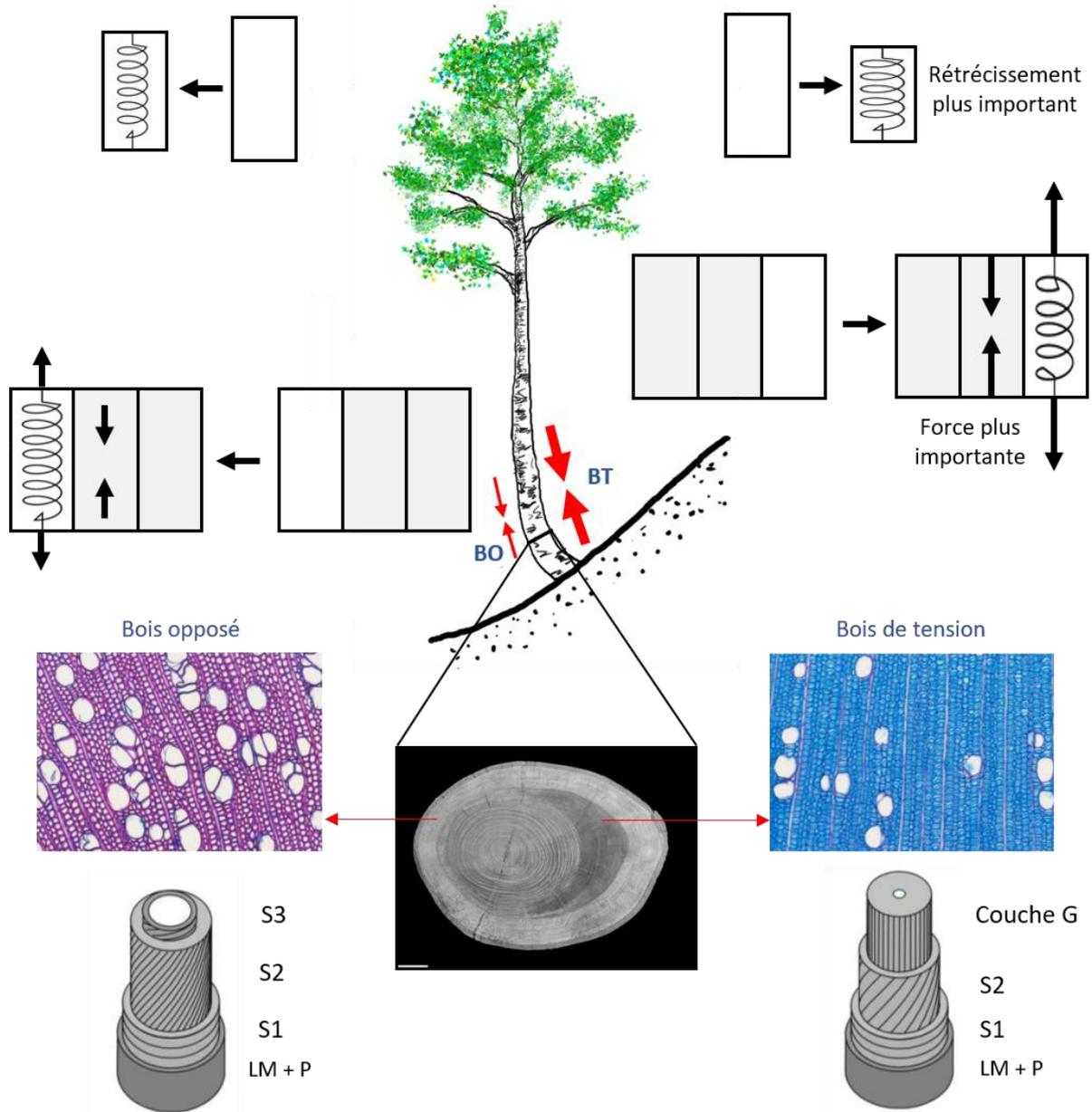


Figure 23 : Bois de réaction chez les feuillus : le bois de tension.

Schématisation des contraintes de maturation dans le bois de tension (BT) et dans le bois opposé (BO). La paroi secondaire des cellules de la couche nouvellement formée (cellule isolée en haut) tend naturellement à se rétracter longitudinalement lors de sa maturation. L'adhésion de cette nouvelle couche de cellules à la couche préexistante gêne cette rétraction, et la nouvelle couche de cellules se retrouve en état de tension longitudinale (flèches externes). Les couches précédentes, initialement en tension suite à leur propre maturation, subissent un incrément de compression (flèches internes). L'asymétrie de retrait longitudinal, entre le bois de tension et le bois opposé, provoque une courbure, et ainsi le redressement de l'arbre. Dans le bois tension, une couche supplémentaire est déposée à l'intérieur des cellules, la couche G, colorée en bleu sur la coupe transversale.

Le présence de cette couche G durant la maturation des cellules produit une forte contrainte de tension dans les microfibrilles de cellulose, ce qui rend les cellules résistantes à l'étirement (Clair *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2015). En effet, plus la couche G est épaisse plus la contrainte de maturation est forte (Fang *et al.*, 2008). Chez certaines espèces, les fibres de bois de tension ne présentent pas de couche G, mais sont caractérisées par une forte contrainte de maturation comparables à des bois de tension à couche G, leur permettant de réorienter leurs axes (Clair *et al.*, 2006 ; Sultana, 2018). Cependant, une étude récente a montré que la couche G était bien présente sur certaines de ces espèces mais qu'elle était difficile à identifier dans le bois mature, masquée par une lignification tardive (Roussel et Clair, 2015). Bien que la présence de lignine dans la couche G ait longtemps été rejetée, il semblerait qu'elle soit déposée tardivement, expliquant que les observations faites sur de jeunes arbres, c'est-à-dire sur du bois de tension récent, ne fassent pas apparaître une présence de lignine (Ghislain et Clair, 2017).

II.4.4 Mécanismes impliqués dans la perception de la gravité et dans la formation du bois de tension

II.4.4.1 Perception du stimulus gravitationnel

La perception de la gravité par la plante joue un rôle clé dans leur développement et leur acclimatation à leur environnement. Etudiée depuis plus d'un siècle, la perception de la gravité par les plantes reste encore aujourd'hui un sujet actif.

Dans la racine, la perception de la gravité commence dans des cellules spécifiques, les statocytes, contenant des organites spécialisés appelés statolithes. Il est généralement accepté que les amyloplastés (c'est-à-dire les organites remplis de grains d'amidon) sont les statolithes principaux dans les statocytes. Dans les tiges d'herbacées et d'espèces ligneuses, la localisation des amyloplastés a été observée dans les cellules de l'endoderme (Nakamura, 2003). Dans les tiges ligneuses, lors de la croissance secondaire, cet endoderme disparaît mais des cellules possédant des amyloplastés se retrouvent alors au niveau du phloème, permettant aux tiges ligneuses plus âgées de continuer à percevoir la gravité. Les mécanismes reliant la sédimentation de ces amyloplastés et la transduction du signal ne sont pas encore élucidés. Toutefois, des études récentes montrent que ces amyloplastés agiraient plus comme des capteurs de position et non de force (Chauvet *et al.*, 2016; Pouliquen *et al.*, 2017).

II.4.4.2 Transmission du signal pour la formation du bois de tension

II.4.4.2.1 Rôle des hormones dans l'induction et la régulation du bois de tension

Il a été démontré que les hormones, y compris l'auxine, les gibbérellines (GAs) et l'éthylène jouent toutes un rôle clé dans l'induction et la régulation des bois de tension.

L'implication de l'auxine dans la régulation du bois de tension a tout d'abord été étudiée en appliquant de l'auxine ou des inhibiteurs d'auxine sur des tiges inclinées. L'application exogène d'auxine sur la face supérieure montrait une inhibition de la formation du bois de tension (Cronshaw et Morey, 1968) tandis que l'application d'inhibiteur d'auxine montrait son induction (Cronshaw et Morey, 1965). Cependant, des résultats contradictoires ont montré que l'équilibre du taux d'auxine endogène n'est pas significativement modifié dans des tiges gravistimulée (Hellgren, 2004). D'autres études *in planta* ont montré que pendant la formation du bois de tension, l'expression de plusieurs gènes *PttIAA* était modifiée (Moyle *et al.*, 2002) induisant une relocalisation de l'auxine de part et d'autre de la tige. Récemment, toujours chez le peuplier, un des transporteurs de l'auxine PIN3 a été montré relocalisé, entraînant un transport plus important de l'auxine vers le cambium du côté en tension (Gerttula *et al.*, 2015). Ces résultats semblent indiquer que ce n'est pas nécessairement la concentration absolue d'auxine dans la zone cambiale qui détermine le type de bois produit, mais plutôt les quantités relatives d'auxine à travers les tissus secondaires ou également la sensibilité différentielle à l'auxine à travers ces tissus (Salisbury *et al.*, 1988). Il est également possible que l'auxine n'induisse pas elle-même directement les différences dans le développement de la zone cambiale, mais qu'elle soit plutôt impliquée comme un signal induisant des gènes impliqués dans la régulation du développement du bois.

L'éthylène a été confirmé comme régulateur clé dans la formation du bois de tension chez le peuplier. La production d'éthylène est contrôlée par l'activité d'une ACC oxydase codée par le gène *PttACO1*. Lors de la formation du bois de tension, l'expression de *PttACO1* est augmentée sur le côté supérieur de la tige et réprimée sur le côté inférieur (Andersson-Gunnerås *et al.*, 2003). D'autre part, l'inclinaison d'arbres transgéniques insensibles à l'éthylène et ceux traités avec un inhibiteur de perception à l'éthylène ont une excentricité de moelle réduite par rapport aux arbres témoins gravistimulés (Love *et al.*, 2009). Il y aurait donc une forte production d'éthylène du côté en tension, ce qui permettrait de stimuler l'activité cambiale et expliquerait l'excentricité de la moelle observée dans le bois de tension.

Les GAs semblent également participer à la régulation de la formation du bois de tension. L'application de GAs exogènes sur *Populus sieboldii* induit la formation du bois de tension sur

des arbres non inclinés (Funada *et al.*, 2008). Récemment chez le peuplier, le suivi de la quantité d'auxine en utilisant le gène rapporteur *GUS* couplé au promoteur *DR5* (gène induit par l'auxine) a montré que l'application de GAs augmentait l'expression du gène rapporteur (Gerttula *et al.*, 2015). Les GAs joueraient donc un rôle dans l'induction de gènes régulant l'activité cambiale, soit directement soit indirectement *via* l'interaction avec d'autres hormones.

Cependant, la compréhension globale de la façon dont ces hormones interagissent et affectent la croissance secondaire dans la formation du bois de tension est encore incomplète.

II.4.4.2.2 Régulation transcriptionnelle du bois de tension

Par des approches à grande échelle comme l'analyse d'ESTs, les microarrays ou les RNA-seq, un certains nombres de gènes, présentant une expression différentielle entre le bois de tension et le bois normal ou bois opposé, ont pu être identifiés et cela chez différents angiospermes, tels que l'*Eucalyptus* (Paux *et al.*, 2005; Mizrachi *et al.*, 2015), le tulipier (*L. tulipifera*) (Jin *et al.*, 2011) et le peuplier (Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015). On retrouve essentiellement des gènes liés à la biosynthèse des parois, à leurs modifications et des gènes liés aux hormones.

Parmi ces gènes, certains codent des protéines FLAs (*Fasciclin-Like Arabinogalactan-Proteins*), appartenant à la sous-classe des protéines AGPs (*Arabinogalactan-Proteins*). En réponse à un stress gravitropique, plusieurs gènes *FLAs* sont surexprimés dans la partie en tension (Lafarguette *et al.*, 2004; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006; Azri *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2017) et les gènes *FLAs* sont maintenant considérés comme des marqueurs moléculaires de la formation de bois de tension. Leur particularité est la présence d'un ou plusieurs domaines fasciclins, domaine qui se retrouve conservé entre les bactéries, les algues et les animaux et qui est considéré comme important pour l'adhésion cellulaire (Gaspar *et al.*, 2001; Moody et Williamson, 2013). Ces domaines fasciclins joueraient le rôle de molécules d'adhésion entre les différents constituants de la paroi cellulaire. En effet, une étude sur des peupliers transgéniques sous-exprimant les gènes *PtFLAs*, a montré que l'expression de certains gènes de la biosynthèse des parois secondaires était réprimée, altérant la composition des parois cellulaires et modifiant *in fine* la biomécanique de la tige, avec une diminution de la résistance à la flexion et de la rigidité des plantes transgéniques (Wang *et al.*, 2015).

Parallèlement aux études effectuées sur les FLAs, les mécanismes transcriptionnels du métabolisme et du dépôt des polysaccharides ont également été étudiés. Ainsi, des travaux soulignent l'importance de la sucrose synthase (SuSy) (Déjardin *et al.*, 2004), de la cellulose

synthase (Paux *et al.*, 2005) et des XET et XTH (Nishikubo *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011) dans la formation du bois de tension.

II.4.5 Le bois de flexion

Comme indiqué dans le chapitre précédent, lorsque les arbres sont soumis à des flexions répétées transitoires (mimant l'effet du vent), le cambium produit un bois spécifique : le bois de flexion (Telewski, 1989).

II.4.5.1 Réponse en croissance

Comme pour les bois de réaction, le bois de flexion se forme dans la direction du stress mécanique, c'est-à-dire dans la direction de la flexion. L'application de flexions bidirectionnelles stimule l'activité cambiale dans le sens de la flexion ce qui conduit à un tronc de forme elliptique, aussi bien chez les gymnospermes que chez les angiospermes (Figure 24) (Telewski, 2016). En revanche, contrairement au bois de réaction, aucune excentricité de la moelle n'a été observée dans les sections d'arbres soumis à des régimes de flexions bidirectionnelles journalières. Autrement dit, l'activité du cambium est identique entre le côté en tension et le côté en compression.

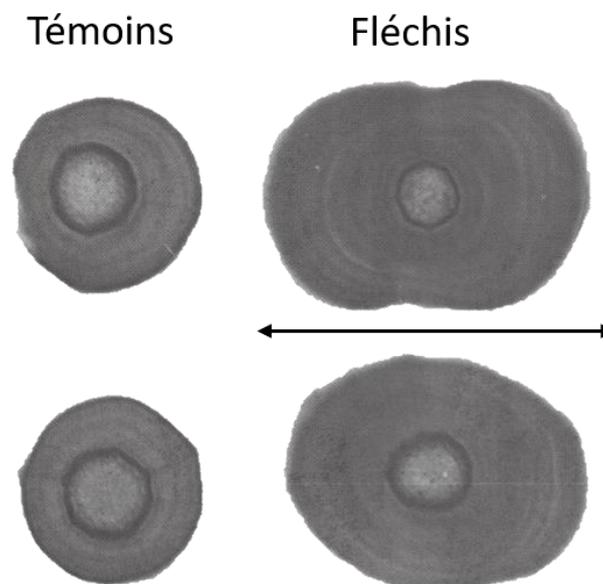


Figure 24 : Ovalisation du tronc des tiges fléchis d'*Abies fraseri* par rapport aux troncs non sollicités.

Les arbres fléchis 20 fois par jour présentent une ovalisation caractéristique du bois de flexion par rapport aux arbres témoins. La flèche indique que les flexions étaient bidirectionnelles. D'après Telewski (1989).

II.4.5.2 Réponses anatomiques

Contrairement au bois de réaction, peu d'études se sont penchées sur le bois de flexion qui a été anatomiquement peu décrit. Quelques observations au niveau anatomique ont été effectuées sur *Pinus* (Telewski et Jaffe, 1986a), *Abies* (Telewski, 1989) et sur les angiospermes (Neel et Harris, 1971; Pruyn, 1997; Kern *et al.*, 2005). Dans ces études, vingt flexions bidirectionnelles et journalières étaient appliquées de sorte que la tige ne dépasse pas les 45° par rapport à la verticale.

Chez les gymnospermes, les nouvelles trachéides formées suite à des sollicitations mécaniques, sont de tailles réduites avec une paroi secondaire plus épaisse et sont plus courtes en longueur (Telewski et Jaffe, 1986a ; Telewski, 1989). La caractérisation anatomique du bois de flexion de peupliers hybrides rapporte uniquement une réduction du diamètre des vaisseaux, de l'aire du lumen des vaisseaux et de leur fréquence (Neel et Harris, 1971; Pruyn, 1997; Kern *et al.*, 2005).

II.4.5.3 Autres modifications

En plus de ces quelques changements anatomiques observés sur les bois de flexion, des différences de composition chimique des parois ont également été mises en évidence. Chez les gymnospermes, une augmentation des lignines insolubles a été observée sur *Pinus taeda* en réponse à la flexion (Telewski et Jaffe, 1981). Chez les peupliers, les flexions n'entraînaient pas d'augmentation du total des lignines par rapport au bois normal, mais une augmentation du taux des monolignols syringyles a cependant été observée (Koehler et Telewski, 2006). De plus, les bois de flexion des gymnospermes et des angiospermes sont tous les deux caractérisés par une augmentation de l'angle des microfibrilles de cellulose.

L'augmentation de la croissance radiale ainsi que les changements anatomiques et chimiques de la paroi modifient les propriétés biomécaniques du bois. Le paramètre mécanique caractérisant l'état mécanique de la tige est la rigidité en flexion EI , où E est le module longitudinal d'élasticité et I le moment quadratique, qui varie à la puissance 4 du diamètre :

$$I = \frac{\pi \times D_{\text{sens } \perp \text{ flexion}} \times (D_{\text{sens flexion}})^3}{64} \quad (5)$$

La plupart des études reportent une diminution du module d'élasticité ce qui augmenterait la flexibilité. Mais l'augmentation de diamètre observée lors des traitements de flexion augmente le paramètre I , d'autant plus que l'augmentation de diamètre s'effectue principalement dans le sens de la flexion. L'augmentation considérable de I vient contrecarrer la diminution de E et

entraîne une augmentation de la rigidité en flexion de la tige *EI* (Telewski et Jaffe, 1986a; Telewski et Jaffe, 1986b; Telewski, 1989; Telewski et Pruyn, 1998; Pruyn *et al.*, 2000).

Par ces études, les bois de flexion ont été comparés au bois de compression des gymnospermes et au bois de tension des angiospermes, mais une caractérisation anatomique plus approfondie est nécessaire pour comparer rigoureusement l'anatomie des bois de réaction et des bois de flexion. De plus, dans la plupart de ces études les sollicitations mécaniques appliquées à la tige sont des flexions bidirectionnelles et d'intensité non contrôlées. Or la déformation étant la variable physique perçue par la plante, il est nécessaire de contrôler l'amplitude de la flexion appliquée à la tige pour ainsi générer des déformations homogènes, et également d'appliquer des flexions unidirectionnelles pour décorréler les réponses anatomiques du côté en tension et du côté en compression. Pour finir, il y a clairement une absence de données moléculaires pour le bois de flexion, mais l'analyse transcriptomique de Pomiès *et al.* (2017) ouvre des pistes sur les acteurs moléculaires impliqués en réponse à une flexion unique. Dans cette étude, on retrouve les gènes CLE dont certains ont un profil d'expression particulier. La modulation de leur expression à la suite d'une flexion et leur rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire chez les plantes laissent à penser que ces gènes seraient de bons candidats pour expliquer la formation du bois de flexion. Nous allons les détailler dans cette dernière partie de l'introduction.

III. Les peptides CLE

La communication intercellulaire est essentielle pour de nombreux processus de croissance et de développement chez les plantes, ainsi que dans la coordination des réponses cellulaires aux signaux de l'environnement. Depuis plusieurs années, la découverte des signaux peptidiques impliqués dans la communication intercellulaire fait l'objet de nombreux travaux (Coninck et Smet, 2016).

De manière générale, les peptides peuvent être regroupés en deux classes majeures : les peptides sécrétés et les peptides non sécrétés, en fonction des propriétés de séquence du côté N-terminale. D'un point de vue structural, les peptides sécrétés sont divisés en deux classes : les peptides subissant une modification post-traductionnelle et les peptides riches en cystéine (Figure 25). Les premiers sont caractérisés par une petite taille de peptides matures et par la présence de modifications post-traductionnelles (Matsubayashi, 2011). Les peptides riches en cystéines sont quant à eux caractérisés par la présence d'un nombre pair de résidus cystéines, nécessaires à la formation de ponts disulfure intramoléculaires (Marshall *et al.*, 2011). L'une

des familles de peptides à modifications post-traductionnelles sans doute la plus étudiée chez les plantes est la famille CLAVATA3 (CLV3)/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (ESR), plus communément appelée famille CLE.

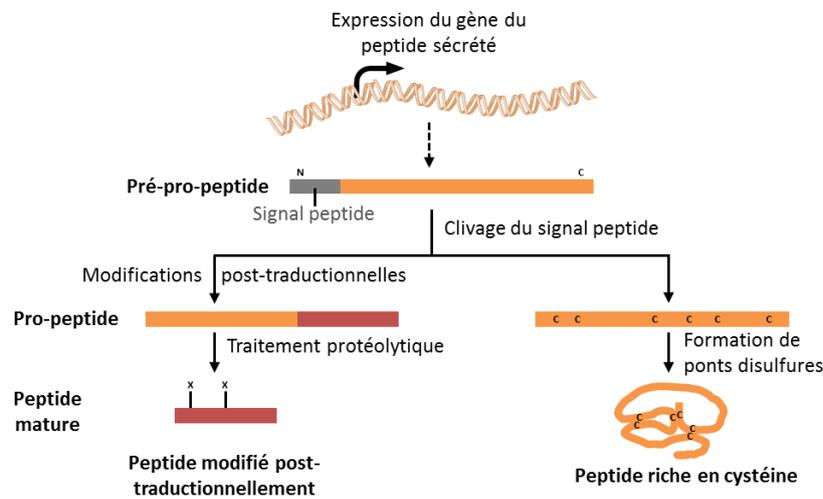


Figure 25 : Classification structurale des peptides sécrétés.

Les peptides qui subissent des modifications post-traductionnelles complexes suivies d'un traitement protéolytique sont définis comme des petits peptides modifiés post-traductionnellement ; les peptides qui subissent une formation de ponts disulfures intramoléculaires sont définis comme des peptides riches en cystéine. D'après Matsubayashi (2011).

III.1 Structure des peptides CLE

Les peptides CLE représentent un groupe majeur dans les peptides de signalisation chez les plantes et sont nommés d'après les premiers membres du groupe identifiés CLAVATA (CLV3) chez *A. thaliana* (Clark *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1999) et *Embryo Surrounding Region* (ESR) chez le maïs (*Zea mays*) (Opsahl-Ferstad *et al.*, 1997). Les peptides CLE sont formés à partir d'un pré-pro-peptide contenant (i) un domaine hydrophobe N-terminal de 15 à 69 acides aminés qui inclut le signal de sécrétion, (ii) un domaine central variable de 40 à 90 acides aminés et (iii) un domaine conservé CLE en position C-terminal de 14 acides aminés (Figure 26) (Strabala *et al.*, 2014). La partie N-terminale est clivée pendant le transport à travers la voie de sécrétion vers l'apoplaste. Ensuite 12 ou 13 acides aminés de la région C-terminale sont clivés par un traitement protéolytique pour donner le peptide CLE fonctionnel (Ni *et al.*, 2011; Djordjevic *et al.*, 2011). Conformément à ce modèle, les peptides CLE synthétisés chimiquement contenant ces 12 ou 13 acides aminés sont suffisants pour entraîner l'activité des CLE (Fiers *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006). Les modifications post-traductionnelles, telles que des hydroxylations et des arabinosylations sont également importantes pour l'activité d'au moins quelques peptides CLE (Ito *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006). Le peptide est sécrété dans l'espace extracellulaire, où il agit comme un ligand pour les

récepteurs tels que les kinases LRR (*leucine-rich receptor*) et active ainsi les voies de signalisation (Figure 27) (Miyawaki *et al.*, 2013 ; Matsubayashi, 2014 ; Coninck et Smet, 2016).

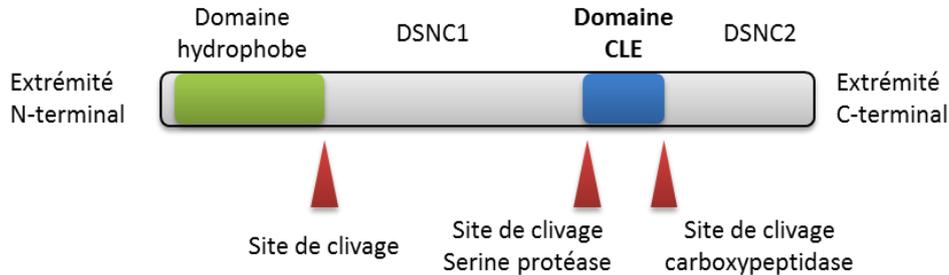


Figure 26 : Représentation de la structure d'un peptide CLE.

La partie N-terminale est composée d'un domaine hydrophobe et du signal de sécrétion. Le domaine CLE, assurant l'activité du peptide CLE se retrouve dans la partie C-terminale. Des domaines de séquences non conservées (DSNC) se retrouvent dans la partie centrale du peptide, et pour quelques peptides on peut retrouver un DSNC à l'extrémité C-terminale. Des sites de clivages sur les domaines hydrophobes et CLE permettent la libération du peptide CLE fonctionnel.

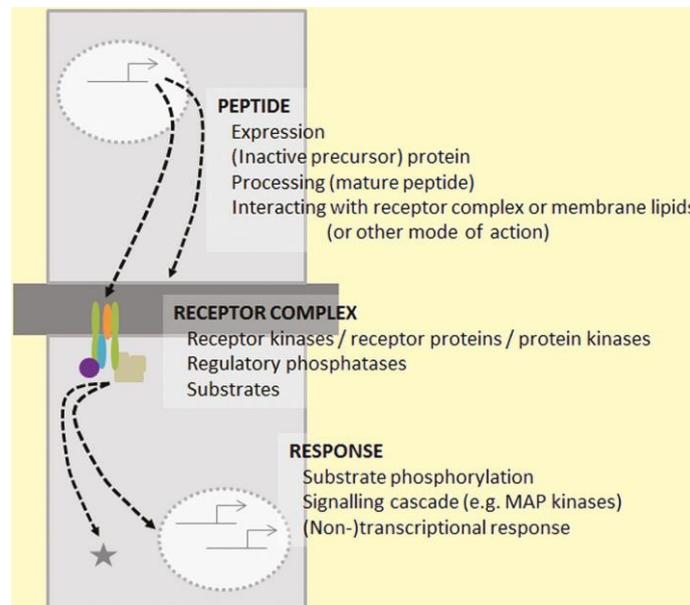


Figure 27 : Vue d'ensemble de la signalisation et de l'activité des peptides.

Schéma simplifié indiquant certains points clés dans la régulation du peptide, du complexe récepteur et de la réponse en aval. Deux cellules adjacentes (gris clair) séparées par une paroi cellulaire (gris foncé) sont représentées. (Coninck et Smet, 2016).

III.2 Implication des protéines CLE dans les régulations méristématiques

Chez *A. thaliana*, 32 membres de la famille CLE ont été identifiés dont la majorité est transcrite dans un voire plusieurs tissus. Chez le peuplier, *Populus trichocarpa* 50 *PtCLE* ont été identifiés (Han *et al.*, 2016). Comme chez *Arabidopsis* ainsi que chez d'autres espèces telles que le riz (*Oryza sativa*) ou le maïs (*Zea mays*), le domaine protéique CLE est très conservé, suggérant une conservation fonctionnelle entre *PtCLEs* et *AtCLEs*. Ces protéines CLE participent notamment à deux voix importantes de régulations dans le méristème apical et vasculaire.

III.2.1 Régulation du méristème apical : la boucle de régulation CLV3/WUS

Dans le développement du méristème apical des tiges d'*Arabidopsis* (SAM, *Shoot Apical Meristem*), la boucle de rétroaction négative *CLV3-WUS* est nécessaire pour équilibrer la prolifération et la différenciation cellulaire, afin de maintenir un pool de cellules souches constantes dans le SAM (Schoof *et al.*, 2000) (Figure 28). Le gène *WUS* (*WUSCHEL*), codant une protéine à homéodomaine, est exprimé dans un groupe de cellules situées à la base de la zone centrale, c'est-à-dire sous le domaine des cellules souches et appelé centre organisateur. Chez les mutants *wus*, les cellules de la zone centrale se différencient prématurément, indiquant que *WUS* aurait pour rôle de maintenir les cellules souches de la zone centrale dans un état indifférencié (Mayer *et al.*, 1998). A l'inverse, le gène *CLV3* est spécifiquement exprimé dans les cellules souches de la zone centrale, clivé puis sécrété dans l'espace extracellulaire et perçu par au moins trois récepteurs transmembranaires *CLV1*, *CLV2-CRN* et *RPK2* des cellules adjacentes (Müller *et al.*, 2008; Kinoshita *et al.*, 2010). Ce complexe ligand-récepteur active alors une cascade de signalisation aboutissant à la répression de la transcription de *WUS*. Simultanément, *WUS* active lui-même l'expression de *CLV3* dans les cellules souches. Ces interactions entre les gènes *WUS* et *CLV* constituent une boucle d'autorégulation de la taille de

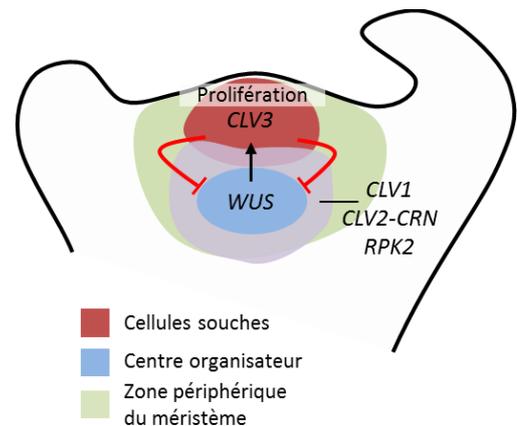


Figure 28 : Régulation de la prolifération cellulaire par la boucle de régulation WUS-CLV3.

WUS est exprimé dans le centre organisateur et induit l'expression de *CLV3* dans les cellules souches. A son tour, *CLV3* à travers ses récepteurs, réprime l'expression de *WUS* dans la zone autour du centre organisateur.

la zone centrale, assurant ainsi le maintien d'une réserve de cellules souches au sein du méristème, et délimitant la zone centrale et les zones périphériques.

III.2.2 Régulation du méristème cambial : le couple TDIF/PXY

Comme cité dans le paragraphe II.3.1.1, le peptide TDIF/CLE41 est impliqué dans la voie de signalisation contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire (Fisher et Turner, 2007; Hirakawa *et al.*, 2010). Le peptide CLE41 est exprimé dans le phloème et son récepteur PXY dans le cambium. Chez le peuplier, lorsqu'on surexprime CLE41 en utilisant des promoteurs constitutifs ou spécifiques du xylème, cela entraîne à la fois une augmentation de la division cellulaire et des défauts dans l'organisation du tissu vasculaire. L'expression localisée de CLE41 dans le phloème est nécessaire pour fournir un signal de position à PXY, afin d'orienter correctement le plan de division des cellules du cambium (Figure 29) (Etchells et Turner, 2010; Etchells *et al.*, 2015).

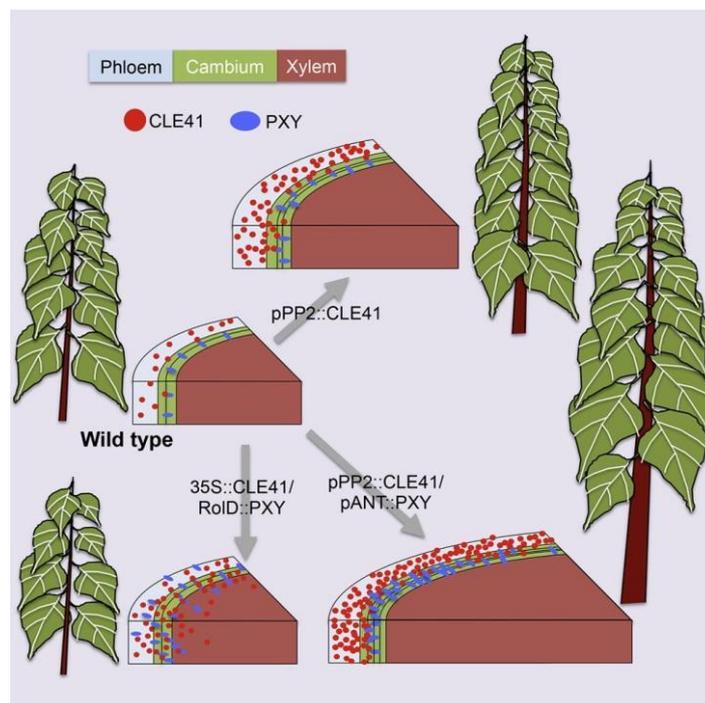


Figure 29 : Modulation de la formation du bois chez les arbres en régulant la voie de signalisation CLE/PXY.

Arbres présentant des expressions localisées ou constitutives des gènes *CLE41* et *PXY*. L'augmentation de l'expression localisée de *CLE41* dans le phloème (pPP2) et de *PXY* dans le cambium (pANT) induit une augmentation de la croissance radiale et longitudinale des arbres. L'expression constitutive et répandue des gènes (35S, RoID) présentent des perturbations au niveau tissulaire. (Etchells *et al.*, 2015).

III.3 Le gène *PtCLE12.2*

On sait peu de choses sur les gènes CLE chez le peuplier. La conservation de leurs rôles fondamentaux dans la régulation et la différenciation des tissus méristématiques montre l'intérêt d'étudier cette famille de gènes chez le peuplier, notamment les gènes présentant une expression dans les tissus vasculaires. Un de ces gènes pourrait être le gène *PtCLE12.2*. En effet des données de la littérature montrent que son expression est localisée au niveau du cambium et du xylème en développement (Han *et al.*, 2016). Chez *Populus trichocarpa*, deux gènes présentent un domaine CLE identique au domaine de *PtCLE12.2* : Potri.010G13040 (*PtCLE12.1*) et Potri.012G05960 (*PtCLE13*). L'homologue chez *A. thaliana* est le gène *At1g73965* (*AtCLE13*) ; mais peu de données dans la littérature sont présentes concernant ces gènes. L'homologue de *PtCLE12.2* chez *Medicago truncatula* (*MtCLE18*) présente une expression multiplié par deux chez le mutant *mtstp* (Wang *et al.*, 2010). Le gène *MtSTP* code un facteur de transcription WRKY, dont la fonction est de maintenir les cellules de la moelle dans un état de cellule de parenchyme en réprimant en amont les facteurs de transcription de type NAC et doigts de zinc C3H, contrôlant la formation de constituants pariétaux. Le mutant *mtstp* présente une augmentation de la biomasse aérienne avec formation d'une paroi secondaire dans les cellules de la moelle. Une étude sur le transcriptome d'arbres soit gravistimulés, soit traités à l'acide gibbérellique, soit présentant une modulation de l'expression d'*ARK2* a permis de modéliser des réseaux de transcription sous-jacents à la formation du bois et d'identifier des modules de co-expression génique (Gerttula *et al.*, 2015). Parmi ces modules *PtCLE12.2* appartient à celui associant l'angle des microfibrilles, la cristallinité de la cellulose ainsi que les hormones et la paroi cellulaire.

La modification de l'expression du gène *PtCLE12.2* ainsi que l'ensemble de ces résultats indiquent que le gène *PtCLE12.2* est un bon candidat pour l'étude de la formation du bois de flexion.

Objectifs de thèse

Dans la littérature, malgré quelques lacunes concernant les mécanismes moléculaires impliqués, la formation du bois de tension généré sous stress gravitropique est bien documentée, notamment lorsqu'il s'agit de la caractérisation anatomique à l'échelle tissulaire ou à l'échelle pariétale. A l'inverse, les caractéristiques du bois de flexion, formé sous sollicitations mécaniques transitoires restent assez mal connues. A mon arrivée au sein de l'équipe MECA (UMR PIAF), des études mêlant approches biomécaniques et approches moléculaires avaient permis d'acquérir des connaissances sur l'effet d'une flexion sur le peuplier. Ces études avaient montré que lors de flexions de tiges, les peupliers perçoivent l'intensité des déformations au sein de l'organe, déformations qui dépendent de la courbure appliquée (Coutand *et al.*, 2009). La découverte du modèle S³m, permettant d'appliquer des sollicitations d'intensité contrôlée, a permis par la suite de caractériser la cinétique de réponse en croissance radiale observée chez le peuplier suite à des flexions répétées et d'intensité contrôlée. Ces études ont permis de montrer que le peuplier répond en croissance en diamètre suite à trois flexions journalières mais ne répond plus les jours suivants (Martin *et al.*, 2010). Cette augmentation de la croissance s'accompagne d'une modification de la nature du bois mis en place, qui a pu être observée chez quelques conifères et angiospermes, et nommé « bois de flexion ». Le bois de flexion analysé par certaines études est généralement formé suite à des flexions bidirectionnelles et d'intensité non contrôlée. Quel est alors l'impact des déformations générées par ces flexions sur l'anatomie du bois ? Et quels sont les mécanismes moléculaires mis en place dans la formation de ce bois de flexion ?

Le premier objectif de la thèse a eu comme originalité de caractériser l'effet de flexions unidirectionnelles et d'intensité contrôlée de la tige sur l'anatomie et les réponses moléculaires du bois formé, permettant ainsi de distinguer les niveaux et signes des déformations que subissent les différentes parties de la tige. Afin d'imposer une déformation d'intensité constante pendant toute la durée de l'expérimentation pour chaque arbre et ce malgré la croissance radiale continue, un dispositif a été mis en place au laboratoire afin de contrôler le niveau de courbure à appliquer lors des flexions. Afin de compléter notre compréhension du phénomène d'accommodation à la flexion différents régimes de flexions répétées ont été testés et l'impact de ces deux régimes de flexions sur la mise en place du bois de flexion a été comparé.

Le second objectif de la thèse était d'identifier des acteurs moléculaires spécifiquement impliqués dans la formation de ce bois de flexion. Au laboratoire, une étude transcriptomique réalisée sur tige entière à la suite d'une flexion unique, a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés, qui, dans la littérature sont reportés comme intervenant dans la

formation du bois. Parmi eux, le gène *CLE12.2* appartient à la famille des peptides CLAVATA. Au vu des données bibliographiques mettant en relation l'activité des peptides CLAVATA et les activités méristématiques chez les plantes (Sawa *et al.*, 2006), le second objectif de la thèse a donc été d'étudier l'impact du gène *CLE12.2* sur la formation du bois de flexion, grâce à l'analyse d'arbres transgéniques présentant une sous- ou surexpression du gène *CLE12.2*.

Résultats

***Chapitre I: Feeling stretched or
compressed? The multiple
mechanosensitive responses of wood
formation to bending***

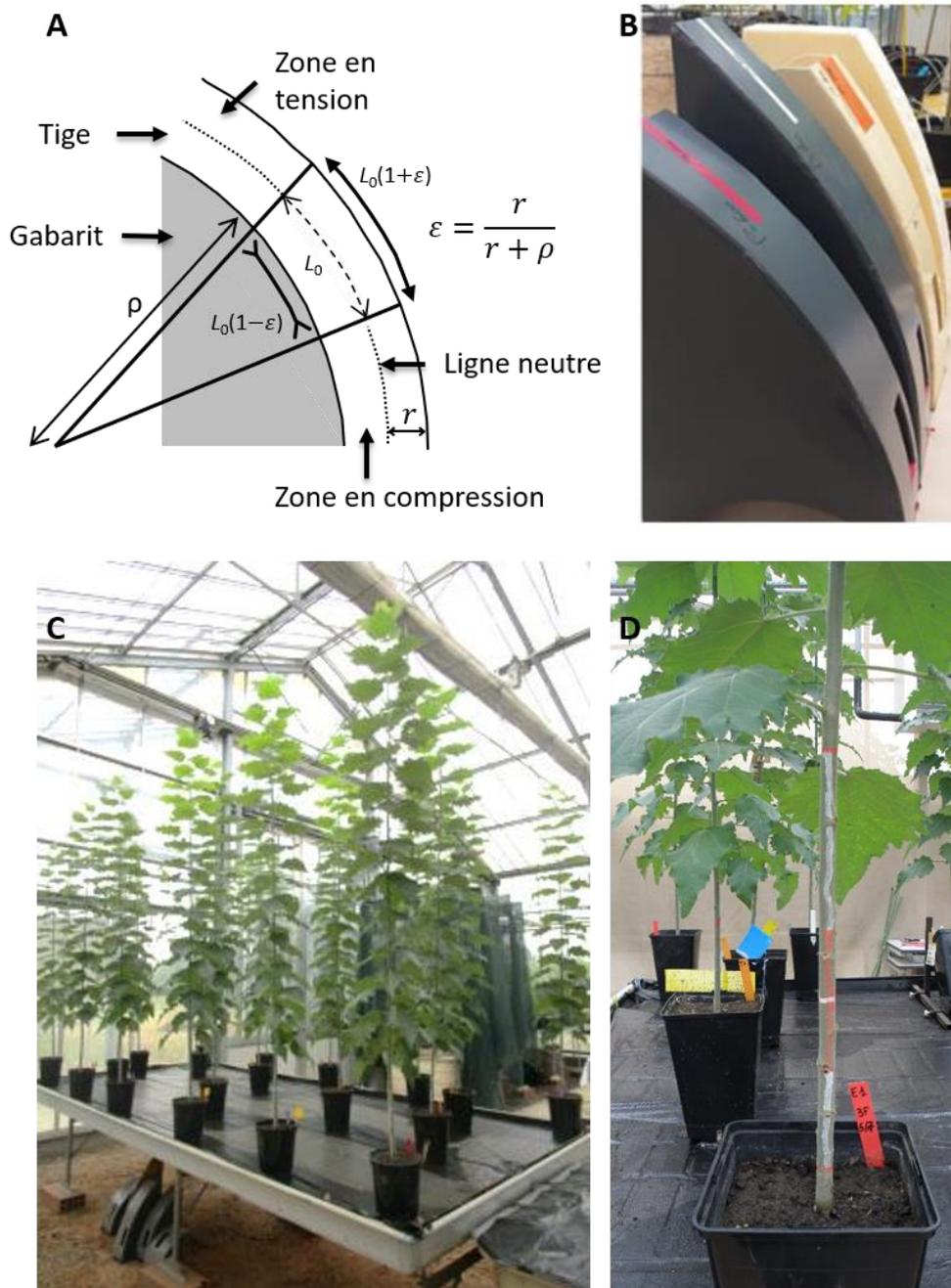


Figure 30: Dispositif expérimental.

(A) Principe de calcul de la déformation longitudinale appliquée à la tige grâce à la relation entre le rayon de courbure (ρ) et le rayon de la tige (r). (B) Gabarits de rayons de courbure croissant permettant d'ajuster le niveau de déformation appliquée à la tige lors de la flexion. Une fenêtre de 10 cm de long a été usinée dans les gabarits afin d'éviter leur contact avec les tiges. (C) Les arbres utilisés pour les expérimentations sont disposés sur une tablette et alimentés en solution nutritive par subirrigation automatisée. Les feuilles sont éliminées sur les 30 premiers centimètres (zone fléchie) une semaine avant l'expérimentation afin d'éviter les blessures lors du contact avec le gabarit. (D) Marquage sur la tige (par un trait vertical) des 30 cm de la zone fléchie. Le trait inférieur se situe à 1 cm au-dessus du collet et marque le premier point de contact entre la tige et la base du gabarit. Un trait horizontal situé au centre de la zone fléchie, indique la position de la mesure hebdomadaire des diamètres.

Le bois constitue une ressource naturelle renouvelable dont l'importance économique et écologique est en pleine expansion. Dans un contexte de changements climatiques, il apparaît essentiel de mieux comprendre les facteurs environnementaux pouvant influencer quantitativement et qualitativement la production de bois. Parmi ces facteurs, le vent et plus particulièrement les tempêtes représentent un risque majeur pour nos forêts. Les scénarii envisagés dans le cadre des changements climatiques prévoient une augmentation de la fréquence des épisodes de vents forts (tempêtes) avec des vents courants plus faibles. Comment les arbres pourront-ils alors s'acclimater à ces changements ? Les recherches menées sur ce sujet ont montré que les arbres sont capables de percevoir les sollicitations mécaniques auxquelles ils sont soumis pendant leur croissance (les vents courants), puis de s'y acclimater en ajustant en conséquence leur croissance et en modifiant la différenciation de leur bois, avec la production d'un bois appelé « bois de flexion » (Telewski, 1989).

Dans la littérature, les caractéristiques du bois de flexion formé sous contraintes mécaniques transitoires restent très peu décrites. L'objectif de ce premier chapitre de résultats est de comprendre comment, en réponse aux sollicitations mécaniques dues au vent, la modification de l'activité du cambium impacte la production quantitative et la structure interne du bois. Les résultats obtenus ces dernières années au sein de l'équipe MECA montrent que la croissance radiale de la tige de peuplier est corrélée avec la somme des valeurs absolues des déformations longitudinales appliquées lors de la flexion. Toutefois, l'intensité de ces déformations est hétérogène sur une section de tige. Ceci pose la question de l'effet local de l'intensité des déformations sur l'activité cambiale. De plus, lors de flexions unidirectionnelles, une moitié de la tige subit des déformations longitudinales d'étirement (tension), tandis que l'autre moitié subit des déformations longitudinales de raccourcissement (compression). La formation du bois n'ayant jamais été étudiée dans un contexte de flexions unidirectionnelles, nous posons la question de l'existence d'un effet potentiel du signe des déformations sur l'anatomie du bois. Pour tester cette hypothèse, un dispositif expérimental a été créé permettant de contrôler l'intensité des déformations longitudinales appliquées à la tige (Figure 30). Ce premier chapitre de résultats présente donc (i) les réponses de croissance d'arbres régulièrement et transitoirement fléchis (ii) les caractéristiques anatomiques, à l'échelle tissulaire et pariétale, et les caractéristiques biochimiques du bois de flexion produit en réponse à des flexions répétées, et (iii) la première mise en évidence de la régulation d'acteurs moléculaires. Dans la discussion, nous développerons les différences entre le bois de flexion et le bois de tension, ainsi que la nature des voies de différenciation déclenchées par un stimulus mécanique. Nous

discuterons également de l'effet des différents types de déformations appliquées (signe de la déformation ou valeur absolue) sur les réponses engendrées. Enfin, nos résultats nous ont amené à proposer une nouvelle terminologie permettant de distinguer les bois formés par différents types de sollicitations mécaniques : ainsi le bois formé sous compression sera appelé CFW (*Compressive Flexure Wood*) et le bois formé sous tension TFW (*Tensile Flexure Wood*). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue en janvier 2018 dans le journal *Annals of Botany*.

Feeling stretched or compressed? The multiple mechanosensitive responses of wood formation to bending

Jeanne Roignant¹, Éric Badel¹, Nathalie Leblanc-Fournier¹, Nicole Brunel-Michac¹,
Julien Ruelle², Bruno Moulia¹ and Mélanie Decourteix^{1,*}

¹Université Clermont Auvergne, INRA, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France and ²UMR LERFoB, AgroParisTech, INRA, 54000 Nancy, France

* For correspondence. E-mail melanie.decourteix@uca.fr

Received: 11 September 2017 Returned for revision: 10 November 2017 Editorial decision: 20 December 2017 Accepted: 4 January 2018

• **Background and Aims** Trees constantly experience wind, perceive resulting mechanical cues, and modify their growth and development accordingly. Previous studies have demonstrated that multiple bending treatments trigger ovalization of the stem and the formation of flexure wood in gymnosperms, but ovalization and flexure wood have rarely been studied in angiosperms, and none of the experiments conducted so far has used multidirectional bending treatments at controlled intensities. Assuming that bending involves tensile and compressive strain, we hypothesized that different local strains may generate specific growth and wood differentiation responses.

• **Methods** Basal parts of young poplar stems were subjected to multiple transient controlled unidirectional bending treatments during 8 weeks, which enabled a distinction to be made between the wood formed under tensile or compressive flexural strains. This set-up enabled a local analysis of poplar stem responses to multiple stem bending treatments at growth, anatomical, biochemical and molecular levels.

• **Key Results** In response to multiple unidirectional bending treatments, poplar stems developed significant cross-sectional ovalization. At the tissue level, some aspects of wood differentiation were similarly modulated in the compressed and stretched zones (vessel frequency and diameter of fibres without a G-layer), whereas other anatomical traits (vessel diameter, G-layer formation, diameter of fibres with a G-layer and microfibril angle) and the expression of fasciclin-encoding genes were differentially modulated in the two zones.

• **Conclusions** This work leads us to propose new terminologies to distinguish the ‘flexure wood’ produced in response to multiple bidirectional bending treatments from wood produced under transient tensile strain (tensile flexure wood; TFW) or under transient compressive strain (compressive flexure wood; CFW). By highlighting similarities and differences between tension wood and TFW and by demonstrating that plants could have the ability to discriminate positive strains from negative strains, this work provides new insight into the mechanisms of mechanosensitivity in plants.

Key words: *Populus tremula* × *alba*, mechanical stimuli, flexure wood, reaction wood, secondary growth, tensile/compressive, strain, mechanosensitivity, wood anatomy, fasciclin, MYB, microtubule-associated protein

INTRODUCTION

Throughout their life, plants constantly experience various external mechanical stimuli, such as wind, rain, weight of snow, or contacts with other plants or animals. Plants are able to cope with these environmental factors by perceiving mechanical strains and modifying their growth accordingly (Moulia *et al.*, 2015). This acclimation of growth to mechanical perturbations is called thigmomorphogenesis (Jaffe, 1973). In the case of trees growing in windy environments, the main mechanical stimulus in branches and stem is bending. At the tree scale, bending generates a decrease of shoot elongation coupled with an increase of radial expansion and an increasingly developed root anchorage (Telewski and Pruyn, 1998; Coutand *et al.*, 2008; Bonnesoeur *et al.*, 2016). These acclimations of growth are thought to be an adaptive response of plants to improve mechanical safety against breakage, buckling and anchorage failure (Fournier *et al.*, 2006).

Apart from thigmomorphogenesis, one of the best-characterized responses to mechanical stimulus in woody angiosperms is the production of ‘tension wood’. This formation of a modified wood is primarily triggered by the perception of change in stem orientation with regard to the gravity field, but also curvature (Coutand *et al.*, 2007; Bastien *et al.*, 2013; Groover, 2016). Its biological function is interpreted as an active motor generating tensile forces that pull the stem back upright (Scurfield, 1973; Alméras and Clair, 2016). In straight inclined axes, the tension wood is produced at the upper side of the leaning organ, while ‘opposite wood’ is formed at the lower side. The term ‘normal wood’ refers to the wood formed in upright trees (Gardiner *et al.*, 2014). Tension wood and opposite wood form through a set of changes at different scales, including asymmetrical radial growth that is higher in the tension wood side and lower in the opposite wood side. Cell differentiation also appears to be affected, since tension wood shows higher ratios of fibres to xylem vessels (Hellgren *et al.*, 2004; Mellerowicz

and Sundberg, 2008) and lower vessel size (Jourez *et al.*, 2001; Ruelle, 2014). At the cell wall scale, in commonly studied species such as beech (*Fagus ssp.*), poplar (*Populus ssp.*) and oak (*Quercus ssp.*), the most distinctive feature of tension wood is the presence of a gelatinous inner wall layer ('G-layer') in the fibres. Depending on species, this G-layer may be observed inside the S3 layer, replacing the S3 layer or replacing both the S3 and S2 layers (Dadswell and Wardrop, 1955; Abedini *et al.*, 2015). It is mainly composed of highly crystalline cellulose featuring microfibrils oriented close to the fibre long axis. At the molecular scale, many key genes contributing to tension wood formation have been identified (see reviews by Tocquard *et al.*, 2014; Groover, 2016), and some that encode fasciclin-like arabinogalactan proteins (FLAs) such as *POPFLA6* (Potri.013G151400) are known to be highly expressed in tension wood (Lafarguette *et al.*, 2004; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006; Groover, 2016).

Although less well documented, wind is another environmental factor that has substantial effects on tree growth and wood formation (Telewski, 2012, 2016; Bonnesoeur *et al.*, 2016). Multiple bending treatments (mimicking the effect of wind) applied to *Abies fraseri* stems lent the stem an elliptical form (Telewski, 1989, 2012). At the tissue level, these stimuli induce the formation of an acclimated wood called 'flexure wood' (Telewski, 1989), which has been studied in a few species including *Pinus* (Telewski and Jaffe, 1986), *Abies* (Telewski, 1989) and *Populus* (Kern *et al.*, 2005). For hybrid *Populus*, anatomical characterization of flexure wood is reduced to the description of a significant reduction in vessel diameter, vessel lumen area and vessel frequency (Kern *et al.*, 2005). Note that all the experiments conducted so far on flexure wood used multidirectional mechanical loadings with uncontrolled intensities. Molecular-scale responses to multiple transient bending treatments in the stem of angiosperm trees have never been investigated. However, Pomiès *et al.* (2017) recently reported on the transcriptomic responses to a single transient bending. In this time-course study, the expression of many genes involved in cell wall organization and/or wood development was affected for late time points. Among these genes, the expression of *PtaFLA14-9*, and of *PtaMYB69* and *PtaMAP70-5* was upregulated at 72 h post-bending. In arabidopsis, MYB69 is known to play a role in secondary cell wall thickening, and MAP70-5 is known to control secondary cell wall patterning (Zhong *et al.*, 2008; Pesquet *et al.*, 2010).

The link between the modulation of secondary growth rate in response to a single controlled bending and the intensity of bending deformation has been studied quantitatively, and formalized through the 'Sum of Strain Sensing' (S³m) integrative model for mechanoperception and thigmomorphogenetic growth responses (Coutand *et al.*, 2009; Moulia *et al.*, 2015). S³m assumes that only the amplitude of the strain is sensed, irrespective of its sign (i.e. compressive and tensile strains yield the same effect). So far, S³m has been used to predict and study global radial growth response at the whole-stem segment level (i.e. without considering the different direction of radial growth), but no attempt has been made to include flexure wood differentiation.

Given that cambial response to bending strains has the specificity of involving both increased radial growth and differentiation of a distinct wood, we designed this study with a

dual purpose. First, in order to better understand the mechano-control of wood formation, we conducted these experiments with the hypothesis that different types of specific local strains (strain amplitude and strain sign) could generate different specific cambium responses.

To assess this hypothesis, multiple quantified flexural strains were applied to young *Populus* stems. This was achieved using unidirectional bending, so that a given cell always experienced strains of the same sign (longitudinal compression or longitudinal tension only), enabling us to distinguish the wood formed under tensile and compressive flexural strains. The different effects of bending were characterized quantitatively by studying radial growth, cell size and cell wall ultrastructure.

To gain a first molecular insight into how multiple bending treatments can modulate wood anatomical traits, we used a quantitative PCR (qPCR) approach to investigate the expression of four mechanosensitive target genes known to play a role in wood differentiation, i.e. *PtaFLA14-9* (Potri.009G012100), *POPFLA6* (Potri.013G151400) and poplar orthologues of the arabidopsis *MYB69* (*PtaMYB69*, Potri.007G106100) and *MAP70-5* (*PtaMAP70-5*, Potri.006G018000) genes (Pomiès *et al.*, 2017). A novel sampling strategy was developed to study zones experiencing different amounts of strain within the same stem cross-section: (1) a zone of wood submitted to controlled longitudinal tensile strains; (2) a zone submitted to controlled longitudinal compressive strains; and (3) a 'neutral zone' that experiences a mix of very small longitudinal compressive and tensile strains around the strain-free neutral line serving as internal control.

The second objective was to investigate the nature of the differentiation pathway triggered by the mechanical bending stimulus. We hypothesized that tension wood and flexure wood differentiation may arise from shared processes that could lead to anatomical similarities. We investigated this point by conducting a quantitative anatomical characterization of the wood formed under tensile or compressive flexural strains, and compared them with tension and opposite wood. In bent poplar stems, we also analysed the localized expression of FLA-encoding genes known to be upregulated in tension wood formation, i.e. *POPFLA6* and *PtaFLA14-9* (Lafarguette *et al.*, 2004; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006; Groover, 2016).

This work refines the definition of 'flexure wood', its differences from reaction woods such as 'tension wood', and the perceptual capacities of poplar stem at the tissue scale.

MATERIALS AND METHODS

Plant material, culture and mechanical perturbations

Experiments were carried out on hybrid poplars (*P. tremula* × *P. alba*, clone INRA 717-1B4), multiplied clonally *in vitro* on 1/2 strength MS medium (Murashige and Skoog, 1962). After 3 weeks of acclimation, plantlets were planted in 4 L pots filled with a substrate composed of one-third black peat and two-thirds local clay-humic Limagne soil (Bornand *et al.*, 1975), and transferred to a greenhouse at 22 (±1) °C (day) and 19 (±1) °C (night) with a relative air humidity of 60 ± 10 %, under natural light. Two independent experiments (years 2015 and 2016) were conducted during 2 months in the same period

of each year (from May to July). Bending treatments started 5 months after micropropagation, when the poplar stems showed an average diameter of 6 mm at 15 cm above the ground, and lasted for 8 weeks. At this stage the stem is already experiencing secondary growth in the bent zone. The treatment consisted of one unidirectional bending of the stem basal part (30 cm) per day on three consecutive days per week, as this protocol was shown to maximize mechanosensing (Martin et al., 2010; Pomies et al., 2017). The magnitude of the bending was controlled by the use of a plastic constant-curvature template that generated a homogeneous strain field along the longitudinal direction, as described in Coutand et al. (2009). A long hole was cut in the plastic template to avoid lateral contact in the middle of the bent zone. Template curvature was adjusted weekly to keep a uniform strain level at around 1 % in all the trees and throughout the treatment period. Maximal strain applied to the stems (ϵ_{\max}) was calculated according to the formula (Coutand et al., 2009; Moulia et al., 2015):

$$\epsilon_{\max} = \frac{r}{r + \rho}$$

where r is the radius of the stem in the direction of bending, and ρ is the radius of the plastic template (Fig. 1A). We chose to bend the stem for a very short 5 s interval in order to minimize graviperception. Note that this time lapse is much shorter than the presentation time (linked to the gravity perception mechanism) (Jourez and Avella-Shaw, 2003). For the two experiments, a total of 26 trees were grown: ten ‘control’ trees that grew without mechanical perturbation, 12 trees that were submitted to the bending treatment and four trees that were made to lean by permanently tilting the pots at 35 ° from the vertical to generate a gravitropic response and produce tension wood. Sampling was designed to distinguish the wood formed under tensile (stretched zone) strains, under compressive (compressed

zone) strains or in the area called the ‘neutral zone’. The ‘neutral zone’ surrounds the neutral line, which theoretically experiences no strain. Thus, the wood in the neutral zone experienced a mix of only very small compressive and tensile strains (Fig. 1B). Sampling preparations are described in the following sections.

Growth analysis

Tree heights were measured with a measuring tape at the beginning and end of the period of mechanical treatment. Stem diameters were measured weekly with a digital calliper in the direction of bending (D_{\parallel}) and in the direction perpendicular to bending (D_{\perp}). D_{\parallel} corresponds to the direction where the applied longitudinal strain is the highest (ϵ_{\max}), while D_{\perp} corresponds to the neutral plane where the applied strain is null. The ovalization of the stem cross-section is defined as:

$$\text{Oval}(t) = \frac{D_{\parallel}(t)}{D_{\perp}(t)}$$

where t is time (in weeks).

Histological analysis

For vessel diameter measurements, portions of bent or unbent stems were collected and immediately embedded in polyethylene glycol (PEG) 1500. Transverse 25 µm thick sections were cut with a microtome (LEICA RM 2165 rotary, Jena, Germany) and then stained with 1 % safranin–astra blue.

For the fibre cell wall measurements, portions of bent or unbent stems were collected, and wood sticks (3–5 mm in length and 3 × 2 mm in cross-section) were cut from the stretched,

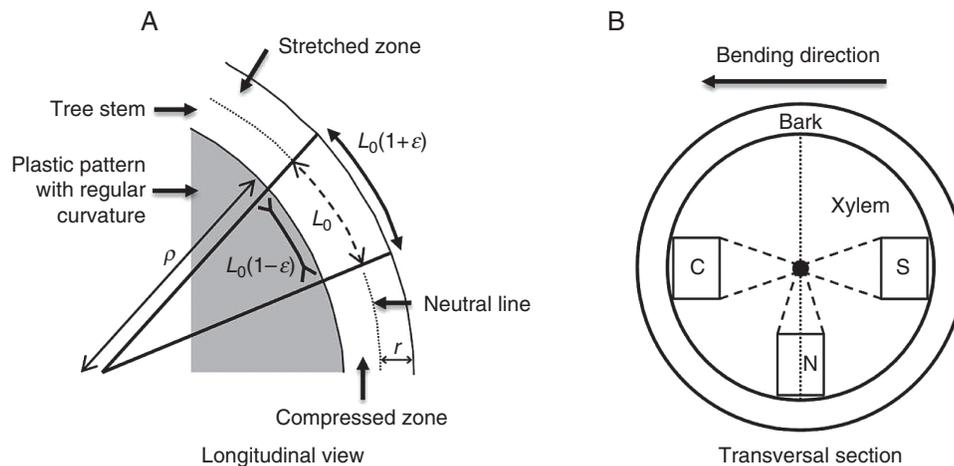


FIG. 1. Schematic representation of a bending treatment (A) and local sampling in a bent stem (B). (A) The arrows in the stretched and compressed zones represent the longitudinal strains that wood experiences during bending: either by longitudinal stretching (tensile strains) or by longitudinal shortening (compressive strains). The ‘neutral line’, represented by the dotted line, is the part of the stem that undergoes no longitudinal strain. ρ is the radius of the plastic pattern; r is the radius of the stem in the direction of bending; ϵ is the longitudinal strain that the stem experiences; L_0 is initial length of the segment. Maximal strain occurs at the periphery and is equal to $\epsilon = r/(r + \rho)$. (B) Sampling for anatomical, biochemical, molecular and microfibril angle measurements. Three zones were defined: wood formed in the compressed zone (C), in the stretched zone (S) and in the neutral zone that undergoes very slight strain (N). The vertical dotted line represents the neutral line. The arrow shows the direction of bending.

compressed and neutral zones using a razor blade, then fixed, dehydrated and gradually infiltrated with medium-grade LR white resin as described in [Azri et al. \(2009\)](#). Then 3–4 µm thick sections were cut using an OmU2 rotary microtome (Reichert, Vienna, Austria) equipped with glass knives, and stained with 0.5 % toluidine blue.

All images were processed with a Zeiss Axio Observer Z1 microscope, digital camera and Zen imaging software system (Zeiss, Jena, Germany). Measurements of vessel diameter, vessel density, G-layer proportion and fibre cell wall thickness were performed with ImageJ software ([Schneider et al., 2012](#)) (see [Supplementary Data Fig. S1](#)). Measurements of cell wall layer thickness were performed on the 4 µm thick sections (from resin-embedded samples). Note that this technique does not allow the precise distinction of the primary wall layer, so we further refer to cell wall layers (excluding the G-layer) using the term ‘S-layer’, which includes primary and S1–S2 layers.

Pith eccentricity

Pith eccentricity, E , represents the position of the pith in the stem diameter: E gets higher as pith gets further from the geometrical centre. Pith eccentricity was defined according to Lenz’s formula ([Lenz, 1954](#)), as:

$$E(\%) = \frac{e}{r} \times 100$$

where e is distance between the geometrical centre of the pith and geometrical centre of the stem section, and r is the mean radius of the stem cross-section (computed with 60 rays). Eccentricity was taken as positive if the geometric centre of the section was on the side of the upper face of the stem (for trees which were made to lean) or on the side where wood was stimulated under tension (for bent trees), and negative if the geometric centre was located on the side of the lower face (for trees which were made to lean) or on the side where wood was stimulated under compression (for bent trees).

Lignin assay

To evaluate lignin concentrations, wood sticks (50–60 × 3 × 2 mm in longitudinal (L), tangential (T) and radial (R) directions, respectively) were cut in the stretched, compressed and neutral zones of debarked portions of oven-dried (48 h at 104 °C) bent or unbent stems using a razor blade. Concentrations of total and soluble lignins were estimated by the sulphuric acid method ([Carrer et al., 2011](#)). These biochemical measurements were conducted at the INRA GENOBOIS Wood analysis technical platform (INRA Orleans, France).

Microfibril angle measurements

Wood strips (15 × 4 × 1 mm samples in the L, T and R directions, respectively) were sampled from debarked and oven-dried (48 h at 104 °C) portions of bent and unbent stems. The

microfibril angle (MFA) of crystalline cellulose was measured at the Xylosciences platform (INRA, Nancy, France). Average MFA was estimated using an X-ray diffractometer (Supernova, Oxford-Diffraction, Abingdon-on-Thames, UK). The Supernova system consists of a kappa geometry including a sample holder, CCD detector and X-ray tube, with a copper source. Samples were exposed to the X-ray beam for 2 × 60 s, and the 002 equatorial reflection was measured. The evaluation of MFA is extracted from the 002 arc intensity curve using the method given in [Verrill et al. \(2006\)](#), as:

$$\text{MFA} = 0.8 \times 0.6 \times (\sigma_1 + \sigma_2)$$

where σ_1 and σ_2 are the widths of the Gaussian fits of the diffraction curves.

Real-time quantitative RT-PCR experiments

Portions of unbent and bent stems were cut 72 h after the last bending, then debarked and immediately frozen in liquid nitrogen in order to avoid RNA degradation. Wood sticks (40 × 2 × 2 mm in the L, R and T directions, respectively) were sampled at the periphery of the wood cylinder in the stretched, compressed and neutral zones of the frozen portion of the stem using a razor blade. Total RNAs was extracted from the sticks using CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) extraction buffer as described in [Chang et al. \(1993\)](#), then treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). RNA was quantified spectrophotometrically using a NanoDrop apparatus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and quality checked by agarose gel electrophoresis. First-strand cDNA was synthesized from 4 µg of total RNAs using oligo(dT) and SuperScript III (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Reverse transcription-qPCR (RT-qPCR) amplifications were done on a StepOnePlus™ real-time PCR system using SYBR green as a fluorescent dye. Each PCR (15 µL) contained cDNA (3 µL of a 1:30 dilution of the first cDNA strands), Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Angers, France) (×1) and primers (10 µM each). After a heat step at 95 °C for 3 min, PCR cycling conditions were: 40 denaturation cycles (95 °C, 10 s), annealing [temperature according to primers (see [Supplementary Data Table S1](#)), 10 s], elongation (72 °C, 15 s), ending with a melt curve (0.5 °C increments each cycle from primer T_m to 95 °C). Transcripts of each studied gene and reference genes were amplified using the primers given in [Supplementary Data Table S1](#). The specificity of amplification was confirmed by determining the melt curves for the PCR products at the end of each run, and gel electrophoresis. An index corresponding to the expression of three reference genes (*UBQ*, *UP2* and *EF-1α*) was calculated. The relative gene expression of each gene transcript was calculated by comparison between the different zones of bent trees (stretched, neutral and compressed) and control plants, and normalizing to indexed expression using the delta-delta method mathematical model ([Pfaffl, 2001](#)). Statistical significance was determined using a Student’s *t*-test or Mann-Whitney U-test.

Statistical analysis

All measured and derived data were statistically analysed using R software (R Core Team, 2014). The Shapiro–Wilk test was used to test for normal distribution of the data. Analysis of variance (ANOVA) (on normally distributed data) or the Kruskal–Wallis test (non-normal data) was used to determine whether anatomical parameters were significantly different. In the case of significant differences between bent trees, trees made to lean and unbent trees, post-hoc analyses were based on the Tukey test (normally distributed data) or Dunn’s method.

RESULTS

Secondary growth is locally influenced by the absolute value of the longitudinal strains

To unravel the local effects of longitudinal strains triggered by stem bending on secondary growth, we measured the stem diameters of poplars submitted for 8 weeks to recurrent unidirectional bending. Diameters were measured in the direction of bending (D_{\parallel}) and in the perpendicular direction (D_{\perp}) where strains are at the maximum and minimum levels, respectively (Fig. 1). The mechanical treatments enhanced secondary growth in both D_{\parallel} and D_{\perp} . However, secondary growth was significantly much higher in D_{\parallel} than in D_{\perp} , resulting in a significant >12 % ovalization of the stem after the 8 weeks of mechanical stimulations (Table 1; Fig. 2). However, no pith eccentricity was observed in response to the bending treatments (Table 1), indicating that the increase of the radial growth was equal on the stretched and compressed sides. This shows that the level of strains locally influences secondary growth of poplar in response to multiple bending treatments (for each radial direction), but that the sign of the strain (compressed or stretched) has no influence. Thus, the stimulation of the secondary growth depends on the absolute value of the level of strain.

Compared with transient bending treatments, stem leaning led to stimulation of the radial growth in the plane of tilting similar to that observed in the stretched zone of the bent stems (+37 %). However, this stimulation was almost the same in the perpendicular direction, thus resulting in a much lower ovalization (6 vs. 12 %). Our results further confirmed the characteristic pith eccentricity observed during tension wood formation

TABLE 1. Morphological dimensions of stems after 8 weeks of mechanical stimulations

Morphological properties	Control	Bent	Leaning
Stem height (cm)	131.5 ± 2.2 ^a	127.8 ± 2.1 ^a	113.7 ± 4.2 ^b
Stem diameter D_{\parallel} (mm)	5.8 ± 0.2 ^a	8.0 ± 0.2 ^b	7.8 ± 0.6 ^b
Stem diameter D_{\perp} (mm)	5.8 ± 0.2 ^a	6.5 ± 0.2 ^a	7.1 ± 0.6 ^b
Ovalization (D_{\parallel}/D_{\perp})	1.01 ± 0.01 ^a	1.12 ± 0.01 ^c	1.06 ± 0.005 ^b
Pith eccentricity (%)	-0.4 ± 2.4 ^a	-4.8 ± 0.8 ^a	16.1 ± 3.7 ^b

Means (± s.e.) within each column with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA with a Tukey post-hoc test). $n = 10$ for control trees from two independent experiments; $n = 12$ for bent trees from two independent experiments; $n = 4$ for leaning trees.

(Jourez et al., 2001), with a higher radial growth rate in the side where tension wood has been produced.

Note that the bending treatments had no effect on longitudinal primary growth in our conditions, whereas the leaning treatment decreased poplar height by 13.2 % (113.7 ± 4.2 cm vs. 131.5 ± 2.2 cm in control trees).

Bending affects wood differentiation

The impact of multiple unidirectional bending treatments on wood differentiation was evaluated by assessing several anatomical traits in both compressed and stretched zones (Table 2; Fig. 3). Vessel frequency decreased by 19 % in bent stems compared with control trees. This decrease was observed in both stretched and compressed zones, i.e. the zones submitted to high levels of strains whatever the sign of the strain (Table 2). In trees made to lean, the opposite wood showed a decrease in vessel frequency similar to that observed in bent stems, whereas the tension wood showed a much greater reduction in vessel frequency. Vessel frequency in the tension wood was 3-fold lower compared with control trees and 2-fold lower compared with bent stems.

Mean vessel diameter was 38.02 ± 0.74 µm in control trees (Table 2). This value was similar in the neutral and compressed zones of bent stems and in the opposite wood of poplars made to lean. In contrast, in the stretched zone, mean vessel diameter was 8.2 % lower compared with control trees, and similar to vessel diameters observed in tension wood of trees made to lean.

Overall, these results showed that multiple bending treatments impact wood cell differentiation only in zones submitted to high levels of strains, but that contrary to what is observed for secondary growth, the absolute level of strains alone cannot account for this response. Indeed, vessel diameter was inhibited by tensile strains only.

In many – but not all – wood fibres in the stretched zone of bent stems, we observed the presence of a G-layer (Fig. 3). Surprisingly, the compressed and neutral zones of the stem were devoid of G-fibres (0.62 and 0.67 % of the fibres with a G-layer, respectively), whereas wood in control trees classically contains a small proportion (almost 2 %) of scattered G-fibres. In bent stems, the diameter of the fibres without a G-layer was 6 % higher in the compressed and stretched zones, whereas the diameter of fibres with a G-layer was 15 % higher than in control tree fibres. Mean diameter of fibres in the neutral zone and in poplars made to lean were similar to those of controls.

Mean S-layer thickness (cell wall layers, excluding the G-layer but including primary and S1–S2 layers) in control tree fibres was 1.15 ± 0.03 µm. In the compressed and stretched zones, the S-layer was 10 % thicker in fibres without a G-layer than in control trees (1.26 vs. 1.15 µm), whereas the neutral zone showed no change. This increase was similar to that observed in the opposite wood of stems made to lean. Fibres with a G-layer in the stretched zone of bent stems showed a strong decrease in S-layer thickness compared with control trees (0.79 vs. 1.15 µm). In trees made to lean, this decrease reached -43 % (0.65 vs. 1.15 µm). However, in poplars made

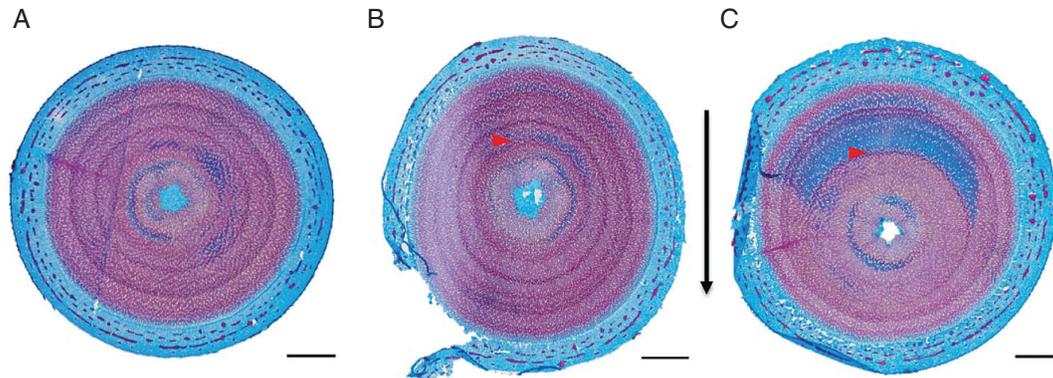


FIG. 2. Unidirectional bending treatments result in ovalization of the stem. Cross-section of *P. tremula* × *P. alba* without mechanical stimulation (A), after 8 weeks of bending treatment (B) and after being leant 35° from the vertical to induce tension wood (C). Staining: 1 % safranin–astro blue. The black arrow shows the direction of bending and red arrows show the position of the cambium at the beginning of the mechanical treatments (bending or leaning). Scale bar = 2 mm.

to lean, the total cell wall layer of fibres with a G-layer was thicker than in fibres with a G-layer in the stretched zone, due to the thicker G-layers in the tension wood compared with the stretched zone.

Effects of multiple bending treatments on wood cell wall ultrastructure and biochemical composition

In addition to variations in thickness, we checked for possible variations in cell wall ultrastructure by analysing MFA X-ray diffraction patterns. MFA was only impacted in the zones containing a significant proportion of fibres with a G-layer, i.e. the stretched zone of bent stems and the tension wood side of leaning stems. Mean MFA was $28 \pm 0.29^\circ$ in control trees but only $22 \pm 0.45^\circ$ in the stretched zone of bent stems and just $6 \pm 0.11^\circ$ in the tension wood side of leaning stems.

We measured the lignin contents in the stretched, neutral and compressed zones of bent trees. Whatever the zone considered, no significant difference between bent and control trees was found for quantity of Klason and soluble lignin (Table 3). Experimental problems deprived us of the measurements for the trees made to lean; but it is well established in the literature

that poplar tension wood contains less lignin than normal wood (Pilate *et al.*, 2004).

Transcriptional regulation of cell wall-related genes by multiple bending treatments

To gain a first molecular insight into how multiple bending treatments can modulate wood differentiation, we analysed the expression of genes known to be responsible for some of the anatomical features we observed (Fig. 4). The literature most often associates FLA with secondary cell wall formation. We tested two *FLA* genes, *PtaFLA14-9* (Potri.009G012100) and *POPFLA6* (Potri.013G151400), both known to be highly expressed in tension wood (Lafarguette *et al.*, 2004; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006). Both these genes were upregulated only in the stretched zone but were downregulated in the compressed zone where fibres are devoid of a G-layer.

In the stretched and compressed zones, fibres devoid of a G-layer had a thicker S-layer, mainly due to the presence of a thicker S2 layer. Given the role of *MYB69* in secondary cell wall thickening and *MAP70-5* in secondary cell wall patterning

TABLE 2. Anatomical features of wood in different zones of bent poplar stems (stretched, neutral and compressed) and leaning poplar stems (tension wood side and opposite wood side)

Anatomical properties	Control	Bent			Leaning	
		Stretched zone	Neutral zone	Compressed zone	Tension wood side	Opposite wood side
Vessel frequency (no. mm ⁻²)	187 ^a	151 ^b	176 ^a	151 ^b	68 ^c	136 ^b
Vessel diameter (µm)	38 ± 0.7 ^a	34 ± 0.6 ^b	37 ± 0.5 ^a	37 ± 0.6 ^a	36 ± 0.3 ^b	40 ± 0.6 ^a
Fibre diameter (µm)	13.9 ± 0.4 ^a	14.8 ± 0.4 ^b , 16 ± 0.3 (G) ^c	14.1 ± 0.3 ^{ab}	14.9 ± 0.4 ^b	15.5 ± 0.5 ^{bc}	13.4 ± 0.4 ^a
G-layer proportion	1.9 ± 0.5 ^a	18.6 ± 1.8 ^c	0.7 ± 0.1 ^b	0.6 ± 0.1 ^b	98.4 ± 0.4 ^d	1.5 ± 0.6 ^{ab}
S-layer thickness (µm)	1.1 ± 0.03 ^a	1.3 ± 0.05 ^b , 0.79 ± 0.03 (G) ^c	1.2 ± 0.02 ^a	1.3 ± 0.06 ^b	–	1.3 ± 0.03 ^b
G-layer thickness (µm)	–	1.16 ± 0.05 ^a	–	–	0.6 ± 0.03 (G) ^d	–
Microfibril angle (°)	28 ^a	23 ^b	27 ^a	27 ^a	2 ± 0.18 ^b	23 ^{ab}

(G) refers to fibres with a G-layer.

Means (± s.e.) within each column with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA or Kruskal–Wallis test with a Tukey or Dunn's post-hoc test). $n = 10$ for control trees from two independent experiments; $n = 12$ for bent trees from two independent experiments; $n = 4$ for leaning trees.

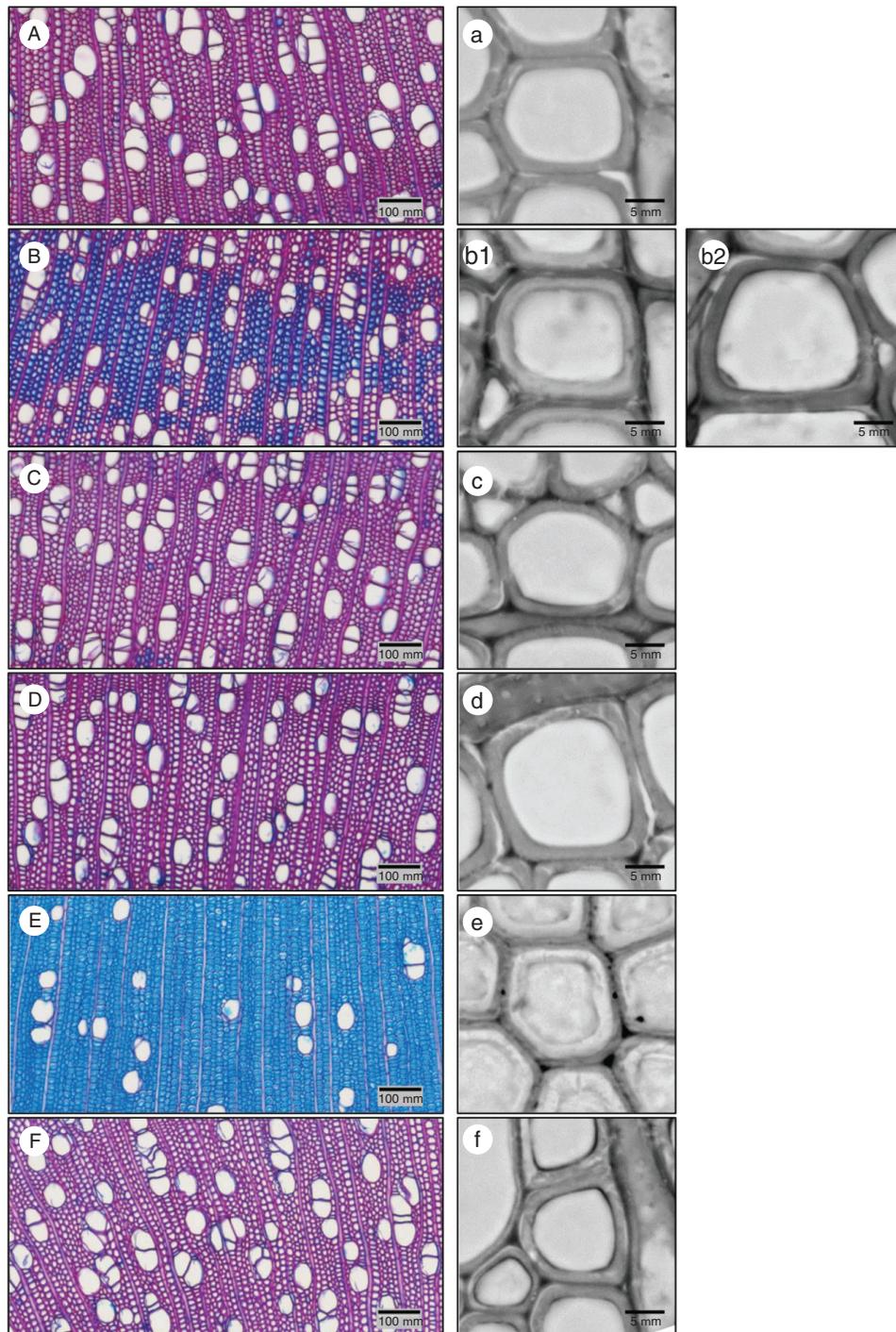


FIG. 3. Unidirectional bending treatments lead to asymmetric wood formation in the stretched zones and the compressed zones. Anatomy details of *P. tremula* × *P. alba* without mechanical stimulation (A), after 8 weeks of mechanical stimulations (B–D) and after leaning (E, F). (B) Stretched zone; (C) compressed zone; (D) neutral zone; (E) tension wood; (F) opposite wood. (a–f) details of the cell wall fibres in wood of (a) a control tree; (b1–b2) the stretched zone of a bent tree with (b1) or without (b2) a G-layer; (c) the compressed zone of a bent tree; (d) the neutral zone of a bent tree; (e) tension wood; (f) opposite wood. (A–F) Samples were collected and embedded in PEG, then cross-sections were stained with 1 % safranin–astra blue. (a–f) Samples were collected and embedded in LR white resin, then stained with toluidine blue.

in arabidopsis (Zhong *et al.*, 2008; Pesquet *et al.*, 2010), we analysed the expression of their poplar orthologues *PtaMYB69* (Potri.007G106100) and *PtaMAP70-5* (Potri.006G018000) in zones submitted to contrasting levels of strain in the bent stems. Both these genes were expressed at a 3- to 4-fold higher level in

the compressed zone than in the neutral zone. They were also overexpressed in the stretched zone, but slightly less than in the compressed zone. For the four genes studied here, expression levels in the neutral zone were comparable with levels observed in controls (Fig. 4).

TABLE 3. Lignin content in the wood of control trees and in different zones (stretched, neutral and compressed) of bent poplar stems as a percentage of dry matter

Biochemical composition	Control	Bent		
		Stretched	Neutral	Compressed
% Klason lignin	16.4 ± 0.6 ^a	17.3 ± 1.3 ^a	17.1 ± 0.9 ^a	15.8 ± 2.1 ^a
% Total lignin	21.4 ± 0.7 ^a	22.0 ± 1.0 ^a	21.8 ± 0.7 ^a	21.3 ± 1.4 ^a

Means (± s.e.) within each column with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Kruskal–Wallis test). $n = 6$ for control trees; $n = 6$ for bent trees.

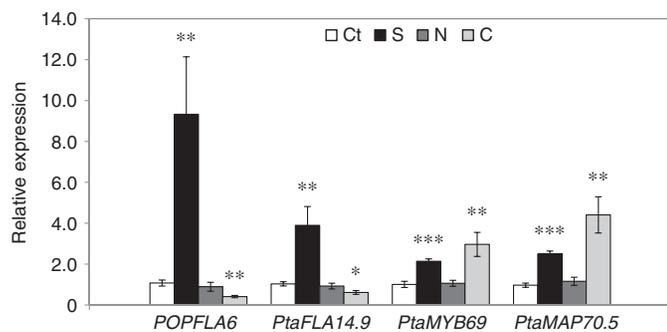


FIG. 4. Expression levels of four cell wall-related genes (*POPFLA6*, *PtaFLA14.9*, *PtaMYB69* and *PtaMAP70.5*) in wood tissue submitted to different types of strain. Gene expression was measured by real-time quantitative PCR in three regions of bent stems: the wood formed in the stretched zone (S), in the compressed zone (C) and in the neutral zone (N). Relative transcript abundance was determined by comparison with the gene expression levels in unbent control poplars (Ct) using *UBQ*, *UP2* and *EF1- α* transcript abundances as reference. Values are means of ten individual trees from two independent experiments (2015 and 2016). Bars represent the s.e. Statistically significant differences (Student's *t*-test or Mann–Whitney U-test) between wood from control poplars and wood from the different zones of bent poplars: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

Tree radial growth is locally influenced by the intensity of strains

A study by Telewski (1989) on *Abies fraseri* showed that the radial growth response to an uncontrolled bidirectional flexure stimulus (in a single plane) followed the plane symmetry of the bending, resulting in an ovalized stem cross-section where the radius of greatest growth was along the direction of the flexure. Here, the controlled intensity of the strains applied and the measurement of stem diameter parallel and perpendicular to the direction of bending revealed that, like in *A. fraseri*, the secondary growth of poplar stem is stimulated in all directions but is much higher in the direction of the bending than in the perpendicular direction, thus resulting in significant ovalization. We also showed that the increment in wood production is similar between the stretched zone and the compressed zone.

These results fit with our hypothesis that radial growth is controlled by the local level of strains. Ovalization is produced through increased radial growth along the radii experiencing higher strain stimuli.

Wood differentiation could be sensitive to bending in angiosperms

In gymnosperms, only a few studies have addressed the effect of multiple stem bending treatments on wood formation and differentiation, and data in angiosperms are even more scarce. The study conducted here on poplar showed that the bending stimulation influenced at least four major processes of wood differentiation: vessel frequency, vessel size, the fate of fibres and secondary cell wall thickening.

Vessel frequency and vessel size. We showed that whereas vessel size is decreased in the stretched zone only, vessel frequency is decreased in both the compressed zone and the stretched zones. Thus, similarly to observations for secondary growth, vessel frequency seems to be influenced by the intensity of the strains. *Liquidambar styraciflua* exposed to a daily 30 s long shaking stimulus produced vessel elements with smaller diameters compared with untreated trees (Neel and Harris, 1971). In poplar, Kern *et al.* (2005) reported a significant reduction of vessel lumen area (22–38 % depending on the clones chosen), vessel diameter (19–49 % depending on the clones) and vessel frequency (10–20 %) in response to a bidirectional flexure treatment. Here, the values for reduction in vessel frequencies (–19 % in the stretched and compressed zones) are in the same range, whereas the effect on vessel diameter (–8.2 % in the stretched zone only) was milder. Revisiting Kern's results, we roughly estimated the intensity of the strain they applied to their poplar stems. Interestingly, the values we found for their experiments were of the same order of magnitude as our stimulations ($\epsilon = 0.7$ % vs. $\epsilon = 1$ %, respectively). However, the higher frequency of the stimulations during Kern's experiments could explain the higher impact of their treatment on vessel diameter. This hypothesis suggests that the response could be linked to the dose experienced by the plant, which is a combination of strain intensity and stimulation frequency.

Fibre fate. While the study on poplar by Kern *et al.* (2005) showed no clear increase in the formation of fibres containing a G-layer, we observed two distinct zones: the stretched zone that showed 20–30 % of fibres containing a G-layer, and the compressed zone that showed almost no fibres containing a G-layer (and much less than in wood of control trees). One explanation for the difference between the results of Kern *et al.* (2005) and this study could lie in the bidirectional nature of the bending treatments applied by Kern *et al.* (2005). We hypothesize that the observed lack of a G-layer in the compressed zones could be due to compressive strains switching off the G-layer-producing machinery whereas tension strains would switch it on. According to this hypothesis, by applying 20 flexures back and forth to an angle of almost 45 ° to stem tissues, Kern *et al.* may have switched this G-layer production alternatively between on and off, ultimately leading to a wood that showed quite normal proportions of fibres with a G-layer.

Cell wall thickening. In the conifer *A. fraseri*, the tracheids formed under the influence of repeated bidirectional flexures exhibited thickened secondary cell walls (Telewski, 1989). Here we measured the S-layer thickness and the proportion of fibres containing a G-layer. S-layer thicknesses of fibres devoid of a G-layer were increased compared with control trees, and the increase was similar between the compressed and the stretched zones. This result can be linked to the upregulation of

the *PtaMYB69* gene in these two zones, since *MYB69* is known to be involved in secondary cell wall thickening (Zhong *et al.*, 2008). Our anatomical investigations also revealed that only the stretched zone accumulates a high amount of fibres possessing a G-layer.

Wood produced in the stretched zone shares some similarities with tension wood produced under gravitational stimulation

In *Populus*, tension wood is characterized by eccentric growth, reduced vessel frequency and diameter, and a high proportion of fibres containing a G-layer (Jourez *et al.*, 2001; Mellerowicz and Gorshkova, 2012). We found all these features except eccentric growth in *Populus* wood formed under tensile strains [tensile flexure wood (TFW)]. The reduction in vessel diameter was identical between tension wood and the wood formed in the stretched zone, but the fibres containing a G-layer presented some differences. The wood formed in the stretched zone has a thinner S-layer than normal wood but was thicker and had a thinner G-layer than tension wood. The presence of a G-layer in the stretched zone was accompanied by a reduction of mean MFA in the cell walls as measured by X-ray diffraction. However, this reduction was far less significant than in tension wood, where the mean G-layer MFA approached zero (6° in this study). X-ray diffraction sums up the signal over a volume of wood. Since wood formed under tensile strains contains only 20–30 % of fibres containing a G-layer, the X-ray diffraction signal results from an average of the signals produced by fibres with and fibres without a G-layer. Moreover, the G-layer is much thinner in TFW than in tension wood, thus reducing the weight of the G-layer MFA in the mean MFA value. This makes it a tricky exercise to compare the mean MFA of fibres in wood formed in the stretched zone against mean MFA in tension wood. Our anatomical observations of TFW suggest that G-layer production was induced but then stopped because the stimulus was only transient. This could explain the low proportion of G-layer fibres compared with tension wood (that typically contains 100 % G-layer fibres), the low thickness of the G-layers and the low impact of the transient stimulus on mean MFA. However, in both cases, the presence of a G-layer decreases the mean MFA compared with normal wood in the control trees or in the neutral zone of bent stems. Several studies have helped establish that very high abundances of *FLA*-encoding gene transcripts is another characteristic of tension wood (Lafarguette *et al.*, 2004; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006; Azri *et al.*, 2014; Gertula *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Here we analysed the localized expression of *FLA*-encoding genes: *POPFLA6*, which is now considered a marker gene for tension wood, and *PtaFLA14-9*, which has been less studied but was shown to be highly upregulated after a single stem bending in poplar (Pomiès *et al.*, 2017). Our qPCR approach revealed that these two genes were upregulated in the stretched zone, where fibres with a G-layer accumulated, but downregulated in the compressed zone, where almost all fibres were devoid of a G-layer. Moreover, the two *FLA* genes were similarly expressed in the neutral zones and in control trees.

Interestingly, the upregulated *FLA* gene expression observed in the stretched zone is much more moderate than that in tension wood, which also raises the question of whether there is

a quantitative link between the expression of *FLA* genes and the proportion of wood fibres developing a G-layer or G-layer thickness.

Responses to unidirectional bending treatments indicates a dual control of cell growth and differentiation by the mechanical stimuli

The aggregate summary of all the responses discussed above demonstrates a striking duality in the responses to repeated compressive or tensile strains. Radial growth, vessel frequency and S-layer thickness of fibres are affected by bending treatments in the same way in both the stretched and the compressed zones, whereas the decrease in vessel diameter and the accumulation of fibres containing a G-layer are specific to the stretched zone. Hence, since only the deformed tissues seem to respond to unidirectional bending treatments, the modulations of radial growth, vessel frequencies and S-layer thicknesses of fibres suggest that they may be driven by the perception of the local absolute value of the longitudinal strain (as proposed by the S³m model for radial growth). However, since the decrease in vessel diameter and the accumulation of fibres containing a G-layer are specific to the stretched zone, the absolute value of strains does not explain the whole set of observed responses. When a stem is transiently bent, it is also briefly inclined. Resemblances between tension wood and the wood produced in the stretched zone naturally lead to questions about the perception of the bending signal. Our results bring two hypotheses: (1) the expansion step of vessel development and the maturation step of fibre development could be responsive to the sign of the longitudinal strains (tension vs. compression); and (2) gravistimulation produced by very short (<5 s) inclination could be perceived by poplar tissue and lead to the formation of some kind of aborted tension wood. For our experimental set-up, we chose a very short bending time (<5 s) expressly to keep the graviresponse to a minimum. There is no evidence in the literature that such short gravistimulations could trigger any response in poplar stems. In the roots and floral stem of arabidopsis, Saito *et al.* (2005) showed that displacement of the mechanosensitive structures, i.e. statoliths, is tiny with <1 min of gravistimulation, and these movements are observed for a very small proportion of the statoliths in the statoliths pile. Moreover, Pouliquen *et al.* (2017) suggested that gravitropic perception might not depend on the displacement of individual statoliths but rather on the displacement of the whole pile of statoliths. We observed that the proportion of fibres containing a G-layer seems to be linked to the strain gradient (the G-layer did not accumulate around the neutral line) and that *FLA* gene expression did not increase around the neutral line. Our data, combined with the above-mentioned reports, suggest that the hypothesis of the sensitivity of wood formation to the sign of the deformation is the most probable one. To discriminate the two hypotheses clearly, one would need to decorrelate gravity and curvature. This could be achieved by repeatedly bending the bottom root-bearing part of the stem, as realized by Coutand *et al.* (2009).

There is clearly now a need for further studies on the mechanisms involved in the mechanobiological control and channeling of wood cell differentiation. In the context of the hypothesis of the sensitivity of wood differentiation to strains, our work

highlighted the existence of a duality in the mechanosensitive responses with the probable involvement of at least two different structures: one perceiving or transducing the absolute value of strains, and another perceiving or transducing the strains, including the sign. In plants, two main types of sensory systems have been described for mechanosensing (for a review, see [Monshausen and Haswell, 2013](#)). The first type of perception system involves mechanosensitive ion channels [such as the mechanosensitive channel of small conductance (MscS) or the Mid1-complementing activity protein (MCA)] at the cell membranes. Their activation could be due to the modification of their conformation along with the membrane deformation. The second type of perception system relies on mechanosensitive wall-associated transmembrane proteins such as receptor-like kinases ([Monshausen and Haswell, 2013](#)). As these proteins have extracellular domains enabling them to attach to the cell wall, their deformation is directly linked to cell wall stresses ([Moulija et al., 2015](#)); and, as the wall is highly anisotropic, we can expect an effect of strain and stress directions on the downstream signalling pathways.

Refining the flexure wood terminology

The hypothesis of a sensitivity of poplar wood formation to the sign of strains leads to the idea that the term ‘flexure wood’ is insufficient to account for the diversity of wood anatomies observed when bending is applied to stems. A refined terminology is clearly needed. Bending stimulations always simultaneously involve longitudinal compression or longitudinal tension in different parts of the stem. We suggest distinguishing three types of wood formed by mechanical stimulations: (1) wood formed under tension only (which we would name ‘tensile flexure wood’, or TFW); (2) wood formed under compression only (which we would name ‘compressive flexure wood’, or CFW); and (3) wood formed under alternating compression and tension, which could keep the name ‘flexure wood’ as already proposed by [Telewski \(1989\)](#).

Conclusion

Trees have the ability to modify their growth and tissue differentiation in response to mechanical stimuli. Here we show that secondary growth responds locally to intensity of the strains. This study marks the first in-depth anatomical analysis of the wood produced in response to different levels and sign of strains. It emerged that some aspects of wood differentiation are modulated by strains in absolute value (vessel frequency and diameter of fibres without a G-layer) whereas others could be modulated by the sign of strains (vessel diameter, G-layer formation, diameter of fibres with a G-layer, wood microfibril angle and expression of fasciclin-encoding genes). For the first time, we establish links between the cell wall modifications observed in response to multiple bending treatments and the expression of genes known to play a role in cell wall formation. Our evidence points to the potential existence of two distinct perceptual mechanisms: one perceiving the intensity of strains, and another for discriminating the appropriate response on both sides of the neutral line frontier. Further research is

warranted to identify the cellular components behind these perceptual abilities.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <https://academic.oup.com/aob> and consist of the following. Figure S1: binarized image of a transverse cross-section of *P. tremula* × *P. alba* stem wood for vessel dimension measurements (A) and transverse cross-section of the stretched zone in bent trees (B). Table S1: table of gene models.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Christelle Boisselet, Patrice Chaleil, Aline Faure, Jérôme Franchel, Brigitte Girard, Stéphane Ploquin and Caroline Savel (UMR UCA-INRA PIAF) for technical help, and Annabelle Déjardin and Gilles Pilate (UMR INRA AGPF) for constructive discussions and suggestions. This work was supported by grants from the Auvergne Regional Council (‘Programme Nouveau Chercheur de la Région Auvergne-2014’).

LITERATURE CITED

- Abedini R, Clair B, Pourtahmasi K, Laurans F, Arnould O. 2015.** Cell wall thickening in developing tension wood of artificially bent poplar trees. *IAWA Journal* **36**: 44–57.
- Almérás T, Clair B. 2016.** Critical review on the mechanisms of maturation stress generation in trees. *Journal of The Royal Society Interface* **13**: 20160550.
- Andersson-Gunnerås S, Mellerowicz EJ, Love J, et al. 2006.** Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *The Plant Journal* **45**: 144–165.
- Azri W, Chambon C, Herbette S, et al. 2009.** Proteome analysis of apical and basal regions of poplar stems under gravitropic stimulation. *Physiologia Plantarum* **136**: 193–208.
- Azri W, Ennajah A, Nasr Z, Woo S-Y, Khaldi A. 2014.** Transcriptome profiling the basal region of poplar stems during the early gravitropic response. *Biologia Plantarum* **58**: 55–63.
- Bastien R, Bohr T, Moulija B, Douady S. 2013.** Unifying model of shoot gravitropism reveals proprioception as a central feature of posture control in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **110**: 755–760.
- Bonnesoeur V, Constant T, Moulija B, Fournier M. 2016.** Forest trees filter chronic wind-signals to acclimate to high winds. *New Phytologist* **210**: 850–860.
- Bornand M, Dejou J, Servant J. 1975.** Les Terres noires de Limagne; leurs différents faciès et leur place dans la classification française des sols. *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences Série D* **281**: 1689–1692.
- Carrier M, Loppinet-Serani A, Denux D, et al. 2011.** Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass Bioenergy* **35**: 298–307.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993.** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113–116.
- Coutand C, Fournier M, Moulija 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, Dupraz C, Jaouen G, Ploquin S, Adam B. 2008.** Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: demonstration with young *Prunus avium* trees. *Annals of Botany* **101**: 1421–1432.
- Coutand C, Martin L, Leblanc-Fournier N, Decourteix M, Julien J-L, Moulija B. 2009.** Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and PtaZFP2 gene expression in poplar. *Plant Physiology* **151**: 223–232.

- Dadswell HE, Wardrop AB. 1955. The structure and properties of tension wood. *Holzforschung* 9: 97–104.
- Fournier M, Moulia B, Stokes A, Coutand C, Fourcaud T. 2006. Tree biomechanics and growth strategies in the context of forest functional ecology. In: Herrel A, Rowe N, Speck T, eds. *Ecology and biomechanics*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1–33.
- Gardiner B, Barnett J, Saranpää P, Gril J, eds. 2014. *The biology of reaction wood*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Gerttula S, Zinkgraf M, Muday GK, et al. 2015. Transcriptional and hormonal regulation of gravitropism of woody stems in *Populus*. *The Plant Cell* 27: 2800–2813.
- Groover A. 2016. Gravitropisms and reaction woods of forest trees – evolution, functions and mechanisms. *New Phytologist* 211: 790–802.
- Hellgren JM. 2004. Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiology* 135: 212–220.
- Jaffe MJ. 1973. Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* 114: 143–157.
- 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'). *Annals of Forest Science* 60: 31–41.
- 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 Journal* 22: 133–157.
- Kern KA, Ewers FW, Telewski FW, Koehler L. 2005. Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiology* 25: 1243–1251.
- Lafarguette F, Lepié J-C, Déjardin A, et al. 2004. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* 164: 107–121.
- Lenz O. 1954. *Le bois de quelques peupliers de culture en Suisse*. PhD Thesis, l'Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 61: 2403–2412.
- Mellerowicz EJ, Gorshkova TA. 2012. Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and composition. *Journal of Experimental Botany* 63: 551–565.
- Mellerowicz E, Sundberg B. 2008. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 293–300.
- Monshausen GB, Haswell ES. 2013. A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *Journal of Experimental Botany* 64: 4663–4680.
- Mouliat B, Coutand C, Julien J-L. 2015. Mechanosensitive control of plant growth: bearing the load, sensing, transducing, and responding. *Frontiers in Plant Science* 6: 52. doi: 10.3389/fpls.2015.00052.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Neel PL, Harris RW. 1971. Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in *Liquidambar*. *Science* 173: 58–59.
- Pesquet E, Korolev AV, Calder G, Lloyd CW. 2010. The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in *Arabidopsis* wood cells. *Current Biology* 20: 744–749.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Pilate G, Chabbert B, Cathala B, et al. 2004. Lignification and tension wood. *Comptes Rendus Biologies* 327: 889–901.
- Pomiès L, Decourteix M, Franchel J, Mouliat B, Leblanc-Fournier N. 2017. Poplar stem transcriptome is massively remodelled in response to single or repeated mechanical stimuli. *BMC Genomics* 18: 300. doi: 10.1186/s12864-017-3670-1.
- Pouliquen O, Forterre Y, Bérut A, et al. 2017. A new scenario for gravity detection in plants: the position sensor hypothesis. *Physical Biology* 14: 35005.
- R Core Team. 2014. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Ruelle J. 2014. Morphology, anatomy and ultrastructure of reaction wood. In: Gardiner B, Barnett J, Saranpää P, Gril J, eds. *The biology of reaction wood*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 13–35.
- Saito C, Morita MT, Kato T, Tasaka M. 2005. Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *The Plant Cell* 17: 548–558.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675.
- Scurfield G. 1973. Reaction wood: its structure and function: lignification may generate the force active in restoring the trunks of leaning trees to the vertical. *Science* 179: 647–655.
- Telewski FW. 1989. Structure and function of flexure wood in *Abies fraseri*. *Tree Physiology* 5: 113–121.
- Telewski FW. 2012. Is windswept tree growth negative thigmotropism? *Plant Science* 184: 20–28.
- Telewski FW. 2016. Flexure wood: mechanical stress induced secondary xylem formation. In: Kim YS, Funada R, Singh AP, eds. *Secondary xylem biology. Origins, functions, and applications*. Elsevier, 73–91.
- Telewski FW, Jaffe MJ. 1986. Thigmomorphogenesis: anatomical, morphological and mechanical analysis of genetically different sibs of *Pinus taeda* in response to mechanical perturbation. *Physiologia Plantarum* 66: 219–226.
- Telewski FW, Pruyn ML. 1998. Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* 18: 65–68.
- Tocquard K, Lopez D, Decourteix M, et al. 2014. The molecular mechanisms of reaction wood induction. In: Gardiner B, Barnett J, Saranpää P, Gril J, eds. *The biology of reaction wood*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 107–138.
- Verrill SP, Kretschmann DE, Herian VL. 2006. *JMFA2 – a graphically interactive Java program that fits microfibril angle X-ray diffraction data*. Research Paper FPL-RP-635. Madison, WI: US Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- Wang H, Jin Y, Wang C, et al. 2017. Fasciclin-like arabinogalactan proteins, PtFLAs, play important roles in GA-mediated tension wood formation in *Populus*. *Scientific Reports* 7: 6182. doi: 10.1038/s41598-017-06473-9.
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye Z-H. 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 2763–2782.

***CHAPITRE II : Effet du régime de
flexions sur la production du bois de
flexion***

Dans le chapitre précédent, il est décrit que l'application de 3 flexions par semaine pendant 2 mois entraîne des modifications de la croissance secondaire de l'arbre, de l'anatomie du bois formé ainsi que de l'expression de gènes impliqués dans la formation du bois. Ces modifications morphologiques et anatomiques semblent être contrôlées par deux systèmes de perception distincts : d'une part certaines caractéristiques anatomiques semblent être modulées uniquement en fonction de l'intensité des déformations en valeur absolue, comme par exemple la fréquence des vaisseaux (du côté tendu et du côté comprimé) ou l'épaisseur des parois des fibres, tandis que d'autres semblent être modulées en fonction du signe de la déformation, comme le diamètre des vaisseaux (du côté tendu) et la présence de couche G à l'intérieur des fibres.

L'étude de Telewski et Pruyn (1998) montre qu'il n'y a aucune différence significative entre la croissance en diamètre des arbres fléchis 5 fois par jour et ceux fléchis 80 fois par jour. Cependant, aucune étude n'a testé l'impact du nombre de flexions sur l'anatomie du bois, et en particulier dans le cadre de flexions unidirectionnelles et d'intensité contrôlée. Quels vont être alors les effets du nombre de flexions sur l'anatomie du bois et sur les réponses moléculaires associées ?

Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'ajouter au traitement « une flexion par jour » du chapitre I, un nouveau lot d'arbres sur lesquels nous avons appliqué 3 flexions par jour pendant 5 cinq jours sur nos arbres *P. tremula* x *P. alba*. Les 3 flexions quotidiennes ont été effectuées toutes les 3h (9h-12h-15h) pendant 8 semaines. Cette expérience a également été effectuée sur deux années consécutives (période de mai à juillet 2015 et 2016) et comporte un total de $n = 12$ arbres fléchis. Par souci de clarté, ce régime de flexion ainsi que les arbres ayant subi ce traitement seront regroupés respectivement sous le nom de « régime 3F » et « arbres 3F ». Hormis cette différence de régime, le matériel et méthodes de ce chapitre est identique à celui du chapitre I.

Dans ce deuxième chapitre, nous avons comparé l'anatomie du bois et les réponses moléculaires entre les arbres 3F et les arbres fléchis présentés dans le chapitre I, à savoir les arbres ayant subi un régime de flexion d'une flexion par jour pendant 3 jours, qui seront regroupés sous le nom de « arbres 1F » et « régime 1F ». La discussion portera sur les différences observées entre les deux traitements en fin d'expérimentation, c'est-à-dire après 8 semaines de flexions.

Tableau 1: Réponses de croissance des arbres 1F et 3F.

Propriétés morphologiques	Témoins	1F	3F
ΔH (cm)	131.5 ± 6.9^a	127.8 ± 7.1^a	124.7 ± 6.4^a
$\Delta D_{//}$ (mm)	5.8 ± 0.7^a	8.0 ± 0.9^b	9.2 ± 0.8^c
ΔD_{\perp} (mm)	5.8 ± 0.6^a	6.5 ± 0.7^a	7.2 ± 0.5^b
Ratio $\Delta H:\Delta D_{//}$	22.8 ± 2.8^a	16.2 ± 1.9^b	13.7 ± 1.4^c
Ovalisation ($D_{//}/D_{\perp}$)	1.01 ± 0.02^a	1.12 ± 0.02^b	1.14 ± 0.04^b

Moyenne \pm sd (écart-type) dans chaque colonne, avec $n = 10$ arbres témoins, $n = 12$ arbres 1F et $n = 12$ arbres 3F. ΔH : accroissement en hauteur ; $\Delta D_{//}$ et ΔD_{\perp} : accroissement en diamètre dans le sens parallèle et perpendiculaire à la flexion. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

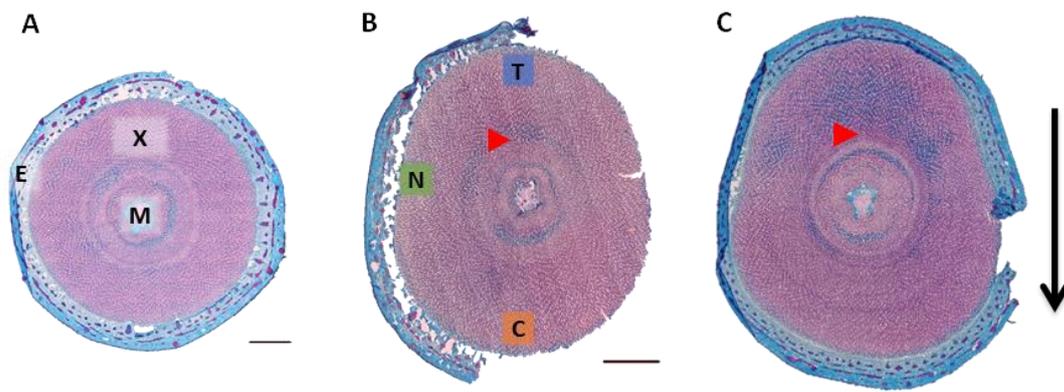


Figure 31 : Coupes transversales représentatives des peupliers *P. tremula* x *P. alba* sans stimulation mécanique (A) et après 8 semaines de flexions selon les régimes 1F (B) ou 3F (C).

La flèche noire indique le sens de flexion et les rouges la position du cambium au début des stimulations mécaniques. Les zones subissant différentes déformations sont indiquées par des rectangles : zone en tension (T) ; zone neutre (N) ; zone en compression (C). E : écorce ; X : xylème ; M : moelle. Coloration : Bleu-Astra safranine. Echelle = 2 mm.

I. Réponses morphologiques

Dans nos expérimentations, les arbres ayant subi les régimes 1F ou 3F ne présentent pas de diminution significative de la croissance en hauteur après 2 mois de stimulation mécanique (Tableau 1). Une augmentation significative du diamètre dans le sens de la flexion ($D_{//}$) des arbres 3F est observée par rapport aux arbres témoins et aux arbres 1F ($D_{//}=9,2$ mm contre 8,0 mm pour les arbres 1F) (Tableau 1 ; Figure 31). Les arbres 3F présentent également un diamètre perpendiculaire à la flexion (D_{\perp}) significativement plus important que celui mesuré chez les arbres 1F. L'ovalisation de la tige n'est de ce fait pas modifiée entre les régimes de flexion 1F et 3F, avec une ovalisation de 1,12 pour les arbres 1F et de 1,14 pour les arbres 3F. L'effet thigmomorphogénétique global, représenté par le ratio $\Delta H:\Delta D$ (ratio entre l'accroissement en hauteur de la tige et l'accroissement en diamètre dans le sens de la flexion) est plus important chez les arbres du traitement 3F ($\Delta H:\Delta D = 13,7$) que celui mesuré suite au traitement 1F ($\Delta H:\Delta D = 16,2$) (plus le ratio $\Delta H:\Delta D$ diminue, plus l'effet thigmomorphogénétique augmente).

L'augmentation du nombre hebdomadaire de flexions du régime 3F a stimulé plus fortement la croissance en diamètre, il y a donc eu un effet dose des déformations sur la croissance radiale. En revanche, il n'y a pas eu d'effet sur la croissance en hauteur et sur l'ovalisation finale de la tige.

II. Réponses anatomiques

Pour déterminer si l'augmentation du nombre hebdomadaire de flexions entraîne des modifications de l'anatomie du bois plus importantes, nous avons analysé et comparé l'anatomie des zones tendue, neutre et comprimée des arbres 1F et 3F (Tableau 2 ; Figure 32). Le régime 3F entraîne une diminution de la fréquence des vaisseaux dans les zones tendue et comprimée par rapport aux arbres témoins, mais qui n'est pas significativement différente de celle observée dans le cadre du régime 1F. Les stimulations mécaniques n'ont eu en revanche aucun effet sur le nombre de vaisseaux situés dans la zone neutre. Chez les arbres 3F, le diamètre des vaisseaux est significativement diminué dans la zone tendue par rapport aux arbres témoins, avec un diamètre de 35 μm pour les arbres 3F et de 38 μm pour les arbres témoins, et aucune différence significative n'est détectée avec le régime de flexion 1F (34 μm).

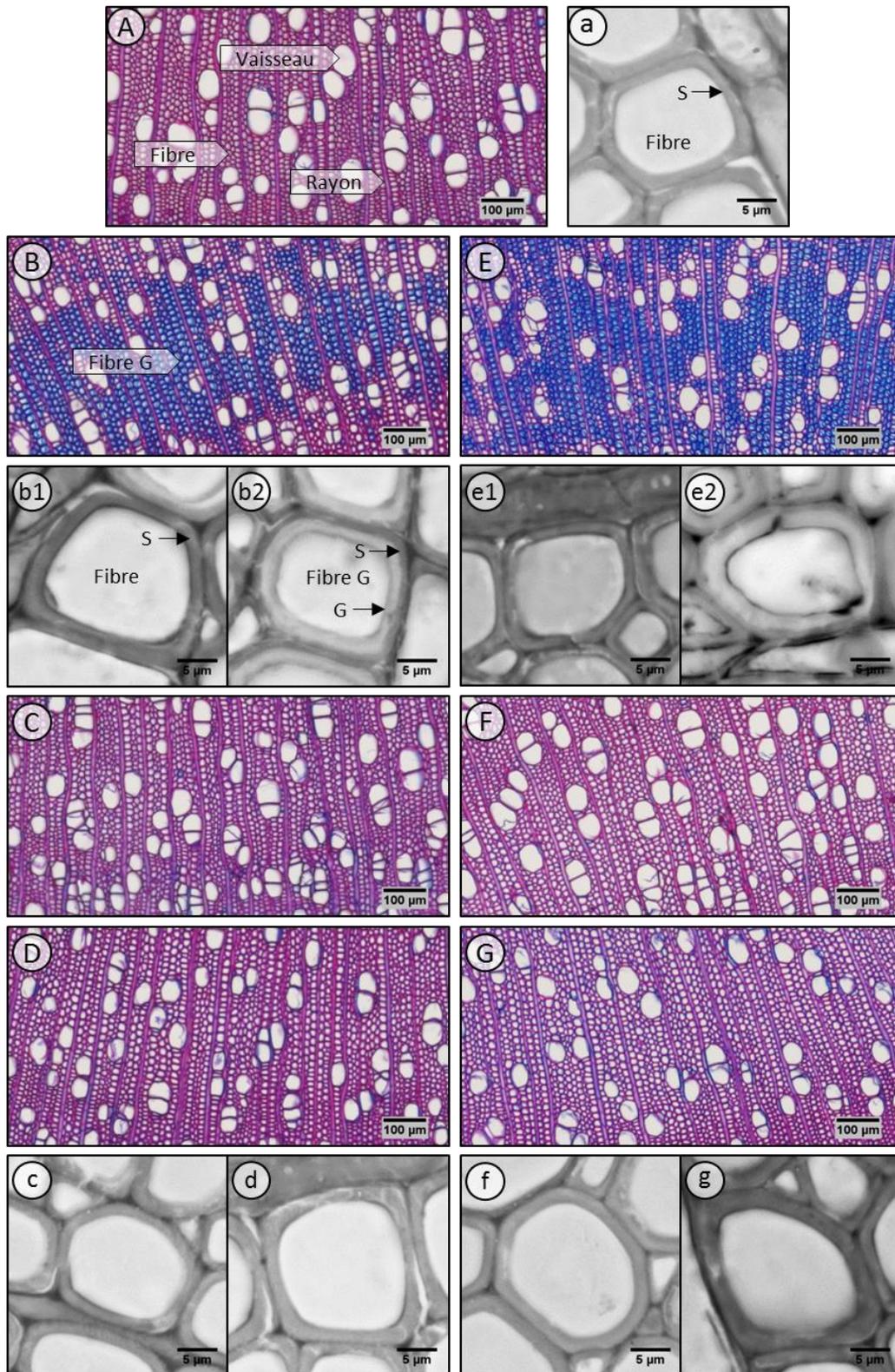


Figure 32 : Coupes transversales du xylème des arbres 1F et 3F, et des arbres non fléchis.

A à G : coupes transversales de bois inclus en PEG, colorées au bleu-Astra safranine pour la mesure du diamètre et du nombre de vaisseaux ; a à g : coupes transversales de bois inclus en résine, colorées au bleu de toluidine pour la mesure du diamètre des fibres, de l'épaisseur de la paroi (S) et de la couche G (cG). A et a : arbre témoin. B à D : arbre soumis au régime 1F ; E à G : arbre soumis au régime 3F. B et E : zone tendue, le bleu représente la couche G à l'intérieur des fibres ; b1 et e1 : fibres dans la zone tendue sans couche G ; b2 et e2 : fibres dans la zone tendue avec couche G ; C (c) et F (f) : zone neutre ; D (d) et G (g) : zone comprimée.

Tableau 2: Mesures anatomiques dans différentes zones de la section des tiges des arbres 1F et 3F.

Propriétés anatomiques	Témoins	1F			3F		
		Zone en tension	Zone neutre	Zone en compression	Zone en tension	Zone neutre	Zone en compression
Fréquence des vaisseaux (No./mm ²)	187 ^a	151 ^{bc}	176 ^a	151 ^{bc}	134 ^c	162 ^{ab}	140 ^c
Diamètre des vaisseaux (µm)	38 ± 0.7 ^a	34 ± 0.6 ^b	37 ± 0.5 ^a	37 ± 0.6 ^a	35 ± 0.6 ^b	39 ± 0.3 ^a	38 ± 0.7 ^a
Diamètre des fibres (µm)	13.9 ± 0.4 ^a	14.8 ± 0.4 ^{bc} 16 ± 0.3 (G) ^d	14.1 ± 0.3 ^{ab}	14.9 ± 0.4 ^{bc}	14.9 ± 0.3 ^{bc} 16.3 ± 0.5 (G) ^d	14.5 ± 0.3 ^{ab}	15.4 ± 0.3 ^{cd}
Proportion de couche G	1.9 ± 0.5 ^a	18.6 ± 1.8 ^c	0.7 ± 0.1 ^b	0.6 ± 0.1 ^b	31.9 ± 2.5 ^d	0.9 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.2 ^b
Épaisseur de paroi (µm)	1.1 ± 0.03 ^a	1.3 ± 0.05 ^{cd} 0.79 ± 0.03 (G) ^f	1.2 ± 0.02 ^{ab}	1.3 ± 0.06 ^{cd}	1.3 ± 0.03 ^d 0.77 ± 0.04 (G) ^f	1.2 ± 0.05 ^{bc}	1.4 ± 0.03 ^e
Épaisseur de couche G (µm)	-	1.16 ± 0.05 ^a	-	-	1.54 ± 0.08 ^b	-	-
Angle des microfibrilles (°)	28 ^a	23 ^b	27 ^a	27 ^a	22 ^b	27 ^a	28 ^a

(G) fait référence aux fibres présentant de la couche G. Moyenne ± se (erreur standard) dans chaque colonne avec $n = 10$ pour les arbres témoins ; $n = 12$ pour les arbres 1F ; $n = 12$ pour les arbres 3F. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Au niveau de la différenciation des fibres, on note quelques différences entre les deux régimes de flexion. Les fibres des arbres 1F ont un diamètre significativement augmenté dans les trois zones observées (zone en tension, zone neutre et zone en compression) par rapport aux arbres témoins, avec une augmentation plus importante du diamètre des fibres présentant une couche G. On retrouve sensiblement le même type de réponses chez les arbres 3F, cependant la zone comprimée des arbres 3F présente des fibres de diamètre plus important par rapport à la zone neutre, résultat que l'on n'observait pas dans les fibres des arbres 1F. Chez les arbres 1F, l'épaisseur des parois des fibres est augmentée significativement dans les zones en tension (1,26 µm) et en compression (1,26 µm) par rapport aux arbres témoins (1,14 µm) et à la zone neutre (1,18 µm). Chez les arbres 3F, la paroi des fibres dans la zone comprimée est plus épaisse (1,38 µm) par rapport à celle mesurée au niveau des zones neutre (1,22 µm) et tendue (1,26 µm). L'épaisseur des parois dans la zone comprimée des arbres 3F est également significativement augmentée par rapport à celle de la zone comprimée des arbres 1F (1,26 µm). Entre les zones tendues des arbres 1F et 3F, la proportion de fibres à couche G est significativement plus importante suite au régime 3F. Les fibres à couche G chez les arbres 1F ont une épaisseur de paroi (S) de 0,79 µm qui n'est pas différente de celle mesurée chez les arbres 3F (0,77 µm). En revanche, l'épaisseur de la couche G est significativement augmentée dans les fibres des arbres 3F par rapport aux arbres 1F. Au niveau de l'angle des microfibrilles, aucune différence n'est observée entre les deux régimes de flexion.

En conclusion, une augmentation du nombre de flexions appliquées ne semble pas avoir d'impact supplémentaire sur la différenciation des vaisseaux. En revanche, elle semble avoir un effet sur la différenciation cellulaire qui mène à la structure des fibres du bois. De plus, alors que le régime 1F stimule la formation de fibres aux parois plus épaisses, aussi bien dans la zone tendue que dans la zone comprimée, le régime 3F semble avoir un effet encore plus marqué dans la zone comprimée.

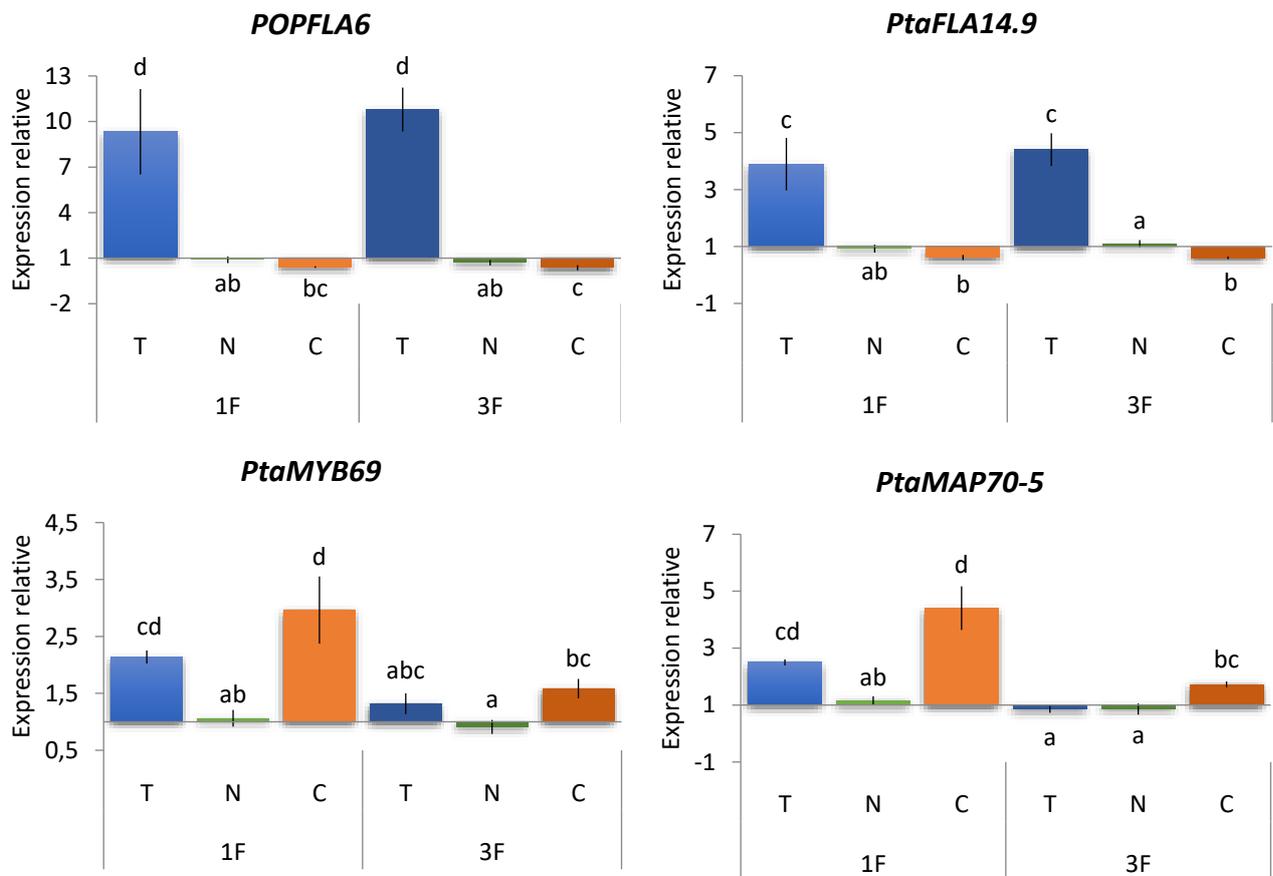


Figure 33 : Expression relative des gènes *POPFLA6*, *PtaFLA14.9*, *PtaMYB69* et *PtaMAP70-5* dans le xylème soumis à différents types de déformations longitudinales, après les régimes 1F ou 3F.

Expression relative des gènes dans les trois zones de la tige fléchée : zone en tension (T), zone neutre (N) et zone comprimée (C). Les valeurs sont les moyennes de $n = 12$ arbres 1F et $n = 8$ arbres 3F. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres. L'expression relative est exprimée par rapport à des portions de xylème prélevées dans des arbres non fléchis.

III. Réponses moléculaires

Pour déterminer si l'expression des gènes impliqués dans la formation de la paroi ou dans la mise en place de la couche G est modulée en fonction du nombre de flexions, nous avons testé et comparé l'expression des gènes entre les deux régimes (Figure 33). Pour les gènes impliqués dans la formation de la couche G (*POPFLA6* et *PtaFLA14.9*), les réponses entre les deux régimes de flexions sont identiques et du même niveau d'intensité. Une augmentation significative de l'expression des gènes est observée dans la zone tendue, et à l'inverse, une diminution significative de leur expression dans la zone comprimée. Dans les arbres 1F, l'expression des gènes *PtaMYB69* et *PtaMAP70.5* est significativement augmentée dans les zones tendue et comprimée. A la suite du régime 3F, le niveau de régulation est plus faible. Pour ces deux gènes, seule une augmentation significative de leur expression est détectée dans la zone comprimée par rapport aux arbres témoins. L'expression dans la zone comprimée des arbres 3F est significativement moins importante que celle retrouvée dans la zone comprimée des arbres 1F.

L'augmentation du nombre des flexions n'a pas eu d'effet supplémentaire sur l'expression relative des gènes *FLA*. En revanche, l'expression des gènes *PtaMYB69* et *PtaMAP70-5* est régulée différemment, avec une augmentation du niveau d'expression uniquement dans la zone en compression chez les arbres 3F.

IV. Composition biochimique

Nous avons mesuré les teneurs en lignine dans les zones tendues, neutres et comprimées des arbres 1F et 3F (Tableau 3). Quelle que soit la zone considérée, aucune différence significative entre les arbres fléchis 1F, 3F et témoins n'a été trouvée pour la quantité de lignine totale ou de Klason.

Tableau 3: Teneur en lignine dans le bois des arbres témoins et dans les différentes zones (tension, neutre et comprimée) des arbres 1F et 3F en pourcentage de matière sèche.

Composition biochimique	Témoin	1F			3F		
		Zone en tension	Zone neutre	Zone en compression	Zone en tension	Zone neutre	Zone en compression
% Lignine de Klason	16.4 ± 0.65 ^a	17.3 ± 1.3 ^a	17.1 ± 0.9 ^a	15.8 ± 2.1 ^a	16.4 ± 0.4 ^a	17.5 ± 0.4 ^a	16.5 ± 1.2 ^a
% Lignines totales	21.4 ± 0.7 ^a	21.9 ± 1.1 ^a	21.8 ± 0.7 ^a	21.3 ± 1.4 ^a	20.7 ± 0.4 ^a	22.4 ± 0.4 ^a	20.9 ± 1.1 ^a

Moyenne ± se dans chaque colonne avec $n = 6$ pour les arbres témoins ; $n = 6$ pour les arbres 1F ; $n = 6$ pour les arbres 3F. Les résultats du test Kruskal-Wallis sont indiqués par les lettres.

V. Discussion

Dans ce travail, nous avons comparé l'effet de deux régimes de flexions différents sur la croissance du peuplier ainsi que sur l'anatomie du bois et sur la régulation de gènes cibles impliqués dans la formation du bois.

V.1 Modifications de croissance à la suite de différents régimes de flexion

V.1.1 Croissance en hauteur

Chez la plupart des espèces testées, l'application de stimulations mécaniques entraîne une réduction de la hauteur des plants (Telewski et Jaffe, 1986a; Telewski et Pruyn, 1998; Kern *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'application de 3 ou de 15 flexions hebdomadaires pendant 8 semaines n'entraîne pas de modification significative de la croissance en hauteur des arbres. Cependant on observe une tendance à une réduction de la croissance primaire pour les deux régimes de flexions par rapport aux arbres témoins. Cette tendance, ainsi que des résultats obtenus auparavant au laboratoire, laissent penser qu'il pourrait exister un effet « dose » des déformations sur la croissance en hauteur. En effet, au laboratoire, nous avons soumis des arbres cultivés en hydroponie à un régime de flexions qui consistait à appliquer 6 flexions par jour pendant 7 jours. Chez ces arbres, une réduction significative de la croissance en hauteur était observée par rapport aux arbres témoins, après 2 mois de stimulation mécanique (Annexe I). Ces résultats suggèrent l'existence d'un seuil de perception du nombre de déformations qui serait nécessaire pour induire une modulation de la croissance en hauteur. Il se peut donc que le régime de flexions 3F ne soit pas suffisant pour induire une réponse statistiquement significative de la croissance en hauteur. Il est aussi tout à fait possible que notre méthodologie n'ait pas permis de détecter une faible modulation de croissance. En effet, l'utilisation d'un simple mètre-ruban ne permet pas une mesure très précise de la hauteur des plantes. En guise de perspectives on peut donc suggérer de reprendre cette question avec une méthodologie spécifiquement adaptée au suivi de la croissance primaire, par exemple par l'utilisation d'un système de caméras.

V.1.2 Croissance en diamètre

Chez les arbres 3F, la croissance en diamètre est plus importante dans le sens de flexion entraînant une ovalisation de la tige ; ce qui confirme notre hypothèse (Chapitre I) d'une perception locale des déformations subies et d'une réponse elle aussi locale. On observe également un effet du nombre plus important de flexions sur la croissance en diamètre chez les

arbres 3F par rapport aux arbres 1F, indiquant un effet dose sur la réponse. L'augmentation de la croissance en diamètre résulte d'une activité cambiale plus fortement stimulée dans le cas du régime 3F par rapport au régime 1F mais chaque flexion supplémentaire n'a pas eu d'effet additif, car l'augmentation du diamètre n'est pas proportionnelle au nombre de flexions supplémentaires. Une étude de Telewski et Pruyn (1998) a démontré un effet sur la croissance par rapport aux arbres témoins avec l'application du régime 5F (5 flexions bidirectionnelles par jour pendant 3 semaines). Les auteurs n'ont cependant pas mis en évidence d'effet dose entre le régime 5F et 80F. Pourquoi le régime 80F n'a pas eu d'impact sur la réponse en croissance ? On peut supposer qu'il existerait un phénomène de désensibilisation à la flexion et/ou une saturation progressive des sites mécanosensibles à l'accumulation de flexions. Autrement dit la plante pourrait répondre en croissance jusqu'à un certain seuil de flexions et/ou la plante ne serait plus capable de réagir à l'accumulation des flexions. Il est difficile de comparer nos résultats avec l'étude de Telewski et Pruyn (1998), car en plus de flexions bidirectionnelles, l'application des flexions était réalisée en une seule fois. Dans nos expérimentations, l'intervalle de 3 h entre les flexions du régime 3F, aurait pu permettre aux sites mécanosensibles de retrouver une sensibilité de réponse aux sollicitations mécaniques suivantes. Est-ce que l'application de 3 flexions successives aurait engendré des réponses de croissance et d'anatomie identiques ? De nouvelles expérimentations seraient à prévoir pour répondre à cette question. Dans l'étude de Martin *et al.* (2010), les auteurs observaient une désensibilisation de la réponse en croissance au bout de trois flexions séparées de 24 h. Ce phénomène de désensibilisation/saturation de la réponse semble être un mécanisme très complexe et des expérimentations suivies de modélisation permettraient d'apporter des éléments de réponse à ce phénomène.

Malgré une croissance en diamètre accrue chez les arbres 3F, l'ovalisation finale de la tige reste identique entre ces deux traitements. Ce résultat est explicable par une croissance plus importante dans le sens perpendiculaire à la flexion chez les arbres 3F. L'augmentation du nombre hebdomadaire de flexions a eu un effet sur l'activité cambiale, également au niveau de la zone neutre, ce qui n'était pas détecté avec un régime plus faible de flexions. Si l'on observe la forme finale des tiges des arbres 3F, on peut noter qu'elle ne présente plus une forme ovale, mais plutôt une forme de poire, un phénomène que l'on appellera « poirisation » (Figure 34) qui se traduit par une section plus élargie dans la zone en compression. Il y a donc eu un effet du nombre des déformations, et on peut se demander si dans ce cas, la croissance radiale n'est plus seulement modulée selon les déformations en valeur absolue. On peut donc penser à une

réponse globale dans la section modulée localement par l'intensité. Quel bénéfice adaptatif la formation d'une poire apporterait-elle alors à la tige ? C'est probablement vers le comportement mécanique de la tige qu'il faut chercher des réponses. Etant donné que la rupture du bois lors de sollicitations mécaniques intervient plutôt en compression, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il est mécaniquement pertinent d'allouer préférentiellement la biomasse du côté en compression afin d'augmenter le volume du bois et éviter la rupture en compression lors d'une flexion. Dans le cas de sollicitations unidirectionnelles, la perception du signe de la déformation et d'un seuil du nombre de flexions permettraient donc de moduler l'activité du cambium et d'adapter la section de la tige aux stress mécaniques qu'elle subit.

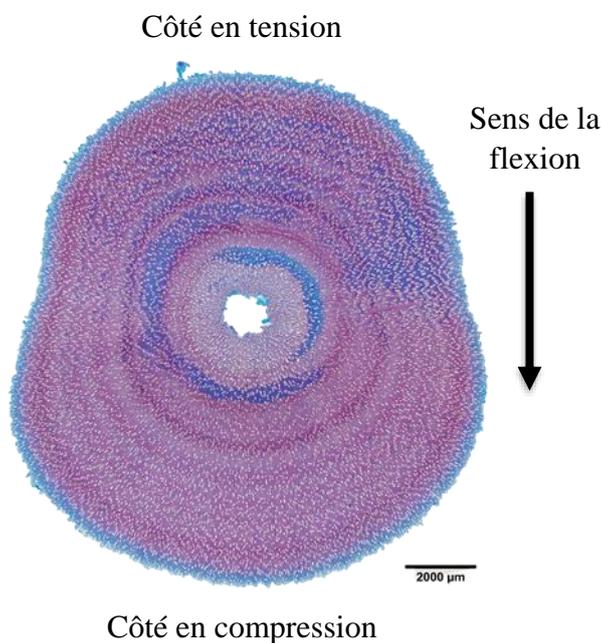


Figure 34: Poirisation de la tige des arbres 3F.

V.2 Modulation des réponses anatomiques à la suite de différents régimes de flexion

Dans la littérature, quelques études ont reporté l'impact de sollicitations mécaniques sur l'anatomie du bois de flexion formé par des flexions bidirectionnelles. Ainsi, Kern *et al.* (2005) ont montré une diminution significative du diamètre des vaisseaux et de leur nombre chez des arbres fléchis 20 fois par jour. Cependant, l'impact du nombre de flexions sur l'anatomie du bois n'a jamais été étudié. De plus, les réponses à l'échelle pariétale n'ont jamais été abordées.

V.2.1 Anatomie des vaisseaux

L'augmentation du nombre hebdomadaire de flexions n'a pas impacté la diminution du diamètre et du nombre des vaisseaux dans le TFW (*Tensile Flexure Wood*). Aucune différence

n'avait été également observée sur les arbres fléchis 6 fois par jour pendant 7 jours par rapport aux arbres ayant subi le régime 1F en chambre de culture (Annexe I-2). Il n'y aurait donc pas d'effet dose dû au nombre de déformations sur le diamètre et le nombre des vaisseaux.

V.2.2 Anatomie des fibres

Dans nos expérimentations, nous avons observé une augmentation du diamètre des fibres dans les zones en tension et en compression chez les arbres 1F et 3F, mais il ne semble pas y avoir un effet dose à la suite du régime 3F. Chez les arbres 3F, dans la zone en compression, l'épaisseur de la paroi des fibres était plus importante que celle mesurée chez les arbres 1F. Chez les arbres 3F, le nombre de flexions a provoqué une poirisation de la tige qui apporterait potentiellement un bénéfice adaptatif mécanique à la tige pour les sollicitations mécaniques suivantes. L'augmentation de l'épaisseur de parois pourrait également intervenir dans ce bénéfice, car lorsqu'une tige est soumise à de fortes compressions et que la limite élastique est dépassée, les parois cellulaires subissent un flambement, causant des dégâts irréversibles. L'augmentation de l'épaisseur de la paroi du côté en compression permettrait donc d'augmenter leur résistance au flambement et d'augmenter la résistance de la tige en cas de dépassement de la limite élastique (Jacobsen *et al.*, 2005). Comme discuté dans le chapitre I, nous pensions que la perception des déformations en valeur absolue contrôlait le processus de différenciation des fibres. On peut émettre l'hypothèse que dans les arbres 1F, l'augmentation de l'épaisseur de paroi des fibres suffirait à éloigner le risque d'endommagement mécanique qui reste faible. En revanche lorsque la stimulation mécanique devient plus récurrente, le risque est plus élevé et les réponses en termes d'épaisseur de paroi se renforcent du côté en compression, le point faible de la tige lors d'une flexion.

Dans les fibres à couche G du côté en tension, une augmentation de l'épaisseur de la couche G est observée à la suite du régime 3F par rapport au régime 1F. Il y aurait donc un effet dose, et le nombre de déformations subies par la tige déterminerait à la fois la proportion de fibres développant une couche G et l'épaisseur de cette couche G. Suivant les espèces, la couche G peut être observée à l'intérieur de la paroi S3, peut remplacer la S3, ou parfois la S3 et tout ou partie de la S2 (Abedini *et al.*, 2015). D'après Fang *et al.* (2007 ; 2008) lorsque l'épaisseur de la couche G augmente, l'épaisseur de la paroi secondaire diminue, comme si la couche G se développait au détriment de la paroi secondaire. Dans notre étude, chez les arbres inclinés, l'épaisseur de la paroi S des fibres à couche G était de 0,6 μm avec une épaisseur de couche G égale à 2 μm . Dans le cas du TFW, bien que l'épaisseur de la couche G chez les arbres 3F soit

significativement supérieure à celle mesurée chez les arbres 1F, on n'observe pas de différence des épaisseurs des parois S dans ces fibres G entre les deux régimes. On peut donc supposer que la formation de la couche G stoppe le développement de la paroi S, et qu'augmenter la stimulation mécanique entretient le processus de formation de la couche G. Il serait donc intéressant de tester d'autres régimes de flexions pour essayer de mettre en relation le nombre de stimulations avec l'augmentation de l'épaisseur de la couche G.

Etant donné l'augmentation de la proportion de couche G dans les arbres 3F (31,9 % contre 18,6 % chez les arbres 1F), nous pensions observer une diminution plus importante de l'AMF dans la zone tendue des arbres 3F. La mesure des AMF a été effectuée par la méthode de diffraction à rayons X. Le faisceau de rayon X est perpendiculaire à la surface de l'échantillon, et en fonction de l'épaisseur de l'échantillon exposé aux rayons X, plusieurs centaines de cellules contribuent à la mesure par diffraction. Dans les arbres que nous avons inclinés, les fibres du bois de tension comportent quasiment toutes une forte proportion de couche G et l'angle des microfibrilles mesuré est de 6°. Or, dans les arbres fléchis 1F ou 3F, la répartition des fibres à couche G est très hétérogène sur l'ensemble de la zone en tension. La mesure de l'AMF correspondant à une moyenne de plusieurs centaines de fibres, et au regard de la précision de la mesure, la dispersion des fibres G peut expliquer que nous n'observons pas de différence entre les deux régimes.

V.3 Régulation transcriptionnelle des gènes liés aux parois cellulaires par différents régimes de flexion

En ce qui concerne les gènes *FLA*, l'augmentation du nombre hebdomadaire de flexions n'a pas impacté leur niveau de régulation. Ces gènes sont induits uniquement du côté tendu de la tige, zone où les fibres présentent une couche G. En réponse à un stress gravitropique, plusieurs gènes *FLAs* sont surexprimés dans la partie en tension (Lafarguette *et al.*, 2004 ; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006 ; Azri *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2017) et les gènes *FLAs* sont maintenant considérés comme des marqueurs moléculaires de la formation de bois de tension. Pourquoi n'observons-nous pas alors de différence dans l'expression des gènes *FLA* dans la zone tendue entre les arbres 1F et 3F, alors que la proportion de fibres à couche G est significativement augmentée ? Dans l'analyse transcriptomique réalisée sur tiges entières de peupliers dans l'équipe, les travaux ont montré que 96% des gènes induits précocement (30 min) étaient régulés de manière atténuée lors d'une seconde flexion (Pomiès *et al.*, 2017). Ces résultats ont été interprétés comme montrant une désensibilisation des peupliers aux flexions successives (Martin *et al.*, 2010; Leblanc-Fournier *et al.*, 2014) et les gènes montrant

ce profil de régulation ont été appelés « gènes accommodés ». Est-ce que les gènes régulés tardivement par une flexion (72 h) sont également soumis à ce phénomène ? Nos données actuelles ne nous permettent pas complètement de répondre à cette question dans le cas des gènes *FLA*, car nous ne connaissons pas précisément leur cinétique d'expression à ces temps tardifs. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : si les gènes *FLA* ont un profil d'expression transitoire, alors quand la deuxième flexion (3 h après) est appliquée, l'expression est de nouveau augmentée. Dans le cas de cette hypothèse cela signifierait que les gènes *FLA* ne sont pas des gènes accommodés comme 4 % des gènes précoces. Chaque dose induirait donc une réponse similaire, ce qui pourrait expliquer la proportion plus importante de fibres à couche G. Dans un autre cas où l'expression des gènes *FLA* serait maintenue sur plusieurs jours, le niveau d'expression obtenu montre qu'il n'y aurait pas d'effet proportionnel de chaque flexion sur la régulation des *FLA*. Cependant, bien que moindre, chaque flexion supplémentaire entraînerait l'augmentation du niveau d'expression de *FLA*, qui pourrait de nouveau être corrélé à une proportion plus importante des fibres à couche G. Des études de cinétique d'expression aux temps tardifs, après 1 ou 2 flexions séparées de 3 h permettrait de tester ces hypothèses. Bien sûr, les gènes *FLA* ne sont probablement pas les seuls gènes impliqués dans la mise en place de la couche G dans les fibres et d'autres gènes pourraient expliquer l'effet du régime 3F.

A l'inverse des gènes *FLA* qui présentent des niveaux d'expression similaires entre les régimes de flexions 1F et 3F, le niveau d'expression relative des gènes *PtaMYB69* et *PtaMAP70-5* diffère entre les régimes. Dans les arbres 3F, l'augmentation significative des gènes est uniquement retrouvée dans la zone en compression. Leur niveau d'expression peut d'ailleurs être mis en relation avec les augmentations d'épaisseur de paroi mesurée chez les arbres 1F et 3F. Dans leur étude, Pomiès *et al.* (2017) montraient que ces deux gènes sont accommodés 30 minutes après une flexion, mais comme pour les gènes *FLA* nous n'avons aucune donnée sur la modulation de leur expression 72 h après une seconde flexion. La différence d'expression entre nos deux traitements pourrait donc s'expliquer par une désensibilisation de la plante aux nombres de déformations plus importantes dans le régime 3F.

Pour conclure, nous avons vu que l'effet de sollicitations multiples est complexe et nécessite de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la perception des déformations et leur régulation ainsi que la localisation des sites de perception. Nos résultats confirment que les flexions successives ne déclenchent pas des réponses de même intensité. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués : phénomène de désensibilisation progressive avec potentiellement un effet mémoire ou saturation des sites de perception ou des réponses mises

en place. Dans ce projet, nous avons appliqué des déformations de même intensité à chaque stimulation. Jouer avec l'intensité des déformations appliquées lors des sollicitations successives permettrait de différencier l'effet saturation de la réponse de l'effet désensibilisation. Nous nous sommes également demandé comment les déformations impactaient l'activité cambiale. Pour apporter des éléments de réponses, nous avons choisi, par une approche gène candidat, d'étudier un gène de la famille CLAVATA, le gène *CLE12.2*.

***Chapitre III : Analyse fonctionnelle du
gène CLE12.2***

Lors de mon arrivée en thèse, l'équipe MECA s'intéressait à la réponse transcriptomique de la tige de peuplier à une unique flexion. Pour cela, elle disposait d'une cinétique de points de mesure de l'expression des gènes obtenue avec des puces ADN. Parmi les gènes différentiellement exprimés, un gène présentait un profil d'expression intéressant, le gène *PtaCLE12.2* (Potri.008G115600). L'expression de ce gène est réprimée 30 minutes après une flexion, puis son expression est significativement augmentée à 2 h, 24 h et 72 h après la flexion. Ce gène fait partie des 10 gènes dont l'expression est la plus fortement modulée 72 h après la flexion (Pomiès *et al.*, 2017). La séquence protéique prédite suggère que ce gène coderait un peptide CLE (CLV3/ESR). La famille des peptides CLE est connue dans la littérature comme régulant les activités méristématiques, notamment *via* CLV3 dans le SAM (Fletcher *et al.*, 1999) et CLE41 au niveau de la zone cambiale (Fukuda *et al.*, 2007) (Yamaguchi *et al.*, 2016).

Au vu de ces connaissances, nous nous sommes demandé si le gène *CLE12.2* interviendrait dans les réponses de croissance et/ou de différenciation induites à la suite de flexions. Pour tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps confirmé que l'expression du gène était modifiée à la suite de flexions multiples. Puis nous avons analysé si l'expression du gène *CLE12.2* était modulée en fonction des déformations ou selon le signe de la déformation et comment les régimes de flexions influencent l'expression du gène à la suite du régime 3F.

Pour confirmer l'implication du gène *PtCLE12.2* dans les réponses engendrées à la suite de flexions, nous avons décidé d'utiliser une approche de génomique fonctionnelle. Dans le cadre d'une collaboration, le Pr Ove Nilsson (UPSC, Umeå – Suède) nous a fourni des plants de *P. tremula* x *P. tremuloides*, clone T89 présentant une surexpression par un promoteur constitutif 35S (OE pour *Over-Expressed*) ou une sous-expression par RNA interférence (RNAi) du gène *PttCLE12.2* (Potri.008G115600). Dans un premier temps, nous avons caractérisé les réponses de croissance induites à la suite du régime 1F chez l'hybride *P. tremula* x *P. tremuloides* (*Ptt*). Dans un second temps, nous avons étudié l'anatomie et les réponses moléculaires retrouvées chez les peupliers transgéniques RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.

I. Expression du gène *CLE12.2* chez *P. tremula* x *P. alba*

Nous savons que l'expression du gène *PtCLE12.2* est augmentée à la suite d'une flexion unique sur tige entière de peuplier (Pomiès *et al.*, 2017). Par une analyse tissulaire locale, tenant compte des champs de déformations perçues, nous avons ici étudié la régulation et la localisation de l'expression de ce gène à la suite de flexions répétées.

L'analyse de l'expression du gène *PtaCLE12.2* sur les arbres 1F montre que son expression est augmentée de manière significative d'un facteur 3,4 aussi bien dans les zones subissant des déformations en tension qu'en compression (Figure 35). Le régime 3F déclenche également une stimulation de l'expression de *PtaCLE12.2* dans les zones tendue et comprimée de la tige, et le niveau de régulation n'est pas statistiquement différent de celui observé suite aux traitements 1F. L'expression relative du gène au niveau de la zone neutre est égale à celle mesurée chez des plants témoins que ce soit pour le traitement 1F ou 3F.

L'expression du gène *PtaCLE12.2* est donc modulée à la suite de flexions répétées et se retrouve dans les zones subissant les plus fortes déformations (en tension et en compression).

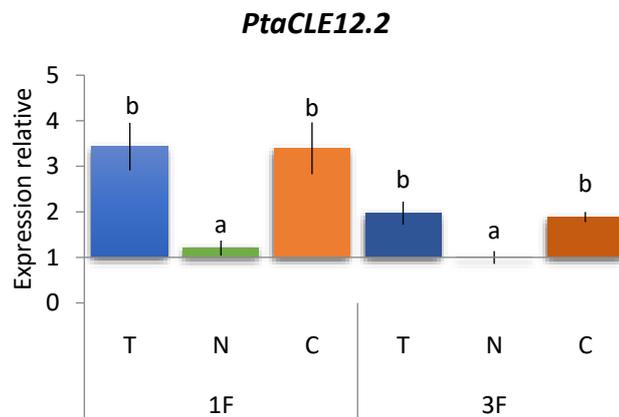


Figure 35 : Expression relative du gène *PtaCLE12.2* dans le xylème soumis à différents types de déformations, chez les arbres 1F ou 3F.

Expression relative du gène dans les zones en tension (T), neutre (N) et en compression (C) par rapport aux arbres sauvages non fléchis. Les valeurs sont les moyennes de $n = 12$ arbres 1F et $n = 8$ arbres 3F. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

II. Effet de flexions répétées sur l'hybride *P. tremula* x *P. tremuloides*

Jusqu'à présent, nous travaillons sur le génotype *P. tremula* x *P. alba* (*Pta*). Pour étudier les effets d'une sous- ou surexpression du gène *PttCLE12.2*, nous avons dû dans un premier temps étudier les réponses thigmomorphogénétiques (régime 1F) sur le génotype *P. tremula* x *P. tremuloides* (*Ptt*). Pour cela, deux expérimentations ont été menées sur les arbres *Ptt* (de

novembre 2016 à janvier 2017 et de mai à juillet 2017) et les résultats obtenus sur les arbres *Ptt* subissant le traitement 1F ont été comparés avec ceux précédemment obtenus chez *Pta*.

II.1 Réponses morphologiques

On peut observer dans le Tableau 4 qu'en absence de flexions, le ratio $\Delta H:\Delta D$ de l'hybride *Ptt* (41.4) est très différent de celui observé chez les hybrides *Pta* (22.8). Cet hybride est donc caractérisé par une croissance en hauteur plus importante que *Pta* et une croissance en diamètre inférieure ($3.45 \mu\text{m}$) à celle observée chez *Pta* ($5,85 \mu\text{m}$). A la suite des 8 semaines de traitements, l'accroissement en hauteur n'a pas été impacté par le régime 1F chez l'hybride *Ptt*, comme observé chez *Pta* (Tableau 4). Suite au régime 1F, les arbres *Ptt* présentent une augmentation significative de leur croissance en diamètre dans le sens de la flexion ($D_{//}$), générant une ovalisation de la tige. Les différences d'accroissement 1F-NF *Ptt* ou 1F-NF *Pta* (valeurs d'arbres fléchis moins la valeur moyenne des arbres non fléchis) indiquent que l'amplitude de cette réponse est identique entre les deux hybrides. Dans le sens perpendiculaire à la flexion, on observe une augmentation significative de la croissance en diamètre pour les arbres *Ptt*. Cette augmentation n'était pas mesurée chez les arbres *Pta*. Le ratio $\Delta H:\Delta D$ montre qu'il y a un effet thigmomorphogénétique plus important chez l'hybride *Ptt* par rapport à l'hybride *Pta*. En revanche, l'ovalisation finale observée chez les arbres fléchis en fin d'expérimentation est plus importante chez l'hybride *Pta* que chez l'hybride *Ptt*.

Tableau 4 : Réponses de croissance de *P. tremula* x *P. tremuloides*.

Propriétés morphologiques	Témoins <i>Ptt</i>	1F <i>Ptt</i>	1F-NF <i>Ptt</i>	1F/NF <i>Pta</i>	Témoins <i>Pta</i>	1F <i>Pta</i>
Hauteur de la tige (cm)	140.7 ± 9.5^a	138.2 ± 4.5^a	-2.5	-3.7	$131.5 \pm 2.2^\alpha$	$127.8 \pm 2.1^\alpha$
Diamètre de la tige $D_{//}$ (mm)	3.4 ± 0.3^a	$5,7 \pm 0.4^b$	1.7	2.1	$5.8 \pm 0.2^\alpha$	$8.0 \pm 0.2^\beta$
Diamètre de la tige D_{\perp} (mm)	3.5 ± 0.3^a	5.0 ± 0.3^b	1.5	0.6*	$5.8 \pm 0.2^\alpha$	$6.5 \pm 0.2^\alpha$
Ratio $\Delta H:\Delta D$	41.4 ± 1.6^a	25.5 ± 2.5^b	-15.9	-6.6***	$22.8 \pm 0.8^\alpha$	$17.9 \pm 0.6^\beta$
Ovalisation ($D_{//}/D_{\perp}$)	0.99 ± 0.01^a	1.07 ± 0.01^b	0.07	0.11**	$1.01 \pm 0.01^\alpha$	$1.12 \pm 0.01^\beta$

Moyenne \pm se dans chaque colonne, avec $n = 8$ arbres NF et $n = 8$ arbres 1F *Ptt* ; $n = 10$ arbres NF et $n = 12$ arbres 1F *Pta*. NF = arbres non fléchis ; 1F = arbres ayant subi le régime 1F. 1F-NF représente la différence de la mesure pour chaque arbre 1F par rapport à la moyenne des arbres NF chez *Ptt* et *Pta*. ΔH : accroissement en hauteur de la tige ; $\Delta D_{//}$ et ΔD_{\perp} : accroissement en diamètre de la tige dans le sens parallèle et perpendiculaire à la flexion. Un t-test a été effectué pour analyser les différences entre les arbres *Ptt* fléchis et non fléchis (a et b, $P < 0.05$) et entre les ratios (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Les lettres α et β rappellent les différences statistiques entre les arbres *Pta* NF et F.

II.2 Réponses anatomiques

Les réponses anatomiques observées suite au régime 1F chez l'hybride *Pta* sont également observées chez l'hybride *Ptt*. Le diamètre des vaisseaux des arbres *Ptt* a diminué de 8,3 % du côté qui subit des déformations en tension par rapport au diamètre des vaisseaux des arbres témoins (Tableau 5). La diminution observée chez les arbres *Pta* était de 9,6 %. Comme observé chez *Pta*, une diminution significative de la fréquence des vaisseaux est observée à la fois dans les zones tendue et comprimée. Par contre, cette diminution de la fréquence des vaisseaux touche aussi la zone neutre chez les arbres *Ptt*. Comme attendu, l'épaisseur des parois des fibres est augmentée du côté tendu (fibres sans couche G) ainsi que du côté comprimé avec une amplitude de réponse supérieure chez *Ptt* (+8,9 % pour le côté tendu et côté comprimé) par rapport à l'hybride *Pta* (+3,1 % pour le côté tendu ; +4,6 % pour le comprimé). L'épaisseur de la paroi S des fibres G est de 0,75 μm , sensiblement identique à la mesure chez *Pta* (0,79 μm). En revanche, l'épaisseur de la couche G est légèrement inférieure chez les arbres *Ptt* avec une épaisseur de 0,97 μm en comparaison des 1,16 μm mesurés chez les arbres *Pta*. Comme observé chez *Pta*, le diamètre des fibres est augmenté dans les zones tendue et comprimée. En revanche, les fibres de la zone neutre présentent également une augmentation de diamètre, et les fibres G n'ont pas un diamètre plus important par rapport aux autres fibres des zones fléchies.

Tableau 5: Mesures anatomiques dans les différentes zones de bois des arbres fléchis *P. tremula* x *P. tremuloides*.

(G) fait référence aux fibres présentant de la couche G. Moyenne \pm se dans chaque colonne, avec $n = 8$

Propriétés anatomiques	<i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>			
	Témoin	Fléchis		
		Zone en tension	Zone neutre	Zone en compression
Fréquence des vaisseaux (no.mm ⁻²)	197 ^a	148 ^b	158 ^b	160 ^b
Diamètre des vaisseaux (μm)	37 \pm 0.3 ^a	34 \pm 0.3 ^b	37 \pm 0.3 ^a	36 \pm 0.3 ^a
Epaisseur de paroi S (μm)	1.08 \pm 0.01 ^a	1.11 \pm 0.01 ^b 0.75 \pm 0.01(G) ^c	1.07 \pm 0.01 ^a	1.13 \pm 0.01 ^b
Epaisseur de la couche G (μm)		0.97 \pm 0.01		
Diamètre des fibres (μm)	14.6 \pm 0.3 ^a	16.4 \pm 0.3 ^b 16.3 \pm 0.3(G) ^b	16.3 \pm 0.3 ^b	16.6 \pm 0.3 ^b

arbres témoins et $n = 8$ arbres fléchis. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres

II.3 Réponses moléculaires

L'ensemble des gènes dont l'expression était modulée chez *Pta* à la suite du régime 1F, ont également été étudiés dans les mêmes conditions chez l'hybride *Ptt* à savoir : *CLE12.2*, *MYB69*, *MAP70-5* et *POPFLA6*.

L'augmentation de l'expression du gène *PttCLE12.2* dans les zones tendue et comprimée est équivalente à celle retrouvée chez *Pta* (expression relative augmentée d'un facteur 3-4) (Figure 36). En revanche, une augmentation de l'expression du gène, à un niveau moindre, est également détectée au niveau de la zone neutre chez *Ptt*. Le même type de profil d'expression est observé dans le cas du gène *PttMAP70-5*. En revanche, les flexions de tige déclenchent une augmentation de l'expression relative du gène *PttMYB69* dans les trois zones de la tige fléchée, avec une amplitude de réponse plus élevée dans la zone en compression par rapport aux zones neutre et tendue.

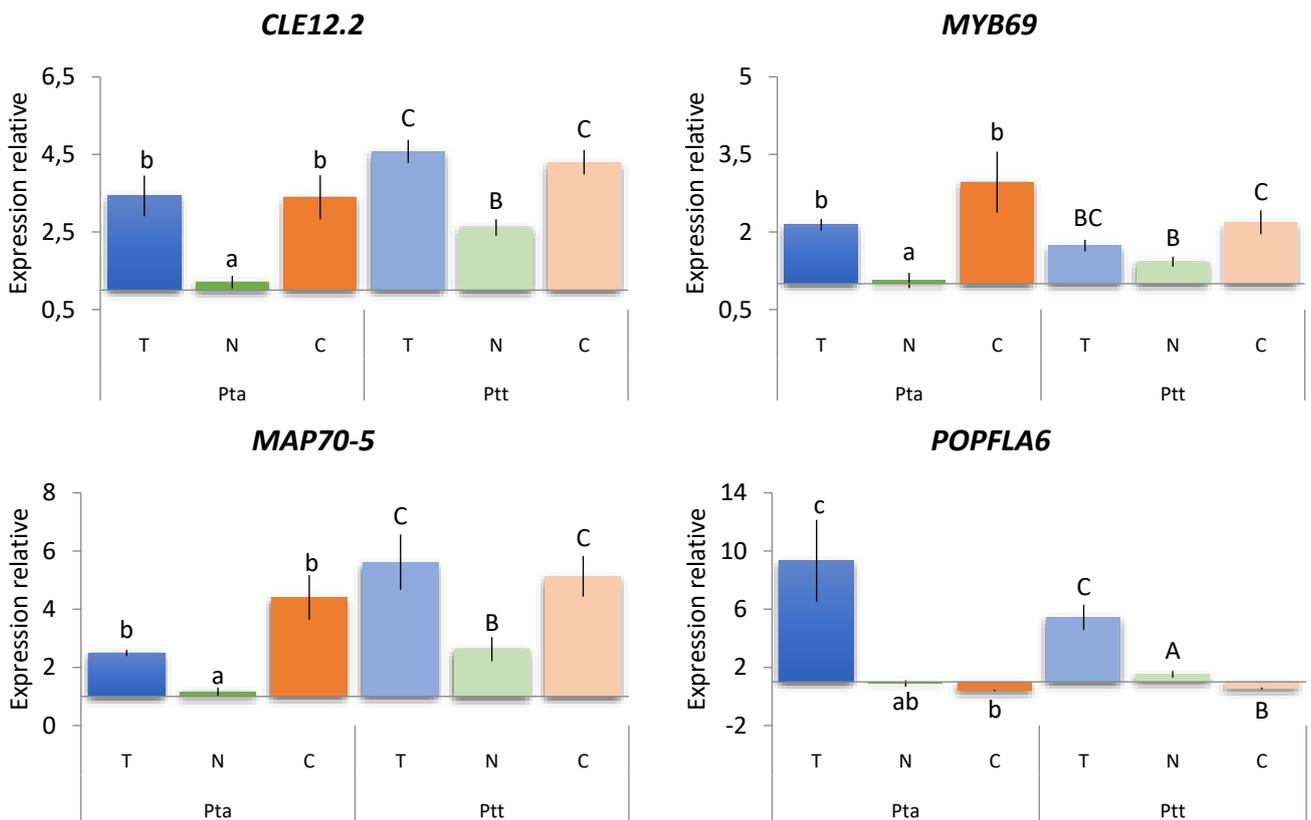


Figure 36 : Expression relative des gènes *CLE12.2*, *MYB69*, *MAP70-5* et *POPFLA6* chez *P. tremula x alba* (*Pta*) et *P. tremula x tremuloides* (*Ptt*) dans le xylème soumis à différents types de déformations. Expression relative des gènes dans les zones en tension (T), neutre (N) et en compression (C) par rapport aux arbres sauvages non fléchis. Les valeurs sont les moyennes de n = 12 arbres fléchis *Pta* et n = 8 arbres fléchis *Ptt*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres (a, b, c pour l'hybride *Pta* et A, B, C pour l'hybride *Ptt*).

Chez les arbres *Ptt*, le gène *POPFLA6* présente le même profil d'expression que celui observé chez *Pta*, avec une augmentation significative du côté tendu, une diminution du côté comprimé et aucune différence par rapport aux témoins dans la zone neutre.

Chez les arbres *Ptt*, le profil d'expression des gènes *CLE12.2*, *MYB69*, *MAP70-5* et *POPFLA6* est sensiblement le même que celui observé pour les arbres *Pta*. On note cependant dans certains cas une augmentation de l'expression des gènes dans la zone de la tige prélevée au niveau de la zone neutre.

III. Caractérisation préliminaire des niveaux d'expression du gène *PttCLE12.2* dans les peupliers transgéniques présentant une sous- et surexpression du gène *PttCLE12.2*

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Ove Nilsson de l'UPSC d'Umeå, nous avons obtenu 4 lignées de peupliers transgéniques RNAi sous-exprimant le gène *PttCLE12.2* : RNAi-4 ; RNAi-7 ; RNAi-8 ; RNAi-11 et 2 lignées sur-exprimant (OE) le gène *PttCLE12.2* : OE-15 ; OE-16. Après avoir testé le niveau d'expression des transcrits *PttCLE12.2* dans les lignées transgéniques, nous nous sommes focalisés sur deux lignées transgéniques RNAi : RNAi-7 et RNAi-8 présentant une expression relative significative du gène *PttCLE12.2* de 0.30 et 0.47 respectivement par rapport aux arbres sauvages, et sur les deux lignées sur-exprimant le gène : OE-15 et OE-16, avec un niveau relatif d'expression de 4.39 et 2.18 respectivement (Figure 37).

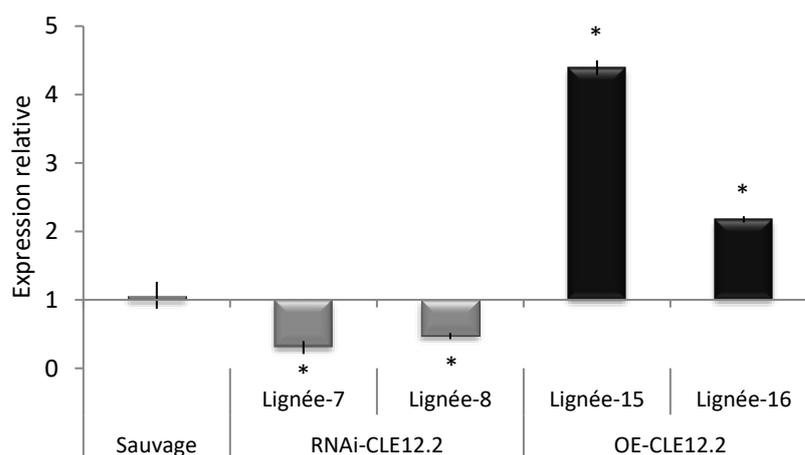


Figure 37: Expression relative du gène *PttCLE12.2* dans le xylème des peupliers sauvages et des lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis.

Les valeurs sont les moyennes de $n = 4$ arbres pour les arbres sauvages, ainsi que pour les lignées 7 et 8 RNAi-CLE12.2 et les lignées 15 et 16 OE-CLE12.2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le résultat du test de Student entre l'expression relative des arbres sauvages et de chaque lignée transgénique est indiqué par un astérisque, $P < 0.05$.

L'analyse de l'expression du gène *PttCLE12.2* chez les arbres RNAi-CLE12.2 fléchis confirme la diminution de l'expression du gène par RNA interférence (Figure 38). Chez les lignées OE-CLE12.2, l'application de flexions induit une augmentation de l'expression du gène dans les zones en tension et en compression, qui reste du même ordre de grandeur que celui retrouvé chez les arbres sauvages.

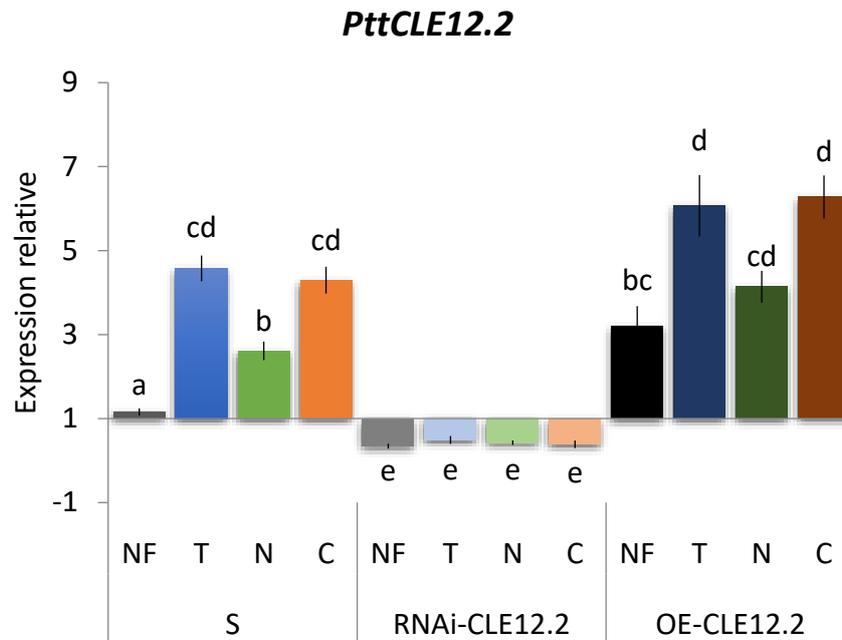


Figure 38: Expression relative du gène *PttCLE12.2* chez les peupliers sauvages (S), RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et dans le xylème soumis à différents types de déformations.

Expression relative du gène dans les zones en tension (T), neutre (N) et en compression (C) des arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 par rapport aux arbres sauvages non fléchis. Les valeurs sont les moyennes de $n = 8$ arbres NF et $n = 8$ arbres 1F sauvages ; $n = 14$ arbres NF et $n = 16$ arbres 1F RNAi-CLE12.2 ; $n = 15$ arbres NF et $n = 13$ arbres 1F OE-CLE12.2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les résultats de l'ANOVA2 (Annexe II) suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Pour tester le rôle du gène *CLE12.2* dans la formation du bois et dans la mise en place des bois de flexion (TFW et CFW), nous avons étudié (i) les réponses de croissance chez les arbres transgéniques non fléchis (NF) puis fléchis avec le régime 1F, (ii) les réponses anatomiques et (iii) les réponses moléculaires. Dans la suite du chapitre, la moyenne des résultats des lignées transgéniques OE-15 et OE-16 est présentée sous le nom de lignée OE-CLE12.2 et la moyenne des résultats des lignées RNAi-7 et RNAi-8 est présentée sous le nom de RNAi-CLE12.2.

III.1 Réponses morphologiques

Les mesures de l'accroissement en hauteur montrent qu'il n'y a pas de différence entre les lignées sauvages et transgéniques non fléchies (Tableau 6 ; Annexe III). L'application du régime 1F n'entraîne pas de diminution de la croissance en hauteur chez l'ensemble des lignées. En absence de flexion, les tiges des arbres RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 ont un accroissement du diamètre moyen significativement plus important, 4,7 mm et 4,6 mm respectivement, par rapport aux arbres sauvages non fléchis (3,5 mm). Suite à l'application du régime de flexion, il y a une augmentation significative de la croissance en diamètre pour chaque lignée dans le sens parallèle à la flexion. Dans le sens perpendiculaire à la flexion, seul le diamètre des arbres RNAi-CLE12.2 est significativement augmenté à la suite du régime 1F, comme observé chez la lignée sauvage *Ptt*. Le ratio $\Delta H:\Delta D$ montre qu'il y a un effet thigmomorphogénétique chez les arbres RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2. La différence entre le ratio $\Delta H:\Delta D$ des arbres non fléchis des lignées sauvages et des lignées transgéniques peut être expliquée par le diamètre plus important des tiges des arbres transgéniques par rapport aux arbres sauvages. L'application du régime 1F entraîne une ovalisation de la tige pour les lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 (Figure 39).

Tableau 6: Réponses de croissance des peupliers sauvages et des lignées transgéniques non fléchies et fléchies.

Propriétés morphologiques	Sauvage		RNAi-CLE12.2		OE-CLE12.2	
	NF	1F	NF	1F	NF	1F
ΔH (cm)	140.7 \pm 9.5 ^a	138.2 \pm 4.5	153.4 \pm 3.2 ^a	141.9 \pm 6.8	139.7 \pm 6.8 ^a	135.1 \pm 6.7
Diamètre de la tige moyen (mm)	3.5 \pm 0.3 ^a	-	4.7 \pm 0.2 ^b	-	4.6 \pm 0.2 ^b	-
$\Delta D_{//}$ (mm)	3.4 \pm 0.3 ^a	5,7 \pm 0.4***	4.8 \pm 0.2 ^b	6.2 \pm 0.2***	4.6 \pm 0.2 ^b	5.9 \pm 0.2***
ΔD_{\perp} (mm)	3.5 \pm 0.3 ^a	5.0 \pm 0.3**	4.7 \pm 0.2 ^b	5.3 \pm 0.2*	4.7 \pm 0.2 ^b	5.0 \pm 0.2
Ratio $\Delta H:\Delta D$	40.8 \pm 1.9 ^a	27.0 \pm 2.5***	33.0 \pm 1.6 ^b	24.5 \pm 1.8***	31.4 \pm 1.6 ^b	25.2 \pm 1.5**
Ovalisation ($D_{//}/D_{\perp}$)	1.00 \pm 0.01 ^a	1.07 \pm 0.01***	1.00 \pm 0.00 ^a	1.08 \pm 0.01***	1.00 \pm 0.00 ^a	1.09 \pm 0.01***

Moyenne \pm se dans chaque colonne. NF = arbres non fléchis. 1F = arbres ayant subi le régime de flexion 1F. Une analyse de la variance à deux facteurs (facteur « génotype » et facteur « traitement ») a été effectuée et montre qu'il n'y a pas d'effet d'interaction entre les facteurs pour l'ensemble des caractères morphologiques (Annexe III). Les différences entre chaque lignée NF ont été analysées par une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ et sont indiquées par les lettres. Les différences significatives entre les arbres NF et 1F au sein de chaque génotype sont indiquées par des astérisques (Test de Student, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Les analyses de croissance des peupliers transgéniques non fléchis suggèrent un rôle potentiel de *PttCLE12.2* dans la croissance radiale. Malgré un niveau moindre de l'expression de *PttCLE12.2* dans les transgéniques RNAi-CLE12.2, et même en présence de flexion, les réponses de croissance liées à la flexion ne sont pas modifiées.

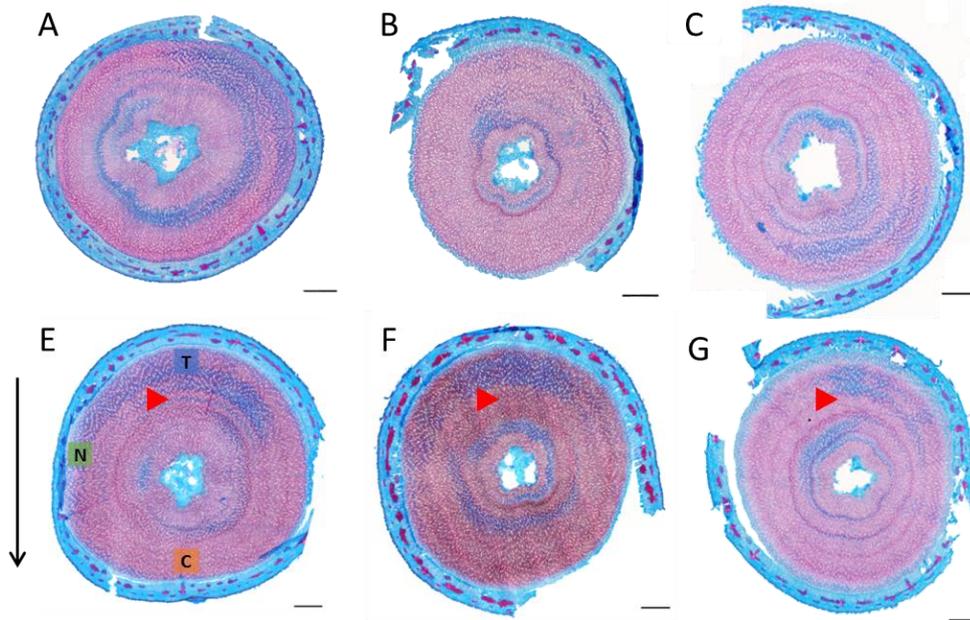


Figure 39 : Coupes transversales représentatives des peupliers *Ptt* sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.

(A) Arbre sauvage non fléchi et (E) fléchi ; (B) Arbre RNAi-CLE12.2 non fléchi et (F) fléchi ; (C) Arbre OE-CLE12.2 non fléchi et (G) fléchi. La flèche noire indique le sens de flexion et les rouges la position du cambium au début des stimulations mécaniques. Les zones subissant différentes déformations sont indiquées par des rectangles : zone en tension (T) ; zone neutre (N) ; zone en compression (C). E : écorce ; X : xylème ; M : moelle. Coloration : Bleu-Astra safranine. Echelle = 1mm.

III.2 Réponses anatomiques

Pour tester si le gène *PttCLE12.2* joue un rôle dans les modifications anatomiques avec ou sans les flexions, nous avons analysé les caractères anatomiques suivants : fréquence des vaisseaux, diamètre des vaisseaux, épaisseur de la paroi des fibres et diamètre des fibres chez les lignées sauvages, RNAi-CLE12.2, OE-CLE12.2 non fléchies et fléchies en distinguant les trois zones de la tige fléchie.

Dans la suite de ce chapitre, les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA2) dans le but de comparer l'effet « génotype » (lignée sauvage vs lignée RNAi-CLE12.2 vs lignée OE-CLE12.2) et l'effet « Tissus » (Tissus non fléchis (NF) vs tissus formés en zone en tension (T) en zone neutre (N) et zone en compression (C)), et ce, pour l'ensemble des caractères anatomiques. La normalité des données

et l'homoscédasticité ont été vérifiées au préalable. Basée sur les résultats de l'analyse de variance, la comparaison multiple de moyennes a été réalisée selon la méthode de Tukey, pour un intervalle de confiance de 95 %, afin de déterminer les variations significatives entre les différents facteurs.

III.2.1 Diamètre et densité de vaisseaux

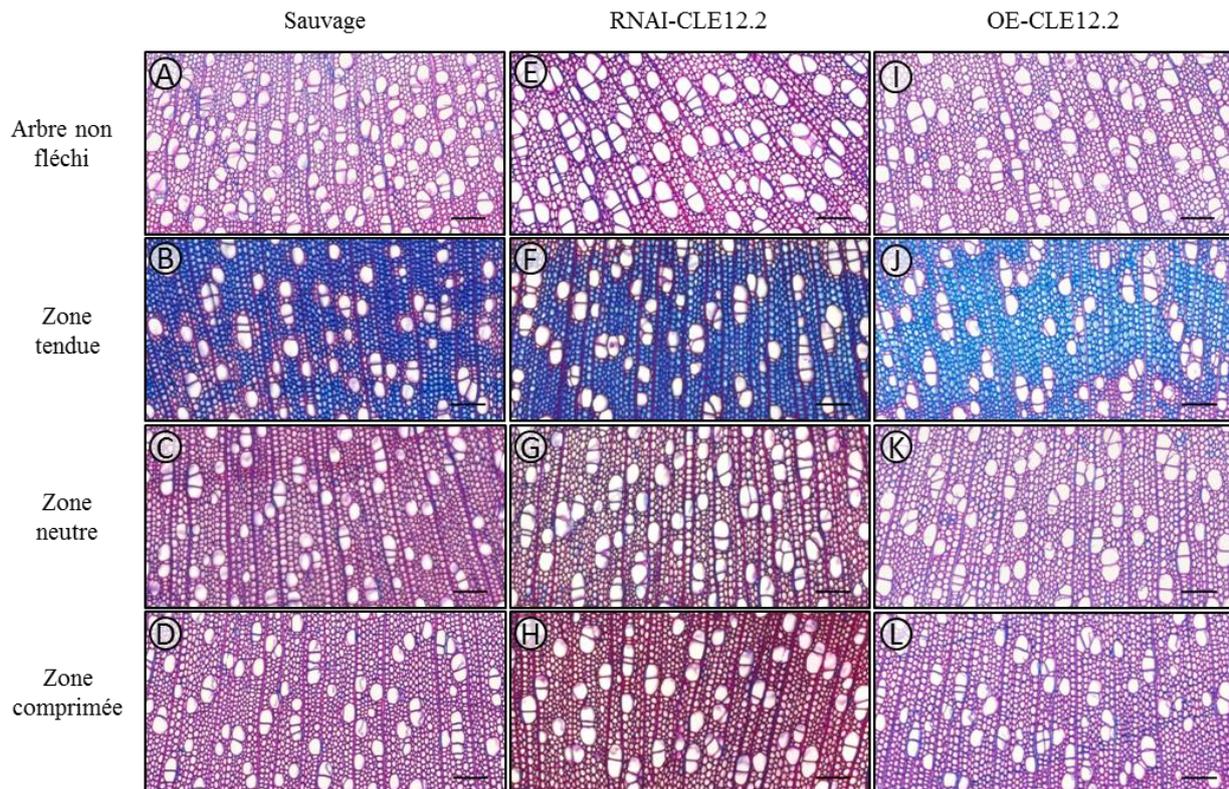


Figure 40 : Coupes transversales du xylème des peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.

Coupes anatomiques de bois inclus en PEG, réalisées pour les mesures de diamètre et de densité des vaisseaux. A à D : arbres sauvages. E à H : arbres RNAi-CLE12.2. I à L : arbres OE-CLE12.2. A, E, I : Arbre non fléchi. B, F, J : zone tendue ; C, G, K : zone neutre ; D, H, L : zone comprimée. Coloration Bleu-Astra-safranine. Echelle = 100µm.

La Figure 41 présente les variations du diamètre des vaisseaux chez les arbres transgéniques non fléchis (NF) et l'effet des flexions sur chaque zone de la tige fléchie (T : zone en tension ; N : zone neutre, C : zone en compression). On observe que le diamètre des vaisseaux des arbres RNAi-CLE12.2 non fléchis (38.8 μm) est significativement augmenté de 5,7 % par rapport à celui des arbres sauvages (36.7 μm) (Figure 40 E ; Figure 41). Chez les arbres OE-CLE12.2, aucune différence significative du diamètre des vaisseaux n'est observée par rapport aux arbres sauvages non fléchis (Figure 40 I ; Figure 41). Pour rappel, chez les arbres sauvages, les flexions déclenchaient une diminution du diamètre des vaisseaux dans la zone en tension (-8.3 % par rapport aux arbres NF). L'application de flexions sur les arbres RNAi-CLE12.2 entraîne une diminution significative du diamètre des vaisseaux dans les trois zones analysées (Figure 40 F, G et H ; Figure 41 A, B et C). La diminution du diamètre des vaisseaux dans la zone en tension des arbres RNAi-CLE12.2 est plus importante (-13 %) que celle mesurée chez les arbres sauvages. Chez les arbres OE-CLE12.2, on note également que dans les trois zones étudiées, l'application de flexions entraîne une diminution du diamètre des vaisseaux (Figure 40 J, K et L ; Figure 41 A, B et C). La diminution du diamètre des vaisseaux dans la zone en tension des arbres OE-CLE12.2 est identique à celle mesurée chez les arbres sauvages. Si on compare les deux lignées transgéniques entre elles, on peut voir que les flexions ont impacté de la même façon le diamètre des vaisseaux, avec une diminution des vaisseaux dans les trois zones analysées.

Le Tableau 7 présente les valeurs obtenues pour la fréquence de vaisseaux des lignées non fléchies et fléchies. Le nombre de vaisseaux chez les arbres RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis n'est pas significativement différent de celui mesuré chez les sauvages. Après stimulations mécaniques, une diminution du nombre de vaisseaux dans les zones subissant des déformations (tendue et comprimée) ainsi que dans la zone neutre est observée chez les lignées RNAi-CLE12.2. Dans les lignées OE-CLE12.2, on n'observe pas de diminution du nombre de vaisseaux dans la zone neutre mais seulement dans les zones tendue et comprimée. L'absence d'interaction entre le facteur « génotype » et « tissus » montre que l'effet des flexions est indépendant de la lignée analysée *i.e* du niveau d'expression du gène *CLE12.2*.

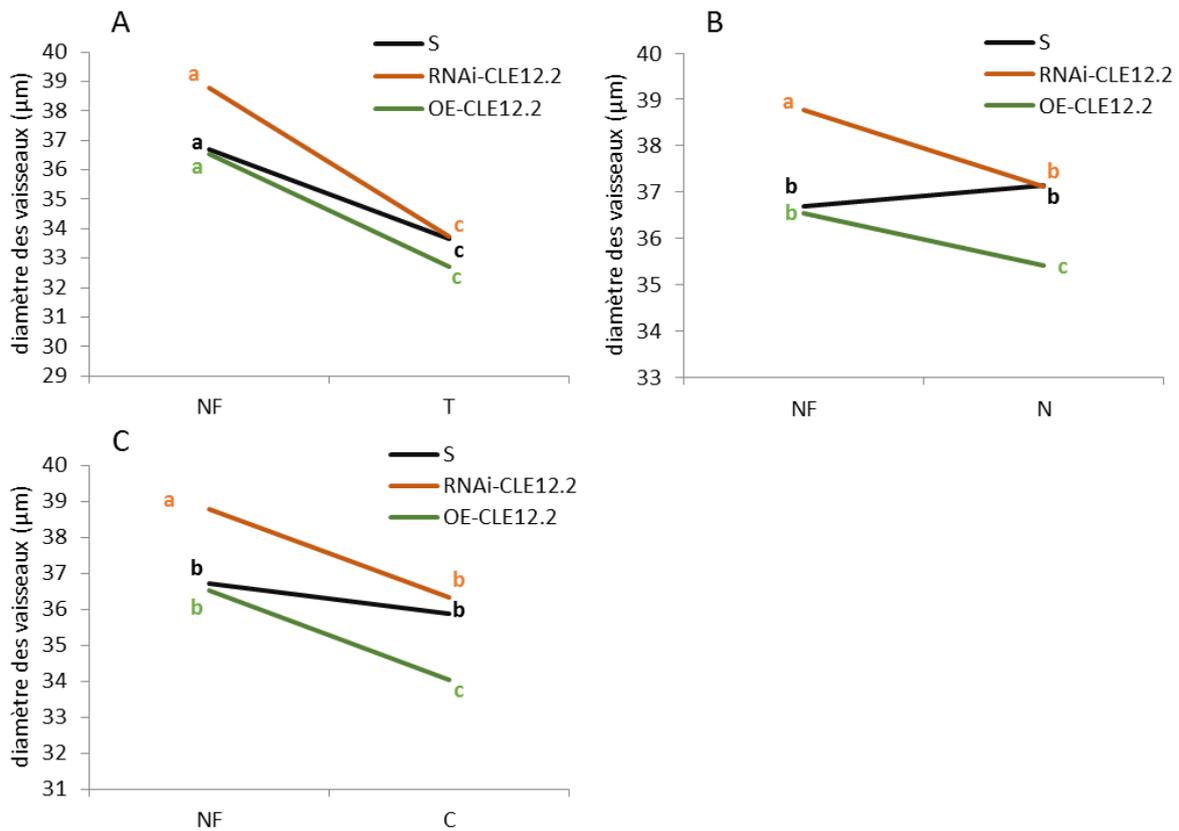


Figure 41 : Variation du diamètre des vaisseaux entre les peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et entre les zones du xylème soumis à différentes déformations.

(A) différence du diamètre des vaisseaux entre les arbres non fléchis (NF) et la zone en tension (T) des arbres fléchis sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2. (B) différence du diamètre des vaisseaux entre les arbres non fléchis (NF) et la zone neutre (N) des arbres fléchis sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2. (C) différence du diamètre des vaisseaux entre les arbres non fléchis (NF) et la zone en compression (C) des arbres fléchis sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2. Les analyses statistiques montrent qu'il y a un effet d'interaction entre les facteurs « génotype » et « tissus » sur le diamètre des vaisseaux (annexe IV). Les résultats de l'ANOVA2 suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Tableau 7 : Modifications de la fréquence des vaisseaux en réponse aux flexions chez les lignées de peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.

Fréquence des vaisseaux (no.mm-2)	Non fléchis	Fléchis		
		Zone en tension	Zone neutre	Zone en compression
Sauvage	197 ^a	148 ^b	158 ^b	160 ^b
RNAi-CLE12-2	198 ^a	177 ^b	181 ^b	168 ^b
OE-CLE12.2	199 ^a	168 ^c	189 ^{ab}	176 ^{bc}

Moyenne \pm se. Les résultats de l'ANOVA2 montrent qu'il n'y a pas d'effet d'interaction entre les facteurs (Annexe IV). Il n'y a pas de différence entre les trois lignées non fléchies. Pour chaque génotype, les différences entre les arbres non fléchis et les différentes zones fléchies ont été analysées par une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ et sont indiquées par les lettres.

III.2.2 Épaisseur de la paroi S et diamètre de fibres

III.2.2.1 Épaisseur de la paroi S

Dans les lignées transgéniques non fléchies, l'épaisseur de la paroi des fibres est augmentée significativement par rapport aux arbres sauvages non fléchis, de 7,7 % pour les arbres RNAi-CLE12.2 et de 9 % pour les arbres OE-CLE12.2 (Figure 42 ; Figure 44 e et i). En absence de flexions, les épaisseurs de paroi des fibres des deux lignées transgéniques sont similaires entre elles. Dans les lignées sauvages, l'application du traitement 1F entraînait une augmentation de l'épaisseur de la paroi des fibres dans les zones en tension et en compression (Figure 42 ; Figure 44 b1 et d). Dans la lignée RNAi-CLE12.2, le régime 1F n'a aucun impact sur l'épaisseur des parois dans la zone en tension (Figure 42 A ; Figure 44 f1). Comme chez les sauvages, aucune variation de l'épaisseur de la paroi n'est détectée dans la zone neutre (Figure 42 B ; Figure 44 g). En revanche, on observe une augmentation significative de l'épaisseur des parois dans la zone en compression des arbres RNAi-CLE12.2 fléchis par rapport aux arbres RNAi-CLE12.2 non fléchis (Figure 42 C ; Figure 44 h). Par comparaison avec les arbres sauvages où la flexion induit l'augmentation de l'épaisseur de paroi de 4,6 % dans la zone en compression, l'augmentation observée dans la zone en compression chez la lignée RNAi-CLE12.2 est de 12.2 %.

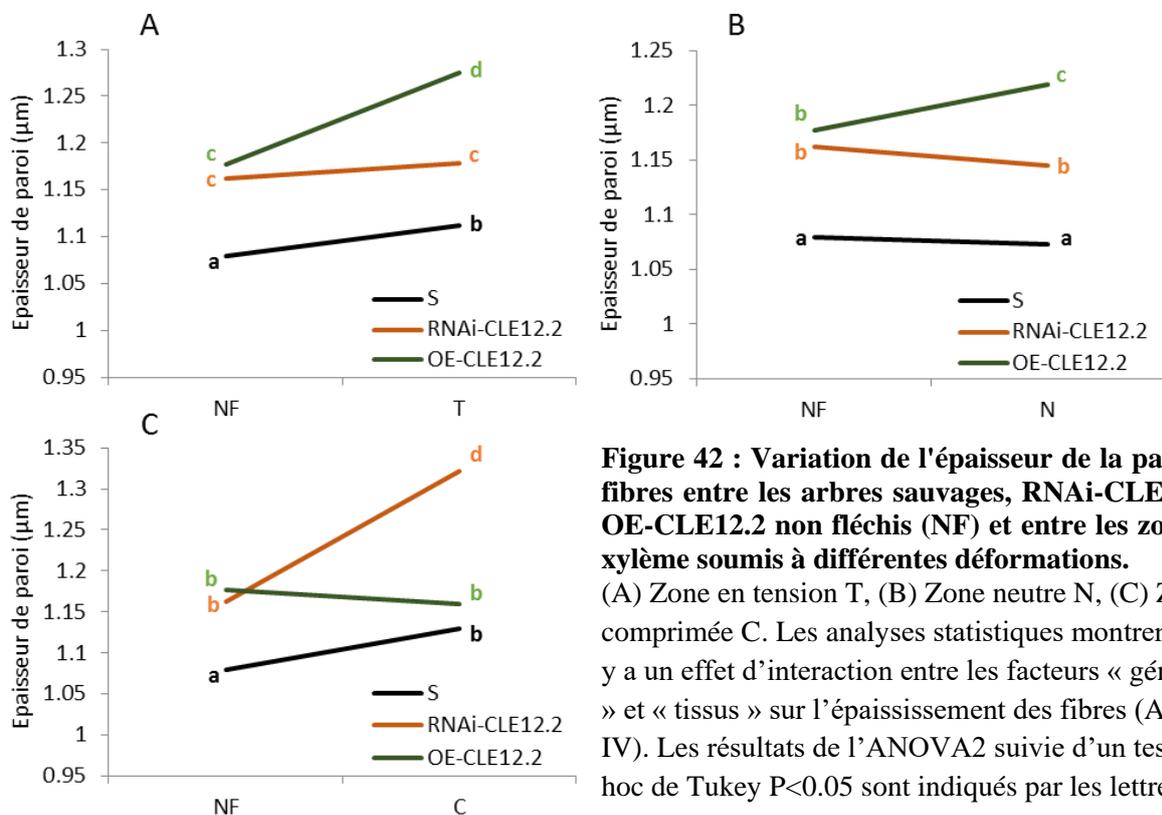


Figure 42 : Variation de l'épaisseur de la paroi des fibres entre les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et entre les zones du xylème soumis à différentes déformations.

(A) Zone en tension T, (B) Zone neutre N, (C) Zone comprimée C. Les analyses statistiques montrent qu'il y a un effet d'interaction entre les facteurs « génotype » et « tissus » sur l'épaississement des fibres (Annexe IV). Les résultats de l'ANOVA2 suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Chez les arbres OE-CLE12.2, les flexions entraînent une augmentation de l'épaisseur des parois des fibres dans la zone en tension de 8,4 % par rapport aux arbres non fléchis (Figure 42 A ; Figure 44 j1). Cette augmentation est plus importante que celle mesurée dans la zone en tension des arbres sauvages qui était de 3 % par rapport aux arbres non fléchis. Toujours chez les arbres OE-CLE12.2, on observe une augmentation de l'épaisseur de paroi des fibres dans la zone neutre (Figure 42 B ; Figure 44 k) qui n'était pas observée chez les arbres sauvages. En revanche, dans la zone en compression des arbres OE-CLE12.2, on n'observe pas de modification de l'épaississement de la paroi par rapport aux arbres OE-CLE12.2 non fléchis (Figure 42 C ; Figure 44 i).

Pour résumer, l'épaisseur de la paroi des fibres dans les lignées transgéniques non fléchies est supérieure à celle mesurée chez les arbres sauvages non fléchis. Les flexions ont généré une augmentation de l'épaisseur de la paroi dans les zones neutre et en tension chez les arbres OE-CLE12.2, mais pas en compression. A l'inverse, les flexions n'ont eu aucun effet sur l'épaisseur de la paroi des fibres dans les zones en tension et neutre chez les lignées RNAi-CLE12.2, mais ont induit une augmentation uniquement dans la zone en compression.

Dans la zone en tension, les lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 présentent des fibres à couche G (TcG) comme chez les arbres sauvages. Au niveau de ces fibres à couche G, les résultats montrent que l'épaisseur de la couche G est plus importante chez les lignées transgéniques par rapport à celle mesurée chez les arbres sauvages (Figure 43 ; Figure 44 f2 et j2). L'épaisseur de la paroi S dans ces fibres à couche G est significativement diminuée dans les lignées transgéniques par rapport à la lignée sauvage.

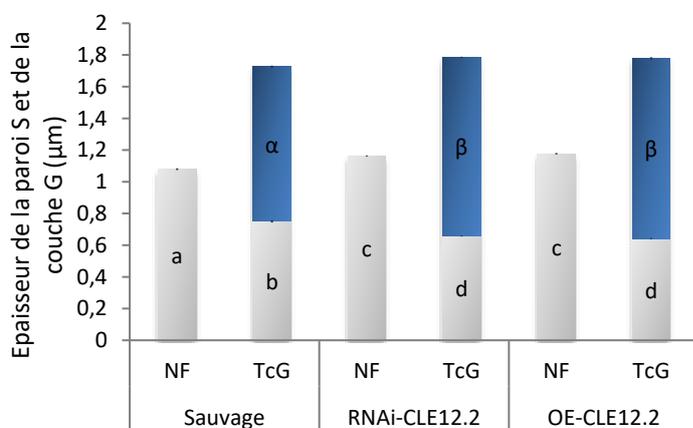


Figure 43: Variation de l'épaisseur de la paroi et de la couche G des peupliers sauvages fléchis et des lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.

Moyenne \pm se. L'épaisseur de la paroi S est représentée par les barres grisées, et l'épaisseur de la couche G par des barres de couleur bleue. NF : Non fléchis, TcG : fibres à couche G. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres (a, b et c pour la paroi S et α et β pour la couche G).

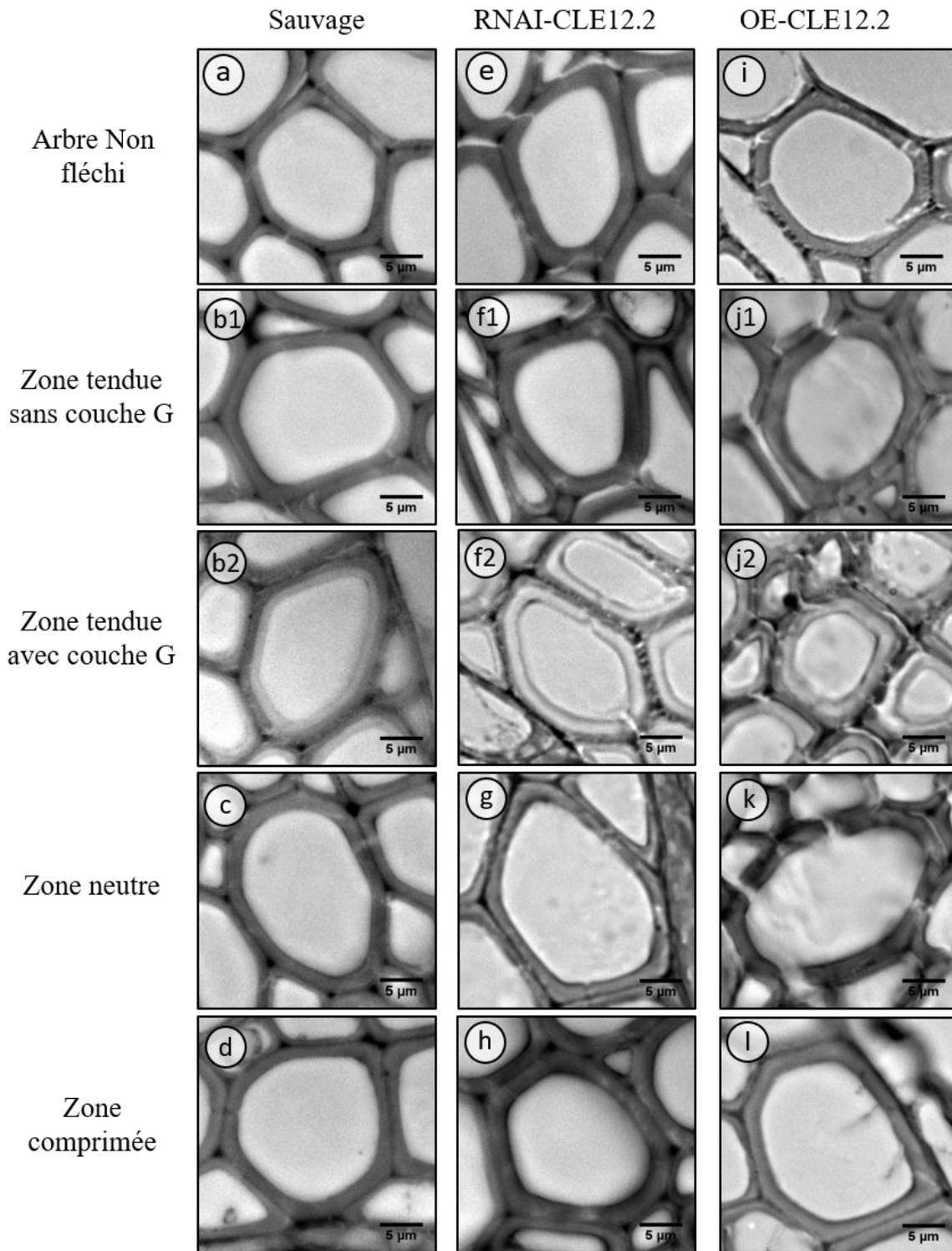


Figure 44 : Anatomie des fibres des peupliers sauvages, RNAI-CLE12.2 et OE-CLE12.2 à la suite du traitement 1F.

Coupes transversales de bois inclus en résine, réalisées pour les mesures de diamètre des fibres et de l'épaisseur de paroi et de couche G. a à d : arbres sauvages ; e à h : arbres RNAi-CLE12.2 ; i à l : arbres OE-CLE12.2 ; a, e et i : arbres non fléchis ; b1, f1 et j1 : zone tendue sans couche G ; b2, f2 et j2 : zone tendue avec couche G ; c, g et k : zone neutre ; d, h et l : zone comprimée. Coloration au bleu de toluidine.

III.2.2.1 Diamètre des fibres

Dans les lignées transgéniques non fléchies, les analyses montrent que le diamètre de fibres est significativement plus important par rapport à celles des arbres sauvages non fléchis, avec une augmentation de 10 % du diamètre chez les arbres RNAi-CLE12.2 et de 12 % chez les arbres OE-CLE12.2 (Figure 45 ; Figure 44 e et i).

Chez les arbres sauvages, après stimulation mécanique, on observait une augmentation du diamètre des fibres dans les zones en tension (fibres avec et sans couche G), neutre et en compression (Figure 45 ; Figure 44 e et i). Chez les arbres RNAi-CLE12.2, en réponse aux flexions, on n'observe pas d'augmentation du diamètre des fibres dans les zones en tension (T et TcG) et neutre (Figure 45 A, D et B) ; Figure 44 f1, f2 et g).

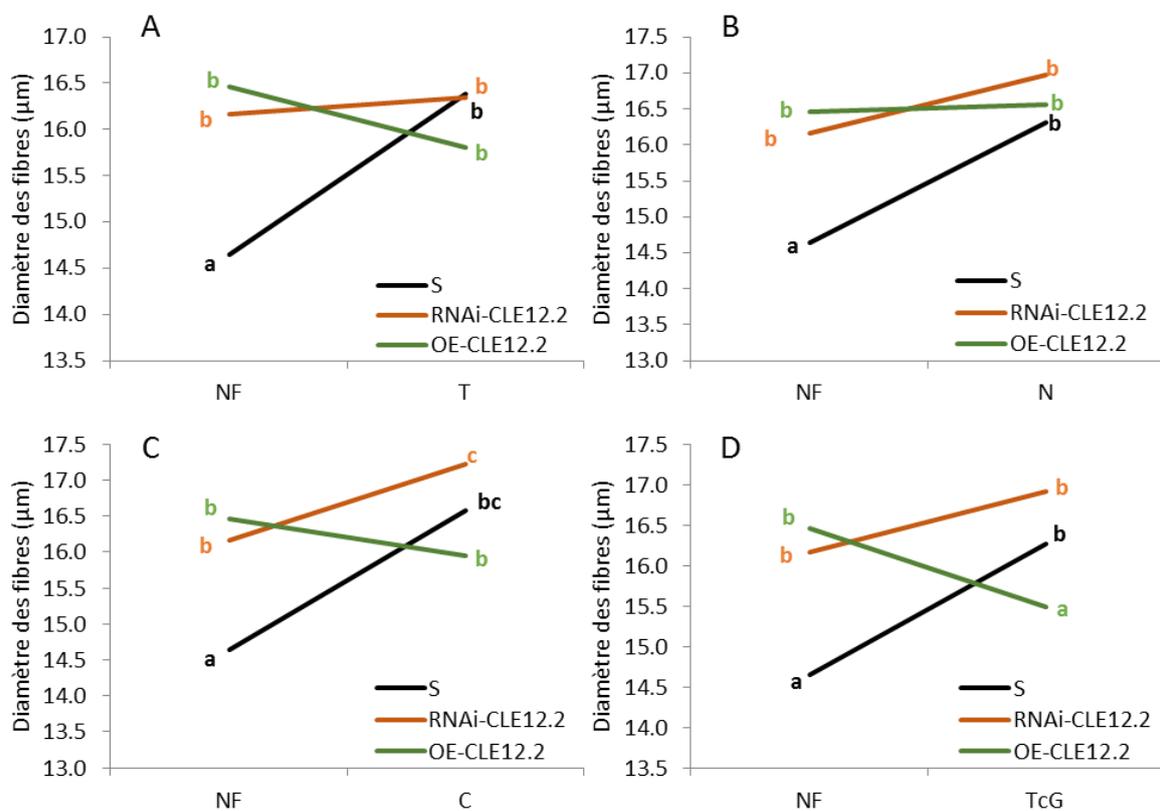


Figure 45 : Modification du diamètre des fibres entre les peupliers sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et entre les zones du xylème soumis à différentes déformations.

(A) Zone en tension T, (B) Zone neutre N, (C) Zone comprimée C, (D) Fibres à couche G dans la zone en tension (TcG). Le diamètre des fibres a été mesuré sur 50 fibres chez les arbres sauvages NF et dans les zones fléchies et sur approximativement 100 fibres chez les lignées transgéniques NF et dans les zones fléchies à l'aide du logiciel ImageJ. Les analyses statistiques montrent qu'il y a un effet d'interaction entre les facteurs « génotype » et « tissus » sur le diamètre des fibres (Annexe IV). Les résultats de l'ANOVA2 suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Une augmentation significative du diamètre des fibres est observée uniquement dans la zone en compression chez les arbres RNAi-CLE12.2 (Figure 45 C ; Figure 44 h). Chez les arbres OE-CLE12.2, on note que l'application de flexions n'a pas eu d'effet sur le diamètre des fibres dans les zones en tension (T : fibres sans couche G), neutre et en compression (Figure 45 A, B et C ; Figure 44 j1, k et l). On observe cependant une diminution significative du diamètre des fibres avec couche G chez les arbres OE-CLE12.2 fléchis (Figure 45 D ; Figure 44 j2).

III.3 Réponses moléculaires

Le niveau d'expression du gène *POPFLA6* présente sensiblement le même profil d'expression entre les lignées sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 (Figure 46). Une surexpression significative du gène est retrouvée dans la zone en tension et une diminution significative du niveau d'expression du gène est observée dans la zone en compression de la tige. L'expression au niveau de la zone neutre des arbres transgéniques ne présente pas de différence significative avec la valeur mesurée chez les arbres non fléchis ainsi que celle mesurée dans la zone en compression.

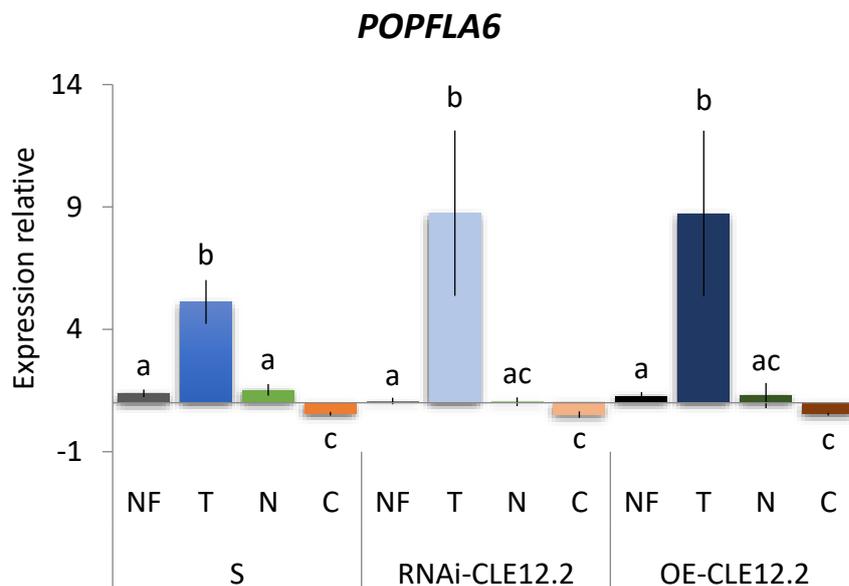


Figure 46: Expression relative du gène *POPFLA6* chez les peupliers sauvages (S), RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et dans le xylème soumis à différents types de déformations.

Expression relative du gène dans les zones en tension (T), neutre (N) et en compression (C) par rapport aux arbres sauvages non fléchis. Les valeurs sont les moyennes de $n = 8$ arbres NF et $n = 8$ arbres 1F sauvages ; $n = 14$ arbres NF et $n = 16$ arbres 1F RNAi-CLE12.2 ; $n = 15$ arbres NF et $n = 13$ arbres 1F OE-CLE12.2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les résultats de l'ANOVA au sein de chaque lignée, suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

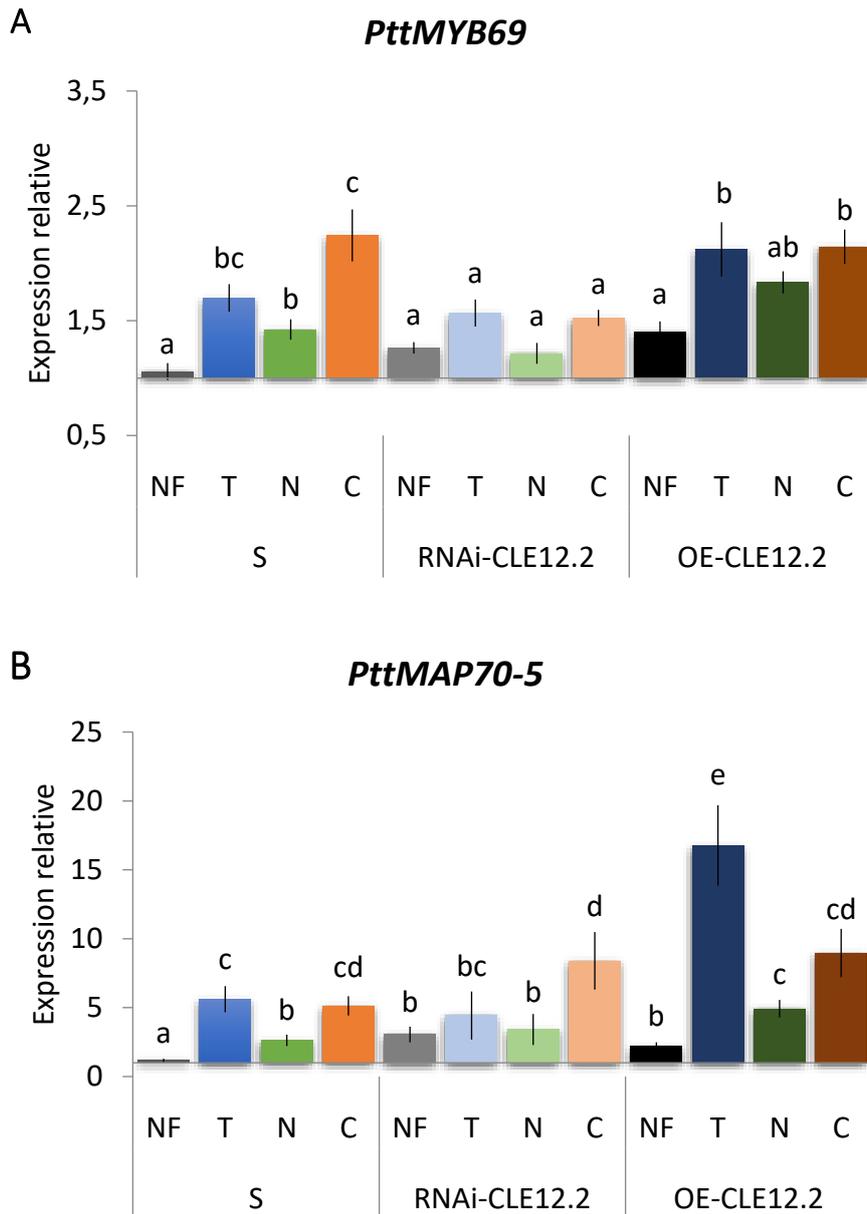


Figure 47: Niveau d'expression du gène *PttMYB69* (A) et *PttMAP70-5* (B) chez les peupliers sauvages (S), RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis (NF) et dans le xylème soumis à différents types de déformations.

Expression relative des gènes dans les zones en tension (T), neutre (N) et en compression (C) par rapport aux arbres sauvages non fléchis. Les valeurs sont les moyennes de $n = 8$ arbres NF et $n = 8$ arbres 1F sauvages ; $n = 14$ arbres NF et $n = 16$ arbres 1F RNAi-CLE12.2 ; $n = 15$ arbres NF et $n = 13$ arbres 1F OE-CLE12.2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les résultats de l'ANOVA2 (Annexe II) suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Dans les arbres non fléchis RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2, le niveau d'accumulation des ARNs *PttMYB69* est similaire à celui des peupliers sauvages non fléchis (Figure 47 A). Comme dans les peupliers sauvages, lorsqu'on applique des flexions aux arbres OE-CLE12.2, l'expression du gène est augmentée de manière significative dans les parties de la tige subissant les plus fortes déformations, soit en tension soit en compression. En revanche, chez les arbres RNAi-CLE12.2, l'application de flexions n'entraîne aucune modification de l'expression du gène quelle que soit la zone considérée. En ce qui concerne le gène *PttMAP70-5*, l'analyse montre que son expression est induite de manière significative dans les lignées transgéniques non fléchies RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 par rapport aux arbres sauvages non fléchis (Figure 47 B). Dans la lignée RNAi-CLE12.2, en réponse aux flexions, une augmentation significative de l'expression du gène est mesurée dans la zone en compression de la tige seulement. Chez les lignées OE-CLE12.2, l'expression du gène est significativement augmentée dans les trois zones étudiées, avec une surexpression plus importante dans la zone en tension.

IV. Discussion

IV.1 Comparaison de la réponse thigmomorphogénétique des peupliers hybrides *P. tremula* x *P. alba* et *P. tremula* x *P. tremuloides*

En comparant les deux hybrides de peuplier, nous avons pu voir que l'ensemble des réponses thigmomorphogénétiques observées chez l'hybride *Pta* se retrouvaient chez l'hybride *Ptt*, à la fois au niveau des paramètres de croissance, d'anatomie et de réponses moléculaires. Cependant, pour plusieurs paramètres (croissance dans le sens perpendiculaire à la flexion, fréquence de vaisseaux, diamètres des fibres, expression de gènes), des variations ont également été observées dans la zone neutre de la tige. Or nos résultats du chapitre I et II suggèrent l'hypothèse que l'amplitude de ces réponses dépend de la perception par les cellules de la valeur absolue des déformations ou du signe de ces déformations. Comment expliquer les résultats obtenus au niveau de la zone neutre ? Rappelons que sous l'effet des flexions, les cellules sont soumises à un champ de déformations au sein de la tige (Figure 48). Nous avons défini la zone neutre comme la zone dont les cellules subissent le plus faible niveau de déformations autour de la ligne neutre. L'hypothèse pour expliquer cette modification de croissance aussi dans le sens perpendiculaire à la flexion serait que le gradient de déformations est plus fort dans ces arbres de petits diamètres, ce qui rend difficile l'échantillonnage dans une zone où la déformation resterait nulle. Pour la même raison, le plus faible diamètre des arbres *Ptt* a rendu plus difficile la délimitation des différentes zones au cours des prélèvements. Pour les analyses

d'expression de gènes et les analyses d'images, il est donc probable qu'en analysant la zone dite neutre, des cellules déformées dans la zone comprimée et la zone tendue aient également pu être prises en compte.

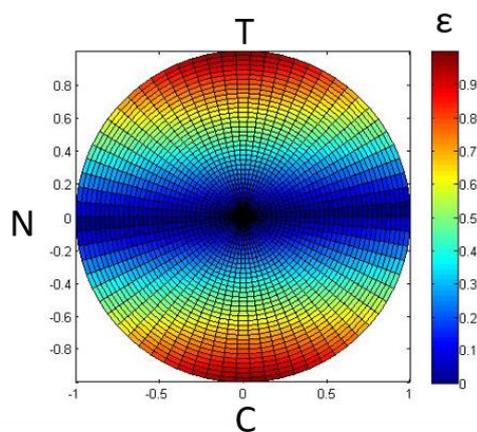


Figure 48 : Modélisation du champ de déformation (ε) au sein d'une section de tige lors d'une flexion.

Les couleurs indiquent l'intensité relative (échelle arbitraire entre 0 et 1) des déformations, avec en bleu intensité = 0 (ligne neutre) et en rouge intensité de déformation maximum = 1. L'application d'une flexion entraîne un champ de déformation hétérogène avec des déformations négatives en compression (C), et positives en tension (T). La zone neutre est la zone subissant le plus faible niveau de déformations (voire nulle sur la ligne neutre).

IV.2 Rôle du gène *PttCLE12.2*

Dans ce chapitre, nous avons montré que le gène *CLE12.2* est exprimé dans la tige chez le peuplier à la suite de flexions multiples. Son expression est principalement localisée dans les zones subissant de fortes déformations : la zone en tension et la zone en compression. Les gènes de la famille CLAVATA sont connus pour réguler les activités méristématiques et la différenciation des cellules. L'étude de Gerttula *et al.* (2015) a montré que le gène *CLE12.2* appartiendrait à un module de co-expression associant des gènes régulant l'angle des microfibrilles, la cristallinité de la cellulose ainsi que les hormones et la paroi cellulaire. L'hypothèse étudiée dans notre analyse était que la régulation du gène *PttCLE12.2* dans les zones tendue et comprimée en réponse à la flexion pourrait expliquer l'augmentation de la croissance radiale dans le sens de la flexion et/ou les différences anatomiques observées, et plus particulièrement les régulations de la formation des parois cellulaires.

IV.2.1 Rôle de *CLE12.2* en absence de flexion

IV.2.1.1 Réponses en croissance

Lors de nos expérimentations, nous avons observé que les arbres transgéniques non fléchis présentent un accroissement en diamètre moyen plus important par rapport aux arbres sauvages. Ce diamètre plus important peut expliquer que le ratio $\Delta H:\Delta D$ soit inférieur chez les lignées transgéniques non fléchies par rapport aux arbres sauvages. Cette augmentation du diamètre moyen laisse penser que la perte d'homéostasie de l'expression de *PttCLE12.2* dans les plantes transgéniques a entraîné une modification de l'activité du cambium. En effet, que ce

soit dans le méristème apical *via* le gène *CLV3* ou dans le cambium *via* le gène *CLE41*, l'expression et la localisation de ces gènes permet, au moyen de boucles de rétrocontrôle, de maintenir la spatialisation de l'activité du méristème (Dodueva *et al.*, 2012).

IV.2.1.2 Réponses anatomiques-anatomie des fibres

Dans les arbres non fléchis RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2, nous avons montré une augmentation de l'épaisseur de la paroi des fibres et de leur diamètre (Tableau 8). Comment pourrait-on expliquer ces modifications au niveau moléculaire ? Dans nos expérimentations, les niveaux d'expression relatifs du gène *PttMAP70-5* dans les lignées transgéniques non fléchies montrent que le gène est surexprimé par rapport aux plantes sauvages non fléchies. Le gène *MAP70-5* serait un gène essentiel pour déterminer la position des microtubules servant à guider les complexes de cellulose synthase (Pesquet *et al.*, 2010). Dans notre étude, l'augmentation de l'expression du gène *PttMAP70-5* peut être mise en relation avec l'épaississement pariétal observé chez les arbres non fléchis transgéniques. Dans les lignées RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchies, le niveau d'expression relatif du gène *PttMYB69* est identique à celui des arbres sauvages non fléchis. Cependant, on observe des différences entre les deux lignées transgéniques OE-CLE12.2. Dans la lignée OE-15 non fléchie (où l'expression de *CLE12.2* est multipliée par 4.39), l'expression du gène *PttMYB69* est significativement augmentée par rapport aux arbres sauvages non fléchis. Ce résultat n'est pas observé pour la lignée OE-16 (où l'expression de *CLE12.2* est multipliée par 2.18). Le gène *PttMYB69* code un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la formation de la paroi (Zhong *et al.*, 2008). L'hypothèse d'un niveau seuil de l'expression de *PttCLE12.2* pourrait expliquer les différences observées entre les deux lignées OE-CLE12.2 non fléchies.

Tableau 8 : Récapitulatif des différences observées sur l'épaisseur de parois des fibres et de leur diamètre entre les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.

Paramètres mesurés	Épaisseur de paroi			Diamètre des fibres		
	Sauvage	RNAi-CLE12.2	OE-CLE12.2	Sauvage	RNAi-CLE12.2	OE-CLE12.2
Arbres non fléchis	-	↗	↗	-	↗	↗

L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle important de ce peptide dans l'activité cambiale chez le peuplier, et en particulier dans la mise en place des parois des fibres du bois. Toutefois, le mode d'action de ce peptide semble complexe puisque les réponses des deux types de lignées transgéniques non fléchies RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 sont similaires dans la plupart des cas alors que le niveau d'expression du gène est respectivement inhibé ou augmenté dans ces lignées. Il est connu dans la littérature que les réponses régulées par les peptides CLAVATA peuvent dépendre d'une régulation dose-réponse impliquant des boucles de rétroaction. Ainsi, dans la racine d'*Arabidopsis*, il a été montré que la réduction de l'activité de CLE40 permettait la prolifération des cellules souches, alors que les niveaux élevés de CLE40 favorisaient la différenciation des cellules distales, montrant un phénomène de dose-réponse (Stahl *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que le gène *PttCLE12.2* pourrait réguler deux voies de signalisation : une voie principale, qui par l'intermédiaire d'un récepteur R1 activerait l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la paroi et une voie secondaire et limitante qui, par l'intermédiaire d'un récepteur R2 inhiberait l'expression des gènes de la biosynthèse de la paroi. Dans le cas des lignées OE-CLE12.2 la voie du récepteur R1 serait privilégiée par rapport à R2 et augmenterait l'épaisseur des parois. On peut d'ailleurs noter que l'augmentation de l'épaisseur de la paroi des fibres est plus importante dans les arbres de la lignée OE-15 (où l'expression de *CLE12.2* est multipliée par 4,39) que celle observée chez la lignée OE-16 (où l'expression de *CLE12.2* est multipliée par 2,18). Dans les lignées RNAi-CLE12.2, la diminution de l'expression du gène n'aurait plus d'effet sur la voie R2, ce qui empêcherait l'inhibition de la formation de la paroi, mais serait capable d'activer la voie R1 (Figure 49). Pour le diamètre des fibres, nous pourrions adopter un raisonnement similaire avec la voie R1 qui serait alors privilégiée.

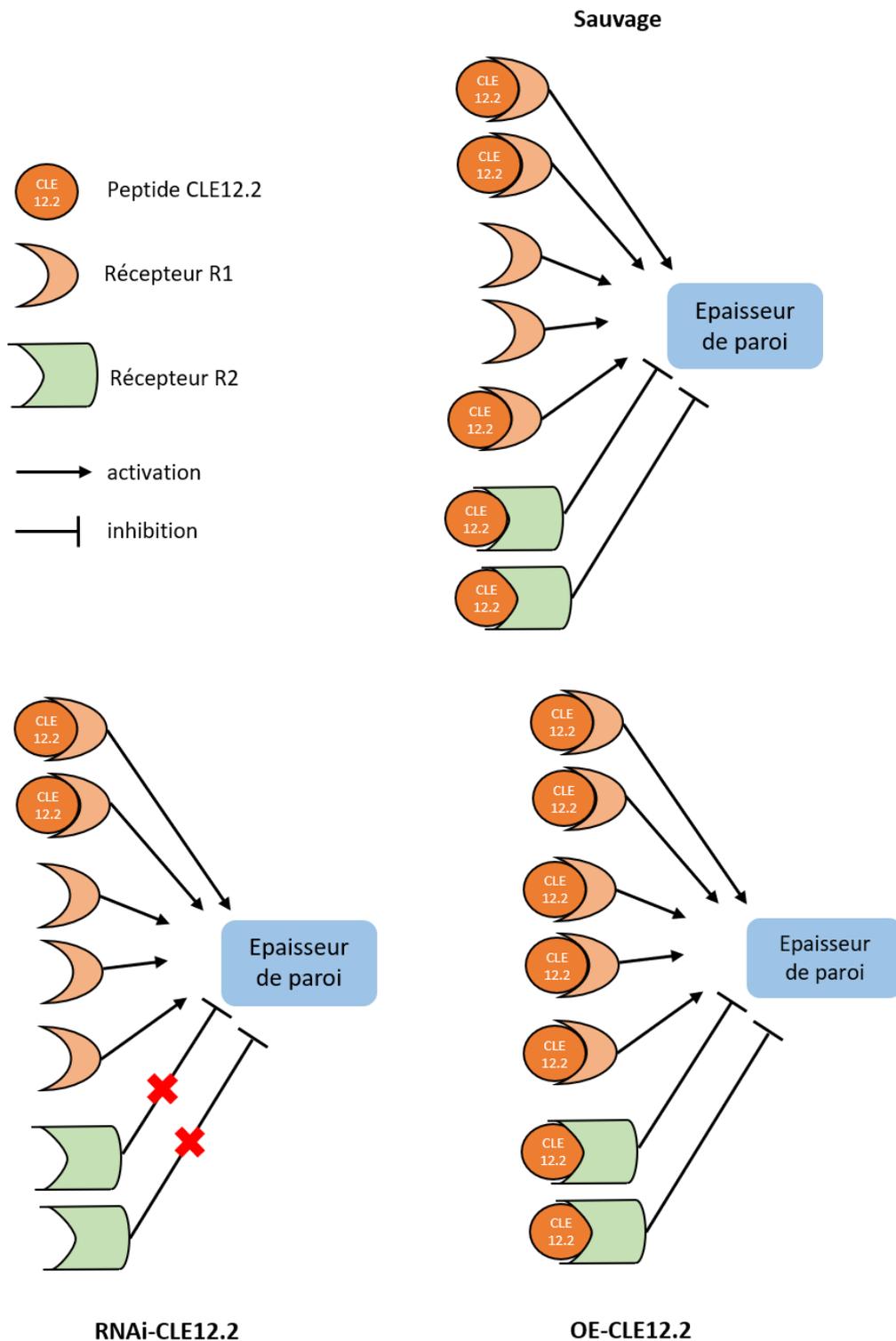


Figure 49 : Régulation de la biosynthèse de la paroi par la régulation du peptide CLE12.2.

Chez les arbres sauvages, CLE12.2 régulerait deux voies de signalisation qui activeraient (R1) ou inhiberaient (R2) la voie de biosynthèse de la paroi. Chez les arbres RNAi-CLE12.2, la voie du récepteur R2 ne jouerait plus son rôle d'inhibition mais la faible expression de *PttCLE12.2* permettrait l'augmentation de la paroi *via* les récepteurs R1. Chez les arbres OE-CLE12.2, la surexpression du gène activerait plus fortement les voies d'activation R1 mais aussi les voies de répression R2.

IV.2.1.3 Réponses sur la formation des vaisseaux

Dans nos expérimentations, nous avons vu que le diamètre des vaisseaux des arbres RNAi-CLE12.2 non fléchis est significativement augmenté par rapport aux arbres sauvages non fléchis (Tableau 9). Nous n’observons pas de différence chez les lignées OE-CLE12.2 non fléchies par rapport aux sauvages. On pourrait supposer que la diminution de l’expression du gène *PttCLE12.2* dans les lignées RNAi-CLE12.2 ait provoqué une modification de la composition de la paroi qui deviendrait alors plus souple. Lors de la maturation des vaisseaux, la diminution de la rigidité de la paroi entraînerait l’augmentation de leur taille chez les arbres RNAi-CLE12.2 non fléchis.

Tableau 9 : Récapitulatif des différences observées dans le diamètre des vaisseaux et de leur nombre chez les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2.

Paramètres mesurés	Diamètre des vaisseaux			Densité de vaisseaux		
	Sauvage	RNAi-CLE12.2	OE-CLE12.2	Sauvage	RNAi-CLE12.2	OE-CLE12.2
Arbres non fléchis	-	↗	-	-	-	-

IV.2.2 Rôle de CLE12.2 dans la mise en place de la réponse thigmomorphogénétique

Rappelons que dans les peupliers sauvages, les flexions déclenchent une augmentation de l’expression de *CLE12.2* dans les zones tendue et comprimée de la tige, indépendamment du signe de la déformation. Dans les plantes OE-CLE12.2, le profil d’expression de *PttCLE12.2* est similaire après flexion, c’est-à-dire une augmentation de l’expression dans les deux zones subissant les plus fortes déformations. En revanche, dans les plantes RNAi-CLE12.2, aucune expression de *PttCLE12.2* n’est observée suite aux flexions.

Après stimulations mécaniques des arbres transgéniques, nos analyses montrent que la réponse de croissance radiale aboutissant à l’ovalisation de la tige n’est pas impactée dans les plantes RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2, ni la diminution de la fréquence des vaisseaux. Suite aux flexions, le niveau d’expression du gène *PttCLE12.2* n’a impacté ni la réponse en croissance, ni la diminution de la fréquence des vaisseaux.

Nos analyses montrent que ce sont de nouveau les caractéristiques anatomiques des fibres qui sont le plus impactés (Tableau 10). Ainsi, alors que la flexion entraîne une augmentation de l’épaisseur des parois des fibres et de leur diamètre dans les zones tendue et comprimée chez les arbres sauvages, dans les plantes RNAi-CLE12.2 la flexion stimule une augmentation de l’épaisseur et du diamètre des fibres uniquement dans la zone en compression. Les effets des flexions sont annulés dans la zone tendue et exacerbés dans la zone comprimée. L’absence d’induction de *PttCLE12.2* suite à une flexion déclenche des réponses contrastées de part et

d'autre de la ligne neutre ; comme si l'absence du peptide PttCLE12.2 dans la zone en compression chez les lignées RNAi-CLE12.2 avait supprimé une inhibition. A l'inverse, chez les lignées OE-CLE12.2, l'épaisseur des fibres est augmentée dans les zones en tension et neutre alors que l'épaisseur des fibres reste inchangée dans la zone en compression par rapport aux arbres non fléchis OE-CLE12.2.

Tableau 10 : Récapitulatif des résultats sur l'épaisseur de la paroi des fibres et de leur diamètre chez les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.

Paramètres mesurés	Épaisseur de paroi			Diamètre des fibres		
	Génotypes Conditions	Sauvage	RNAi- CLE12.2	OE-CLE12.2	Sauvage	RNAi- CLE12.2
Non fléchis	-	↗	↗	-	↗	↗
Zone en tension	↗	-	↗	↗	-	-
Zone neutre	-	-	↗	↗	-	-
Zone compression	↗	↗	-	↗	↗	-
Zone en tension avec couche G	↘	↘	↘	↗	-	↘
Couche G	-	↗	↗			

Au niveau moléculaire, parmi les gènes testés, le profil d'expression de *PttMYB69* est impacté chez les lignées RNAi-CLE12.2 ; son expression relative n'étant plus modifiée par la flexion. Pour les lignées OE-CLE12.2, on observe le même profil d'expression du gène que dans les arbres sauvages fléchis. De manière intéressante, alors que *PttMAP70-5* est surexprimé dans les plantes RNAi-CLE12.2 non fléchies, son profil de régulation après flexion suit les différences anatomiques observées dans les fibres des plantes RNAi-CLE12.2 ; c'est-à-dire une augmentation ciblée dans la zone comprimée. On retrouve le phénomène inverse chez les lignées OE-CLE12.2, avec une augmentation plus importante de son expression dans la zone en tension.

Comment expliquer ces différences ? Chez les lignées OE-CLE12.2, en réponse à la flexion, l'augmentation de l'expression du gène dans la partie en tension activerait plus fortement la voie de signalisation R1 ce qui entraînerait un épaississement de la paroi. Dans la zone en compression on peut supposer que la quantité de CLE12.2 entraînerait l'inhibition d'une voie de signalisation alternative de la biosynthèse des parois. Chez les lignées RNAi-CLE12.2, en réponse à la flexion, la diminution de l'expression du gène n'entraînerait pas

d'augmentation supplémentaire de l'épaisseur de paroi dans les zones en tension. En revanche, dans la zone en compression, la levée de l'inhibition du récepteur R3 entraînerait l'augmentation importante de l'épaisseur de la paroi.

En conclusion, il est difficile de se prononcer sur le rôle exact du peptide CLE12.2 dans la formation du bois normal ou des TFW et CFW. Cependant nous avons montré que la modulation de son expression entraînait des variations importantes de l'anatomie du bois et de l'expression des gènes impliqués dans la formation du bois, et ce que ce soit pour des arbres non fléchis ou fléchis. Pour essayer de creuser la question du rôle de CLE12.2, il serait intéressant d'identifier son récepteur. A ce stade, les hypothèses que nous pouvons émettre sur le rôle du peptide CLE12.2 sont que (i) le peptide CLE12.2 interviendrait dans le contrôle des épaisseurs de paroi et du diamètre des fibres en réponse à la flexion (ii) l'activité du peptide serait régulée par le signe de la déformation et (iii) il y aurait un effet dose de la quantité de CLE12.2 qui régulerait, soit en les activant soit en les inhibant, des voies de signalisation impliquées dans les modifications de constructions pariétales. Enfin, en réponse à la flexion, les zones en tension et en compression seraient le lieu de régulations réalisées par deux mécanismes distincts où CLE12.2 jouerait un rôle d'inhibiteur dans la zone en compression.

Discussion générale

I. Réponses thigmomorphogénétiques : un mécanisme adaptatif

L'étude des mouvements induits par le vent sur les plantes est motivée par des problématiques de recherche importantes (agronomie, industrie de la filière bois). Les problèmes majeurs liés à l'action du vent concernent l'endommagement des cultures par la verse, le risque de casse et l'influence des contraintes mécaniques sur la croissance des plantes. Ce dernier effet est appelé la thigmomorphogénèse et constitue un domaine de recherche en plein essor. Mes travaux de thèse ont eu pour but de caractériser les réponses du peuplier aux sollicitations mécaniques mimant l'effet du vent. Les moments de flexion induits par le vent entraînent des déformations et des contraintes répétées au sein de la tige. Des études précédentes menées au laboratoire PIAF avaient permis d'identifier la variable mécanique perçue par la plante comme étant les déformations (Coutand et Moulia, 2000). L'étude de Coutand *et al.* (2009) avait permis de montrer que la réponse à la flexion déclenche une réponse locale caractérisée par l'augmentation de la croissance radiale, dont l'amplitude dépend de l'intensité des déformations. Toutefois, lors d'une flexion unidirectionnelle, c'est un champ de déformations hétérogènes qui est généré au sein de la tige, avec des déformations maximales en tension (d'un signe positif) d'un côté et des déformations en compression (d'un signe négatif) de l'autre. Grâce à notre étude nous avons montré que cette réponse de croissance radiale dépendait de la valeur absolue des déformations, la réponse étant de même intensité dans les deux zones. L'originalité de notre dispositif expérimental nous permettant d'appliquer des flexions unidirectionnelles et d'intensité contrôlée, nous a permis de caractériser pour la première fois l'anatomie du bois formé en fonction de la déformation appliquée ; la distinction des zones stimulées en tension ou en compression n'ayant jusqu'alors jamais été envisagée. Nos études ont révélé que la différenciation cellulaire était modulée en fonction de la valeur absolue des déformations mais aussi du signe de ces déformations, suggérant des mécanismes de perception différents. Pour la première fois, les modifications anatomiques des bois formés sous sollicitations mécaniques ont été mises en relation avec des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi. L'hypothèse de l'implication d'un gène mécanosensible *PttCLE12.2* sur la régulation de la croissance radiale et sur les modifications de caractéristiques anatomiques a pu être également testée par l'utilisation de plants transgéniques. Cette étude a révélé que le peptide CLE12.2 régulerait des acteurs moléculaires impliqués dans la biosynthèse de la paroi et qu'un mécanisme spécifique du côté en compression était mis en place. Ces résultats nous ont permis d'affiner la terminologie de « bois de flexion » proposé par Telewski (1989) avec

d'un côté le bois formé sous des déformation en tension : le *Tensile Flexure Wood* (TFW) et le bois formé en compression, le *Compressive Flexure Wood* (CFW).

Afin de tester l'effet de la dose appliquée sur les réponses observées, nous avons étudié l'effet de deux régimes de flexion : l'un comportant 3 flexions par semaine (1F) et le second 15 flexions par semaine (3F), sur la croissance et l'anatomie du bois de peuplier. Le modèle S³m postule que la réponse en croissance des plantes s'effectue quantitativement en fonction d'une dose de signal reçu dans les cellules vivantes. Dans notre étude, l'augmentation du nombre de déformations (dose de signal) n'a pas eu d'effet additif sur la réponse en croissance radiale du peuplier. Dans le cadre du modèle S³m, ce phénomène peut être expliqué par un ajustement de la sensibilité, ou par une augmentation du seuil de perception. Dans leur étude sur des flexions multiples, Telewski et Pruyn, (1998) n'observaient aucune différence sur la croissance en diamètre d'arbres sollicités par 5 flexions ou 80 flexions journalières. L'effet non additif des flexions pourrait être expliqué par une désensibilisation et/ou une saturation des sites mécanoperceptifs. Ce phénomène, nommé accommodation à la flexion (Martin et al., 2010), permet à un arbre sollicité fréquemment de ne pas sur-réagir aux sollicitations chroniques mais de réagir efficacement aux variations anormales de sollicitations (Bonnesoeur *et al.*, 2016). Dans notre étude, l'augmentation du nombre de flexions a conduit à la formation d'une tige dont la section transversale présente une forme de poire. Dans le CFW des arbres 3F, nous avons également observé une épaisseur de paroi de fibres plus importante par rapport aux arbres 1F. L'arbre semble avoir donc ajusté sa croissance au nombre de déformations subies. Le bois étant moins résistant aux efforts mécaniques en compression, l'augmentation de la quantité de bois formé conjuguée aux épaisseurs de paroi plus importantes apporterait à la tige un avantage mécanique afin de mieux résister aux sollicitations futures. Etant donné qu'en conditions naturelles l'intensité et la direction du vent varient, il serait intéressant d'étudier la réponse des arbres à la suite de flexions bidirectionnelles et également d'alterner la direction des sollicitations pour observer les ajustements de croissance engendrés. Durant ma thèse, nous n'avons pu étudier que l'effet d'une intensité de déformations. La mise en place d'expérimentations appliquant une gamme d'intensité de déformations différentes permettrait d'avancer dans la compréhension des phénomènes d'accommodation. Comprendre ce phénomène d'accommodation et le mécanisme de restauration de la sensibilité lorsque les sollicitations s'arrêtent est un point clé pour expliquer les réponses thigmomorphogénétiques.

II. La perception des déformations permet la mise en place du TFW et du CFW

Dans notre étude, le TFW partage des caractéristiques anatomiques avec le bois de tension, formé sous stress gravitropique, comme la présence de fibres à couche G. Toutefois, la couche G observée dans le TFW est à la fois moins abondante et plus fine que celle observée dans le bois de tension, nous amenant à penser que le TFW pourrait être qualifié de bois de tension avorté. Si cette hypothèse était validée, alors le TFW serait formé en réponse à la gravité et les mécanismes de perception conduisant à la formation de la couche G dans le bois de tension et dans le TFW seraient identiques. Pour la formation du bois de tension, le déplacement des statolithes dans la cellule entraînerait la transduction du signal « gravité » (Chauvet *et al.*, 2016; Pouliquen *et al.*, 2017). Lors de l'application de la flexion, la tige reste en position inclinée moins de 5s. Or, il a été montré dans la hampe florale d'*Arabidopsis* que le déplacement des statolithes était négligeable lorsque la gravistimulation était inférieure à 1 minute (Saito *et al.*, 2005). De plus, des coupes histologiques réalisées sur des portions de tiges prélevées au-dessus de la zone fléchie qui avaient subies une inclinaison due à la flexion ne présentaient pas de formation de fibres à couche G (résultats non présentés). Pour confirmer que la présence de couche G dans les fibres du TFW ne serait pas due au facteur gravité, il serait pertinent d'étudier la réponse à la flexion de mutants agravitropiques. On peut donc penser que le TFW ne constitue pas une réponse à la gravité et serait plutôt une conséquence de la perception au niveau cellulaire des déformations en tension. Cependant, la mise en place du bois de tension et du TFW pourrait partager des acteurs moléculaires communs, tels que les gènes *FLA* impliqués dans la mise en place de la couche G.

On peut penser que les formations du TFW et du bois de tension seraient le résultat de voies de signalisation distinctes : celles activées par une exposition lente à la gravité (inclinaison) et celles activées par une déformation rapide de la tige. Quels mécanismes interviendraient dans la perception des déformations rapides ? Les distinctions entre le TFW et le CFW laissent à penser qu'il y aurait deux mécanismes de perception : un mécanisme pour la perception de la valeur absolue des déformations et un mécanisme pour le signe de la déformation.

Les mécanosenseurs impactés précocement par la flexion pourraient être les canaux mécanosensibles, les transducteurs les plus rapides connus à ce jour dans les systèmes biologiques (Peyronnet *et al.*, 2014). L'activation des canaux ioniques par une tension créée au niveau de la membrane entraînerait des entrées ou des sorties d'ions de la cellule qui

déclencheraient la transduction du signal. Parmi ces ions, le calcium est déjà connu comme étant un messager secondaire impliqué dans la mécanotransduction. En effet, lors d'une flexion rapide de la racine d'*Arabidopsis*, une augmentation du calcium cytosolique a été mesurée uniquement du côté en tension (Monshausen *et al.*, 2009). Ce résultat reflète l'activation de mécanosenseurs spécifiques du signe de la déformation. L'influx de calcium asymétrique entre les zones tendue et comprimée permettrait d'activer localement des voies de signalisation. La liaison du calcium avec des protéines telles que les calmodulines du côté tendu entraînerait des régulations de l'expression de gènes pouvant expliquer les différences anatomiques entre le CFW et le TFW.

D'autres molécules capables de connecter la paroi, la membrane plasmique et le cytosquelette pourraient également avoir une fonction clé dans la perception des stress mécaniques (Telewski, 2006). Certaines de ces molécules ont déjà été identifiées dans la réponse à des stress mécaniques. C'est le cas des récepteurs like-kinases (RLK) tels que les WAKs dont l'expression est modulée par l'inclinaison de la tige, et *FERONIA* qui semble intervenir dans le thigmotropisme des racines d'*Arabidopsis* (Monshausen et Haswell, 2013; Tocquard, 2016). Ainsi, lors d'une sollicitation mécanique, l'étirement ou la compression des protéines pourrait modifier la conformation tridimensionnelle des protéines et/ou induire des interactions de la partie extracellulaire avec des constituants de la paroi, entraînant la transduction du signal mécanique. Deux gènes WAKs (*WAK-Like1*, *WAK2*) ont une expression induite 30 minutes et 2 h après une flexion unique sur tige entière (Pomiès *et al.*, 2017). Pour approfondir ces résultats et comprendre si l'expression de ces WAK est régulée préférentiellement dans la zone en tension et/ou en compression, des analyses par hybridation *in situ* effectuées sur les différentes zones des arbres fléchis pourraient être réalisées. Des approches de génomique fonctionnelle (utilisation de plantes transgéniques) permettraient d'analyser leur rôle dans la transduction du signal dans les zones de bois formées en tension ou en compression.

III. Complexité du contrôle moléculaire en réponse à la flexion

Le contrôle moléculaire régulant la formation du bois en réponse à des flexions multiples n'a jamais fait l'objet d'études. Nos travaux ont montré que l'épaisseur de la paroi des fibres était augmentée en réponse à des flexions. Ces modifications peuvent être à l'origine d'un avantage mécanique pour la tige lui permettant de mieux résister aux sollicitations mécaniques suivantes. Dans notre étude, que ce soit chez les arbres 1F ou 3F, cette augmentation d'épaisseur de paroi pourrait être mise en relation avec l'expression des gènes *PtaMYB69* et *PtaMAP70-5*.

De nombreux travaux ont permis de révéler une partie de la complexité du contrôle moléculaire de la formation de la paroi secondaire (Figure 50). Il est donc peu probable que les réponses observées dans notre étude se résument à l'implication uniquement de *PttMYB69* et *PttMAP70-5*. Quel serait le réseau de gènes activés lors de sollicitations mécaniques ? L'étude de Zhong *et al.* (2008) a montré que la répression du gène *MYB69* entraînait une réduction importante de l'épaississement de la paroi secondaire des fibres des tiges d'*Arabidopsis*. Ces résultats ont été également observés avec la répression d'autres facteurs de transcription tels que *SND1/2/3*, *MYB103*, *MYB85*, *MYB52* et *MYB54*. Les résultats de l'analyse transcriptomique sur tige entière fléchie (Pomiès *et al.*, 2017) montrent que certains de ces gènes sont surexprimés 72 h après une flexion, c'est le cas des gènes *SND1/2*, *MYB103* et *MYB46*. Cette analyse ayant été effectuée à la suite d'une flexion unique, il serait intéressant d'étudier la réponse de ces gènes à des flexions multiples et d'essayer de comprendre leur lien de régulation dans ce contexte.

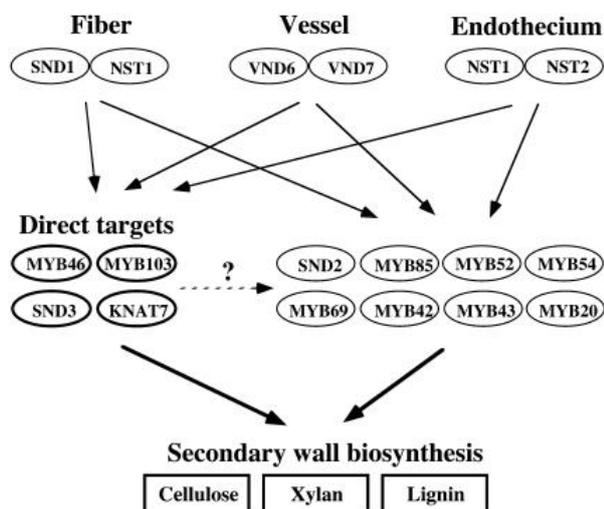


Figure 50 : Schéma du réseau transcriptionnel régulant la biosynthèse des parois secondaires. *SND1*, *NST1*, *NST2*, *VND6* et *VND7* sont des *master switch*, redondants et spécifiques au type de cellule qui activent l'ensemble de la voie de signalisation de la biosynthèse de la paroi secondaire. Ils induisent l'expression de différents facteurs de transcription qui à leur tour vont activer un ensemble de gènes régulant la biosynthèse de la paroi (Zhong *et al.*, 2008).

Un autre élément régulant le dépôt de la paroi secondaire est la position des microtubules. En effet, ces microtubules permettent de guider les complexes de cellulose synthase durant le dépôt de la paroi primaire et secondaire (Paredez *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2015). Dans notre étude sur les arbres 1F, 3F et sur les plants transgéniques RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2, nous avons vu que l'expression de *PttMAP70-5* était corrélée à l'épaississement des parois observé dans les zones en tension et en compression. L'étude de Pesquet *et al.* (2010) avait montré que la protéine AtMAP70-5 se localisait le long des parois secondaires et jouait un rôle dans l'emplacement de l'épaississement des parois. Notre étude a montré que ce gène intervenait dans la réponse aux flexions. D'autres protéines MAPs seraient également impliquées dans la réorganisation des microtubules durant la formation du xylème, telles que MAP65-1 et MAP70-1 (Pesquet *et al.*, 2010; Derbyshire *et al.*, 2015). Il serait intéressant par la suite de mesurer l'expression de ces gènes dans les différentes zones du bois fléchi pour tester s'ils interviennent

également dans les modifications pariétales observées. L'étude de peupliers transgéniques sous-exprimant le gène *MAP70-5* permettrait de confirmer si *MAP70-5* est un régulateur clé de la biosynthèse des parois secondaires en réponse à la flexion.

IV. Les peptides CLAVATA : régulateurs de l'activité méristématique

Les plantes ont développé des mécanismes de signalisation à longue distance médiés par des phytohormones et des signalisations à courte distance par la médiation de peptides sécrétés. L'une des familles les mieux caractérisées de tels peptides est la famille des peptides CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE) qui jouent un rôle important dans la régulation d'un large spectre de processus de développement (Clark *et al.*, 1995; Hobe *et al.*, 2003; Etchells et Turner, 2010). L'étude de Pomiès *et al.* (2017) a montré que le gène *PtCLE12.2* était un gène mécanosensible. Notre étude a permis de montrer que ce gène répondait aux flexions multiples, et que son expression ne semblait pas dépendre du nombre de déformations appliquées (arbres 3F). L'étude des plants transgéniques RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 nous a permis d'émettre des hypothèses quant à sa fonction. Nous avons montré que ce gène était impliqué dans le processus de la formation du bois, en régulant potentiellement l'expression du gène *PttMYB69*. En réponse à la flexion, la modulation de son expression entre les lignées transgéniques a entraîné des différences de régulation entre les côtés en tension et en compression. La répression de son expression a entraîné une augmentation de l'épaisseur de la paroi des fibres du côté en compression. A l'inverse, la surexpression de *PttCLE12.2* n'a pas entraîné de modification du côté en compression. Les différences observées pourraient être expliquées par l'inhibition par le peptide CLE12.2 d'une voie de signalisation intervenant dans la biosynthèse de la paroi du côté en compression. Le gène *CLE12.2* pourrait donc intervenir dans la régulation de la biosynthèse pariétale. Les arbres 3F présentaient une épaisseur de paroi plus importante du côté en compression. Il aurait été intéressant d'appliquer ce régime de flexion sur les lignées transgéniques. Mais l'utilisation de l'hybride *Pta* semble être un choix plus judicieux dans la réponse des arbres aux flexions. L'utilisation de nouvelles techniques pour la production de plants transgéniques, telles que la technique du CRISPR-Cas9 permettrait de cibler spécifiquement notre gène d'intérêt ; l'efficacité de cette technique ayant déjà été démontrée chez le peuplier (Fan *et al.*, 2015). Pour continuer la caractérisation du gène *CLE12.2*, l'étude par RNA-Seq des régulations géniques chez ces lignées transgéniques pourraient être envisagée.

Pour comprendre le mode d'action du peptide CLE12.2, la recherche de son récepteur pourrait être également envisagée. La plupart des récepteurs des peptides sécrétés appartient

à la famille des récepteurs membranaires riches en leucine LRR-RLK (*leucine-rich repeat receptor-like kinase*). On dénombre 213 membres chez *Arabidopsis* (Shiu et Bleecker, 2001) et 379 chez *Populus trichocarpa* (Zan *et al.*, 2013) ce qui constitue la plus grande famille de protéines kinases réceptrices chez les plantes. Quelques études ont permis de mettre en évidence les récepteurs de peptides CLE, comme TDR/PXY pour le peptide TDIF et CLV1 pour le peptide CLV3, mais les récepteurs pour beaucoup d'entre eux restent non identifiés. L'étude de la structure cristalline du complexe PXY-TDIF a montré que les récepteurs de peptides CLE présentaient une structure commune (Figure 51) (Zhang *et al.*, 2016). Au niveau du domaine CLE, quelques acides aminés semblent jouer un rôle primordial dans la liaison au récepteur. C'est le cas des acides aminés P4, G6, P7, et P9 qui forment un repliement en forme de fer à cheval "Ω". Ces quatre acides aminés sont également retrouvés dans la séquence des peptides PtCLE12.2 et AtCLE13 (Annexe V). La modélisation du peptide permettrait de rechercher des motifs clés d'interaction avec un récepteur et de modéliser par la suite la structure de ce récepteur potentiel. Des analyses de bio-informatiques sur l'ensemble des protéines LRR-RLR permettraient de réduire le nombre de récepteurs candidats du peptide CLE12.2.

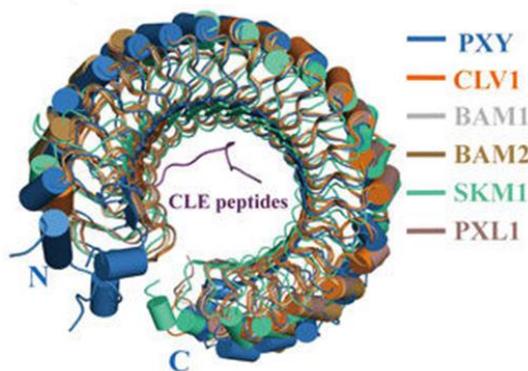


Figure 51 : La structure cristalline du complexe PXY-TDIF révèle un mécanisme de reconnaissance conservé entre les paires peptide-récepteurs CLE.

Superposition de la structure cristalline de PXY-TDIF avec des structures modélisées d'autres récepteurs CLE connus. (Zhang *et al.*, 2016).

Une autre possibilité pour identifier le récepteur de CLE12.2 serait de créer une banque d'ADNc pour cribler l'interaction du peptide CLE12.2 avec les 379 PtLRR-RLR, mais cela représenterait un investissement important en manipulations. Quelques données de la littérature peuvent cependant nous permettre de focaliser notre attention sur certains récepteurs. Dans le but d'étudier l'implication des protéines PtLRR-RLK dans la formation du système vasculaire chez le peuplier, Wang *et al.* (2015) ont étudié l'expression de sept gènes *PtLRR-RLK* connus pour intervenir dans ce processus chez *Arabidopsis*. Parmi ces gènes, on retrouve le récepteur TDR/PXY, ainsi que trois gènes appelés *PXC* pour *PXY-CORRELATED* (*At2g36570*, *At5g01890* et *At2g41820*). Ces trois gènes *PXC* ont été identifiés comme ayant des profils d'expression similaires à PXY/TDR (Wang *et al.*, 2013). De plus, les mutants *pxc1* présentent

une réduction de l'épaisseur de paroi de fibres. Aucune étude n'a été effectuée sur les gènes *PXC2* et *PXC3*. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction entre ces protéines et le peptide CLE12.2 grâce aux techniques du double hybride ou de pull-down.

Les arbres transgéniques RNAi-CLE12.2 et OE-CLE12.2 présentant des différences de croissance et d'anatomie du bois par rapport aux arbres sauvages, nous nous sommes également demandés quel pourrait être la régulation du gène *CLE12.2* chez le peuplier et chez *Arabidopsis*. L'analyse des promoteurs de *PtCLE12.2* et *AtCLE13* a montré la présence d'un site de fixation AtHB (AtHB1 chez *Arabidopsis* et AtHB15 (POPCORONA) chez le peuplier (Annexe VI). *POPCORONA* code un facteur de transcription classe III à leucine-zipper jouant un rôle dans le développement et la différenciation vasculaire. Chez *Arabidopsis* il a été montré que l'activation du microARN mir165b réprime l'expression de AtHB15 et induit le développement d'une paroi secondaire lignifiée dans la moelle (Du *et al.*, 2015). Chez le peuplier, l'orthologue *POPCORONA* (*PCN*) est aussi exprimé lors de la croissance secondaire, avec une forte expression dans les fibres phloémiennes, la zone cambiale, le xylème en développement et potentiellement la moelle (Du *et al.*, 2011). La présence de sites de fixation AtHB dans les promoteurs de *PtCLE12.2* et *AtCLE13*, montre que HB15 serait un candidat potentiel de la régulation de *PtCLE12.2*. L'encadrement d'un stage de master I réalisé dans notre équipe par Elodie Pierre, nous a permis de tester l'hypothèse d'une régulation du gène *AtCLE13* par AtHB15. L'analyse de l'expression du gène *AtCLE13* chez le mutant *athb15-1* montre que l'expression du gène *AtCLE13* est réprimée. La répression d'*AtHB15* pourrait entraîner de façon directe ou indirecte une répression du gène *AtCLE13*, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'une régulation d'*AtCLE13* par AtHB15. Nous avons donc voulu vérifier s'il existait une interaction entre la protéine HB15 et la séquence promotrice de *AtCLE13*. Pour cela, la technique du gel retard a été utilisée (EMSA). Cette technique consiste à mettre en contact la protéine recombinante AtHB15 et un oligonucléotide marqué contenant le cis-motif présent sur la séquence promotrice d'*AtCLE13*, puis à les faire migrer sur un gel. S'il y a une interaction entre les deux éléments, la bande correspondante sera retardée par rapport à celle correspondant à l'oligonucléotide marqué migrant seul. Bien qu'à ce jour la technique de gel retard n'ait pas pu être mise en œuvre, toutes les étapes préliminaires ont, quant à elles pu être réalisées (*i.e* production des protéines recombinantes).

En conclusion, ma thèse a permis de caractériser les réponses en termes de formation du bois sur des peupliers soumis à différents régimes de flexions. Elle a également permis des avancées significatives sur les acteurs moléculaires intervenant dans ces réponses aux flexions.

Les résultats obtenus constituent des bases solides pour les études futures sur l'impact des sollicitations mécaniques sur les arbres. Je rajouterais que ces travaux de thèse m'ont permis d'aborder la problématique de mon sujet *via* la connexion de différents champs disciplinaires, alliant physiologie, anatomie, biologie moléculaire et notions de mécanique. Ce fort caractère pluridisciplinaire a été très enrichissant autant d'un point de vue d'acquisition de compétences techniques que dans la vision globale d'une problématique de recherche.

Références bibliographiques

- Abedini, R., Clair, B., Pourtahmasi, K., Laurans, F., and Arnould, O. (2015) Cell wall thickening in developing tension wood of artificially bent poplar trees. *IAWA J Int Assoc Wood Anat* **36**: 44–57.
- Agusti, J., Lichtenberger, R., Schwarz, M., Nehlin, L., and Greb, T. (2011) Characterization of transcriptome remodeling during cambium formation identifies MOL1 and RUL1 as opposing regulators of secondary growth. *PLOS Genet* **7**: e1001312.
- Alméras, T., Costes, E., and Salles, J.-C. (2004) Identification of biomechanical factors involved in stem shape variability between Apricot tree varieties. *Ann Bot* **93**: 455–468.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., and Yadav, R.C. (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* **19**: 307–321.
- Andersson-Gunnerås, S., Hellgren, J.M., Björklund, S., Regan, S., Moritz, T., and 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, E.J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P.M., *et al.* (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.
- André, S., Siebert, H.-C., Nishiguchi, M., Tazaki, K., and Gabius, H.-J. (2005) Evidence for lectin activity of a plant receptor-like protein kinase by application of neoglycoproteins and bioinformatic algorithms. *Biochim Biophys Acta* **1725**: 222–232.
- Anten, N.P.R., Casado-Garcia, R., Pierik, R., and Pons, T.L. (2006) Ethylene sensitivity affects changes in growth patterns, but not stem properties, in response to mechanical stress in tobacco. *Physiol Plant* **128**: 274–282.
- Arnaud, D., Déjardin, A., Lepié, J.-C., Lesage-Descauses, M.-C., Boizot, N., Villar, M., *et al.* (2012) Expression analysis of LIM gene family in poplar, toward an updated phylogenetic classification. *BMC Res Notes* **5**: 102.
- Arteca, J.M., and Arteca, R.N. (1999) A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase (ACS6) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol Biol* **39**: 209–219.
- Asai, S., Ichikawa, T., Nomura, H., Kobayashi, M., Kamiyoshihara, Y., Mori, H., *et al.* (2013) The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *J Biol Chem* **288**: 14332–14340.
- 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.
- Badel, E., Ewers, F.W., Cochard, H., and Telewski, F.W. (2015) Acclimation of mechanical and hydraulic functions in trees: impact of the thigmomorphogenetic process. *Front Plant Sci* **6**: 266.
- 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.

- 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* **110**: 755–760.
- Bdeir, R., Busov, V., Yordanov, Y., and Gailing, O. (2016) Gene dosage effects and signatures of purifying selection in lateral organ boundaries domain (LBD) genes LBD1 and LBD18. *Plant Syst Evol* **302**: 433–445.
- Bellande, K., Bono, J.-J., Savelli, B., Jamet, E., and Canut, H. (2017) Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? *Int J Mol Sci* **18**
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11–21.
- Biddington, N.L. (1986) The effects of mechanically-induced stress in plants — a review. *Plant Growth Regul* **4**: 103–123.
- Birkenmeier, G.F., and Ryan, C.A. (1998) Wound signaling in tomato plants: Evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiol* **117**: 687–693.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., and 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.
- Bleecker, A.B., and Kende, H. (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 1–18.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003) Lignin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519–546.
- Bollhöner, B., Prestele, J., and Tuominen, H. (2012) Xylem cell death: Emerging understanding of regulation and function. *J Exp Bot* **63**: 1081–1094.
- Bonawitz, N.D., and Chapple, C. (2010) The genetics of lignin biosynthesis: Connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet* **44**: 337–363.
- Bonnesoeur, V., Constant, T., Moulia, B., and Fournier, M. (2016) Forest trees filter chronic wind-signals to acclimate to high winds. *New Phytol* **210**: 850–860.
- Botella, J.R., Arteca, J.M., Somodevilla, M., and Arteca, R.N. (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean. *Plant Mol Biol* **30**: 1129–1137.
- Botella, J.R., Arteca, R.N., and Frangos, J.A. (1995) A mechanical strain-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 1595–1598.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A., and Fromm, H. (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 435–466.
- Bourquin, V., Nishikubo, N., Abe, H., Brumer, H., Denman, S., Eklund, M., *et al.* (2002) Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. *Plant Cell* **14**: 3073–3088.

- Braam, J. (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* **165**: 373–389.
- Braam, J., and Davis, R.W. (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. *Cell* **60**: 357–364.
- Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M.-T., and Persson, S. (2012) POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 163–177.
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., *et al.* (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**: 316.
- Chang, S.-S., Quignard, F., Alméras, T., and Clair, B. (2015) Mesoporosity changes from cambium to mature tension wood: a new step toward the understanding of maturation stress generation in trees. *New Phytol* **205**: 1277–1287.
- Chauvet, H., Pouliquen, O., Forterre, Y., Legué, V., and Moulia, B. (2016) Inclination not force is sensed by plants during shoot gravitropism. *Sci Rep* **6**: 35431.
- Chehab, E.W., Eich, E., and Braam, J. (2009) Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *J Exp Bot* **60**: 43–56.
- Chehab, E.W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S., and Braam, J. (2012) Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Curr Biol* **22**: 701–706.
- Chen, J., Chen, B., and Zhang, D. (2015) Transcript profiling of *Populus tomentosa* genes in normal, tension, and opposite wood by RNA-seq. *BMC Genomics* **16**
- Clair, B., Alméras, T., Pilate, G., Jullien, D., Sugiyama, J., and Riekkel, C. (2011) Maturation stress generation in poplar tension wood studied by synchrotron radiation microdiffraction. *Plant Physiol* **155**: 562–570.
- Clair, B., Ruelle, J., Beauchêne, J., Prévost, M.F., and Fournier, M. (2006) Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species. *IAWA J* **27**: 329–338.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. (1995) CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development* **121**: 2057–2067.
- Coninck, B.D., and Smet, I.D. (2016) Plant peptides – taking them to the next level. *J Exp Bot* **67**: 4791–4795.
- Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850–861.
- Cosgrove, D.J., and Jarvis, M.C. (2012) Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front Plant Sci* **3**: 204.
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., *et al.* (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically-activated cation channels. *Science* **330**: 55–60.

- Coutand, C., Dupraz, C., Jaouen, G., Ploquin, S., and Adam, B. (2008) Mechanical stimuli regulate the allocation of biomass in trees: Demonstration with young *Prunus avium* trees. *Ann Bot* **101**: 1421–1432.
- Coutand, C., Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Decourteix, M., Julien, J.-L., and Moulia, B. (2009) Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and PtaZFP2 gene expression in poplar. *Plant Physiol* **151**: 223–232.
- Coutand, C., and Moulia, B. (2000) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *J Exp Bot* **51**: 1825–1842.
- Cronshaw, J., and Morey, P.R. (1965) Induction of Tension Wood by 2,3,5-Tri-iodobenzoic Acid. *Nature* **205**: 816–818.
- Cronshaw, J., and Morey, P.R. (1968) The effect of plant growth substances on the development of tension wood in horizontally inclined stems of *Acer rubrum* seedlings. *Protoplasma* **65**: 379–391.
- Dadswell, H., and Wardrop, A. (1955) The structure and properties of tension wood. *Holzforschung* **9**: 97–104.
- Damiani, I., Drain, A., Guichard, M., Balzergue, S., Boscari, A., Boyer, J.-C., *et al.* (2016) Nod factor effects on root hair-specific transcriptome of *Medicago truncatula*: focus on plasma membrane transport systems and reactive oxygen species networks. *Front Plant Sci* **7**: 794.
- Daniel, G., Filonova, L., Kallas, Å.M., and Teeri, T.T. (2006) Morphological and chemical characterisation of the G-layer in tension wood fibres of *Populus tremula* and *Betula verrucosa*: Labelling with cellulose-binding module CBM1 H₂ Cel7A and fluorescence and FE-SEM microscopy. *Holzforschung* **60**: 618–624.
- Das, R., and Pandey, G.K. (2010) Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Curr Genomics* **11**: 2–13.
- Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T., Hedden, P., Fromm, H., and Aloni, R. (2012) Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. *Plant Cell* **24**: 66–79.
- Decreux, A., and 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., and Pilate, G. (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues - A comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biol* **6**: 55–64.
- Demko, V., Perroud, P.-F., Johansen, W., Delwiche, C.F., Cooper, E.D., Remme, P., *et al.* (2014) Genetic analysis of DEFECTIVE KERNEL1 loop function in three-dimensional body patterning in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* **166**: 903–919.
- Denis, E., Kbir, N., Mary, V., Claisse, G., Conde e Silva, N., Kreis, M., and Deveaux, Y. (2017) WOX14 promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J* **90**: 560–572.

- Depège, N., Varenne, M., and Boyer, N. (2000) Induction of oxidative stress and GPX-like protein activation in tomato plants after mechanical stimulation. *Physiol Plant* **110**: 209–214.
- Derbyshire, P., Ménard, D., Green, P., Saalbach, G., Buschmann, H., Lloyd, C.W., and Pesquet, E. (2015) Proteomic analysis of microtubule interacting proteins over the course of xylem tracheary element formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**: 2709–2726.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., *et al.* (2007) Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15572–15577.
- Didi, V., Jackson, P., and Hejátko, J. (2015) Hormonal regulation of secondary cell wall formation. *J Exp Bot* **66**: 5015–5027.
- Djordjevic, M.A., Oakes, M., Wong, C.E., Singh, M., Bhalla, P., Kusumawati, L., and Imin, N. (2011) Border sequences of *Medicago truncatula* CLE36 are specifically cleaved by endoproteases common to the extracellular fluids of *Medicago* and soybean. *J Exp Bot* **62**: 4649–4659.
- Doblin, M.S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., and Delmer, D.P. (2002) Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* **43**: 1407–1420.
- Doblin, M.S., Pettolino, F., and Bacic, A. (2010) Plant cell walls: The skeleton of the plant world. *Funct Plant Biol* **37**: 357–381.
- Dodueva, I.E., Yurlova, E.V., Osipova, M.A., and Lutova, L.A. (2012) CLE peptides are universal regulators of meristem development. *Russ J Plant Physiol* **59**: 14–27.
- Donaldson, L.A. (2001) Lignification and lignin topochemistry — An ultrastructural view. *Phytochemistry* **57**: 859–873.
- Du, J., Mansfield, S.D., and Groover, A.T. (2009) The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth. *Plant J* **60**: 1000–1014.
- Du, J., Miura, E., Robischon, M., Martinez, C., and Groover, A. (2011) The *Populus* class III HD ZIP transcription factor POPCORONA affects cell differentiation during secondary growth of woody stems. *PLOS ONE* **6**: e17458.
- Du, Q., Avci, U., Li, S., Gallego-Giraldo, L., Pattathil, S., Qi, L., *et al.* (2015) Activation of miR165b represses AtHB15 expression and induces pith secondary wall development in *Arabidopsis*. *Plant J* **83**: 388–400.
- Ebringerová, A., and Heinze, T. (2000) Xylan and xylan derivatives – Biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol Rapid Commun* **21**: 542–556.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., and Heinze, T. (2005) Hemicellulose. In *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use*. Adv. Polym. Sci, pp. 1–67.
- Etchells, J.P., Mishra, L.S., Kumar, M., Campbell, L., and Turner, S.R. (2015) Wood formation in trees is increased by manipulating PXY-regulated cell division. *Curr Biol* **25**: 1050–1055.

- Etchells, J.P., Provost, C.M., Mishra, L., and Turner, S.R. (2013) WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development* **140**: 2224–2234.
- Etchells, J.P., and Turner, S.R. (2010) The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development* **137**: 767–774.
- Falkenstein, E., Groth, B., Mithöfer, A., and Weiler, E.W. (1991) Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducers of tendrill coiling. *Planta* **185**: 316–322.
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y., and Luo, K. (2015) Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep* **5**: 12217.
- Fang, C.-H., Clair, B., Gril, J., and Alméras, T. (2007) Transverse shrinkage in G-fibers as a function of cell wall layering and growth strain. *Wood Sci Technol* **41**: 659–671.
- Fang, C.-H., Clair, B., Gril, J., and Liu, S.-Q. (2008) Growth stresses are highly controlled by the amount of G-layer in poplar tension wood. *IAWA J* **29**: 237–246.
- Fiers, M., Golemic, E., Xu, J., Geest, L. van der, Heidstra, R., Stiekema, W., and Liu, C.-M. (2005) The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* **17**: 2542–2553.
- Fisher, K., and Turner, S. (2007) PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr Biol* **17**: 1061–1066.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M. (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**: 1911–1914.
- Fournier, M., Baillères, H., and Chanson, B. (1994) Tree biomechanics : growth, cumulative prestresses, and reorientations. *Biomimetics* **2**: 229–251.
- Fukuda, H., Hirakawa, Y., and Sawa, S. (2007) Peptide signaling in vascular development. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 477–482.
- Funada, R., Miura, T., Shimizu, Y., Kinase, T., Nakaba, S., Kubo, T., and Sano, Y. (2008) Gibberellin-induced formation of tension wood in angiosperm trees. *Planta* **227**: 1409–1414.
- Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P. (1999) Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants. *Mol Gen Genet MGG* **262**: 212–219.
- Gardiner, B., Barnett, J., Saranpää, P., and Gril, J. (2014) *The Biology of Reaction Wood*. Springer Science & Business Media.
- Gardiner, B., Berry, P., and Moulia, B. (2016) Review: Wind impacts on plant growth, mechanics and damage. *Plant Sci* **245**: 94–118.
- Gaspar, Y., Johnson, K.L., McKenna, J.A., Bacic, A., and Schultz, C.J. (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol Biol* **47**: 161–176.

- Gerttula, S., Zinkgraf, M., Muday, G., Lewis, D., Ibatullin, F.M., Brumer, H., *et al.* (2015) Transcriptional and hormonal regulation of gravitropism of woody stems in *Populus*. *Plant Cell* tpc.15.00531.
- Ghislain, B., and Clair, B. (2017) Diversity in the organisation and lignification of tension wood fibre walls – A review. *IAWA J* **38**: 245–265.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., and Thomashow, M.F. (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* **16**: 433–442.
- Gorshkova, T.A., Gurjanov, O.P., Mikshina, P.V., Ibragimova, N.N., Mokshina, N.E., Salnikov, V.V., *et al.* (2010) Specific type of secondary cell wall formed by plant fibers. *Russ J Plant Physiol* **57**: 328–341.
- Gouget, A., Senchou, V., Govers, F., Sanson, A., Barre, A., Rougé, P., *et al.* (2006) Lectin receptor kinases participate in protein-protein interactions to mediate plasma membrane-cell wall adhesions in Arabidopsis. *Plant Physiol* **140**: 81–90.
- Guedes, F.T.P., Laurans, F., Quemener, B., Assor, C., Lainé-Prade, V., Boizot, N., *et al.* (2017) Non-cellulosic polysaccharide distribution during G-layer formation in poplar tension wood fibers: abundance of rhamnogalacturonan I and arabinogalactan proteins but no evidence of xyloglucan. *Planta* **246**: 857–878.
- Guharay, F., and Sachs, F. (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* **352**: 685–701.
- Hamant, O., Heisler, M.G., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., *et al.* (2008) Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* **322**: 1650–1655.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg Arch* **391**: 85–100.
- Hamilton, E.S., Jensen, G.S., Makshev, G., Katims, A., Shero, A.M., and Haswell, E.S. (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* **350**: 438–441.
- Han, H., Zhang, G., Wu, M., and Wang, G. (2016) Identification and characterization of the *Populus trichocarpa* CLE family. *BMC Genomics* **17**: 174.
- Haswell, E.S. (2007) MscS-like proteins in plants. In *Current Topics in Membranes*. Academic Press, pp. 329–359.
- Haswell, E.S., and Meyerowitz, E.M. (2006) MscS-like Proteins control plastid size and shape in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* **16**: 1–11.
- Haswell, E.S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E.M., and Frachisse, J.-M. (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr Biol* **18**: 730–734.

- Hellgren, J.M. (2004) Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in Poplar and Pine. *PLANT Physiol* **135**: 212–220.
- Hématy, K., Sado, P.-E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., *et al.* (2007) A receptor-like kinase mediates the response of Arabidopsis cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr Biol* **17**: 922–931.
- Hertzberg, M., Aspeborg, H., Schrader, J., Andersson, A., Erlandsson, R., Blomqvist, K., *et al.* (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14732–14737.
- Hill, J.L., Hammudi, M.B., and Tien, M. (2014) The Arabidopsis cellulose synthase complex: A proposed hexamer of CESA trimers in an equimolar stoichiometry. *Plant Cell* **26**: 4834–4842.
- Hirakawa, Y., Kondo, Y., and Fukuda, H. (2010) TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 2618–2629.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., *et al.* (2008) Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15208–15213.
- Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003) Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. *Dev Genes Evol* **213**: 371–381.
- Hoch, G. (2007) Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Funct Ecol* **21**: 823–834.
- Hynes, R.O. (2002) Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673–687.
- 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.
- Israelsson, M., Sundberg, B., and Moritz, T. (2005) Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *Plant J* **44**: 494–504.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., and Fukuda, H. (2006) Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**: 842–845.
- Jacobs, M.R. (1954) The effect of wind sway on the form and development of Pinus radiata D. Don. *Aust J Bot* **2**: 35–51.
- Jacobsen, A.L., Ewers, F.W., Pratt, R.B., Paddock, W.A., and Davis, S.D. (2005) Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiol* **139**: 546–556.
- Jaffe, M.J. (1973) Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**: 143–157.

- Jaffe, M.J., Leopold, A.C., and Staples, R.C. (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *Am J Bot* **89**: 375–382.
- Jin, H., Do, J., Moon, D., Noh, E.W., Kim, W., and 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.
- Johnson, K.A., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., and Braam, J. (1998) *Arabidopsis thaliana* responses to mechanical stimulation do not require ETR1 or EIN2. *Plant Physiol* **116**: 643–649.
- Johnson, K.L., Faulkner, C., Jeffree, C.E., and Ingram, G.C. (2008) The phytochrome defective kernel 1 is a novel *Arabidopsis* growth regulator whose activity is regulated by proteolytic processing. *Plant Cell* **20**: 2619–2630.
- 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 J* **22**: 133–157.
- Kern, K.A., Ewers, F.W., Telewski, F.W., and Koehler, L. (2005) Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiol* **25**: 1243–1251.
- Kim, J., Jung, J.-H., Reyes, J.L., Kim, Y.-S., Kim, S.-Y., Chung, K.-S., *et al.* (2005) microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J* **42**: 84–94.
- Kim, J.S., and Daniel, G. (2012) Distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem and their changes under tension stress. *Planta* **236**: 35–50.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., *et al.* (2010) RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development* **137**: 3911–3920.
- Knight, M.R., Smith, S.M., and Trewavas, A.J. (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 4967–4971.
- Koehler, L., and Telewski, F.W. (2006) Biomechanics and transgenic wood. *Am J Bot* **93**: 1433–1438.
- Kohorn, B.D., and Kohorn, S.L. (2012) The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front Plant Sci* **3**.
- Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H., and Sakagami, Y. (2006) A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* **313**: 845–848.
- Koo, A.J.K., and Howe, G.A. (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**: 1571–1580.

- Koser, D.E., Thompson, A.J., Foster, S.K., Dwivedy, A., Pillai, E.K., Sheridan, G.K., *et al.* (2016) Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci* **19**: 1592–1598.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., *et al.* (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* **19**: 1855–1860.
- Kucukoglu, M., Nilsson, J., Zheng, B., Chaabouni, S., and Nilsson, O. (2017) WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 (WOX4)-like genes regulate cambial cell division activity and secondary growth in *Populus* trees. *New Phytol* **215**: 642–657.
- Kurusu, T., Iida, H., and Kuchitsu, K. (2012) Roles of a putative mechanosensitive plasma membrane Ca²⁺-permeable channel OsMCA1 in generation of reactive oxygen species and hypo-osmotic signaling in rice. *Plant Signal Behav* **7**: 796–798.
- Lachaud, S., Catesson, A.-M., and Bonnemain, J.-L. (1999) Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus Académie Sci - Ser III - Sci Vie* **322**: 633–650.
- Lafarguette, F., Leplé, J.-C., Déjardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M.-C., and Pilate, G. (2004) Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol* **164**: 107–121.
- Lakhal, W. (2010) Caractérisation moléculaire de la cinétique d'acclimatation des peupliers (*Populus tremula x alba*) à des flexions multiples. *Univ Blaise Pascal Clermont Ferrand 2*.
- Larson, P.R. (1994) The vascular cambium: development and structure. *Springer-Verlag*.
- Leblanc-Fournier, N., Coutand, C., Crouzet, J., Brunel, N., Lenne, C., Moulia, B., and 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.
- Leblanc-Fournier, N., Martin, L., Lenne, C., and Decourteix, M. (2014) To respond or not to respond, the recurring question in plant mechanosensitivity. *Front Plant Sci* **5**: 401.
- Lee, D., Polisensky, D.H., and Braam, J. (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol* **165**: 429–444.
- Lefèvre, J., Boyer, N., Gaspar, T., and Desbiez, M.O. (1993) Change of peroxidase activity related to storage of information and immediate or delayed expression of the effect of cotyledon prickings on hypocotyl growth in tomato. *Plant Peroxidases Biochem Physiol Publ L'Université Genève* 345–348.
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J., and Sundberg, B. (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 5984–5989.
- MacMillan, C.P., Mansfield, S.D., Stachurski, Z.H., Evans, R., and Southerton, S.G. (2010) Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in Arabidopsis and Eucalyptus. *Plant J* **62**: 689–703.

- MacMillan, C.P., Taylor, L., Bi, Y., Southerton, S.G., Evans, R., and Spokevicius, A. (2015) The fasciclin-like arabinogalactan protein family of *Eucalyptus grandis* contains members that impact wood biology and biomechanics. *New Phytol* **206**: 1314-1327.
- Mader, M., Le Paslier, M.-C., Bounon, R., Bérard, A., Rampant, P.F., Fladung, M., *et al.* (2016) Whole-genome draft assembly of *Populus tremula* x *P. alba* clone INRA 717-1B4. *Silvae Genet* **65**: 74-79.
- Marshall, E., Costa, L.M., and Gutierrez-Marcos, J. (2011) Cysteine-Rich Peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell–cell communication in plant reproduction and development. *J Exp Bot* **62**: 1677–1686.
- Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Azri, W., Lenne, C., Henry, C., Coutand, C., and 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., and Coutand, C. (2010) Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *J Exp Bot* **61**: 2403–2412.
- Matsubayashi, Y. (2011) Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant Cell Physiol* **52**: 5–13.
- Matsubayashi, Y. (2014) Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 385–413.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., and Kakimoto, T. (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20027–20031.
- Mauch, F., Kmecl, A., Schaffrath, U., Volrath, S., Grolach, J., Ward, E., *et al.* (1997) Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in Wheat. *Plant Physiol* **114**: 1561–1566.
- Mauriat, M., and 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.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T. (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**: 805–815.
- McAinsh, M.R., and Pittman, J.K. (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol* **181**: 275–294.
- McCarthy, R.L., Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2009) MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**: 1950–1964.
- McFarlane, H.E., Döring, A., and Persson, S. (2014) The cell biology of cellulose synthesis. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 69–94.
- Mellerowicz, E.J., Baucher, M., Sundberg, B., and Boerjan, W. (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. In *Plant Cell Walls*. Springer Netherlands, pp. 239–274.

- Mellerowicz, E.J., and Sundberg, B. (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 293–300.
- Meng, S.X., Lieffers, V.J., Reid, D.E.B., Rudnicki, M., Silins, U., and Jin, M. (2006) Reducing stem bending increases the height growth of tall pines. *J Exp Bot* **57**: 3175–3182.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.-Y., and Helariutta, Y. (2012) Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J* **32**: 178–193.
- Miyawaki, K., Tabata, R., and Sawa, S. (2013) Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 598–606.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 765–769.
- Mizrachi, E., Maloney, V.J., Silberbauer, J., Hefer, C.A., Berger, D.K., Mansfield, S.D., and Myburg, A.A. (2015) Investigating the molecular underpinnings underlying morphology and changes in carbon partitioning during tension wood formation in *Eucalyptus*. *New Phytol* **206**: 1351–1363.
- Møller, I.M., and Sweetlove, L.J. (2010) ROS signalling – Specificity is required. *Trends Plant Sci* **15**: 370–374.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Weisenseel, M.H., and Gilroy, S. (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **21**: 2341–2356.
- Monshausen, G.B., and Gilroy, S. (2009) Feeling green: Mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol* **19**: 228–235.
- Monshausen, G.B., and Haswell, E.S. (2013) A force of nature: Molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *J Exp Bot* **64**: 4663–4680.
- Moody, R.G., and Williamson, M.P. (2013) Structure and function of a bacterial Fasciclin I Domain Protein elucidates function of related cell adhesion proteins such as TGFBIp and periostin. *FEBS Open Bio* **3**: 71–77.
- Moreira, L.R.S., and Filho, E.X.F. (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 165.
- Mori, I.C., and Schroeder, J.I. (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol* **135**: 702–708.
- Moulija, B. (2000) Leaves as shell structures: Double curvature, auto-stresses, and minimal mechanical energy constraints on leaf rolling in grasses. *J Plant Growth Regul* **19**: 19–30.

- Moulia, B., and Combes, D. (2004) Thigmomorphogenetic acclimation of plants to moderate winds greatly affects height structure in field-grown alfalfa (*Medicago sativa* L.), an indeterminate herb. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **137**: 3–S1.
- Moulia, B., Coutand, C., and Julien, J.-L. (2015) Mechanosensitive control of plant growth: Bearing the load, sensing, transducing, and responding. *Plant Physiol* **6**: 52.
- Moulia, B., Loughian, C.D., Bastien, R., Martin, O., Rodríguez, 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*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 269–302.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., De Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P. (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J Integr Plant Biol* **52**: 360–376.
- Moyle, R., Schrader, J., Stenberg, A., Olsson, O., Saxena, S., Sandberg, G., and Bhalerao, R.P. (2002) Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid aspen. *Plant J* **31**: 675–685.
- Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R. (2008) The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* **20**: 934–946.
- Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qi, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., *et al.* (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 3639–3644.
- Nakamura, T. (2003) Control of morphogenesis of woody plant by gravity on earth. *Uchu Seibutsu Kagaku* **17**: 144–148.
- Neel, P.L., and Harris, R.W. (1971) Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in liquidambar. *Science* **173**: 58–59.
- Ni, J., Guo, Y., Jin, H., Hartsell, J., and Clark, S.E. (2011) Characterization of a CLE processing activity. *Plant Mol Biol* **75**: 67–75.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., *et al.* (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20032–20037.
- Nilsson, J., Karlberg, A., Antti, H., Lopez-Vernaza, M., Mellerowicz, E., Perrot-Rechenmann, C., *et al.* (2008) Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell* **20**: 843–855.
- Nishikubo, N., Awano, T., Banasiak, A., Bourquin, V., Ibatullin, F., Funada, R., *et al.* (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.

- Nonomura, K., Woo, S.-H., Chang, R.B., Gillich, A., Qiu, Z., Francisco, A.G., *et al.* (2017) Piezo2 senses airway stretch and mediates lung inflation-induced apnoea. *Nature* **541**: 176–181.
- Oelkers, K., Goffard, N., Weiller, G.F., Gresshoff, P.M., Mathesius, U., and Frickey, T. (2008) Bioinformatic analysis of the CLE signaling peptide family. *BMC Plant Biol* **8**: 1.
- Ohashi-Ito, K., and Fukuda, H. (2003) HD-Zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (*Zinnia*)/ATHB-15 (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol* **44**: 1350–1358.
- Olsson, A.-M., Bjurhager, I., Gerber, L., Sundberg, B., and Salmén, L. (2011) Ultra-structural organisation of cell wall polymers in normal and tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy. *Planta* **233**: 1277–1286.
- Opsahl-Ferstad, H.-G., Deunff, E.L., Dumas, C., and Rogowsky, P.M. (1997) ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J* **12**: 235–246.
- Paredez, A.R., Somerville, C.R., and Ehrhardt, D.W. (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**: 1491–1495.
- Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012) Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **158**: 465–475.
- Paux, E., Carocha, V., Marques, C., Mendes de Sousa, A., Borralho, N., Sivadon, P., and Grima-Pettenati, J. (2005) Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol* **167**: 89–100.
- Persson, S., Paredez, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., *et al.* (2007) Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15566–15571.
- Pesquet, E., Korolev, A.V., Calder, G., and Lloyd, C.W. (2010) The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in *Arabidopsis* wood cells. *Curr Biol* **20**: 744–749.
- Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T., and Frachisse, J.-M. (2014) Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. *Front Plant Sci* **5**: 558.
- Pivetti, C.D., Yen, M.-R., Miller, S., Busch, W., Tseng, Y.-H., Booth, I.R., and Milton H. Saier, J. (2003) Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 66–85.
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiol* **127**: 1513–1523.
- Pomiès, L., Decourteix, M., Franchel, J., Moulia, B., and Leblanc-Fournier, N. (2017) Poplar stem transcriptome is massively remodelled in response to single or repeated mechanical stimuli. *BMC Genomics* **18**: 300.

- Pouliquen, O., Forterre, Y., Bérut, A., Chauvet, H., Bizet, F., Legué, V., and Moulia, B. (2017) A new scenario for gravity detection in plants: the position sensor hypothesis. *Phys Biol* **14**: 035005.
- Pruyn, M.L. (1997) Thigmomorphogenesis: Responses of two *Populus* hybrids to mechanical stress. Thesis, Michigan State Univ East Lansing, MI, 90 p
- Pruyn, M.L., Ewers, B.J., and Telewski, F.W. (2000) Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and mechanical properties of two *Populus* hybrids in response to mechanical perturbation. *Tree Physiol* **20**: 535–540.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., and Hardtke, C.S. (2011) Mobile gibberellin directly stimulates *Arabidopsis* hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell* **23**: 1322–1336.
- Reina, J.J., Domínguez, E., and Heredia, A. (2001) Water sorption–desorption in conifer cuticles: The role of lignin. *Physiol Plant* **112**: 372–378.
- Reiter, W.-D. (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 536–542.
- Rennie, E.A., and Scheller, H.V. (2014) Xylan Biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* **26**: 100–107.
- Richter, G.L., Monshausen, G.B., Krol, A., and Gilroy, S. (2009) Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiol* **151**: 1855–1866.
- Roussel, J.-R., and Clair, B. (2015) Evidence of the late lignification of the G-layer in Simarouba tension wood, to assist understanding how non-G-layer species produce tensile stress. *Tree Physiol* **35**: 1366–1377.
- Ruelle, J. (2014) Morphology, anatomy and ultrastructure of reaction wood. In *The Biology of Reaction Wood*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 13–35.
- Saito, C., Morita, M.T., Kato, T., and Tasaka, M. (2005) Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell* **17**: 548–558.
- Salisbury, F.B., Gillespie, L., and Rorabaugh, P. (1988) Gravitropism in higher plant shoots: V. Changing sensitivity to auxin. *Plant Physiol* **88**: 1186–1194.
- Sampathkumar, A., Yan, A., Krupinski, P., and Meyerowitz, E.M. (2014) Physical forces regulate plant development and morphogenesis. *Curr Biol* **24**: R475–R483.
- Sawa, S., Kinoshita, A., Nakanomyo, I., and Fukuda, H. (2006) CLV3/ESR-related (CLE) peptides as intercellular signaling molecules in plants. *Chem Rec* **6**: 303–310.
- Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 263–289.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., and Laux, T. (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**: 635–644.

- Schopfer, P. (2006) Biomechanics of plant growth. *Am J Bot* **93**: 1415–1425.
- Schrader, J., Nilsson, J., Mellerowicz, E., Berglund, A., Nilsson, P., Hertzberg, M., and Sandberg, G. (2004) A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell* **16**: 2278–2292.
- Schweingruber, F.H. (1996) Tree rings and environment: dendroecology. *Tree Rings Environ Dendroecology*.
- Shih, H.-W., Miller, N.D., Dai, C., Spalding, E.P., and Monshausen, G.B. (2014) The receptor-like kinase FERONIA is required for mechanical signal transduction in Arabidopsis seedlings. *Curr Biol* **24**: 1887–1892.
- Shiu, S.-H., and Bleecker, A.B. (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 10763–10768.
- Ślesak, I., Ślesak, H., Libik, M., and Miszalski, Z. (2008) Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *J Plant Physiol* **165**: 127–137.
- Smith, L.G. (2001) Cell division: Plant cell division: Building walls in the right places. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 33–39.
- Somerville, C. (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 53–78.
- Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., and Anfodillo, T. (2013) Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Rep* **32**: 885–898.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U.C., and Teige, M. (2012) Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J Exp Bot* **63**: 1525–1542.
- Stokes, A., Fitter, A.H., and Courts, M.P. (1995) Responses of young trees to wind and shading: effects on root architecture. *J Exp Bot* **46**: 1139–1146.
- Strabala, T.J., Phillips, L., West, M., and Stanbra, L. (2014) Bioinformatic and phylogenetic analysis of the CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION (CLE) and the CLE-LIKE signal peptide genes in the Pinophyta. *BMC Plant Biol* **14**: 47.
- Stull, R.B. (1988) An introduction to boundary meteorology. *Atmospheric Sci Libr.*
- Suer, S., Agusti, J., Sanchez, P., Schwarz, M., and Greb, T. (2011) WOXA imparts auxin responsiveness to cambium cells in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **23**: 3247–3259.
- Sultana, R.S. (2018) Relationships among anatomical characteristics of nine Japanese angiosperm trees without g-fiber in reaction wood. *J Plant Sci Res* **5**(1): 174.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2006) Plant physiology. 4th. *Sinauer Assoc Sunderland Mass EUA*.

- Takahashi, N., and Koshijima, T. (1988) Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci Technol* **22**: 231–241.
- Tamasi, E., Stokes, A., Lasserre, B., Danjon, F., Berthier, S., Fourcaud, T., and Chiatante, D. (2005) Influence of wind loading on root system development and architecture in oak (*Quercus robur* L.) seedlings. *Trees* **19**: 374–384.
- Tatsuki, M., and Mori, H. (1999) Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. *Plant Cell Physiol* **40**: 709–715.
- Taylor, N.G., Howells, R.M., Huttly, A.K., Vickers, K., and Turner, S.R. (2003) Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 1450–1455.
- Taylor, N.G., Laurie, S., and Turner, S.R. (2000) Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2529–2539.
- Taylor, W.R. (1987) Multiple sequence alignment by a pairwise algorithm. *Bioinformatics* **3**: 81–87.
- Telewski, F.W. (1989) Structure and function of flexure wood in *Abies fraseri*. *Tree Physiol* **5**: 113–121.
- Telewski, F.W. (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am J Bot* **93**: 1466–1476.
- Telewski, F.W. (2012) Is windswept tree growth negative thigmotropism? *Plant Sci* **184**: 20–28.
- Telewski, F.W. (2016) Chapter 5 - Flexure Wood: mechanical stress induced secondary xylem formation. In *Secondary Xylem Biology*. Academic Press, Boston. pp. 73–91
- Telewski, F.W., and Jaffe, M.J. (1981) Thigmomorphogenesis: changes in the morphology and chemical composition induced by mechanical perturbation in 6-month-old *Pinus taeda* seedlings. *Can J For Res* **11**: 381–388.
- Telewski, F.W., and Jaffe, M.J. (1986a) Thigmomorphogenesis: Anatomical, morphological and mechanical analysis of genetically different sibs of *Pinus taeda* in response to mechanical perturbation. *Physiol Plant* **66**: 219–226.
- Telewski, F.W., and Jaffe, M.J. (1986b) Thigmomorphogenesis: Field and laboratory studies of *Abies fraseri* in response to wind or mechanical perturbation. *Physiol Plant* **66**: 211–218.
- Telewski, F.W., and Pruyn, M.L. (1998) Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiol* **18**: 65–68.
- Thomas, L.H., Forsyth, V.T., Šturcová, A., Kennedy, C.J., May, R.P., Altaner, C.M., *et al.* (2013) Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. *Plant Physiol* **161**: 465–476.

- Timell, T.E. (1986) Compression wood in gymnosperms. In *New Y.S.U.* Springer.
- Timoshenko, S.P., and Goodier, J.N. (1951) Theory of Elasticity. *McGraw-Hill Book Co.*
- Tocquard, K. (2016) Gravitropisme chez le peuplier : implication des kinases associées à la paroi (WAK) dans les événements précoces après inclinaison. Thèse *Univ Blaise Pascal Clermont-Ferrand 2.*
- Tocquard, K., Lopez, D., Decourteix, M., Thibaut, B., Julien, J.-L., Label, P., *et al.* (2014) The molecular mechanisms of reaction wood induction. In *The Biology of Reaction Wood.* Springer Berlin Heidelberg, pp. 107-138.
- Toyota, M., and Gilroy, S. (2013) Gravitropism and mechanical signaling in plants. *Am J Bot* **100**: 111–125.
- Tran, D., Galletti, R., Neumann, E.D., Dubois, A., Sharif-Naeini, R., Geitmann, A., *et al.* (2017) A mechanosensitive Ca²⁺ channel activity is dependent on the developmental regulator DEK1. *Nat Commun* **8**: 1009.
- Tretner, C., Huth, U., and Hause, B. (2008) Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *J Exp Bot* **59**: 2847–2856.
- Trewavas, A., and Knight, M. (1994) Mechanical signalling, calcium and plant form. *Plant Mol Biol* **26**: 1329–1341.
- Trouy, M.-C. (2015) *Anatomie du bois: Formation, fonctions et identification.* Editions Quae.
- Tuominen, H., Puech, L., Fink, S., and Sundberg, B. (1997) A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiol* **115**: 577–585.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., *et al.* (2006) The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596–1604.
- Uchida, N., and Tasaka, M. (2013) Regulation of plant vascular stem cells by endodermis-derived EPFL-family peptide hormones and phloem-expressed ERECTA-family receptor kinases. *J Exp Bot* **64**: 5335–5343.
- Uggla, C., Moritz, T., Sandberg, G., and Sundberg, B. (1996) Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 9282–9286.
- Ursache, R., Nieminen, K., and 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., *et al.* (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* **200**: 511–522.
- Vain, T., Crowell, E.F., Timpano, H., Biot, E., Desprez, T., Mansoori, N., *et al.* (2014) The cellulase KORRIGAN is part of the cellulose synthase complex. *Plant Physiol* **165**: 1521–1532.

- Van Bel, M., Diels, T., Vancaester, E., Kreft, L., Botzki, A., Van de Peer, Y., *et al.* (2018) PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res* **46**: D1190–D1196.
- Vandavasi, V.G., Putnam, D.K., Zhang, Q., Petridis, L., Heller, W.T., Nixon, B.T., *et al.* (2016) A structural study of CESA1 catalytic domain of Arabidopsis cellulose synthesis complex: evidence for CESA trimers. *Plant Physiol* **170**: 123–135.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* **153**: 895–905.
- Vanholme, R., Morreel, K., Darrach, C., Oyarce, P., Grabber, J.H., Ralph, J., and Boerjan, W. (2012) Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol* **196**: 978–1000.
- Veley, K.M., Makshev, G., Frick, E.M., January, E., Kloepper, S.C., and Haswell, E.S. (2014) Arabidopsis MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive ion channel activity. *Plant Cell* **26**: 3115–3131.
- Veley, K.M., Marshburn, S., Clure, C.E., and Haswell, E.S. (2012) Mechanosensitive channels protect plastids from hypoosmotic stress during normal plant growth. *Curr Biol* **22**: 408–413.
- Wang, H., Avci, U., Nakashima, J., Hahn, M.G., Chen, F., and Dixon, R.A. (2010) Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 22338–22343.
- Wang, Haihai, Jiang, C., Wang, C., Yang, Y., Yang, L., Gao, X., and Zhang, H. (2015) Antisense expression of the fasciclin-like arabinogalactan protein FLA6 gene in Populus inhibits expression of its homologous genes and alters stem biomechanics and cell wall composition in transgenic trees. *J Exp Bot* **66**: 1291–1302.
- Wang, H., Jin, Y., Wang, C., Li, B., Jiang, C., Sun, Z., *et al.* (2017) Fasciclin-like arabinogalactan proteins, PtFLAs, play important roles in GA-mediated tension wood formation in Populus. *Sci Rep* **7**: 6182.
- Wang, J., Kucukoglu, M., Zhang, L., Chen, P., Decker, D., Nilsson, O., *et al.* (2013) The Arabidopsis LRR-RLK, PXC1, is a regulator of secondary wall formation correlated with the TDIF-PXY/TDR-WOX4 signaling pathway. *BMC Plant Biol* **13**: 94.
- Wang, Rui, Ji, Y., Wang, J., Yang, S., and Song, Y. (2015) Vascular expression of Populus LRR-RLK genes and the effects of their overexpression on wood formation. *Mol Breed* **35**: 220.
- Wang, T., and Hong, M. (2016) Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *J Exp Bot* **67**: 503–514.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681–697.
- Watanabe, Y., Meents, M.J., McDonnell, L.M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H.N., *et al.* (2015) Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. *Science* **350**: 198–203.

- White, P.J., and Broadley, M.R. (2003) Calcium in Plants. *Ann Bot* **92**: 487–511.
- Xu, W., Purugganan, M.M., Polisensky, D.H., Antosiewicz, D.M., Fry, S.C., and Braam, J. (1995) Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**: 1555–1567.
- Yamaguchi, Y.L., Ishida, T., and Sawa, S. (2016) CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *J Exp Bot* **67**: 4813–4826.
- Yamanaka, T., Nakagawa, Y., Mori, K., Nakano, M., Imamura, T., Kataoka, H., *et al.* (2010) MCA1 and MCA2 that mediate Ca²⁺ uptake have distinct and overlapping roles in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1284–1296.
- Yordanov, Y.S., Regan, S., and Busov, V. (2010) Members of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in Populus. *Plant Cell* **22**: 3662–3677.
- York, W.S., and O’Neill, M.A. (2008) Biochemical control of xylan biosynthesis — which end is up? *Curr Opin Plant Biol* **11**: 258–265.
- You, T.-T., Zhang, L.-M., Zhou, S.-K., and Xu, F. (2015) Structural elucidation of lignin–carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from *Arundo donax* Linn. *Ind Crops Prod* **71**: 65–74.
- Zan, Y., Ji, Y., Zhang, Y., Yang, S., Song, Y., and Wang, J. (2013) Genome-wide identification, characterization and expression analysis of Populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BMC Genomics* **14**: 318.
- Zhang, H., Lin, X., Han, Z., Qu, L.-J., and Chai, J. (2016) Crystal structure of PXY-TDIF complex reveals a conserved recognition mechanism among CLE peptide-receptor pairs. *Cell Res* **26**: 543–555.
- Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z.-H. (2010) Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis. *Trends Plant Sci* **15**: 625–632.
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L., and Ye, Z.-H. (2008) A Battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **20**: 2763–2782.
- Zhong, R., McCarthy, R.L., Haghghat, M., and Ye, Z.-H. (2013) The Poplar MYB master switches bind to the SMRE site and activate the secondary wall biosynthetic program during wood formation. *PLOS ONE* **8**: e69219.
- Zhong, R., Richardson, E.A., and Ye, Z.-H. (2007) The MYB46 transcription factor is a direct target of *snd1* and regulates secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2776–2792.
- Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2014) Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol* **56**: 195–214.

Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2015) The Arabidopsis NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems. *Plant Signal Behav* **10**: e989746.

Zhou, C., and Wu, Q. (2012) Recent development in applications of cellulose nanocrystals for advanced polymer-based nanocomposites by novel fabrication strategies. In *Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications*. InTechOpen.

Zhou, Q., Rutland, M.W., Teeri, T.T., and Brumer, H. (2007) Xyloglucan in cellulose modification. *Cellulose* **14**: 625–641.

Zinkgraf, M., Liu, L., Groover, A., and Filkov, V. (2017) Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in *Populus* under diverse environmental conditions. *New Phytol* **214**: 1464–1478.

Annexes

Annexe I

Annexe I-1

Réponses thigmomorphogénétiques d'arbres fléchis 1 fois par jour (3jours/7) et 6 fois par jour (7jours/7) pendant 2 mois.

Propriétés morphologiques	Témoins	1F	6F
ΔH (cm)	55.9 ± 7.1^a	51.5 ± 7.8^{ab}	47.7 ± 7.8^b
$\Delta D_{//}$ (mm)	2.0 ± 0.5^a	3.3 ± 0.8^b	3.8 ± 0.7^b
ΔD_{\perp} (mm)	1.9 ± 0.5^a	2.9 ± 0.7^b	2.9 ± 0.7^b
Ratio $\Delta H:\Delta D_{//}$	29.6 ± 7.6^a	16.2 ± 3.2^b	12.9 ± 1.9^c
Ovalisation ($D_{//}/D_{\perp}$)	1.01 ± 0.02^a	1.05 ± 0.03^b	1.14 ± 0.04^c

Moyenne \pm écart-type dans chaque colonne, avec $n = 18$ arbres témoins, $n = 8$ arbres 1F et $n = 8$ arbres 6F. ΔH : accroissement en hauteur ; $\Delta D_{//}$ et ΔD_{\perp} : accroissement en diamètre dans le sens parallèle et perpendiculaire à la flexion. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres. Les arbres ont été cultivés en hydroponie en chambre de culture.

Annexe I-2

Mesures anatomiques dans les sections des tiges des arbres 1F et 6F subissant différentes déformations.

Propriétés anatomiques	Témoins	1F			6F		
		T	N	C	T	N	C
Fréquence des vaisseaux (No./mm ²)	152 ^a	113 ^{bcd}	138 ^{ab}	129 ^{abc}	93 ^d	137 ^{ab}	109 ^{cd}
Diamètre des vaisseaux (μm)	42.0 ± 2.0^a	33.9 ± 1.6^b	36.6 ± 1.6^{ab}	33 ± 1.7^b	33 ± 1.8^b	33.8 ± 0.9^b	33.7 ± 1.1^b

Moyenne \pm écart-type dans chaque colonne avec $n = 4$ pour les arbres témoins ; $n = 4$ pour les arbres 1F ; $n = 4$ pour les arbres 6F. T : zone en tension, N : zone neutre, C : zone en compression. Les résultats de l'ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey $P < 0.05$ sont indiqués par les lettres.

Annexe II

Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (génotype et tissus) sur les expressions relatives des gènes chez les arbres sauvages, RNAi-CLE12.2, OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis dans les zones en tension, neutre et en compression.

	Source of Variation	F	P -value
Expression du gène <i>PttCLE12.2</i>	Génotype	345.059	<0.001
	Tissus	23.640	<0.001
	Génotype x Tissus	5.419	<0.001
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Expression du gène <i>POPFLA6</i>	Génotype	0.265	0.767
	Tissus	62.053	<0.001
	Génotype x Tissus	1.366	0.23
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Expression du gène <i>PttMYB69</i>	Génotype	6.655	0.002
	Tissus	10.396	<0.001
	Génotype x Tissus	1.533	0.168
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Expression du gène <i>PttMAP70-5</i>	Génotype	18.858	<0.001
	Tissus	27.3	<0.001
	Génotype x Tissus	5.736	<0.001
	Résidus		
	Total		

F : test de Fisher.

L'analyse de variance sur les expressions relatives des gènes chez les arbres sauvages, RNAi-CLE12 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis montre qu'il y a un effet d'interaction pour les gènes *PttCLE12.2* et *PttMAP70-5*.

Annexe III

Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (génotype et traitement) sur les réponses morphologiques des arbres sauvages, RNAi-CLE12.2, OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis.

	Source of Variation	F	P -value
Accroissement en hauteur (ΔH)	Génotype	1.420	0.250
	Traitement	1.132	0.292
	Génotype x Traitement	0.232	0.794
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Accroissement en diamètre dans le sens de la flexion ($D_{//}$)	Génotype	4.961	0.01
	Traitement	53.221	<0,001
	Génotype x Traitement	1.287	0.284
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Accroissement en diamètre dans le sens de la flexion (D_{\perp})	Génotype	3.537	0.035
	Traitement	15.901	<0,001
	Génotype x Traitement	1.923	0.155
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Ratio ($\Delta H/D_{//}$)	Génotype	4.798	0.012
	Traitement	49.352	<0,001
	Génotype x Traitement	1.736	0.185
	Résidus		
	Total		
	Source of Variation	F	P -value
Ovalisation ($D_{//}/D_{\perp}$)	Génotype	0.709	0.496
	Traitement	249.276	<0,001
	Génotype x Traitement	2.217	0.117
	Résidus		
	Total		

F : test de Fisher.

L'analyse de variance sur les réponses de croissance aux flexions des arbres sauvages, RNAi-CLE12 et OE-CLE12.2 montre qu'il n'y a pas d'effet d'interaction entre les facteurs génotype et traitement.

Annexe IV

Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (génotype et tissus) sur les réponses anatomiques des arbres sauvages, RNAi-CLE12.2, OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis dans les zones en tension, neutre et en compression.

	Source of Variation	F	P -value
Diamètre de vaisseaux	Génotype	32.088	<0.001
	Tissus	74.051	<0.001
	Génotype x Tissus	2.569	0.019
	Résidus		
	Total		
Fréquence des vaisseaux	Source of Variation	F	P -value
	Génotype	9.388	<0.001
	Tissus	22.167	<0.001
	Génotype x Tissus	2.123	0.05
	Résidus		
Epaisseur de Paroi	Source of Variation	F	P -value
	Génotype	345.253	<0.001
	Tissus	85.684	<0.001
	Génotype x Tissus	133.921	<0.001
	Résidus		
Diamètres des fibres	Source of Variation	F	P -value
	Génotype	12.94	<0.001
	Tissus	5.214	<0.001
	Génotype x Tissus	3.987	<0.001
	Résidus		
	Total		

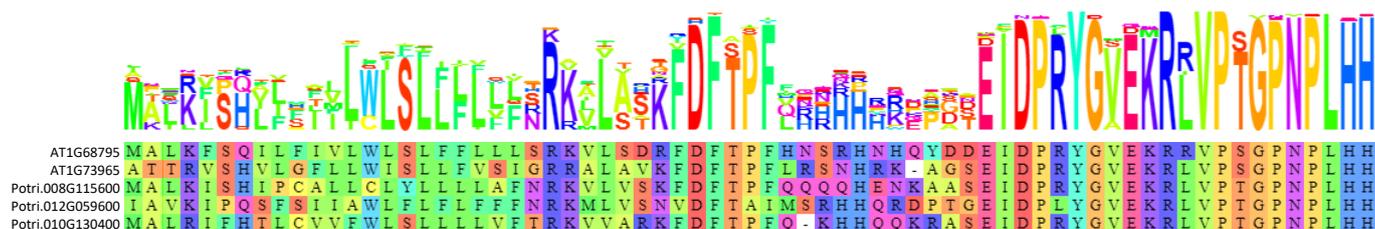
F : test de Fisher.

L'analyse de variance sur les modifications anatomiques des arbres sauvages, RNAi-CLE12 et OE-CLE12.2 non fléchis et fléchis montre qu'il y a un effet d'interaction pour les paramètres « diamètres de vaisseaux » « Epaisseur de paroi » « Diamètres des fibres »

Annexe V

Caractéristiques du gène *PtaCLE12.2* (Potri.008G11560)

L'analyse des domaines fonctionnels de la protéine *PtCLE12.2* a été effectuée grâce à la base de données [Plaza](#) où les séquences protéiques des homologues de *PtCLE12.2* chez le peuplier (Potri.010G13040 (*PtCLE12.1*) et Potri.012G05960 (*PtCLE13*)) et chez *Arabidopsis* (AT1G68795 (*AtCLE12*) et AT1G73965 (*AtCLE13*)) ont été alignées. Nous retrouvons en position N-terminale une séquence courte d'acides aminés hydrophobes, servant de peptide signal pour la sécrétion du prépropeptide. Ensuite une région très variable, avec cependant au sein de cette région variable un motif conservé RK-L-FDFTPF dont le rôle est inconnu. Dans son analyse bio-informatique Oelkers *et al.* (2008), avait déjà montré la présence de motifs conservés en amont du peptide signal. Le domaine CLE de 12 acides aminés est très conservé (RLVPTGPNPLHH) et on peut également noter que les 10 acides aminés en amont de la lysine sont conservés.

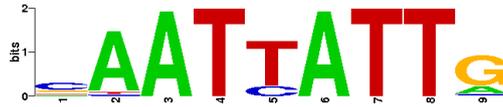


Alignement multiple réduit des séquences protéiques CLE d'*Arabidopsis thaliana* AT1G68795 (*AtCLE12*) et AT1G73965 (*AtCLE13*) et de *Populus trichocarpa* Potri.008G11560 (*PtCLE12.2*), Potri.010G13040 (*PtCLE12.1*) et Potri.012G05960 (*PtCLE13*). L'alignement a été obtenu en utilisant BioJS MSAViewer hébergé sur le site Plaza (Van Bel *et al.*, 2018). Les couleurs représentent l'alignement de Taylor (Taylor, 1987).

Annexe VI

Cis-motif présent sur la séquence promotrice d'*AtCLE13* et de *PtCLE12.2*.

AtHB1



AtHB15



Les séquences de liaison des gènes *AtHB1* (*A. thaliana*) et *AtHB15* (*Populus trichocarpa*) présentent une forte similarité.

Résumé

Les arbres ont la capacité de percevoir des sollicitations mécaniques quotidiennes dues au vent et d'acclimater leur croissance et leur développement en conséquence. Ce stress mécanique se traduit essentiellement par des flexions des organes, en particulier des branches et de la tige. Des études antérieures ont montré que la croissance en diamètre du peuplier était stimulée en réponse aux flexions mimant l'effet du vent. Cette augmentation de la croissance s'accompagne d'une modification de la nature du bois mis en place, qui a pu être observé chez quelques conifères et angiospermes, et nommé « bois de flexion ». Mais la caractérisation anatomique de ce bois a été peu approfondie, et les acteurs moléculaires de sa formation n'ont jamais été recherchés. De plus, dans la plupart de ces études les sollicitations mécaniques appliquées à la tige sont des flexions multidirectionnelles et d'intensité non contrôlée. Or, la déformation étant la variable physique perçue par la plante, il est nécessaire de contrôler l'amplitude de la flexion appliquée à la tige. Grâce à un dispositif expérimental original, nous avons appliqué des flexions unidirectionnelles sur de jeunes tiges de peupliers tout en contrôlant l'intensité des déformations appliquées. Cette étude a montré que la perception des déformations s'effectuait à une échelle locale, conduisant à une ovalisation de la tige. Nous avons pu également différencier le bois formé sous des déformations en tension, que nous avons nommé *Tensile Flexure Wood*, du bois formé sous des déformations en compression, que nous avons nommé *Compressive Flexure Wood*. Les analyses anatomiques et moléculaires montrent que l'intensité des déformations en valeur absolue ne suffit pas à expliquer toutes les réponses et que le signe (tension ou compression) de ces déformations joue également un rôle. Chez des arbres stimulés par des flexions unidirectionnelles plus fréquentes, la croissance et la différenciation cellulaire sont modulés encore différemment, notamment dans la zone en compression, apportant à la tige un bénéfice adaptatif face aux sollicitations suivantes. Le gène *CLE12.2* appartenant à la famille des gènes *CLAVATA*, gènes impliqués dans les régulations méristématiques, a été montré mécanosensible. Une approche de génomique fonctionnelle du gène *CLE12.2* par l'utilisation de plants transgéniques présentant une sous- ou une surexpression du gène nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une implication du peptide CLE12.2 dans la régulation des voies de biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette étude a permis de mettre en avant la complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du bois et apporte de nouvelles connaissances pour la poursuite des études sur l'acclimatation des arbres au vent.