



Progression de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à des variations de contraintes mécaniques de son substrat

Juliette Roué

► To cite this version:

Juliette Roué. Progression de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à des variations de contraintes mécaniques de son substrat. Biologie végétale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC082 . tel-02172070

HAL Id: tel-02172070

<https://theses.hal.science/tel-02172070>

Submitted on 3 Jul 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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET
DE LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie végétale

Soutenue le 19 décembre 2018

Présentée par

Juliette ROUE

**Progression de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* en
réponse à des variations de contraintes mécaniques de son
substrat**

Rapporteurs :

Lionel DUPUY, Chercheur, The James Hutton Institute, Dundee,
Scotland UK

Evelyne KOLB, Maître de Conférences, Université Sorbonne, Paris,
France

Maïté VICRE-GIBOUIN, Maître de Conférences, Normandie
Université, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France

Examineurs :

Jean-Louis JULIEN, Professeur, Président du Jury, Université
Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Alexis MAIZEL, Professeur, Université de Heidelberg, Heidelberg,
Allemagne

Directrice de thèse :

Valérie LEGUE, Professeure, Université Clermont Auvergne,
Clermont-Ferrand, France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement les membres de mon jury de soutenance qui ont accepté de juger mon travail et de participer à la soutenance de ma thèse : merci à Mmes Evelyne Kolb et Maïté Vicré ainsi qu'à Mrs Lionel Dupuy, Jean-Louis Julien et Alexis Maizel.

Je remercie ma directrice de thèse Valérie Legué pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, et pour m'avoir encadré durant ces trois années. Je remercie également l'ancien directeur du PIAF, Jean-Louis Julien, ainsi que la nouvelle équipe de direction, constituée par Bruno Moulia, Hervé Cochard, Nicolas Donnes et Valérie Legué pour m'avoir accueillie dans cette belle unité de recherche et m'avoir permis de réaliser ces trois ans de thèse dans de bonnes conditions.

Merci également aux membres de mon comité de thèse, Mmes Nathalie Leblanc-Fournier et Soazig Guyllomarc'H ainsi que Mrs Olivier Pouliquen et Laurent Laplace, pour m'avoir guidé et conseillé à des moments cruciaux de mon projet de thèse. Cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est sans l'aide précieuse et les conseils avisés de Hugo Chauvet, François Bizet, Eric Badel, Bruno Moulia, Evelyne Kolb et Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot. Un grand grand merci à vous tous !

Je tenais à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du personnel technique du PIAF sans qui le labo ne pourrait fonctionner correctement, et notamment Caro, Brigitte, Céline, Jérôme, Nicole et Stéphane sur qui j'ai toujours pu compter ces trois années. Vous êtes tous impliqués et disponibles et faites la force de ce laboratoire. Je ne saurais oublier les gestionnaires du PIAF Sandrine, Sylvie et Dominique T qui sont toujours d'une grande efficacité, merci à vous ! Je remercie également tous les membres du PIAF qui m'ont aidé plus ou moins directement dans mon projet de thèse ou qui m'ont simplement apporté de la joie durant ces trois années, que ce soit au détour d'une tasse de café, lors d'un des nombreux moments de convivialités organisés au PIAF, au cours d'une réunion, ou encore d'une fameuse marmite. Je remercie bien évidemment tous les docs, post docs ou encore stagiaires que j'ai pu croiser pendant ces trois années. Un grand merci à Hugo, François, Jeanne, Sébastien, Robin, Lise, Marie, Antoine, Ludo, Kevin, ... J'ai adoré la solidarité et l'entraide qui régnait entre nous tous et qui a été déterminante pour la réussite de cette thèse. Merci également à Jane, Claire, Céline, Pauline et Aurélie pour tous ces repas de midi qui ont égayés mes journées et m'ont permis de relâcher la pression quand j'en avais besoin.

Et enfin (le meilleur pour la fin !), je te remercie, ma ninette, pour avoir été une oreille attentive, une épaule solidaire, pour m'avoir toujours supportée et donnée de précieux conseils, pour m'avoir écoutée me plaindre pendant des heures, pour m'avoir apporté de la joie dans les moments difficiles ... bref merci pour TOUT !

MERCI MERCI MERCI

milles fois à vous tous et à ceux que j'aurais pu oublier.

Résumé

Le comportement mécanique d'un sol constitue un des facteurs prépondérants affectant la croissance et le développement racinaire. L'augmentation de la résistance mécanique d'un sol affecte l'architecture du système racinaire, la croissance axiale et radiale des racines, et l'orientation de la croissance. Bien que ces réponses soient décrites sur diverses espèces végétales dans la littérature, leur mise en place et les mécanismes de signalisation sous-jacents restent à ce jour méconnus. L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la mise en place des réponses des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à des variations de contraintes mécaniques de son substrat. La littérature fait état jusqu'ici de deux voies de signalisation mécanique possibles, l'une impliquant une mécanoperception au niveau de la coiffe racinaire, et l'autre faisant intervenir entre autres l'activation de canaux mécano-sensibles au niveau de l'apex racinaire. Pour étudier leur implication respective, nous avons caractérisé les réponses à une augmentation des contraintes mécaniques de racines primaires issues de la lignée *Arabidopsis thaliana* sauvage et de lignées mutantes affectées au niveau de l'organisation de la coiffe (*fez-2*, *smb-3*, *brn1-1 brn2-1*) ou au niveau de canaux ioniques mécanosensibles (*mca1-null*, *msl15*). Nous avons développé un système expérimental original basé sur le suivi de croissance et d'orientation des racines dans des milieux de culture à base de Phytigel. Ces milieux de culture permettent de mimer d'une part une augmentation à long terme et simultanée des contraintes mécaniques axiales, radiales et des frottements et d'autre part une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales. Tout d'abord, nous avons observé que la mise en place des réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à ces augmentations de contraintes mécaniques reposait sur une interaction entre des processus mécaniques (flambement) et biologiques (régulations de la zone de croissance). Ensuite, nous avons mis en évidence que la coiffe racinaire participait à la mise en place des réponses des racines d'*Arabidopsis thaliana* face à une augmentation des contraintes mécaniques. Nos résultats suggèrent que la coiffe pourrait constituer un siège de la mécanoperception. Par ailleurs, nos résultats sur les lignées *mca1-null* et *msl15* suggèrent que les canaux ioniques MCA1 et MSLs participeraient également à la mise en place des réponses racinaires à l'augmentation des contraintes mécaniques.

Abstract

Root growth and development are highly modulated by soil mechanical properties such as texture, structure and bulk density. Increases in soil penetration resistance affect root system architecture, root cell production and elongation, root diameter, and root tip orientation. Although root responses to changes in mechanical stresses are well described in several plant species, their establishment and the signaling pathways underlying these responses remains misunderstood. The main objective of this thesis is to study the establishment of *Arabidopsis thaliana* primary root responses to changes in mechanical stresses. So far, studies reported two distinct putative mechanical signaling pathways involving either (i) the root cap as a main mechanosensing site or (ii) the activity of stretch-activated ion channels localized on the cell plasma membranes along the root apex. According to previous studies, we studied the implication of the root cap and of the stretch-activated channels of the MCA and MSL families in the root responses to increases in mechanical stresses. We developed an original experimental set-up based on the monitoring of growth and orientation of *Arabidopsis thaliana* primary roots in one-layer and two-layer Phytigel based growth media. The one-layer growth media mimicked a long-term increase in frictions and in radial and axial mechanical stresses whereas the two-layer growth media mimicked a short-term increase in axial mechanical stresses. We characterized penetration abilities, growth rate and tip orientation of *Arabidopsis thaliana* wild type roots (Col-0) and mutant roots showing defects in root cap organization (*fez-2*, *smb-3*, *brn1-1 brn2-1*) or in stretch-activated ion channels activity (*mca1-null*, *msl15*) in one-layer and two-layer media. Firstly, we observed that the establishment of root growth responses to increases in mechanical stresses involved both mechanical (buckling) and biological (growth zone modulations) mechanisms. Then, our experiments demonstrated that alterations in root cap organization led to altered root growth responses to increases in mechanical stresses. Our results suggest that the root cap acts as a mechanosensing site. Moreover, the results obtained with the *mca1-null* and *msl15* *Arabidopsis* lines suggest that the MCA1 and MSLs ion channels also participate in the establishment of root responses to increases in mechanical stresses.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	23
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. LES SOLS	7
I.1. COMPOSITION ET ORGANISATION GÉNÉRALES DU SOL	7
I.2. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES SOLS ET LEUR DIVERSITÉ	9
I.3. LES DIFFÉRENTS SOLS MODÈLES UTILISÉS EN LABORATOIRE	15
II. COMPOSANTES DE LA PROGRESSION DES RACINES DANS UN SOL	25
II.1. LA RACINE PRIMAIRE D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	27
II.2. CROISSANCE AXIALE DE L' APEX RACINAIRE	43
II.3. L' ORIENTATION DE LA CROISSANCE RACINAIRE	49
II.4. ANCRAGE DE LA RACINE : POILS ABSORBANTS ET RACINES LATÉRALES	57
III. RÉPONSES DES RACINES À L' AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES	61
III.1. IMPACT SUR LA POUSSEE AXIALE : NOTIONS DE PRESSION DE CROISSANCE CRITIQUE	61
III.2. AUGMENTATION DU DIAMÈTRE RACINAIRE EN RÉPONSE AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES	67
III.3. L' AUGMENTATION DU DIAMÈTRE RACINAIRE FAVORISE LA PROGRESSION RACINAIRE...	69
III.4. ORIENTATION DE LA CROISSANCE OU THIGMOTROPISME	73
III.4. RÔLE DE LA COIFFE DANS LA RÉPONSE AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES	79
IV. QUID DE LA PERCEPTION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES ?	83
IV.1. LES CANAUX IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES	85
IV.2. LES RLKS COMME PROTÉINES CLÉS DE LA MÉCANOPERCEPTION	89
IV.3. RÔLE DU CALCIUM ET DES PHYTOHORMONES DANS LA SIGNALISATION MÉCANIQUE	91
OBJECTIFS	95
RÉSULTATS	101
CHAPITRE 1 : CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES MILIEUX DE CULTURE À BASE DE PHYTAGEL	105

I. PROTOCOLE DE PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE UNE-COUCHE ET DEUX-COUCES	107
II. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES MILIEUX UNE-COUCHE	109
II.1. DÉTERMINATION DE LA RIGIDITÉ DES MILIEUX EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PHYTAGEL	109
II.2. ESTIMATION DE LA RÉSISTANCE MÉCANIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PHYTAGEL	113
III. RÉSISTANCE MÉCANIQUE À LA PÉNÉTRATION DE L'INTERFACE DANS LES MILIEUX DEUX-COUCES	117
III.1. MÉTHODE : TESTS DE PÉNÉTROMÉTRIE SUR LES MILIEUX DEUX-COUCES	117
III.2. L'INTERFACE IMPLIQUE UNE AUGMENTATION DE LA RÉSISTANCE MÉCANIQUE, QUI DÉPEND DE LA CONCENTRATION EN PHYTAGEL DE LA COUCHE INFÉRIEURE DE MILIEU	119
IV. CONCLUSION ET DISCUSSION	121

CHAPITRE 2 : RÉPONSES DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES **125**

I. RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA À UNE AUGMENTATION DE LA RIGIDITÉ DU MILIEU	127
I.1. MÉTHODES : ANALYSE DES RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES DANS LES MILIEUX UNE-COUCHE	127
I.2. LA RIGIDITÉ DU MILIEU IMPACTE LA VITESSE DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA	135
I.3. LA RIGIDITÉ DU MILIEU IMPACTE LA RECTITUDE DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA	139
II. RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	141
II.1. MÉTHODES : ANALYSE DES RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES DANS LES MILIEUX DEUX-COUCES	141
II.2. LES CAPACITÉS DE PÉNÉTRATION DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA SONT IMPACTÉES PAR LA RÉSISTANCE MÉCANIQUE DE L'INTERFACE	147
II.3. PÉNÉTRATION ET RÉORIENTATION : LA RÉSISTANCE MÉCANIQUE DE L'INTERFACE IMPACTE LA RECTITUDE DES RACINES PRIMAIRES D'ARABIDOPSIS THALIANA	151

II.4. LES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES INDUISENT UNE RÉDUCTION DE LA VITESSE DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	155
III. DISCUSSION	159
III.1. L'AUGMENTATION DE LA RIGIDITÉ DU MILIEU IMPACTE LA CROISSANCE RACINAIRE ET L'ORIENTATION DES RACINES	159
III.2. LES MILIEUX DEUX-COUCHES PERMETTENT UNE CARACTÉRISATION MÉCANIQUE PARTIELLE DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	163
III.3. LA RÉPONSE DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES IMPLIQUE À LA FOIS DES MÉCANISMES PASSIFS ET ACTIFS	167

CHAPITRE 3 : IMPLICATION DE LA COIFFE RACINAIRE DANS LA MISE EN PLACE DES RÉPONSES À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES

I. CARACTÉRISATIONS MORPHOLOGIQUES DE L'APEX DES RACINES PRIMAIRES DES LIGNÉES D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA FEZ-2, SMB-3 ET BRN1-1 BRN2-1</i>	177
I.1. MÉTHODES : CARACTÉRISATION DU DIAMÈTRE, DE LA LONGUEUR ET DE LA GÉOMÉTRIE DE LA COIFFE RACINAIRE	177
I.2. LA TAILLE ET LA GÉOMÉTRIE DE LA COIFFE SONT ALTÉRÉES CHEZ LES RACINES <i>FEZ-2</i> , ET <i>SMB-3</i> MAIS PAS CHEZ LES RACINES <i>BRN1-1 BRN2-1</i>	181
II. RÉPONSE GRAVITROPIQUE DES RACINES PRIMAIRES DES LIGNÉES <i>FEZ-2, SMB-3 ET BRN1-1 BRN2-1</i>	185
II.1. MÉTHODE : ANALYSE DE LA RÉPONSE GRAVITROPIQUE	185
II.2. LES ALTÉRATIONS DE LA COIFFE DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA FEZ-2, SMB-3 ET BRN1-1 BRN2-1</i> N'ENTRAÎNENT PAS D'ALTÉRATION DE LA RÉPONSE GRAVITROPIQUE	187
III. IMPACT DES ALTÉRATIONS DE LA COIFFE SUR LES RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES À UNE AUGMENTATION DE LA RIGIDITÉ DU MILIEU	189
IV. IMPACT DES ALTÉRATIONS DE LA COIFFE SUR LES RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	193
IV.1. LES CAPACITÉS DE PÉNÉTRATION DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> SONT ALTÉRÉES CHEZ LES LIGNÉES <i>FEZ-2</i> ET <i>SMB-3</i>	193

IV.2. LA MISE EN PLACE DES ZONES DE COURBURE DES RACINES EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES DIFFÈRE CHEZ LES LIGNÉES <i>FEZ-2</i> ET <i>SMB-3</i>	197
IV.3. LA VITESSE DE CROISSANCE DES RACINES <i>FEZ-2</i> N'EST PAS AFFECTÉE PAR UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	205
V. DISCUSSION	209
V.1. LA GÉOMÉTRIE DE LA COIFFE NE SEMBLE PAS ÊTRE LE FACTEUR PRINCIPAL MODULANT LES RÉPONSES DES RACINES AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES.	209
V.2. LES CELLULES DE LA COIFFE RACINAIRE SERAIENT IMPLIQUÉES DANS LA MISE EN PLACE DES RÉPONSES DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES	213
<u>CHAPITRE 4 : VERS LA COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉORIENTATION DES RACINES EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES</u>	219
I. RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES ISSUES DES LIGNÉES <i>MCA1-NULL</i> ET <i>MSL45</i> À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	223
I.1. LE TAUX DE PÉNÉTRATION DES RACINES PRIMAIRES, ET NON LA FORCE CRITIQUE AXIALE, EST RESTREINT CHEZ LES LIGNÉES <i>MCA1-NULL</i> ET <i>MSL45</i>	223
I.2. LA RÉORIENTATION DE L'APEX DES RACINES PRIMAIRES FACE À LA PLUS FORTE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES EST ALTÉRÉE CHEZ LES LIGNÉES <i>MCA1-NULL</i> ET <i>MSL45</i>	225
I.3. LA VITESSE DE CROISSANCE DES RACINES <i>MCA1-NULL</i> ET <i>MSL45</i> N'EST PAS AFFECTÉE PAR L'AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	231
II. RÉPONSE DE L'AUXINE AU COURS DE LA RÉORIENTATION EN MARCHE DE L'APEX DES RACINES PRIMAIRES D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	235
II.1. MÉTHODE : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA RÉPONSE À L'AUXINE	235
II.2. LA RÉORIENTATION DES RACINES DANS LE MILIEU DEUX-COUCHES EST ACCOMPAGNÉE D'UNE RÉPONSE À L'AUXINE ASYMÉTRIQUE	239
III. DISCUSSION	243
III.1. L'ACTIVITÉ DES CANAUX MÉCANOSENSIBLES DE LA FAMILLE DES MCA ET DES MSL PARTICIPE À LA MISE EN PLACE DES RÉPONSES DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	243

III.2. L'AUXINE SERAIT IMPLIQUÉE DANS LA RÉORIENTATION DE L'APEX DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DES CONTRAINTES MÉCANIQUES AXIALES	247
--	-----

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	253
--	------------

I. DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME EXPÉRIMENTAL PERMETTANT UN PHÉNOTYPAGE PRÉCIS DES RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINAIRE AUX VARIATIONS DE CONTRAINTES MÉCANIQUES	255
--	------------

I.1. LES MILIEUX DE CULTURE DE TYPE HYDROGEL PERMETTENT DE CONTRÔLER LES VARIATIONS DE CONTRAINTES MÉCANIQUES IMPOSÉES AUX RACINES	255
---	-----

I.2. L'ÉTUDE DES RÉPONSES DE CROISSANCE PAR ANALYSE D'IMAGE : UNE MÉTHODE COMPLÈTE DE PHÉNOTYPAGE	257
--	-----

II. RÉPONSES DE CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> AUX AUGMENTATIONS DE CONTRAINTES MÉCANIQUES DANS LES HYDROGELS	259
--	------------

II.1. LA CROISSANCE RACINAIRE EST AFFECTÉE DANS LES MILIEUX UNE-COUCHE ET DANS LES MILIEUX DEUX-COUCHE	259
---	-----

II.2. LA RÉSISTANCE MÉCANIQUE DE L'INTERFACE CONDITIONNE LA RÉORIENTATION DE L'APEX DES RACINES PRIMAIRES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	261
---	-----

III. MODÈLE HYPOTHÉTIQUE DE MÉCANOPERCEPTION ET TRANSDUCTION PERMETTANT LA MISE EN PLACE DES RÉPONSES DES RACINES AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES	263
---	------------

III.1. LA COIFFE RACINAIRE : SIÈGE DE LA MÉCANOPERCEPTION ?	265
---	-----

III.2. UNE MÉCANOPERCEPTION PARALLÈLE ET/OU COMPLÉMENTAIRE PAR LE BAIS DES CANAUX IONIQUES MÉCANOSENSIBLES ?	269
---	-----

III.3. UNE TRANSDUCTION DU SIGNAL DES ZONES DE PERCEPTION VERS LA ZONE DE CROISSANCE IMPLIQUANT L'AUXINE ?	271
---	-----

BIBLIOGRAPHIE	275
----------------------	------------

ANNEXES	297
----------------	------------

Table des figures

<i>Figure 1: Représentation d'un profil de sol.....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 2 : Milieux transparents pour l'étude de la croissance des racines</i>	<i>22</i>
<i>Figure 3 : Progression d'une racine dans un sol.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 4 : La coiffe racinaire d'Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 5 : Contrôle moléculaire de la mise en place de l'apex racinaire d'Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 6 : Expression des gènes FEZ, SMB, BRN1 et BRN2 dans les cellules de la coiffe racinaire d'Arabidopsis thaliana</i>	<i>30</i>
<i>Figure 7 : Morphologie de la coiffe racinaire d'Arabidopsis thaliana chez les racines sauvages (A, D), smb-3 (B, E), fez-2 (C, F) et brn1-1 brn2-1 (G)</i>	<i>30</i>
<i>Figure 8 : Contrôle hormonal du développement de la racine primaire d'Arabidopsis thaliana</i>	<i>34</i>
<i>Figure 9 : Transport de l'auxine dans l'apex racinaire d'Arabidopsis thaliana grâce aux transporteurs d'efflux de l'auxine PINs.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 10 : Schématisation de l'expansion anisotrope des cellules végétales.</i>	<i>44</i>
<i>Figure 11 : Cinétique de la mise en place de la réponse gravitropique.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 12 : L'hydrotropisme ne nécessite pas de transport asymétrique d'auxine (Shkolnik et al., 2016).</i>	<i>54</i>
<i>Figure 13 : Impact de la résistance mécanique du sol sur la croissance en longueur des racines</i>	<i>62</i>
<i>Figure 14 : Recouvrement de la croissance racinaire et de la longueur de la zone de croissance des racines de Pisum sativum (Croser et al., 2000).....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 15 : Méthode expérimentale de mesure de la force critique de la croissance racinaire (Bizet et al., 2016)</i>	<i>64</i>
<i>Figure 16 : Impact de la résistance mécanique du sol sur le diamètre des racines de blé (Triticum aestivum) (Colombi et al., 2017).....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 17 : Oscillations de croissances en réponse à une contrainte mécanique (Oliva and Dunand, 2007).....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 18 : Contournement d'un obstacle par l'apex racinaire.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 19 : Flambement des racines de Medicago truncatula dans des gels composés de deux couches de concentration en Agar croissante (Silverberg et al., 2012)</i>	<i>76</i>
<i>Figure 20 : Impact de la résistance mécanique du sol sur la coiffe des racines de Zea mays.....</i>	<i>80</i>

<i>Figure 21 : Modèle hypothétique de la mécanotransduction et action des différents mécanorécepteurs putatifs (Monshausen and Gilroy, 2009)</i>	<i>84</i>
<i>Figure 22 : Perception et transduction des signaux mécaniques lors du contournement d'un obstacle rigide par la racine primaire d'Arabidopsis thaliana (d'après Monshausen et al., 2009).....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 23 : Représentation de l'appareil (Instron) utilisé pour la caractérisation de la rigidité du milieu de culture en fonction de la concentration en Phytigel.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 24 : Courbes de contrainte-déformation obtenues à la suite des tests de compression réalisés sur des cubes de gel de concentration croissante en Phytigel.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 25 : Module d'Young ou module élastique E en fonction de la concentration croissante en Phytigel.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 26 : Représentation d'un test de pénétrométrie réalisé pour la caractérisation de la résistance mécanique des milieux de culture une-couche et deux-couche.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 27 : Tests de pénétrométrie réalisés sur les milieux une-couche contenant de 0,2 % à 1,2 % de Phytigel.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 28 : Tests de pénétrométrie réalisés sur les milieux deux-couche contenant 0,2 % de Phytigel dans la couche supérieure et 0,2 %, 0,3 % et 0,5 % de Phytigel dans la couche inférieure</i>	<i>118</i>
<i>Figure 29 : Contraintes mécaniques imposées aux racines lors de leur croissance dans les milieux une-couche et dans les milieux deux-couches</i>	<i>120</i>
<i>Figure 30 : Problématiques du chapitre 2 et critères d'études des racines primaires d'Arabidopsis thaliana progressant dans les milieux une-couche et deux-couches.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 31 : Système expérimental de suivi de croissance et d'orientation des racines primaires d'Arabidopsis thaliana</i>	<i>126</i>
<i>Figure 32 : Profils de longueur cellulaire, de vitesse et d'EER de l'apex des racines primaires d'Arabidopsis thaliana</i>	<i>130</i>
<i>Figure 33 : Vitesse de croissance des racines primaires d'Arabidopsis thaliana progressant en fonction de la rigidité des milieux une-couche.....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 34 : Profils de longueur cellulaire de racines primaires d'Arabidopsis thaliana qui ont progressé dans un milieu une-couche contenant 0,2 % ou 1,2 % de Phytigel.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 35 : Angle de l'apex des racines primaires d'Arabidopsis thaliana au cours de leur croissance dans les milieux une-couche.....</i>	<i>138</i>

<i>Figure 36 : Amplitude des oscillations et déviation de l'apex par rapport à la verticale chez les racines primaires d'Arabidopsis thaliana dans les milieux une-couche en fonction de la rigidité du milieu</i>	<i>138</i>
<i>Figure 37 : Suivi spatiotemporel des zones de courbure des racines primaires d'Arabidopsis thaliana progressant dans des milieux une-couche de rigidité croissante</i>	<i>140</i>
<i>Figure 38 : Etapes conduisant à l'estimation de la force critique de rupture de l'interface et de la force de croissance axiale critique des racines primaires d'Arabidopsis thaliana</i>	<i>142</i>
<i>Figure 39 : Croissance des racines primaires d'Arabidopsis thaliana dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 (A), 0,2-0,3 (B), 0,2-0,5 (C)</i>	<i>146</i>
<i>Figure 40 : Comparaison des forces critiques de rupture de l'interface et de croissance axiale des racines primaires d'Arabidopsis thaliana</i>	<i>148</i>
<i>Figure 41 : Caractérisation spatiotemporelle des zones de courbure formées chez les racines primaires d'Arabidopsis thaliana au cours de leur pénétration dans la couche inférieure des milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B).....</i>	<i>150</i>
<i>Figure 42 : Réorientation de l'apex de racines primaires d'Arabidopsis thaliana dans les milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 43 : Vitesse de croissance des racines primaires d'Arabidopsis thaliana pénétrant dans la couche inférieure des milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B)</i>	<i>154</i>
<i>Figure 44 : Vitesse de croissance des racines primaires d'Arabidopsis thaliana ne pénétrant pas la couche inférieure des milieux deux-couche 0,2-0,3 (A) et 0,2-0,5 (B).</i>	<i>156</i>
<i>Figure 45 : Taux d'élongation racinaire en fonction de la résistance mécanique du substrat chez plusieurs espèces végétales (d'après Bengough et al., 2011).</i>	<i>160</i>
<i>Figure 46 : Croissance hélicoïdale des racines primaires d'Arabidopsis thaliana dans des milieux une-couche de concentration en Agar croissante (d'après Yan et al., 2018).</i>	<i>162</i>
<i>Figure 47 : Etapes illustrant la caractérisation morphologique de l'apex des racines Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1.....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 48 : Caractérisation de l'apex des racines de la lignée sauvage Col-0 et des lignées transgéniques fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1.</i>	<i>180</i>
<i>Figure 49 : Réponse gravitropique des racines primaires d'Arabidopsis thaliana issues des lignées Col-0, fez-2, et smb-3 et brn1-1 brn2-1</i>	<i>186</i>
<i>Figure 50 : Vitesse de croissance des racines primaires d'Arabidopsis thaliana issues des lignées Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1 en fonction de la rigidité du milieu.....</i>	<i>188</i>

<i>Figure 51 : Profils de vélocité et d'EER obtenus pour les racines Col-0 (A-B), fez-2 (C-D), smb-3 (E-F) et brn1-1 brn2-1 (G-H) dans les milieux une couche contenant 0,2% de Phytigel ou 1,2% de Phytigel.....</i>	<i>190</i>
<i>Figure 52 : Longueur de la zone de croissance (ZC, A) et EER_{max} (B) des racines Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1 dans les milieux un-couche contenant 0,2% ou 1,2% de Phytigel..</i>	<i>190</i>
<i>Figure 53 : Taux de pénétration des racines Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1 dans les milieux deux-couches, en fonction de la résistance mécanique de l'interface.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure 54 : Force critique de croissance axiale des racines primaires d'Arabidopsis thaliana issues des lignées Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1 dans le milieu deux-couche 0,2-0,3</i>	<i>194</i>
<i>Figure 55 : Pénétration des racines fez-2 dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B).....</i>	<i>196</i>
<i>Figure 56 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée fez-2 dans les milieux deux-couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5.</i>	<i>196</i>
<i>Figure 57 : Pénétration des racines smb-3 dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B).....</i>	<i>198</i>
<i>Figure 58 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée smb-3 dans les milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5.....</i>	<i>198</i>
<i>Figure 59 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée brn1-1 brn2-1 dans les milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5.....</i>	<i>200</i>
<i>Figure 60 : Boucles formées au cours de la progression de trois racines primaires distinctes issues de la lignées brn1-1 brn2-1 dans la couche supérieure du milieu 0,2-0,5.....</i>	<i>202</i>
<i>Figure 61 : Vitesse de croissance des racines Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1 pénétrant dans la couche inférieure dans les milieux deux couches 0,2-0,2 (A-D) et 0,2-0,3 (E-H).....</i>	<i>204</i>
<i>Figure 62 : Vitesse de croissance des racines Col-0, fez-2, smb-3 et brn1-1 brn2-1 se réorientant après contact avec l'interface dans les milieux 0,2-0,3 (A-D) et 0,2-0,5 (E-H).</i>	<i>206</i>
<i>Figure 63 : Taux de pénétration des racines mca1-null et mslΔ5 dans les milieux deux-couche 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5, en fonction de la résistance mécanique du milieu.....</i>	<i>222</i>
<i>Figure 64 : Force axiale critique des racines mca1-null et mslΔ5 dans le milieu deux-couches 0,2-0,3.....</i>	<i>224</i>
<i>Figure 65 : Pénétration des racines mca1-null (A) et mslΔ5 (B) dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 et 0,2-0,3..</i>	<i>224</i>
<i>Figure 66 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée mca1-null dans les milieux deux-couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5</i>	<i>226</i>

<i>Figure 67 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la mslΔ5 dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5.....</i>	<i>228</i>
<i>Figure 68 : Vitesse de croissance des racines Col-0, mca1-null et mslΔ5 se réorientant après contact avec l'interface dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5.....</i>	<i>230</i>
<i>Figure 69 : Observation microscopique de la réponse à l'auxine au cours de la mise en place de la première zone de courbure dans le milieu 0,5-0,8 grâce à la construction DII-Venus</i>	<i>238</i>
<i>Figure 70 : Observation microscopique de la réponse à l'auxine au niveau de la deuxième zone de courbure dans le milieu 0,5-0,8</i>	<i>238</i>
<i>Figure 71 : Observation microscopique de la réponse à l'auxine lors de la mise en place de la première zone de courbure dans le milieu 0,5-0,8 grâce à la construction DR5::GFP</i>	<i>240</i>
<i>Figure 72 : Modèle hypothétique de la perception et de la transduction du signal mécanique permettant la mise en place des réponses des racines aux variations de contraintes mécaniques</i>	<i>264</i>

Abréviations

ABA	Acide Abscissique	CLE	CLV3/ESR
ABCB	ATP-BINDING CASSETTE GROUP B	CLV	CLaVata
ACR4	ARABIDOPSIS CRINKLY4	CML	CalModuline Like
ADN/DNA	Acide DésoxyriboNucléique	COL	Columelle
AFBs	AUXIN-SIGNALING F- BOX PROTEINs	CPMCW	Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall
ARFs	Auxin Response Factors	CUC	Cup-Shaped Cotyledon
ARN	Acide RiboNucléique	DII	Domain II
ARNm	ARN messenger	DR5	Death Receptor 5
ANOVA	ANalysis Of Variance	EPI	Epiderme
ATAF	Arabidopsis Transcription Activation Factor	ESR	EMBRYO SURROUNDING REGION
AUX	AUXIN RESPONSE FACTOR	FER	FERONIA
BBM	BABYBOOM	FT	Facteur de transcription
BC	Cellules Bordantes	GA	Gibberellic Acid
BR	BRassinostéroïdes	GID1	GA INSENSITIVE DWARF1
BRN	BEARSKIN	HOS1	HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1
Ca²⁺	ion calcium	IAA	Indole Acetic Acid
CaM	CalModuline	JA	Jasmonic Acid
CK	CytoKinine		
Cl⁻	ion chlorure		

KRP2	KIP-RELATED	PLT	PLETHORA
PROTEIN2		QC	Centre Quiescent
LRC	Lateral Root Cap	RBR	RETINOBLASMA-RELATED
MAR	Méristème Apical Racinaire	RLK	Receptor Like Kinase
MCA	Mid1-Complementing Activity	RNAi	RNA interference
MS ½	Milieu Murashige et Skoog ½	ROS	Reactive Oxygene Species
MS	MécanoSensible	SCR	SCARECROW
MscS	MechanoSensisitive Channel of Small conductance	SIM	SIAMESE
MSL	MscS-like	SHR	SHORT ROOT
MP	MONOPTEROS	SL	StrigoLactone
NAC	NAM ATAF CUC	SMB	SOMBRERO
NAM	No Apical Meristem	TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
NPA	Acide nahtylphtalamique	WAK	Wall Associated Kinase
NPH4	NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL4	WOX	Wuschel like homeobOX
PID	PINOID	XEH	Xyloglucan EndoHydrolase
PIP	PLASMA MAMBRANE INTRINSEQUE PROTEIN	XET	Xyloglucan EndoTransglycosylase
		XTH	XET/hydrolase

Introduction générale

PROBLÉMATIQUE ÉQUIPE MECA

Comment les arbres tiennent debout (tout en croissant) dans un environnement mécanique fluctuant ?

AXE 1

Acclimatation des structures et fonctions de l'arbre sous contraintes mécaniques

AXE 2

Contrôle postural : perception et régulation

- Croissance apicale et signalisation longue distance
- Caractérisation du bois formé sous contraintes et conséquences fonctionnelles
- **Apex racinaire et contraintes mécaniques**

Ma thèse a été réalisée au sein de l'Unité Mixte de Recherche PIAF (UMR INRA/UCA 547, Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en Environnement Fluctuant). Cette unité s'intéresse au fonctionnement des arbres en réponse à des variations de facteurs de l'environnement. L'équipe MECA, au sein de l'UMR PIAF, s'intéresse tout particulièrement à la régulation mécanoperceptive de la croissance et du développement architectural des plantes pour comprendre entre autres l'acclimatation et la résilience au vent. Depuis l'arrivée de Mme Valérie Legué au sein de l'équipe MECA il y a quelques années, cette équipe a élargi sa thématique de recherche au système racinaire et notamment à la réponse des racines aux variations de contraintes mécaniques. C'est par cette présente thèse, réalisée sous la direction de Mme. Legué, que la recherche orientée sur les racines végétales a été initiée.

Le système racinaire est une composante essentielle du fonctionnement des plantes terrestres. Dans le cadre de la vie stationnaire et autotrophe de la plante, il joue un rôle majeur dans l'absorption de l'eau et des éléments minéraux et dans leur transport vers la partie aérienne, permettant la croissance et le développement de la plante entière. Le système racinaire présente de nombreuses fonctions supplémentaires, en constituant notamment le siège d'associations symbiotiques avec des microorganismes du sol importantes dans l'assimilation de l'azote et du phosphore, en favorisant l'ancrage de la plante ou encore, en limitant la dégradation des sols par érosion et compaction. Lors de leur progression dans un sol, les racines sont confrontées à une importante variabilité spatiotemporelle des propriétés physiques et mécaniques du sol (Jin *et al.*, 2013). Il est connu que les variations de contraintes mécaniques, telle qu'une compaction du sol ou la présence d'un obstacle, entraînent de nombreuses altérations morphologiques et physiologiques du système racinaire, qui peuvent être transmises jusqu'aux parties aériennes (Bengough *et al.*, 2011; Potocka and Szymanowska-pułka, 2018). Il a été mis en évidence que l'augmentation des contraintes mécaniques expérimentées par les racines entraînait une diminution de leur croissance en longueur, une augmentation de leur diamètre, et une diminution de la croissance aérienne ainsi que du rendement (Masle and Passioura, 1987; Young *et al.*, 1997; Whalley *et al.*, 2008). Malgré un nombre croissant d'études portant sur les réponses des racines ou du système racinaire aux variations de contraintes mécaniques, la perception de ces variations de contraintes ainsi que les mécanismes contrôlant la mise en place des réponses sont encore peu décrits.

C'est dans ce contexte que nous avons débuté ce projet de recherche au sein de l'équipe MECA, visant à caractériser les réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation à court et long terme des contraintes mécaniques. Pour initier l'étude des mécanismes contrôlant la mise en place des réponses mécaniques chez les racines, nous avons étudié l'implication dans ces réponses d'une part de la coiffe racinaire et d'autre part de certains acteurs moléculaires auparavant suggéré comme acteurs de la signalisation mécanique. Cette thèse représente le début d'un projet de recherche complexe, dont l'objectif *in fine* est de comprendre l'ensemble des mécanismes de perception et de transduction du signal mécanique au sein des racines, permettant la mise en place des réponses racinaires aux variations des contraintes mécaniques.

Ce manuscrit est articulé en 3 parties principales. La première partie est une **Synthèse bibliographique** qui dresse l'état des connaissances actuelles relatives à mon sujet d'étude. Cette synthèse présente les différentes composantes de la progression des racines dans un sol ou un substrat ainsi que les effets déjà connus des variations de contraintes mécaniques sur ces composantes. La synthèse bibliographique est clôturée par la présentation détaillée des **Objectifs** de la thèse

Ensuite, la partie **Résultats** est organisée en quatre chapitres. Un **premier chapitre** est consacré à la caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels utilisés pour la culture des plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Le **deuxième chapitre** porte sur les réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à des augmentations à court ou long terme des contraintes mécaniques, mimées dans les hydrogels. Le **troisième chapitre** tend à déterminer l'importance de la coiffe racinaire dans la mise en place des réponses des racines d'*Arabidopsis* à l'augmentation des contraintes mécaniques. Enfin, le **quatrième chapitre** concerne des expérimentations préliminaires réalisées les derniers mois de la thèse, qui visent à identifier, à terme, des acteurs moléculaires de la perception et de la transduction de l'augmentation des contraintes mécaniques axiales. Les résultats obtenus au cours de la thèse sont finalement discutés de manière globale au sein d'une **Discussion générale** et des **Perspectives** pour la suite de ce projet de recherche sont proposées.

Synthèse Bibliographique

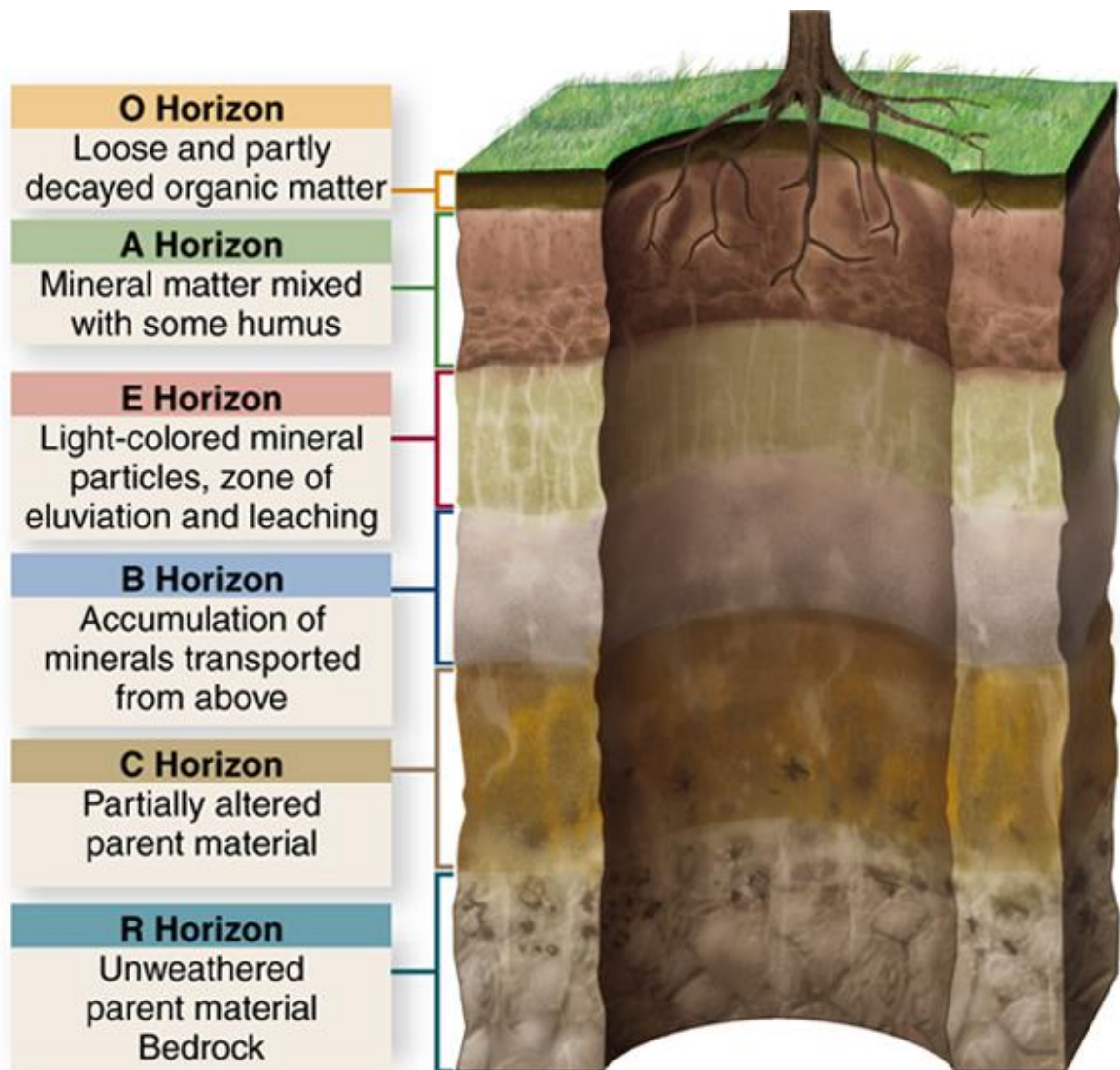


Figure 1: Représentation d'un profil de sol. Le sol est divisée en plusieurs horizons regroupés sous deux catégories principales : les horizons humifères (O, A) et les horizons minéraux (E, B, C, R) (D'après Kaufmann et Cleveland 2007, Environmental Science)

I. Les sols

I.1. Composition et organisation générales du sol

Le sol est la couche la plus externe de la croûte terrestre, résultat de l'accumulation de l'eau, de l'air et des organismes vivants et morts sur la roche mère (Pour livres, Stengel et Gelin, 1998 ; Drénou, 2006 ; Gobat *et al.*, 2010). La formation du sol, ou pédogénèse, se divise en trois phases :

- (i) L'altération de la roche mère donne naissance à des éléments grossiers (blocs, pierres, cailloux et graviers) ainsi qu'à des particules minérales réparties en trois classes selon leur taille : les argiles (diamètre $< 2\mu\text{m}$), les limons (2 à $50\mu\text{m}$) et les sables (50 à $200\mu\text{m}$).
- (ii) La colonisation du sol par la végétation apporte de la matière organique. Cette matière organique subit deux types de transformations qui sont la minéralisation¹ et l'humification². L'humus se lie ensuite aux argiles pour former le complexe argilo-humique empêchant ainsi la dispersion de l'argile et évitant le colmatage et la compaction du sol. Par ailleurs, les complexes argilo-humiques favorisent la structuration, l'aération du sol et une bonne rétention d'eau.
- (iii) Des horizons de sol bien différenciés se mettent en place grâce aux transferts de matière selon des migrations descendantes (lessivage³, podzolisation⁴,...) ou ascendantes (fluctuation de la nappe⁵, évaporation,...). Dans un sol, deux types d'horizons sont distingués, les horizons humifères et les horizons minéraux (Figure 1). L'horizon humifère le plus superficiel, l'horizon organique (O), regroupe la litière au sens large. Le deuxième horizon, appelé horizon de surface ou horizon organo-minéral (A) est constitué d'un mélange de matière organique fine et de matière minérale (sables, limons, argiles). Les horizons O et A reposent sur des horizons minéraux beaucoup moins riches en matière organique : l'horizon de lessivage (E), l'horizon d'accumulation (B), la roche mère peu altérée (C) et enfin la roche mère non altérée (R) (Figure 1).

¹ Décomposition de substances complexes d'origine organique ou minérale, en composés plus petits et de forme plus simple.

² Transformation de la matière organique morte en humus par l'action de la pédoflore et de la pédofaune.

³ Processus d'entraînement par l'eau des substances solides contenues dans le sol.

⁴ Processus de dégradation des argiles par des acides organiques, acidification du sol.

⁵ Variation du niveau de la nappe phréatique, en fonction des pluies.

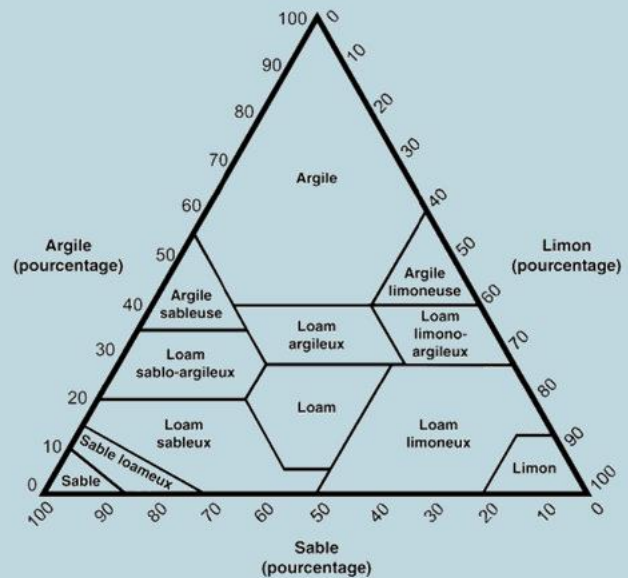
Box 1: Propriétés mécaniques du sol

Texture du sol

Proportion relative dans le sol des particules minérales réparties selon leur taille :

- Les sables : 50 à 200 μm
- Les limons : 2 à 50 μm
- Les argiles : inférieur à 2 μm

Pour déterminer la texture d'un sol, on utilise un triangle textural sur lequel on reporte les proportions des 3 différentes catégories de particules minérales. Les textures sont regroupées en classes : sol argileux, limono-sableux, limoneux,...



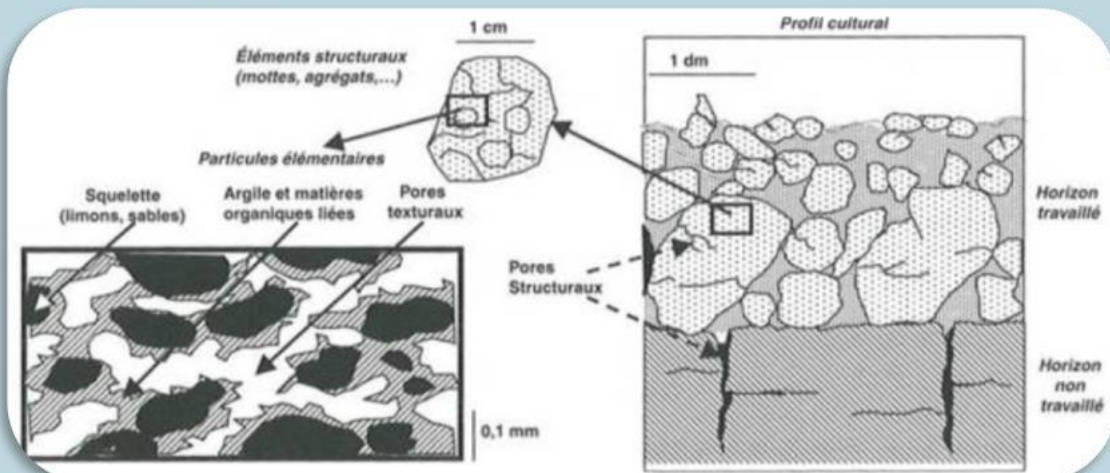
Structure du sol

Agencement dans l'espace des constituants du sol. La structure est déterminée par la forme des agrégats et elle est liée à la texture du sol mais aussi aux activités biologiques. Par exemple, un sol argileux aura préférentiellement une structure angulaire.



Porosité du sol

La porosité du sol désigne la fraction du volume total du sol occupé par des vides. La porosité peut être observée à différentes échelles et classée selon des critères dimensionnels, fonctionnels et selon l'origine des pores.



Les horizons se composent tous de trois phases, représentées en proportions différentes selon l'horizon en question : la phase solide ou matrice, la phase liquide (l'eau ou solution du sol) qui contient les substances dissoutes et la phase gazeuse. La phase solide est constituée de particules minérales et organiques de diverses tailles et formes. La proportion dans le sol des particules minérales de chaque classe (argiles, sables, limons) définit la **texture du sol** (Box1). La **structure du sol**, quant à elle, traduit la taille, la forme et la disposition de ces particules minérales (Box1). A une échelle plus large, elle peut également faire référence à la continuité des pores, leur capacité à retenir et transférer les fluides et substances organiques et inorganiques. L'assemblage et la taille des éléments minéraux créent un réseau poreux et influent de façon majeure sur la porosité. La **porosité du sol** désigne la fraction du volume total du sol occupé par des vides (eau ou air) (Box1). Elle se caractérise par la distribution de la taille des pores, par leur forme et leur connectivité. Deux classifications distinctes des pores ont été définies selon leur taille et selon leur origine. On considère trois classes de taille : (i) les micropores retenant l'eau indisponible pour les racines, (ii) les mésopores retenant l'eau utile aux racines et (iii) les macropores remplis d'air. Par ailleurs, la porosité peut être classée selon son origine en porosité structurale ou en porosité texturale. La porosité structurale regroupe la macroporosité comme les fissures due aux cycles de dessèchement/humectation du sol par exemple, ou encore aux pores biologiques dus à l'action des racines et aux galeries de vers de terre. La porosité texturale, quant à elle, correspond à la porosité résultant de l'agencement des particules de sable, limon, argile et matière organique. La porosité intervient dans de nombreux processus tels que la circulation de l'eau et de l'air, le transport de solutés et la croissance et le développement des racines. La porosité joue également sur la **densité apparente du sol** qui correspond à la masse de sol sec par unité de volume apparent.

I.2. Propriétés mécaniques des sols et leur diversité

Toutes les caractéristiques du sol, structure, texture, porosité et densité, varient fortement dans le temps et l'espace. Dans le temps, les phénomènes rapides se produisant dans les sols ont une origine externe, découlant aussi bien de leur interaction avec les végétaux que de phénomènes atmosphériques tels que les précipitations ou les échanges thermiques. La variabilité spatiale de la phase solide du sol, quant à elle, découle directement de la texture et la structure du sol. En effet, un sol constitué de sables en quantité importante implique la présence de pores larges, ayant une faible capacité à retenir l'eau. Au contraire, un sol composé de particules fines telles que les argiles permet une bonne rétention d'eau.

La variation spatiale de la phase solide peut être importante à la fois en profondeur, d'un horizon à l'autre, ou pour une même profondeur. Ainsi, du type de sol et du climat en question dépendra la disponibilité en eau et en nutriments pour l'absorption racinaire mais également les contraintes mécaniques expérimentées par les racines (Jin *et al.*, 2013). D'un point de vue mécanique, la capacité des racines à pénétrer et progresser dans le sol dépendra des propriétés physiques et mécaniques du sol, et notamment de sa résistance mécanique à la pénétration (Jin *et al.*, 2013). Les racines doivent générer une pression de croissance axiale suffisante, dont l'importance dépend de la résistance mécanique du sol qui s'oppose à la progression racinaire (Kirby and Bengough, 2002). La résistance du sol varie selon les sols, selon leur composition et organisation ainsi qu'en fonction des pratiques culturales par exemple.

1.2.1. Résistance mécanique des sols : outil de mesure et ordre de grandeur

La résistance mécanique d'un sol ou d'un substrat est classiquement mesurée à l'aide d'un pénétromètre, c'est-à-dire une sonde métallique généralement composée d'une pointe conique attachée à un axe cylindrique, qui est poussé dans le sol à une vitesse constante (en général, $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$). La force nécessaire pour pousser le pénétromètre dans le sol à vitesse constante est mesurée, puis divisée par l'aire de la section transversale du cône pour obtenir la rigidité du sol (Ruiz *et al.*, 2016). Le diamètre de l'axe cylindrique du pénétromètre peut varier de 0,1 mm à plus de 10 mm selon l'utilité. Les pénétromètres de plus grande taille sont fréquemment utilisés pour mesurer la dureté d'un sol destiné à accueillir des fondations. Dans le cadre des études de la progression des racines dans un sol sont généralement utilisés des pénétromètres de 1 mm de diamètre, taille comparable au diamètre racinaire de plusieurs espèces végétales de grandes cultures (maïs, blé, pois, ...) (Jin *et al.*, 2013). Dans ces études, le cylindre est choisi de façon à ce que son diamètre soit plus petit que celui du cône afin de limiter les frottements et l'adhésion entre le sol et le cylindre. Le cône du pénétromètre peut être plus ou moins pointu, avec un demi-angle allant classiquement de 5° à 30° (Tracy *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2013). Un demi-angle plus important, autour de 30° génère un front d'expansion sphérique lorsque le pénétromètre est poussé dans le sol. Un demi-angle de 5° entraîne en revanche une déformation cylindrique, correspondant à la déformation générée par la progression racinaire. L'acuité du cône influe sur la mesure de la résistance mécanique du sol.

Une résistance mesurée à l'aide d'un pénétromètre de demi-angle 30° est jusqu'à 3 fois supérieure à la résistance mesurée avec un pénétromètre de demi-angle 15° (Ruiz *et al.*, 2016). L'ordre de grandeur de la résistance mécanique du sol mesurée par pénétrométrie est généralement de l'ordre de 1MPa mais il est important de préciser que la résistance à la pénétration réellement expérimentée par les racines est bien plus faible que la résistance mesurée avec un pénétromètre. Selon les pénétromètres utilisés et les espèces végétales considérées, il a été estimé que la résistance mesurée par pénétrométrie pouvait être de 1,5 à 7,5 fois supérieure à la résistance expérimentée par la racine (Whiteley and Dexter, 1984; Misra *et al.*, 1986; Bengough and Mullins, 1990). Cette différence peut être expliquée par plusieurs caractéristiques de la croissance racinaire. Tout d'abord, alors qu'un pénétromètre est poussé dans le sol, la progression de la racine est permise par une croissance en longueur de la zone apicale. Ainsi, alors que l'ensemble de la sonde se déplace dans le sol, seulement une petite zone à l'apex de la racine est concernée par le déplacement. De plus, contrairement au pénétromètre, l'apex racinaire n'est pas forcé à prendre une direction prédéfinie et peut orienter sa croissance localement vers des zones de moindre résistance. Enfin, les frottements qui s'exercent sur la racine en croissance sont beaucoup plus faibles que ceux s'exerçant sur le pénétromètre, d'une part du fait de la croissance très lente des racines (quelques micromètres par minutes) et d'autre part grâce à la production de mucilage et la desquamation des cellules bordantes à l'apex de la racine.

1.2.2. Facteurs majeurs impactant les propriétés mécaniques des sols

La **compaction du sol** est en grande partie le résultat de facteurs externes, comme le passage des engins agricoles, le travail du sol ou labour, le piétinement par les animaux, et dépend dans une moindre mesure de sa composition propre (Batey, 2009). Les facteurs climatiques peuvent également jouer sur la compaction d'un sol. En effet, les fortes averses peuvent entraîner la formation de croues de surface sur le sol et les cycles d'assèchement/humectation peuvent modifier le contenu en eau du sol et entraîner l'assemblage des particules du sol en agrégats. La compaction du sol correspond à une augmentation de la densité apparente du sol qui peut aller de l'ordre de 1,2 g.cm⁻³ pour un sol meuble jusqu'à des valeurs supérieures à 1,6 g.cm⁻³ pour des sols très denses (Van Noordwijk *et al.*, 1993; Kirby and Bengough, 2002). Or, une forte densité apparente augmente la résistance mécanique du sol. La compaction du sol entraîne également une modification de la distribution des tailles de pores, avec une diminution notamment du nombre de pores grossiers, et altère la connectivité du réseau poreux (Tracy *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2017).

L'altération de la porosité limite la circulation et la disponibilité de l'eau utile dans le sol, au détriment de l'absorption racinaire. Sont aussi limités le transport de solutés, la diffusion de nutriments et les échanges gazeux, affectant l'aération du sol nécessaire à l'activité microbienne et à la croissance racinaire.

Le **contenu en eau** du sol est également une propriété physique qui altère la résistance mécanique du sol (Bengough *et al.*, 2011). Des sols avec une faible teneur en eau présentent un comportement cassant, friable, alors qu'une forte rétention d'eau procure au sol un comportement plus élastique. Pour un même type de sol, doubler le contenu en eau de 15 à 30 kg.kg⁻¹ peut diviser la résistance mécanique du sol d'un facteur 3 (Ruiz *et al.*, 2016). L'effet du contenu en eau dépend de la composition du sol. En effet, des sols plus argileux ou avec beaucoup de matière organique ont un comportement élastique malgré un contenu en eau modéré (Richefeu *et al.*, 2006). Selon le contenu en eau, des ponts capillaires se forment entre les particules du sol et induisent des forces de tension qui tirent les agrégats les uns vers les autres et augmentent la taille des hétérogénéités ou obstacles du sol (Richefeu *et al.*, 2006). Le dessèchement d'un sol est souvent caractérisé à l'aide du potentiel matriciel du sol, qui correspond aux tensions de surface et aux ponts capillaires affectant la disponibilité en eau pour les plantes (Kramer and Boyer, 1995). Plus le potentiel matriciel est négatif, plus le sol est considéré comme sec mais cette relation de dépendance est non-linéaire. Un déficit en eau dans le sol impactera la croissance racinaire de deux façons distinctes : (i) en diminuant la quantité d'eau disponible pour l'absorption par les racines et (ii) en augmentant la résistance mécanique du sol (Bengough *et al.*, 2011).

I.3. Les différents sols modèles utilisés en laboratoire

Du fait de l'opacité du sol, l'étude du comportement racinaire, en termes de croissance, ramification, interactions biotiques et abiotiques, constitue un véritable challenge. Si beaucoup d'études ont tenté de caractériser le comportement racinaire dans des sols après excavation et lavage des racines, l'objectif aujourd'hui est de développer des méthodes pour étudier les racines *in situ* durant leur croissance et leur développement. En effet, l'excavation des racines reste une technique destructrice et fastidieuse qui peut altérer à la fois la racine et la structure du sol (Smit *et al.*, 2000). Les récentes avancées des techniques d'imagerie, notamment des techniques basées sur les radiations, facilitent l'observation des racines en 3D dans des « vrais » sols (Schmidt *et al.*, 2012).

La tomographie à rayons X a été utilisée par plusieurs études pour visualiser les racines en milieu opaque et quantifier à la fois la structure du sol et l'architecture racinaire (Schmidt *et al.*, 2012). Cependant, cette technique est encore à ses balbutiements pour ce qui est de caractériser la dynamique de croissance racinaire (Carminati *et al.*, 2009) et ne permet pas à ce jour d'analyser l'activité biologique, surtout à cause de l'incapacité à l'utiliser pour détecter des marqueurs fluorescent (Downie *et al.*, 2015).

Pour pallier aux problèmes de visualisation des racines dans les vrais sols, de nombreuses méthodologies expérimentales ont été élaborées : rhizotrons, milieux de croissance de type hydrogels, ou encore milieux granulaires transparents. Ces méthodes peuvent offrir aux racines des conditions culturales assez éloignées des conditions naturelles mais présentent chacune leur avantage. Ces différents sols modèles sont généralement couplés avec des techniques d'imagerie allant du simple appareil photo, à l'utilisation de la fluorescence, permettant l'exploration non-invasive des processus de croissance racinaire et des interactions racines-sol.

I.3.1. Les Rhizotrons

Un rhizotron est un système permettant une visualisation 2D des racines progressant dans un sol (Dong *et al.*, 2003). Les rhizotrons se composent typiquement de colonnes de sol fermées de part et d'autre par des plaques transparentes (plastique ou verre) qui sont généralement légèrement inclinées pour favoriser la croissance des racines à l'interface entre la surface vitrée et le sol (Dechamps *et al.*, 2008). Dans les rhizotrons, les racines qui progressent le long de la vitre peuvent être visualisées *in situ* sans être manipulées ou sans altérer le sol. Les rhizotrons ont prouvé leur utilité pour plusieurs espèces végétales comme le maïs et l'orge et permettent d'étudier, entre autres, l'effet de stress biotiques et abiotiques sur la croissance racinaire, comme l'impact du contenu en eau ou de la nutrition minérale du sol (Kuchenbuch and Ingram, 2002; Dong *et al.*, 2003; Nagel *et al.*, 2012). Comme pour toutes les techniques de culture en 2D, les études en rhizotrons négligent l'aspect tridimensionnel complexe de la croissance et de l'orientation des racines et peuvent ainsi masquer des éléments de réponses des racines (Downie *et al.*, 2015). De plus, la présence de la vitre en contact avec la racine durant sa croissance peut constituer une source de contraintes mécaniques additionnelles, pouvant déclencher des réponses thigmotropiques chez les racines.

Box 2.1 : Mesure des propriétés élastiques des hydrogels

Calcul du Module de Young ou module d'élasticité longitudinale E

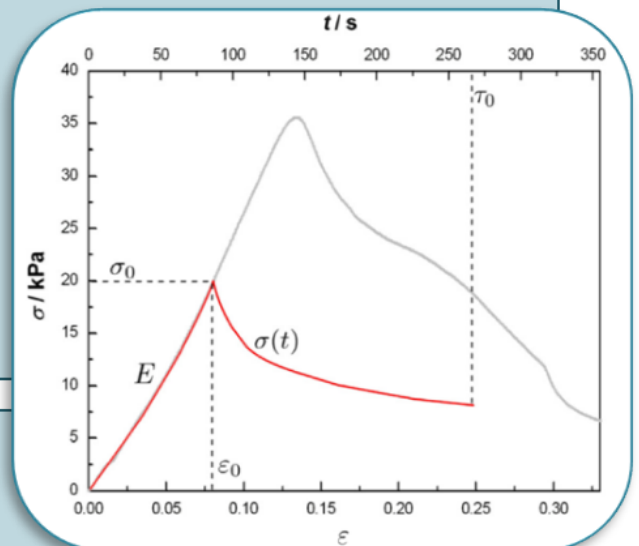
E est la constante qui relie la **contrainte** σ (traction ou compression) et la **déformation élastique** ε (allongement ou contraction) d'un matériau. La contrainte nécessaire pour déformer le matériau d'un certain pourcentage est mesurée. La courbe contrainte-déformation obtenue (courbe grise) présente deux phases : (i) une phase de déformation élastique pour de faibles/moyens niveaux de contraintes et (ii) une phase de déformation plastique pour de hauts niveaux de contraintes. Lorsqu'un matériau est déformé de façon élastique, il retrouve parfaitement sa forme et ses dimensions initiales dès lors que l'on supprime les forces appliquées. Selon la **loi de Hooke**, une déformation élastique est toujours linéairement proportionnelle à la force appliquée. La portion de la courbe contrainte-déformation correspondant à la déformation élastique du matériau est donc linéaire et sa pente est égale au module de Young E .

Loi de Hooke :

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon}$$

$$\text{où } \sigma = \frac{F}{A} \text{ et } \varepsilon = \frac{l_0}{\Delta l}$$

Avec F la Force (N), A l'aire de surface de l'échantillon (m^2), l_0 l'épaisseur initiale de l'échantillon (m) et Δl la variation de cette épaisseur (m)



Courbes contrainte-déformation (grise) et contrainte-temps (rouge) pour le calcul de E et de τ_0 respectivement

Box 2.2 : Mesure des propriétés viscoélastiques

Calcul du temps de relaxation τ_0

La viscosité d'un matériau signifie qu'il présente une certaine résistance à l'écoulement en cisaillement.

Plus la viscosité augmente, et plus la capacité du matériau à s'écouler facilement diminue, plus l'énergie dissipée par l'écoulement sera importante. Par exemple, l'eau qui s'écoule facilement et rapidement présente une viscosité 10^4 fois plus faible que le miel (de l'ordre de 10^{-3} pour l'eau et 10^1 pour le miel à une température de 20°C). Le comportement viscoélastique des hydrogels peut être caractérisé *via* le calcul du **temps de relaxation** τ_0 du matériau après déformation. Pour mesurer le temps de relaxation, une déformation élastique ε_0 maintenue constante est imposée au matériau. La contrainte résultante $\sigma(t, \varepsilon_0)$ est suivie en fonction du temps (courbe rouge). Dans un premier temps, la contrainte augmente linéairement avec la déformation, puis elle diminue avant de se stabiliser. Le temps de relaxation correspond alors au temps nécessaire pour que le niveau de contrainte se stabilise.

Modèle de Kohlrausch-Williams-Watts (KWW):

$$\Phi(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right)^\gamma$$

Où t est le temps (s), τ_0 est le temps de relaxation pour lequel $\Phi(t) = 1/e$ et γ est l'étendue de la distribution dans les limites $0 \leq \gamma \leq 1$

Le contact permanent entre les racines et la vitre entraîne ainsi un biais dans l'étude de l'orientation et de la croissance des racines. Enfin, les rhizotrons ne sont pas complètement représentatifs d'un vrai sol, à la fois en terme de résistance mécanique, de température, de contenu en eau, ou encore de réactions redox (Paez-Garcia *et al.*, 2015).

1.3.2. Les hydrogels

Les substrats de type gels/hydrogels sont fréquemment utilisés en laboratoire comme « sols modèles » pour cultiver les plantes *in-vitro* (Massa and Gilroy, 2003; Yamamoto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2017). Ces milieux sont généralement composés d'un milieu de culture adapté à la croissance et au développement végétal, combiné à un gélifiant de type agar⁶. Le milieu de croissance, qui doit être stérile, comprend de manière générale des macroéléments (N, P, K, Ca, Mg, Mn, ...), des microéléments (Bo, Fe, Cu, ...), des vitamines et des sucres. Ajouté à une solution homogène, l'agar fond à haute température (autour de 85°C). Une fois refroidie, la solution se gélifie grâce à la formation d'un maillage tridimensionnel, formé par agrégation d'hélices d'agarose. Pour la culture *in-vitro*, le Phytigel⁷ est parfois préféré à l'agar pour gélifier un milieu de culture, car il est plus stable à haute température et confère au milieu une meilleure clarté optique et une plus forte résistance mécanique (Schiavi *et al.*, 2016). L'ajout de Phytigel dans une solution chauffée puis refroidie entraîne la formation d'un gel physique via la réticulation ionique au niveau des acides glucuroniques (Morris *et al.*, 2012). La présence d'ions dans la solution, et particulièrement de cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} , ...) impacte grandement la rigidité du milieu à base de Phytigel. En effet, les cations divalents forment des gels plus rigides via l'agrégation de multiples hélices (Morris *et al.*, 2012). Le Phytigel, comme l'agar, confère à l'hydrogel un comportement viscoélastique (Box 2, Schiavi *et al.*, 2016). Les propriétés physiques et mécaniques des hydrogels à base d'agar et de Phytigel peuvent être affectées par la température, les vibrations ou encore la vitesse de déformation (Schiavi *et al.*, 2016). Pour ce qui est de l'effet de la température, il a été montré qu'un gel présentant un module d'Young, ou module d'élasticité E, autour de 280 kPa à 20°C voyait son module diminuer à 240 kPa à une température de 35°C (Box 2 ; Schiavi *et al.*, 2016). De plus, pour une même température, augmenter la vitesse de déformation entraîne également une augmentation du module d'élasticité de l'hydrogel (Schiavi *et al.*, 2016).

⁶ Complexe polysaccharidique composé de 70% d'agarose et de 30% d'agaropectine. L'agarose est un gélifiant composé d'un polymère linéaire de D-galactose et de 3,6-anhydrogalactose (Chen *et al.*, 2004). L'agaropectine est la fraction non-gélifiante de l'agar constituée d'unités D-galactose liées à des β -1,3-glycosides.

⁷ Composé poly(carboxylic acid) produit par la fermentation bactérienne. Il est composé de glucose, d'acide glucuronique et de rhamnose.

Dans le cadre de la culture *in vitro*, le Phytigel ou l'agar sont généralement ajoutés à un milieu Murashige and Skoog (MS) ou MS/2 comprenant une quantité d'ions précise et constante, à une concentration comprise entre 0,2% et 2,5% (w/w). Dans cette gamme de concentration, il a été montré que le module d'Young des hydrogels à base d'Agar augmentait avec la concentration en Agar, et se situait entre 1,5 kPa pour 0,3% d'Agar et 254 kPa pour 2,5% d'Agar (tests en compression, Normand *et al.*, 2000). En revanche, peu d'études ont été réalisées pour caractériser les propriétés mécaniques des hydrogels à base de Phytigel. De plus, ces propriétés étant fortement influencées par la température, les vibrations, le contenu en ions de la solution de base, il est difficile de les comparer entre les différentes études et avec les études portant sur l'Agar. Toutefois, Dobránszki *et al.* (2011) ont mesuré à l'aide d'un rhéomètre les modules élastiques et visqueux de milieux MS additionnés soit de Phytigel, soit d'Agar. Il a été montré qu'un milieu MS contenant 4% d'Agar présentait un module élastique de 1360 Pa alors que le même milieu contenant 2% de Phytigel présentait un module de 3910 Pa (Dobránszki *et al.*, 2011). Bien que ces valeurs soient très faibles par rapport aux valeurs mesurées dans les autres études, elles illustrent le fait que le Phytigel confère au milieu une grande rigidité par rapport à l'Agar.

En plus de la rigidité du milieu, la disponibilité en eau est un paramètre primordial à prendre en compte lorsqu'on prépare un hydrogel destiné à cultiver des plantes. Les hydrogels, aussi appelés gels hydrophiles, ont la caractéristique d'absorber de grandes quantités d'eau sans pour autant se dissoudre (Morris *et al.*, 2012). Leur capacité à absorber l'eau vient de la présence dans ces gels de groupes fonctionnels hydrophiles attachés au squelette des polymères. Leur capacité à résister à la dissolution vient quant à elle de la réticulation entre les mailles du réseau (Lodha and Netravali, 2005). Dans un hydrogel, une partie de l'eau se lie aux groupes hydrophiles et aux ions. Une fois que ces molécules sont saturées, le réseau du gel va imbiber de l'eau additionnelle qui va remplir les espaces ou pores entre le maillage du réseau. Cette eau correspondra à l'eau libre du gel. Le contenu en eau libre et/ou liée du gel en fonction de la concentration en agent gélifiant a été très peu mesuré. Toutefois, dans une étude, il a été montré que l'ajout de Phytigel à une résine à des concentrations croissantes impactait peu sa teneur en eau (Lodha and Netravali, 2005). En effet, la teneur en eau dans la résine est mesurée à 19% pour une concentration en Phytigel de 5% et à 17,2% pour une concentration en Phytigel à 50%. Entre ces deux mêmes concentrations en Phytigel, le module de Young de la résine est quant à lui multiplié par 3 (Lodha and Netravali, 2005).

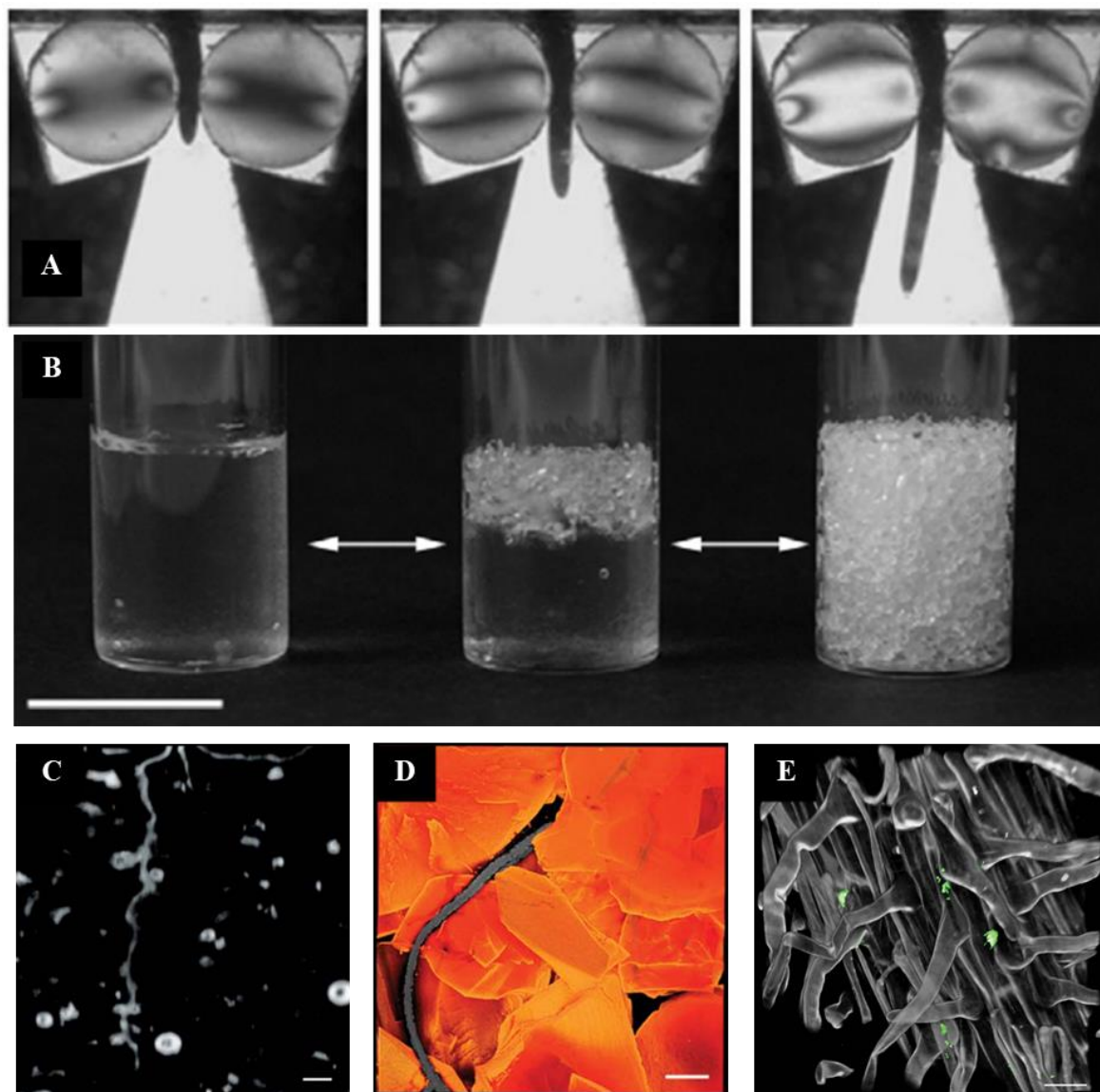


Figure 2 : Milieux transparents pour l'étude de la croissance des racines

Croissance d'une racine de pois chiche à l'intérieur d'un interstice de 9 mm entre deux disques photoélastiques. La croissance de la racine dans l'interstice induit la déformation des disques photoélastiques (Kolb *et al.*, 2012). Les franges photoélastiques, après analyse, permettent de quantifier la force axiale exercée par les racines. (B) Principe du milieu transparent « Refractive-Index Matched Medium » (Downie *et al.*, 2012). La solution aqueuse et les particules de Nafion présentent le même indice de réfraction. Lorsque les particules sont immergées, leurs contours ne sont plus visible (à gauche). (C-E) Exemples d'acquisitions d'images de racines progressant dans le milieu granulaire transparent. (C) Projection 2D d'une racine de *Nicotiana benthamiana* obtenue par tomographie optique, échelle = 1mm. (D) Visualisation en microscopie confocale d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* exprimant de la GFP dans ses membranes plasmiques (gris) et progressant dans un milieu dont les particules ont été colorées avec du sulphordamine-B (orange), échelle 300µm. (E) Visualisation en microscopie confocale d'une racine de *Lactuca sativa*, échelle = 30µm.

Il a également été montré que la diffusion de l'eau dans un hydrogel (eau milli Q et Agar) était négativement corrélée à la concentration en agar, avec une diffusion de l'eau divisée par un facteur 1,2 entre une solution contenant 2,5% d'agar et une solution contenant 12.5% d'agar (Davies *et al.*, 2010). La diminution de la teneur en eau libre et de la diffusion de l'eau dans les gels avec l'augmentation de la concentration en agent gélifiant pourrait impacter négativement la croissance végétale. Toutefois, l'agar et le Phytigel étant rarement utilisés à une concentration supérieure à 2,5 % pour la culture *in-vitro*, les effets sur la disponibilité en eau peuvent être négligés.

Les hydrogels ont été largement utilisés en culture *in-vitro* et présentent des avantages à la fois en termes de visualisation du système racinaire, de facilité de mise en place méthodologique et sont compatibles avec de nombreuses techniques d'imageries (Box 2). Le plus gros inconvénient des hydrogels est qu'ils sont très éloignés des sols, notamment au niveau de leurs propriétés mécaniques. En effet, alors que le sol est un milieu granulaire constitué de particules solides et de pores que les racines peuvent exploiter pour progresser, le gel est un matériau continu présentant un maillage physique, duquel les racines doivent rompre les liaisons pour progresser.

1.3.2. Les milieux granulaires transparents

Ces dernières années, des tentatives de mise en place de nouveaux sols modèles ont vu le jour pour d'une part conserver l'atout de visualisation des hydrogels et d'autre part se rapprocher des conditions naturelles en termes de propriétés mécaniques expérimentées par les racines. Divers milieux granulaires transparents destinés à l'étude des racines sont apparus dans la littérature dans ce but (Bengough *et al.*, 2009; Downie *et al.*, 2012; Kolb *et al.*, 2012). Dans certaines études, des grains ont été ajoutés à un milieu de croissance classique pour mimer la structure granulaire d'un sol (Bengough *et al.*, 2009; Vollsnes *et al.*, 2010). Les grains peuvent être représentés par des billes de verres mobiles ajoutées dans un milieu type hydrogel ou encore par des plots fixes immergés dans une solution hydroponique. Dans les deux cas, le milieu de croissance ou solution nutritive permet de contrôler l'apport en eau et en nutriments pour les racines et les grains/plots permettent de mimer la présence d'obstacles et d'un réseau poreux exploitable par la croissance racinaire (Bengough *et al.* 2009, Kolb, unpublished). Selon certaines études, la présence des grains peut avoir un double usage et permettre de mieux comprendre la progression racinaire dans un sol. Kolb *et al.* (2012) ont mis en place un système dans lequel deux billes photoélastiques éclairées par une lumière monochromatique et placées entre deux filtres polarisant étaient séparées d'une distance donnée (Figure 2A).

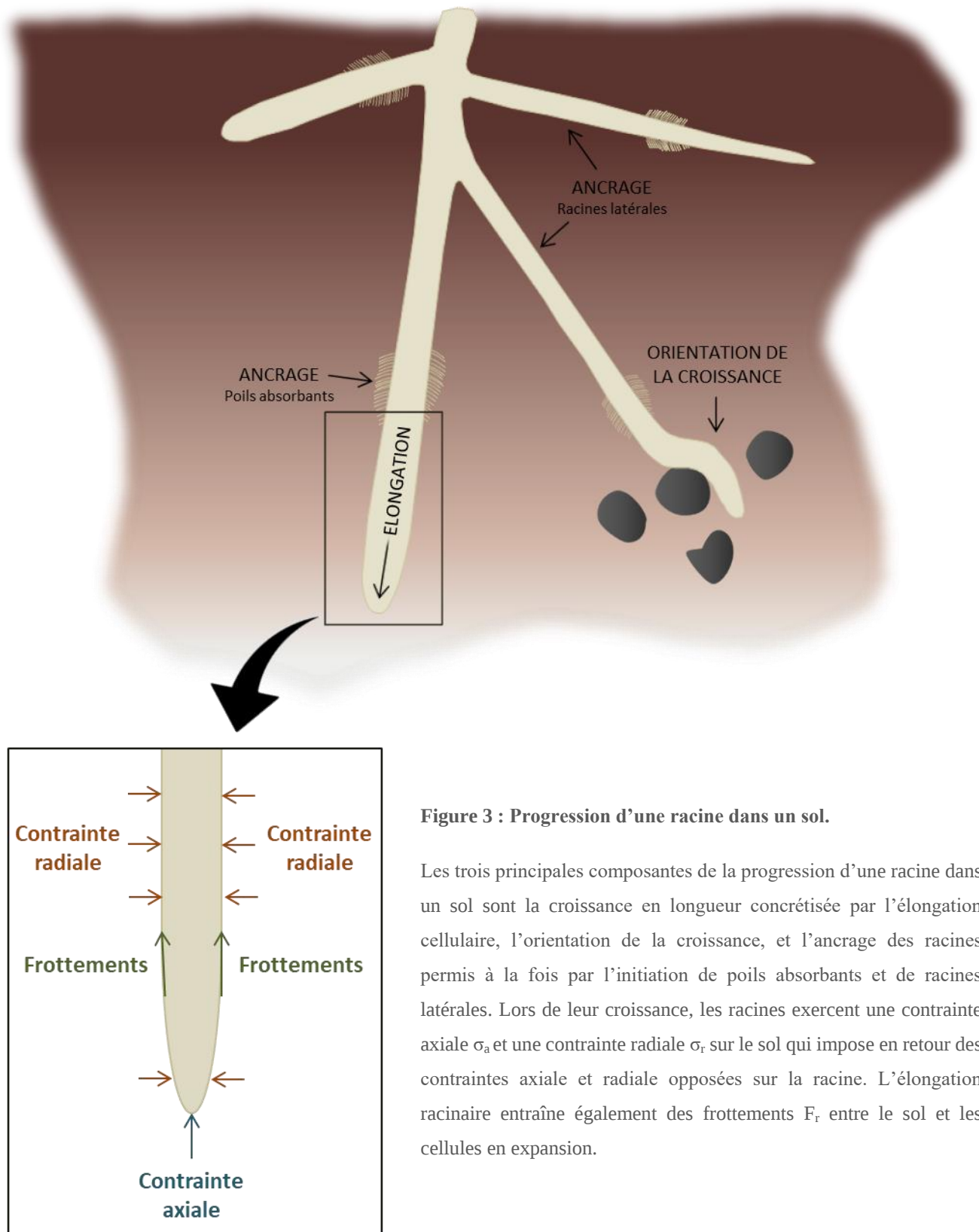


Figure 3 : Progression d'une racine dans un sol.

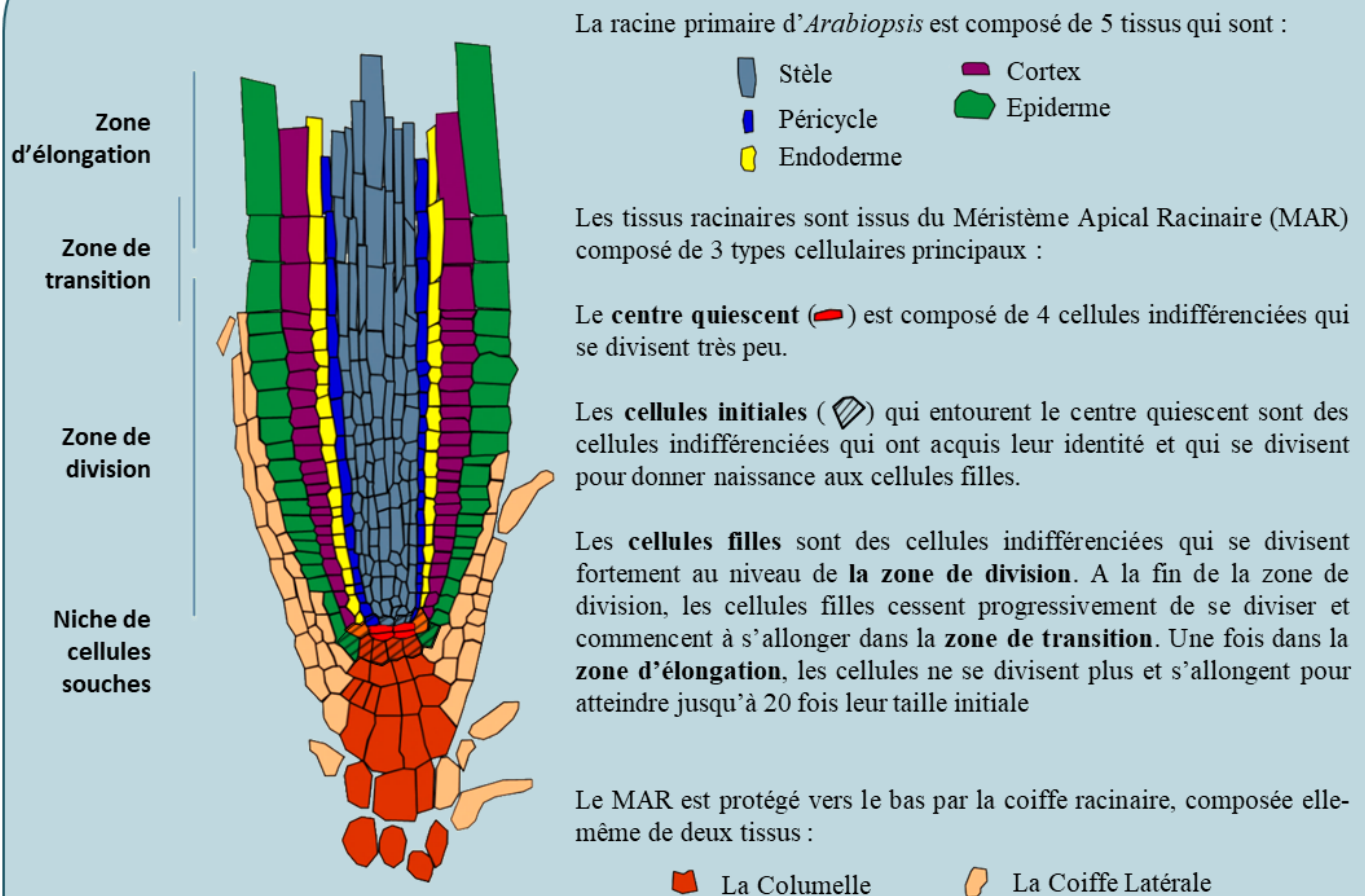
Les trois principales composantes de la progression d'une racine dans un sol sont la croissance en longueur concrétisée par l'élongation cellulaire, l'orientation de la croissance, et l'ancrage des racines permis à la fois par l'initiation de poils absorbants et de racines latérales. Lors de leur croissance, les racines exercent une contrainte axiale σ_a et une contrainte radiale σ_r sur le sol qui impose en retour des contraintes axiale et radiale opposées sur la racine. L'élongation racinaire entraîne également des frottements F_r entre le sol et les cellules en expansion.

Une graine de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est alors posée au-dessus des billes et les racines qui en émergent sont amenées à progresser dans l'espace entre les deux billes. Lors de leur passage, les racines déforment les billes photoélastiques et des franges optiques se développent en relation avec la charge mécanique imposée par le passage des racines (Figure 2A). Cette méthode permet ainsi de quantifier la force radiale exercée par les racines lors de leur passage dans le pore (Kolb et al., 2012). Par ailleurs, Downie *et al.* (2012) ont élaborés un milieu transparent plus réaliste que les hydrogels regroupant des particules solides et des pores contenant de l'eau et de l'air. Ils ont exploités l'indice de réfraction des matériaux pour incorporer des particules solides dans le milieu nutritif tout en les rendant invisibles. En effet, si des particules solides d'indice de réfraction donné sont immergées dans un liquide de même indice de réfraction, alors les contours des particules ne sont plus visibles (Figure 2B). Dans leur étude, Downie *et al.* (2012) ont utilisé des particules de Nafion immergées dans une solution aqueuse. Le but de ce procédé est de constituer un milieu granulaire dont les particules solides n'obturent pas la croissance et le développement racinaire (Figure 2B). Ils ont combiné cette méthode de culture aux techniques de Tomographie à projection optique et de microscopie confocale, permettant d'obtenir une représentation 3D des racines et la cartographie de marqueurs fluorescents (Figure 2C-E; Downie *et al.*, 2012).

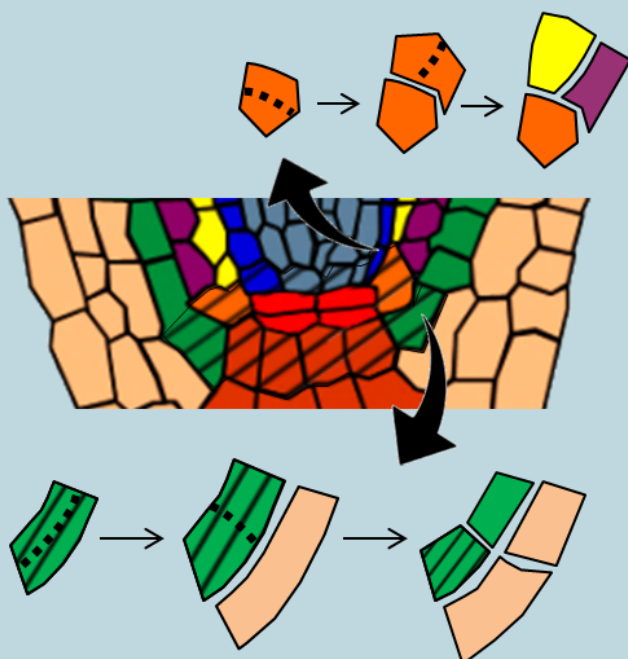
II. Composantes de la progression des racines dans un sol

La progression d'une racine dans un sol ou un substrat dépend de nombreux mécanismes internes à la racine ainsi que des interactions racines-environnement (Figure 3). La croissance primaire qui s'établit à l'apex des racines par la production et l'élongation successives des cellules agit comme un moteur de la poussée axiale de la racine dans le sol/substrat. La croissance primaire génère une force de pression de croissance, également appelée contrainte axiale, qui permet à la racine de déplacer les particules du sol ou du substrat pour progresser. Le sol en retour impose une contrainte axiale qui s'oppose à la croissance racinaire (Figure 3). Lors de l'élongation de la racine, des contraintes de frottements sont également mises en jeu entre les cellules en élongation de la racine et le sol environnant (Figure 3). En plus du taux de croissance axiale de la racine, l'orientation de cette croissance est également une composante clé de la progression racinaire dans le sol/substrat. Dans les sols homogènes, en l'absence de stimuli asymétriques, les racines poussent en direction du vecteur de gravité. Or, en conditions naturelles, l'environnement dans lequel les racines évoluent est rarement homogène, notamment au niveau de la disponibilité en eau et en nutriments et au niveau des propriétés mécaniques.

Box 3 : Organisation de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*



Division des initiales pour former les tissus racinaires



Les couches cellulaires de cortex et d'endoderme proviennent d'une même initiale, l'initiale Cortex/endoderme (■) qui se divise en deux temps : d'abord de façon anticline puis de façon péricline.

Les couches cellulaires d'épiderme et de coiffe latérale proviennent d'une initiale commune (▨) qui se divise également de façon anticline puis péricline. Le MAR des racines d'*Arabidopsis* est un méristème fermé, et diffère des méristèmes ouverts, au sein desquels l'épiderme et la coiffe latérale sont issues de deux initiales distinctes.

Les couches cellulaires composant la stèle proviennent d'un lot d'initiales péricycle/vaisseaux qui sont proximales au centre quiescent (▨).

Les cellules de la columelle sont issues de la division d'un lot d'initiales propres disposées juste en dessous du centre quiescent (■).

A chaque division formative des initiales EPI/LRC et COL, une nouvelle couche de de façon proximale à la précédente, déplaçant la couche voisine plus ancienne vers la périphérie de la racine.

Les racines sont fréquemment amenées à réorienter leur croissance en direction de stimuli (eau, nutriments, oxygène,...) ou à l'opposé d'obstacles pour optimiser la croissance et le développement végétal.

II.1. La racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*

La racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*, comme les racines de la plupart des espèces végétales, peut être vue comme un ensemble de cylindres concentriques (Box 3). Elle est composée radialement de 5 tissus distincts qui sont, du plus externe au plus interne, l'épiderme, le cortex, l'endoderme, le péricycle, et la stèle contenant les tissus vasculaires. L'apex de la racine est entouré d'un tissu particulier, la coiffe racinaire, composé lui-même de deux types cellulaires : les cellules de la columelle (COL) au centre et les cellules de la coiffe latérale (LRC) (Figure 4). Chez *Arabidopsis*, la columelle est composée de 4 à 6 couches cellulaires alors qu'on en compte plus de 20 chez le maïs. La coiffe latérale, quant à elle, est composée chez *Arabidopsis* de 3 couches de cellules, dont la plus externe recouvre l'épiderme. Les cellules de la coiffe racinaire, tout comme les cellules des 5 tissus composant le corps de la racine sont issues du méristème apical racinaire (MAR).

II.1.1. Le méristème apical racinaire : des cellules souches aux tissus racinaires

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'organisation du MAR a été précisément décrite (Benfey and Scheres, 2000; Arnaud *et al.*, 2010; Kumpf and Nowack, 2015) (Box 3). Le **centre quiescent** (QC) est composé de 4 cellules indifférenciées qui se divisent rarement. L'identité du centre quiescent est spécifié grâce à deux voies de signalisation : la voie impliquant les facteurs de transcription (FTs) PLETHORA (PLT) et la voie impliquant les FTs SHORT ROOT (SHR)/SCARECROW (SCR) (Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). Les protéines PLTs, présentes principalement dans la niche de cellules souches, induisent la division cellulaire. SHR, quant à lui, se déplace de la stèle vers le centre quiescent où il active la transcription de SCR qui permet à son tour de maintenir l'identité du QC (Sabatini *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence que SHR pouvait se déplacer également dans les cellules de l'endoderme pour y induire l'expression de SCR et que SHR et SCR interagiraient ensuite pour promouvoir la division des cellules filles du cortex et de l'endoderme ainsi que la spécification des cellules endodermiques (Levesque *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007).

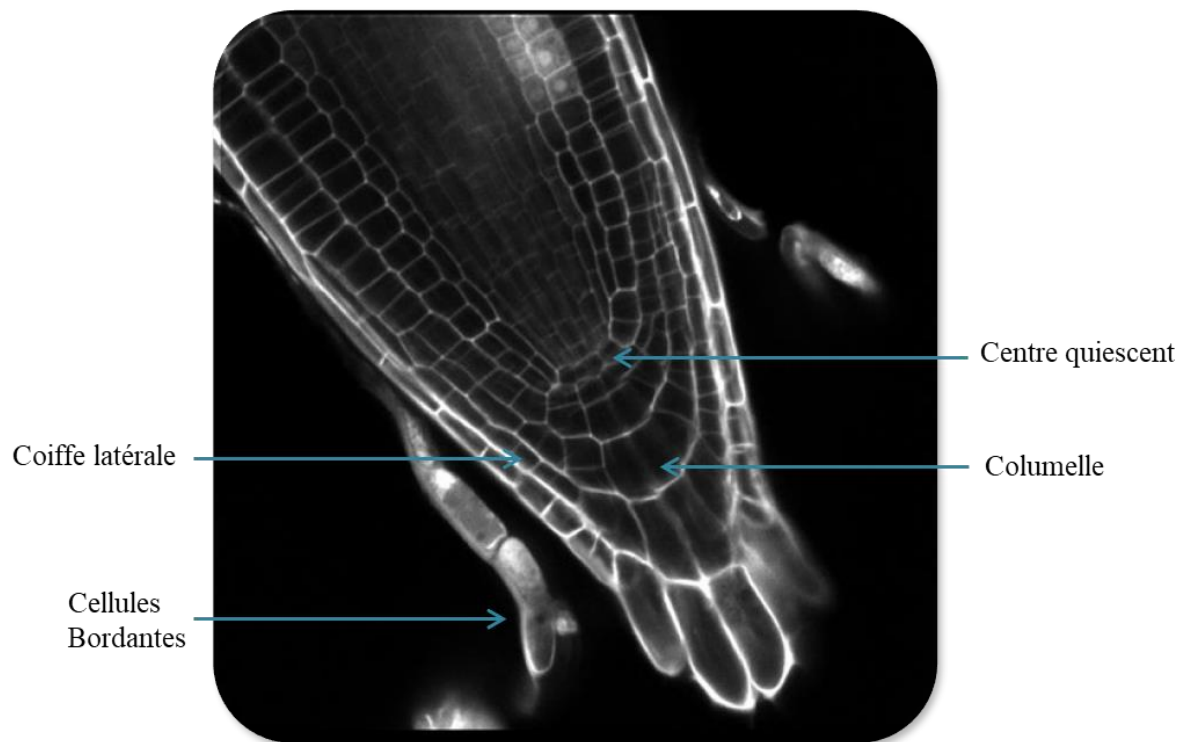


Figure 4 : La coiffe racinaire d'*Arabidopsis thaliana*.

Une racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* âgée de 5 jours a été prélevée, colorée à l'iodure de propidium (PI) et observée au microscope confocal. La coiffe racinaire présente trois types de cellules différenciées, les cellules de la coiffe latérale, les cellules de la columelle, et les cellules bordantes. Chaque division formative des initiales forme une nouvelle couche de cellules de coiffe latérale ou de columelle, qui pousse la couche cellulaire plus âgée vers l'extrémité de la coiffe. La coiffe est ainsi organisée en couches cellulaires d'âge croissant. Les cellules les plus âgées, c'est-à-dire sur la couche la plus externe de la coiffe sont desquamées, soit après avoir subi une mort programmée, soit vivantes. Les cellules vivantes desquamées constituent les cellules bordantes.

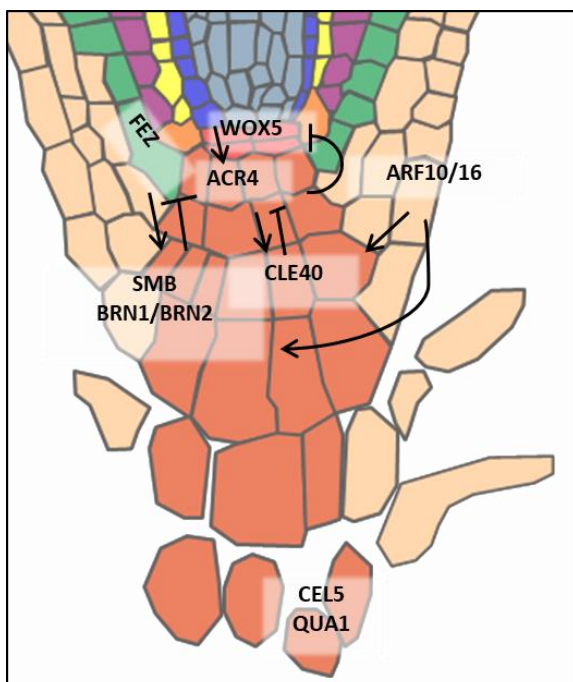


Figure 5 : Contrôle moléculaire de la mise en place de l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana* (d'après Kumpf and Nowack, 2015)

Le QC est à l'origine de la mise en place et la maintenance du méristème, il est non seulement la source des cellules initiales qui l'entourent mais permet également le maintien de ces dernières dans un état indifférencié. Les cellules du QC produisent un signal de courte portée pour maintenir les cellules initiales voisines en état indifférencié. Le FT WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5), qui agit en aval de SCR et SHR, a été désigné comme signal probable. Le gène WOX5 est exprimé dans le centre quiescent et il est requis pour inhiber la différenciation des cellules souches (Sarkar *et al.*, 2007). Il a été montré que l'expression de WOX5 était réprimée dans les cellules en dehors du centre quiescent via l'action du récepteur kinase (RLK) ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4), lui-même activé par l'action du peptide CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40 (CLE40) (Stahl and Simon, 2009).

II.1.2. La coiffe racinaire : tissu en renouvellement constant

La coiffe racinaire est organisée en multiples couches cellulaires d'âge croissant (Box 3, Figure 4) (Dolan *et al.*, 1993). Les cellules filles de la coiffe racinaire se différencient très rapidement après leur formation. Juste après la division des initiales COL, les proplastides contenus dans les cellules filles COL commencent à accumuler de l'amidon, ce qui augmente considérablement leur poids, et qui entraîne leur sédimentation au sein des cellules COL (Iijima *et al.*, 2008). Ces amyloplastides, appelés **statolites**, permettent aux cellules COL internes, appelées **statocytes**, de percevoir la gravité (*Cf* gravitropisme) (Strohm *et al.*, 2012). L'amidon contenu dans les amyloplastides est progressivement dégradé lors de la différenciation des statocytes en **cellules sécrétrices**. Dans ces cellules constituant la couche COL externe, le nombre d'organelles augmente, notamment l'appareil de golgi et les vésicules sécrétrices (Juniper and Clowes, 1965). Contrairement aux cellules COL, les jeunes cellules LRC se différencient uniquement en cellules sécrétrices. Après une différenciation complète, les cellules sécrétrices COL et LRC augmentent leur volume, jusqu'à un facteur 10 (Juniper and Clowes, 1965; Iijima *et al.*, 2008). Les cellules sécrétrices synthétisent et exportent un **mucilage** composé de polysaccharides de haut poids moléculaire. Le mucilage forme une capsule hydro-soluble autour de l'apex racinaire ayant une fonction de lubrification. Au niveau moléculaire, le développement de la coiffe racinaire implique l'action de CLE40, ACR4 et WOX5 (Figure 5). Il a été montré notamment que les mutants *acr4* et *cle40* présentaient des couches d'initiales COL additionnelles, dû à un défaut de différenciation des cellules filles COL (Stahl and Simon, 2009).

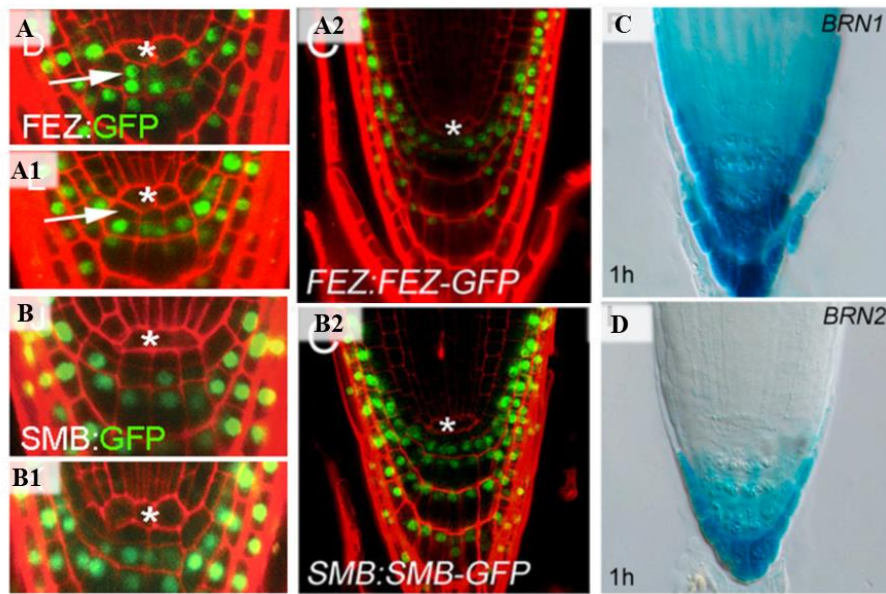


Figure 6 : Expression des gènes FEZ, SMB, BRN1 et BRN2 dans les cellules de la coiffe racinaire d'*Arabidopsis thaliana* (d'après Willemssen et al., 2008a; Bennett et al., 2010, 2014)

(A-B) Coiffes issues de racines âgées de 5 jours colorées à l'Iodure de Propidium (PI) et exprimant FEZ:FEZ-GFP (A) ou SMB:SMB-GFP (B). (C-D) Colorations GUS dans l'apex de racines âgées de 5 jours exprimant BRN1pro:GUS (C) et BRN1pro:GUS (D).

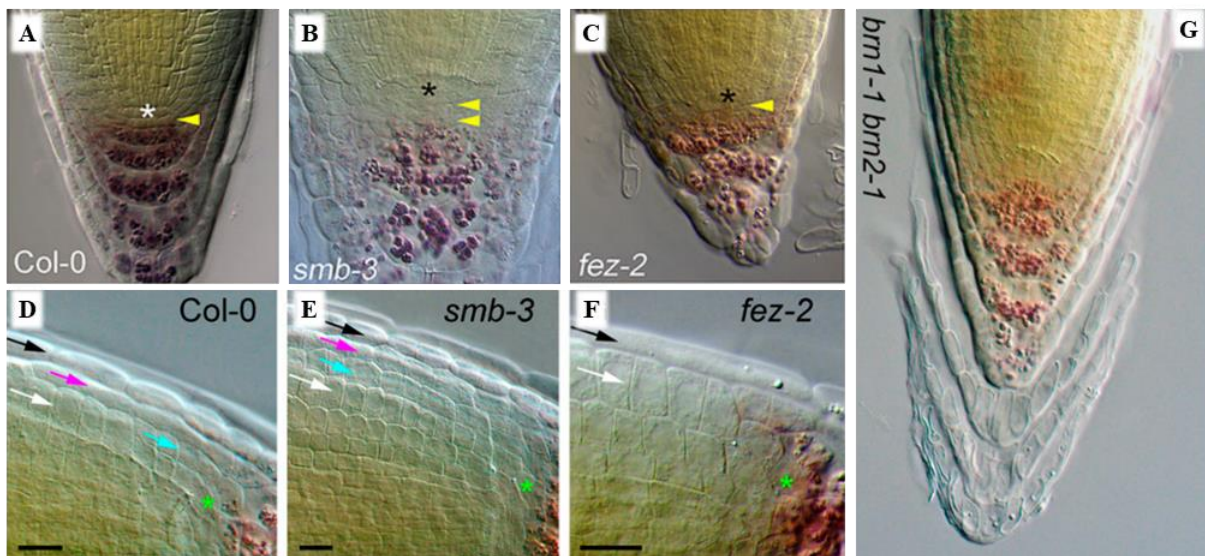


Figure 7 : Morphologie de la coiffe racinaire d'*Arabidopsis thaliana* chez les racines sauvages (A, D), *smb-3* (B, E), *fez-2* (C, F) et *brn1-1 brn2-1* (G) (d'après Bennett et al. 2010 ; Bennett et al. 2014)

(A-G) Racines âgées de 7 jours et colorée au Lugol. (A-C) Les astérisques désignent l'emplacement du centre quiescent. Les flèches jaunes désignent les couches de cellules initiales COL. (D-F) Les astérisques verts désignent la cellule initiale EPI/LRC. Les flèches blanches désignent la couche cellulaire de l'épiderme. Les flèches bleues, roses et noires désignent les couches de cellules LRC.

En plus d'ACR4, le récepteur RLK CLAVATA1 (CLV1) serait également impliqué dans la différenciation des cellules filles COL (Stahl *et al.*, 2013). Le mutant *clv1* présente, tout comme *acr4*, une accumulation d'initiales COL indifférenciées. L'action d'ACR4 et CLV1 étant redondante, une interaction entre les deux récepteurs RLKs pour promouvoir la différenciation des cellules COL peut être suggérée (Stahl *et al.*, 2013). Au niveau de la coiffe racinaire, la balance entre la maintenance des initiales COL et EPI/LRC et la différenciation cellulaire est en partie contrôlée par des FTs de la famille NAC [pour NAM (NO APICAL MERISTEM), ATAF (ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR), CUC (CUP-SHAPED COTYLEDON)] (Reuves Arnaud *et al.* 2010 ; Kumpf et Nowack 2015) (Figure 5). Dans cette famille, plusieurs facteurs de transcription ont un rôle important.

Le FT FEZ s'accumule dans les initiales LRC et COL ainsi que dans les cellules filles LRC et COL après division. Il est codé par le gène *FEZ* dont l'expression est cyclique, c'est à dire que ce gène s'exprime à tour de rôle dans les initiales et dans les cellules filles (Figure 6). FEZ est impliquée dans la régulation de la division des cellules souches de la columelle et de la coiffe latérale. Chez le mutant de perte d'expression *fez-2*, les divisions périclinales des initiales de la columelle et de la coiffe latérale sont moins fréquentes (seulement 23% du taux de division des racines sauvages) (Bennett *et al.* 2014). En revanche, les divisions anticlines des cellules souches EPI/LRC, générant les cellules de l'épiderme, ne sont pas différentes chez les racines *fez-2* par rapport aux racines sauvages (Bennett *et al.* 2014). La mutation conduit à la mise en place d'une seule rangée de cellules de la coiffe latérale au lieu de 3 chez les racines sauvages, et entraîne le raccourcissement de la couche externe de coiffe latérale sans pour autant impacté le nombre de cellules de cette couche (Bennett *et al.* 2014; Figure 7). Par ailleurs, la taille et le nombre des cellules du MAR ainsi que la longueur des racines *fez-2* sont comparables à ce qui est observé chez les racines sauvages, suggérant qu'il n'y a pas de défaut de production de cellules dans la zone de division des racines *fez-2* (Willemssen *et al.*, 2008). FEZ pourrait interagir avec la protéine RETINOBLASMA-RELATED (RBR) pour promouvoir la division des cellules de la coiffe.

Le FT SOMBRERO (SMB) intervient quant à lui dans la différenciation des cellules issues des initiales de la coiffe. L'expression de *SMB* est activée par FEZ dans les cellules filles et réprime l'expression de *FEZ* en retour dans ces mêmes cellules pour inhiber leur division et promouvoir leur différenciation (Figure 6B). Chez le mutant de perte d'expression *smb-3*, une couche additionnelle de cellules initiales de la columelle et de la coiffe latérale est mise en place juste en-dessous du QC (Figure 7B).

Il a été montré que la coiffe de la lignée *smb-3* contenait systématiquement une couche cellulaire de coiffe supplémentaire, provenant d'une difficulté des cellules en position mature à se détacher correctement de l'apex racinaire (Bennett *et al.* 2014). Sur des racines *smb-3* âgées de 7 jours ou plus, une couche de cellules LRC additionnelle a également été observée à l'extérieur de l'épiderme et les cellules contenus dans cette couche ne présentaient pas la morphologie normale des cellules LRC matures (Figure 7E; Bennett *et al.* 2014). Il semblerait que les cellules LRC chez le mutant cessent difficilement de se diviser et présentent un retard dans leur différenciation. De plus, la columelle apparaît désorganisée chez la lignée *smb-3* par rapport à la lignée sauvage (Bennett *et al.* 2014).

Les cellules COL et LRC composant les couches les plus externes, et donc les plus âgées, se détachent peu à peu du reste de la coiffe permettant le renouvellement permanent de la coiffe racinaire. La balance entre la production de nouvelles cellules et la desquamation des plus anciennes permet ainsi une **homéostasie de la taille et du nombre de cellules** de la coiffe racinaire (Box 3, Figure 4) (Barlow, 2003). Lorsque les cellules LRC de la couche externe atteignent la zone d'élongation, elles rentrent en mort cellulaire programmée (PCD) et sont relâchées dans la rhizosphère. En revanche, les autres cellules LRC matures à l'apex ainsi que les cellules COL les plus âgées sont desquamées vivantes et permettent entre autres la libération de **cellules bordantes** dans la rhizosphère (Figure 4) (Driouich *et al.*, 2007). Les BCs, cellules parfaitement viables malgré leur séparation de la coiffe, présentent une forte activité métabolique et présentent des fonctions de cellules sécrétrices (Hawes, 1990; Wang *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2017). De plus, ces cellules sont parfaitement distinctes des cellules COL et LRC de par leur contenu protéique et leur information génétique (Hawes and Lin, 1990; Brigham *et al.*, 1995). De ce fait, les BCs sont considérées comme le troisième stade de différenciation de la coiffe racinaire. La séparation des BCs du reste de la coiffe est encore méconnue mais semble requérir l'action de plusieurs enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, comme les pectines méthylesterases, qui seraient sécrétées dans le mucilage (Stephenson and Hawes, 1994; Wen *et al.*, 1999; del Campillo *et al.*, 2004; Mravec, 2017). Le mucilage permet également de maintenir les BCs reliées à la coiffe jusqu'à sa solubilisation par l'eau (Brigham *et al.*, 1995). Chez *Arabidopsis*, l'apex racinaire libère des BCs particulières, appelées BC-like (BCL), qui sont regroupées en 3 ou 4 cellules organisées en une seule couche (Vicré *et al.*, 2005). Il est apparu que les homogalacturonans, composants de la paroi cellulaire de la famille des pectines, empêchaient le détachement des BCs les unes des autres et ainsi permettaient la formation des BCL (Durand *et al.*, 2009).

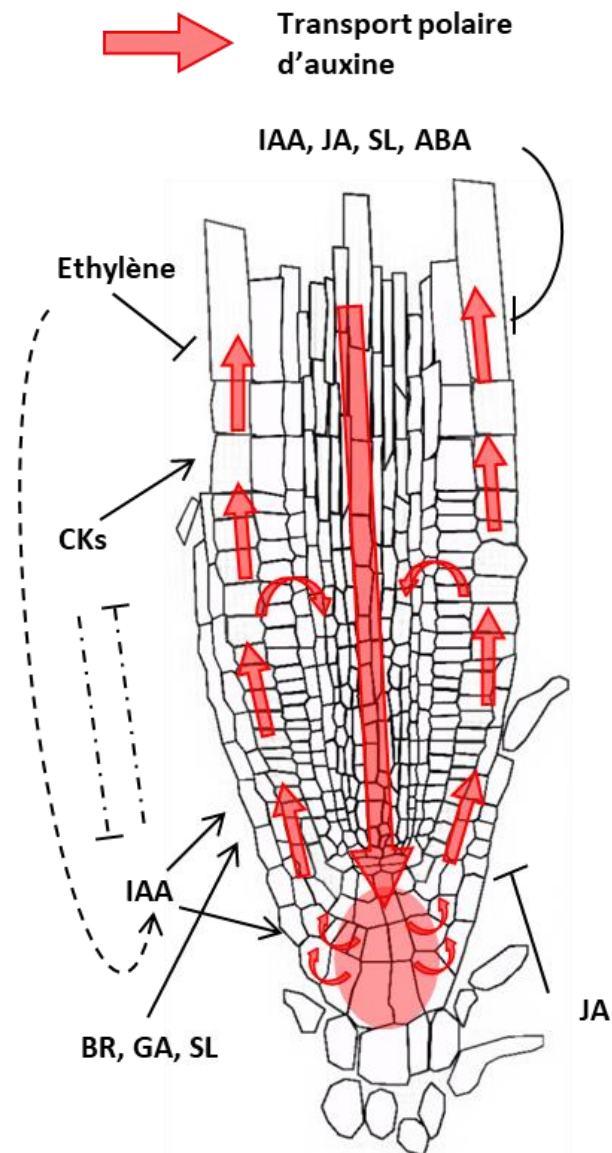


Figure 8 : Contrôle hormonal du développement de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*

Schématisation simplifiée du rôle des différentes hormones dans la division et l'élongation des cellules et de leurs interactions. Les flèches rouges indiquent le transport polaire d'auxine. Le cercle rouge indique l'accumulation d'auxine dans les cellules COL. IAA : Auxine ; JA : Acide Jasmonique ; SL : Strigolactones ; ABA : Acide Abscissique ; CKs : Cytokinines ; BR : Brassinostéroïdes ; GA : Acide Gibbérellique.

Le nombre de BCs libérées chaque jour par l'apex racinaire est très variable selon les espèces, de 10 ou moins pour les plantes avec un MAR fermé comme le tabac (*Nicotiana tabacum*) et *Arabidopsis* à plusieurs milliers pour les plantes avec un MAR ouvert (10000 chez le Pin) (Iijima *et al.*, 2000; Vicré *et al.*, 2005; Hamamoto *et al.*, 2006).

BEARSKIN (BRN) 1 et 2, FTs de la famille des NAC, sont tous deux impliqués dans la régulation de la desquamation des cellules de la columelle (Figure 5). Les deux FTs s'accumulent dans les cellules COL matures et les cellules LRC adjacentes, c'est-à-dire uniquement dans les couches cellulaires de la coiffe les plus externes (Figure 6C) (Bennett *et al.*, 2010). L'expression de *BRN1* et *BRN2* est induite pendant la maturation des cellules des couches extérieures de la coiffe et leur expression dans les cellules matures de la coiffe latérale semble être notamment induite par le facteur de transcription SMB (Kamiya *et al.*, 2016). Les mutants de pertes d'expression *brn1-1* et *brn2-1* ne présentent pas de phénotype particulier. En revanche, chez le double mutant *brn1 brn2*, les cellules matures ne sont pas desquamées et restent attachées à la coiffe racinaire, suggérant que les deux gènes régulent de manière redondante la séparation des couches de cellules COL (Bennett *et al.* 2010) (Figure 7G). Il a récemment été montré que BRN1 et BRN2 activaient l'expression d'un gène codant un polygalacturonase dans les couches externes de la coiffe racinaire et que l'expression de ce gène facilitait ensuite la desquamation des cellules (Kamiya *et al.*, 2016).

II.1.3. Contrôle hormonal de la mise en place de l'apex racinaire d'Arabidopsis thaliana

Les protéines contrôlant le développement de la racine et de la coiffe racinaire agissent en parallèle ou sont elles-mêmes contrôlées par des hormones. Le rôle des hormones dans le développement végétal est de premier ordre. La balance entre la production des cellules, leur élongation, leur différenciation et leur desquamation est mise en place par un contrôle hormonal complexe est spécifique qui implique l'action individuelle des hormones ainsi que leurs nombreuses interactions synergistes ou antagonistes (Figure 8).

❖ L'auxine

L'auxine est la première hormone dont les processus de transduction ont été précisément caractérisés (Lee *et al.*, 2012; Jalean J. Petricka, Cara M. Winter, 2013; Pacifici *et al.*, 2015). L'auxine est synthétisée chez les végétaux au niveau de l'apex de la tige puis est transportée dans la stèle de façon basipète jusqu'au QC et aux initiales COL.

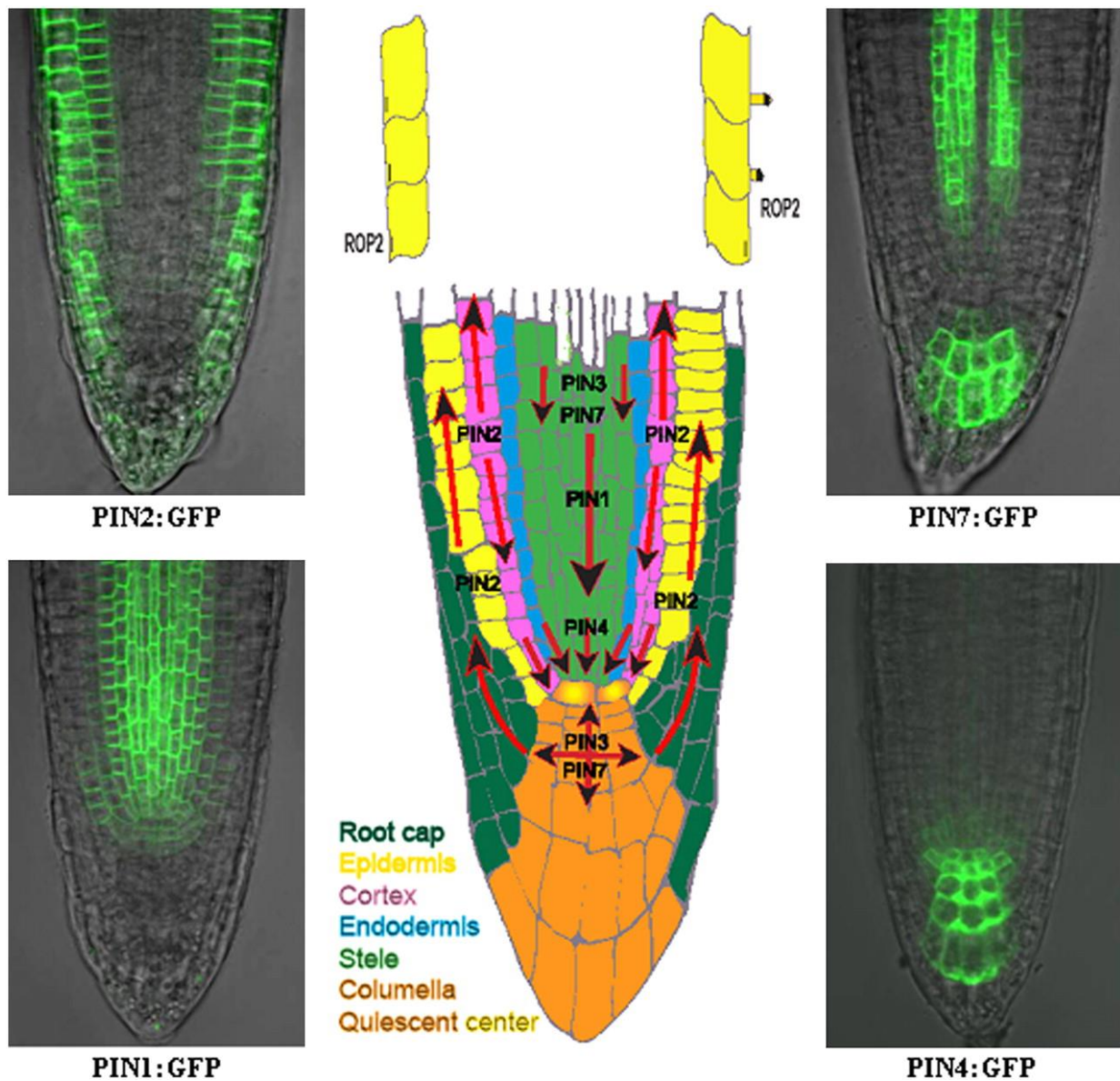


Figure 9 : Transport de l'auxine dans l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana* grâce aux transporteurs d'efflux de l'auxine PINs (d'après Feraru and Friml, 2008)

La localisation de l'expression de *PIN1*, *PIN2*, *PIN4* et *PIN7* est présentée sur les images microscopiques grâce à des constructions GFP pour chaque gène. Le schéma présente la place de chaque membre de la famille des PINs dans les transports basipète et acropète de l'auxine dans l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana*.

La columelle constitue un puits d'auxine et le siège de sa redistribution vers les cellules de la coiffe latérale (Brunoud *et al.*, 2012) (Figure 8). Il a été montré que la perte d'accumulation de l'auxine dans les initiales de la columelle entraînait l'apparition de couches de columelle additionnelles (Friml *et al.*, 2002a). L'auxine est ensuite transportée de façon acropète dans les couches cellulaires de l'épiderme et du cortex (Figure 8). Ainsi, les transports basipète et acropète de l'auxine sont spatialement distincts (Swarup *et al.*, 2001; Blilou *et al.*, 2005; Balzan *et al.*, 2014). Dans l'apex racinaire, une homéostasie de l'auxine est mise en place grâce à la combinaison du transport polaire et d'une biosynthèse locale d'auxine (Petersson *et al.*, 2009). Le transport de l'auxine est permis par l'action combinée des transporteurs d'influx d'auxine, comme les PINs et les ATP-BINDING CASSETTE GROUP B (ABCB), et des transporteurs d'influx d'auxine dont ceux de la famille des AUX1/LAX (Blilou *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007; Balzan *et al.*, 2014). Les transporteurs AUX1/LAX semblent impliqués dans la formation du MAR durant les stades précoces de l'embryogénèse, et notamment dans la formation de la coiffe racinaire (Ugartechea-Chirino *et al.*, 2010). Cependant, ils n'apparaissent pas directement impliqués dans l'activité ou le maintien du QC et des initiales. Les protéines PIN, quant à elles, semblent jouer un rôle clé dans la spécification du centre quiescent en créant un maximum d'auxine au niveau du MAR basal (Sabatini *et al.*, 1999; Blilou *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007; Feraru and Friml, 2008) (Figure 8). Le positionnement des protéines PIN dans la racine est régulé par la protéine kinase PINOID (PID) (Benjamins *et al.*, 2001). PID phosphoryle les PINs pour les conduire au niveau de la membrane plasmique basale des cellules. Une fois présente dans la cellule, l'auxine se fixe à un récepteur nommé TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/ AUXIN-SIGNALING F-BOX PROTEINs (TIR1/AFBs), composant d'un complexe E3 ubiquitine ligase. Le complexe auxine-TIR1/AFBs cible les répresseurs transcriptionnels de la famille auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) qui sont fixés sur les promoteurs de gènes de réponse à l'auxine (Auxin Response Factors, ARFs) (Kepinski and Leyser, 2005). Il va alors entraîner leur dégradation par le protéasome, ce qui permettra l'activation transcriptionnelle des ARFs. Au stade embryonnaire, le maximum d'auxine induit la spécification du QC et la formation de la racine, notamment via l'action des deux ARFs MONOPTEROS/ARF5 (MP/ARF5) et NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL4/ AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (NPH4/ARF7) (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007; Jiang and Feldman, 2010). ARF5 et ARF7 induisent l'expression de certains gènes PLETHORA (PLTs), comme PLT1, PLT2, PLT3 et BABYBOOM (BBM), qui sont des protéines clés dans la régulation du développement racinaire et agissent de manière dose-dépendante (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007).

A haute concentration, ARF5 et ARF7 maintiennent l'activité et la position du QC et des initiales, notamment en régulant la transcription des PINs. En revanche, en faible concentration, ils régulent la division et la différenciation des cellules filles, notamment des cellules filles de la coiffe racinaire (Galinha *et al.*, 2007). Les ARF10 et ARF16 sont quant à eux impliqués dans le control des divisions des initiales COL. Il a en effet été montré qu'une perte de fonction combinée de ces deux ARFs entraînait la mise en place d'une coiffe désorganisée contenant des cellules initiales COL additionnelles (Wang, 2005). ARF10 et ARF16 sont régulés de façon post-transcriptionnelle par le microARN (miARN) miR160 (Wang, 2005). En effet, la surexpression de miR160 et le double mutant KO *arf10 arf16* présentent le même phénotype, c'est à dire une racine avec un développement retardée, insensible à la gravité présentant des initiales COL additionnelles et élargies. Il a été montré que miR160, en inhibant ARF10 et ARF16, entraînait l'inhibition de l'expression de *WOX5* et *PLT1* dans les cellules filles COL (Wang, 2005). Ce mécanisme favoriserait ainsi le maintien de l'état indifférencié des initiales distales. En conclusion, l'auxine régule le QC et les initiales du MAR à la fois en inhibant l'activation du QC et en promouvant la différenciation des cellules initiales.

❖ Autres hormones et interactions

Les Cytokinines (CKs) et l'auxine interagissent de façon antagoniste pour contrôler la croissance racinaire durant le développement post-embryonnaire (Figure 8). Cette interaction permet de réguler la taille du méristème. Alors que l'auxine promeut la division cellulaire et la maintenance de l'état indifférencié des cellules, notamment en inactivant la signalisation des CKs, les CKs stimulent en retour la différenciation des cellules dans les zones de division et d'élongation en supprimant le transport et la distribution d'auxine dans ces cellules (Dello Ioio *et al.*, 2008; Ruzicka *et al.*, 2009). Entre autres, les CKs inhibent l'expression de *PIN1* et *PIN4* et induisent l'expression de *PIN7*, permettant de réguler la distribution de l'auxine (Ruzicka *et al.*, 2009). Il a été montré également que le transport polaire de l'auxine était régulé par un transport symplastique de CKs via le phloème (Bishopp *et al.*, 2011). Cette régulation maintiendrait le pattern vasculaire du MAR. Les CKs ne semblent pas avoir de rôle ni dans la spécification du QC ni dans la maintenance des cellules initiales (Dello Ioio *et al.*, 2008).

L'éthylène est une hormone gazeuse produite par les plantes, connue pour inhiber l'élongation cellulaire et stimuler la sénescence. Au niveau de la coiffe racinaire, l'éthylène semble réguler la taille de la coiffe en influençant la production et la desquamation des cellules (Ponce *et al.*, 2005). De plus, il serait impliqué dans la différenciation des statocytes (Ponce *et al.*, 2005). L'éthylène induit la biosynthèse d'auxine et module sa distribution transport-dépendante, induisant ainsi l'inhibition de l'expansion des cellules à la sortie du MAR (Figure 8, Swarup *et al.*, 2007). Le mutant *eto1* qui produit de l'éthylène en excès présente un taux de division cellulaire ectopique dans le QC (Ortega-Martínez *et al.*, 2007). L'induction de ces divisions est également observé chez les racines traitées avec de l'acide naphthylphthalamique (NPA, inhibiteur de transport de l'auxine), suggérant que l'effet de l'auxine sur le QC requiert une biosynthèse de l'auxine éthylène-dépendante (Ortega-Martínez *et al.*, 2007). Chez les racines de maïs, il a été montré en effet que l'effet du traitement NPA était annulé par une application d'éthylène (Ponce *et al.*, 2005).

L'acide abscissique (ABA) est une hormone végétale impliquée dans l'induction de la tolérance à la dessiccation du grain, la dormance, la tolérance au stress et la fermeture des stomates (Frinkelstein *et al.*, 2002). L'ABA inhibe la croissance racinaire à de fortes concentrations (de l'ordre du μM) mais la stimule à de plus faibles concentrations (de l'ordre du nM) (Figure 8, Zhang *et al.*, 2010). Dans le MAR, l'ABA serait impliqué dans la maintenance du QC et semble inhiber la différenciation des cellules initiales (Zhang *et al.*, 2010). De plus, l'ABA inhibe la division cellulaire dans le MAR et réduit le taux de différenciation, résultant en une augmentation du nombre de cellules dans les zones de division et de transition. Cette action se ferait par le biais de l'action de *WOX5* mais n'impliquerait pas la biosynthèse de l'éthylène (Zhang *et al.*, 2010).

Les gibbérellines (GAs) appartiennent à une famille de phytohormones régulant à la fois la croissance de la racine et celle de la tige, la germination, et l'élongation des cellules. Au sein des cellules, les GAs se lient à un récepteur nommé GA INSENSITIVE DWARF1 (*GID1*), activant l'interaction *GID1*-*DELLA* induisant ainsi la dégradation rapide de *DELLA* par le protéasome (Schwechheimer, 2008). La dégradation de *DELLA* permet la régulation transcriptionnelle des gènes de réponse aux GAs (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008, 2009; Achard *et al.*, 2009). *DELLA* notamment induit les niveaux de certains inhibiteurs du cycle cellulaire tel que KIP-RELATED PROTEIN 2 (*KRP2*) et SIAMESE (*SIM*). Dans le MAR, la biosynthèse de GAs, entraînant la dégradation de *DELLA*, permet ainsi d'activer la prolifération cellulaire (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009) (Figure 8).

II.2. Croissance axiale de l'apex racinaire

La croissance racinaire implique deux processus cellulaires fondamentaux que sont la division cellulaire et l'élongation cellulaire. La prolifération des cellules dans la zone de division du MAR génère un flux de cellules qui pousse les cellules plus anciennes dans la zone d'élongation puis dans la zone de différenciation. Ce flux de cellules fournit un potentiel de croissance qui est ensuite concrétisé par l'allongement des cellules. Les cellules indifférenciées qui atteignent la zone de transition cessent progressivement de se diviser et leur taille commence à augmenter. Cette phase de transition s'achève avec l'arrêt total des divisions cellulaires et l'expansion anisotropique rapide des cellules. Dans la zone d'élongation, les cellules peuvent alors atteindre jusqu'à 20 fois leur taille initiale (Barrada *et al.* 2015). En ce sens, l'élongation est la composante de la croissance concrètement responsable du déplacement de l'apex racinaire. Cependant, il a été montré que le taux de production de cellules, majoritairement dépendant du taux de division cellulaire, était le principal moteur de la croissance axiale des racines alors que le taux d'élongation cellulaire était plutôt responsable des ajustements à court-termes de la croissance (Youssef *et al.*, 2018).

L'élongation cellulaire requiert la mise en place de deux processus, d'une part l'augmentation de la pression de turgescence induite par l'influx d'eau dans la vacuole et d'autre part, l'extension irréversible de la paroi cellulaire permise par son relâchement et par l'ajout de nouveau matériel (Forouzesh *et al.*, 2013). Grâce à cette expansion, la racine va générer une pression de croissance axiale qui lui permettra de pénétrer dans un sol/substrat (pour revue, Kolb *et al.*, 2017).

II.2.1. Notion de pression de croissance axiale

Selon Lockhart, le taux d'élongation relative des cellules individuelles dépend principalement de la pression de turgescence, des propriétés de la paroi et de la conductivité hydraulique de la membrane plasmique (Lockhart, 1965). Alors que les propriétés de la paroi sont considérées comme le principal rhéostat de l'expansion cellulaire, la pression de turgescence est sa force motrice. Le taux d'élongation relative peut être noté :

$$\dot{\epsilon} = \Phi \cdot (P - Y) \quad (1)$$

Avec P la pression de turgescence, Y le seuil minimum de pression nécessaire pour permettre l'extension de la paroi cellulaire et Φ l'extensibilité de la paroi cellulaire.

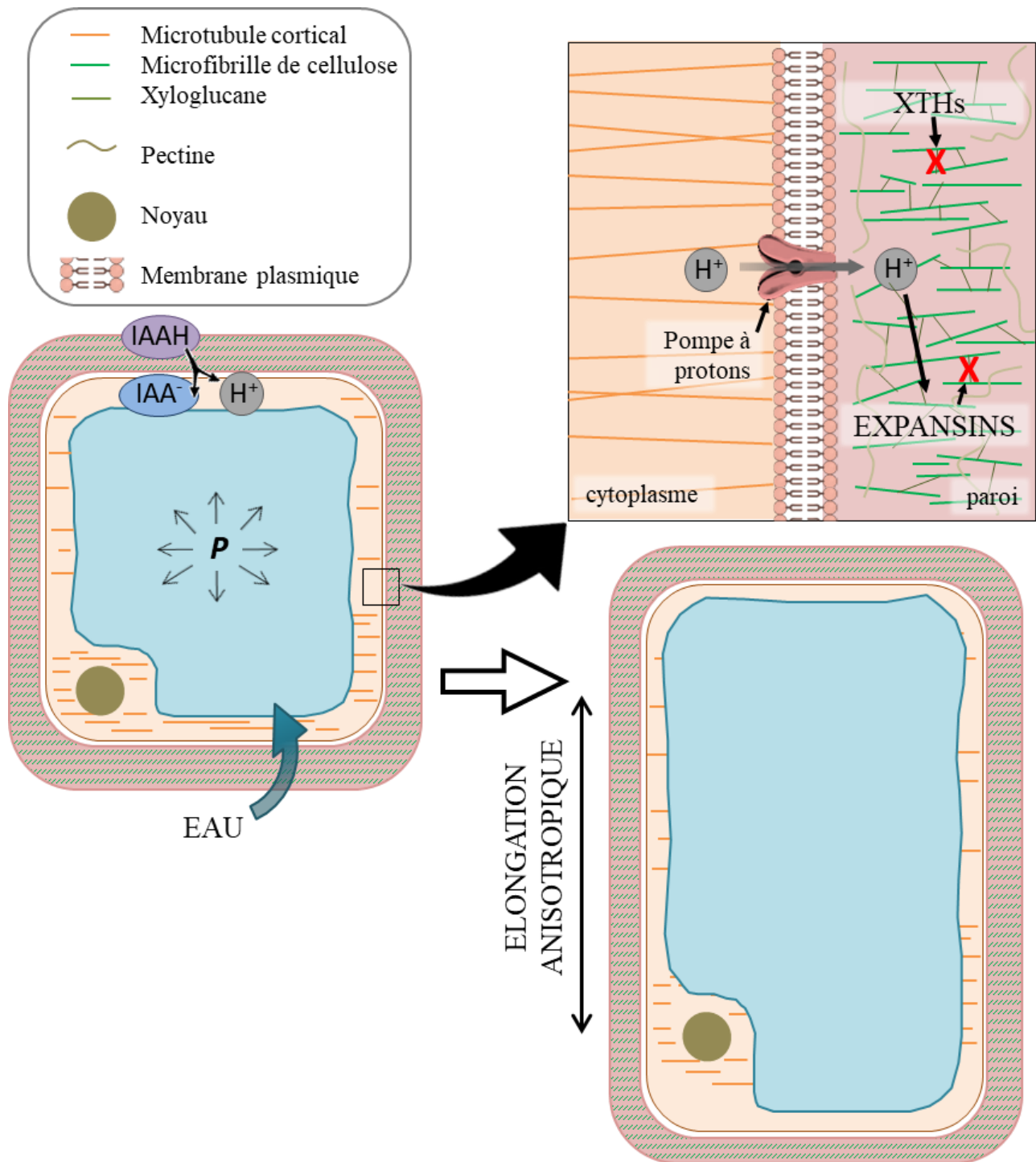


Figure 10 : Schématisation de l'expansion anisotrope des cellules végétales.

L'expansion est permise par la pression de turgescence qui exerce une contrainte de tension isotropique sur la paroi, et le relâchement de la paroi grâce à l'action d'enzymes de la paroi comme les EXPANSINS et les XTHs. Les EXPANSINS sont activées grâce à l'acidification de la paroi auxine-dépendante et permettent de dissocier les xyloglucanes reliant les microfibrilles de cellulose.

L'asymétrie des potentiels hydriques due aux concentrations en solutés différentes entre l'intérieur de la cellule, *i.e.* le cytoplasme, et l'extérieur de la cellule, *i.e.* les parois cellulaires et espaces extracellulaires, entraîne un flux d'eau contre le gradient de potentiel hydrique. Etant donné que les cellules végétales vivent en général dans un environnement hypotonique, c'est-à-dire un environnement ayant une concentration en solutés inférieure à celle du cytoplasme, le gradient osmotique tend à diriger l'eau vers l'intérieur du cytoplasme jusqu'à atteindre un équilibre entre les potentiels hydriques interne et externe. La pression de turgescence, due à l'entrée d'eau dans le cytoplasme, presse la membrane plasmique contre la paroi cellulaire, générant une contrainte de tension sur la paroi (Figure 10). La paroi en retour empêche la cellule d'exploser. Pour une cellule cylindrique, la contrainte circonférentielle imposée à la paroi équivaut à deux fois la contrainte axiale (Mirabet *et al.*, 2011). Les contraintes de tension, couplées avec l'action d'acteurs moléculaires impactant l'extensibilité de la paroi cellulaire, induisent des déformations plastiques de la paroi qui permettent l'expansion de la cellule (Figure 10), les cellules s'allongeant principalement dans la direction axiale. L'anisotropie d'élongation cellulaire peut être expliquée par une hétérogénéité des propriétés mécaniques de la paroi, avec une extensibilité beaucoup plus importante dans la direction axiale que dans la direction circonférentielle (Baskin, 2005; Hamant and Traas, 2010). L'expansion anisotrope des cellules est en grande partie attribuée aux microfibrilles de cellulose déposées dans la paroi de façon perpendiculaire à l'axe principal de la croissance racinaire (Figure 10) (Baskin, 2005; Anderson *et al.*, 2010). La direction et le degré de l'expansion cellulaire anisotrope sont en effet contrôlés par la direction et le degré de l'alignement des microfibrilles de cellulose. Les microfibrilles de cellulose présentent une résistance élevée et procurent à la paroi cellulaire sa rigidité et sa force (Haman and Traas, 2010). Le dépôt anisotrope des microfibrilles de cellulose est quant à lui dirigé par la matrice intracellulaire de microtubules (Figure 10). Les microtubules corticaux des cellules végétales sont organisés en matrices parallèles adjacentes à la membrane plasmique (Lloyd *et al.*, 2000). Il a été montré que les microfibrilles de cellulose étaient déposées dans la même direction que les microtubules corticaux durant la croissance racinaire (Yuan *et al.*, 1994; Paredez *et al.*, 2006). La déformation plastique de la paroi des cellules en expansion peut également être renforcée ou au contraire limitée de façon mécanique par d'autres contraintes de tension et de compression imposées à la paroi. La racine est composée radialement de couches cellulaires concentriques, chaque couche se composant de types cellulaires distincts avec une géométrie différente contribuant aux propriétés mécaniques de la racine.

Cette anatomie racinaire implique que des couches de cellules avec des parois extensibles peuvent être connectées à des couches cellulaires avec des parois moins extensibles. Ces connexions peuvent générer des forces de compression et de tension en plus des contraintes générées par la pression de turgescence (Pritchard, 1994). Il a été montré que les cellules de l'épiderme de la racine d'*Arabidopsis* avaient une influence très importante dans l'expansion des cellules de l'ensemble de la racine par rapport aux couches de cortex ou d'endoderme (Pritchard, 1994).

II.2.2. Contrôle moléculaire de l'extensibilité des parois

A court terme, l'allongement irréversible des cellules, et donc de leurs parois, et en partie permise par le relâchement des liaisons entre les microfibrilles de cellulose de la paroi (Figure 10). A long terme, l'accroissement de la paroi nécessite en plus l'ajout de nouveau matériel mais l'expansion par relâchement et la synthèse de nouvelle paroi sont des processus contrôlés de façon distincte. Les réponses de croissance rapides (mises en place en quelques secondes) sont donc basées sur des changements rapides de l'extensibilité de la paroi sans altérations majeures de la composition ou la structure de cette paroi. L'extensibilité de la paroi est principalement contrôlé par quatre mécanismes moléculaires incluant les expansines, les xyloglucanes endotransglycosylase/ hydrolases (XTHs), les endo-(1,4)- β -glucanase et les radicaux hydroxyls (Ledbetter and Porter, 1963; Cosgrove, 2005). Les EXPANSINS sont des protéines responsables du relâchement de la paroi et agissent de façon pH-dépendante (Shcherban et al. 1995; Park & Cosgrove 2012, 2015). Il semblerait que l'auxine, en augmentant l'acidification des parois cellulaires, induise l'activité des EXPANSINS et ces dernières participeraient à la dissociation des complexes polysaccharidiques qui lient les microfibrilles de cellulose entre elles (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994, 1995). Les protéines de la famille des XTHs joueraient quant à elles de nombreuses fonctions, à la fois dans le relâchement et dans le renforcement de la paroi cellulaire, mais aussi dans l'intégration de nouveaux xyloglucanes dans la paroi (Rose *et al.*, 2002; Thompson and Holbrook, 2004). Deux types de protéines de la famille des XTHs sont distinguées : (i) les XEHs agissent en hydrolysant les chaînes de xyloglucanes de la paroi et donc en les raccourcissant de façon irréversible, (ii) les XETs agissent en hydrolysant puis en polymérisant les chaînes de xyloglucanes (Rose *et al.*, 2002; Eklof and Brumer, 2010).

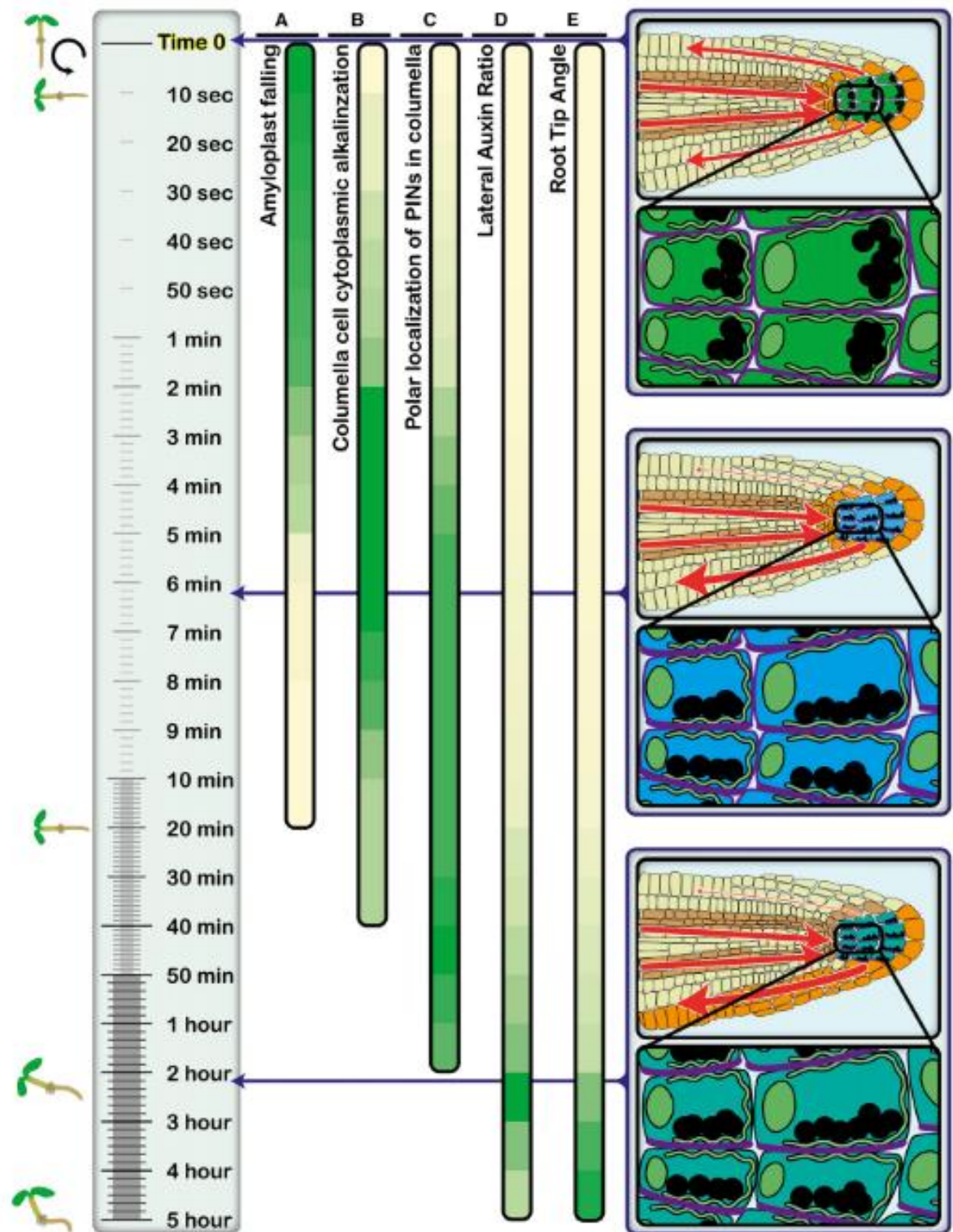


Figure 11 : Cinétique de la mise en place de la réponse gravitropique (Baldwin 2013).

Après inclinaison de la racine, les amyloplastes sédimentent à partir de quelques secondes. Une alcalinisation cytoplasmique des cellules COL, puis par la relocalisation des PIN dans les cellules de la columelle sont ensuite observées en quelques minutes. Le gradient latéral d'auxine est formé à partir de 30 minutes après le stimulus gravitropique et permet la mise en place d'une courbure gravitropique.

II.3. L'orientation de la croissance racinaire

Un tropisme peut être défini comme un mouvement de croissance directionnelle d'un organe végétal déclenché par un stimulus anisotrope. Les tropismes sont déclenchés par de multiples stimuli comme la gravité, la lumière, les gradients d'humidité, les ions, l'oxygène ou encore la température (pour revue, Harmer and Brooks, 2018). En tant qu'organismes sessiles, les plantes dépendent de ces tropismes pour contrecarrer les multiples stress environnementaux auxquelles elles font face et ainsi assurer leur survie. Au niveau racinaire, dans un environnement parfaitement homogène la croissance est dirigée naturellement pour la plupart des espèces végétales en direction du vecteur de gravité (pour revues, Strohm *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017). La gravité est ainsi décrite comme le principal stimulus déterminant la direction de la croissance racinaire. Selon leur environnement, les racines peuvent dévier leur croissance de la verticale pour se diriger vers une source d'eau ou d'oxygène par exemple et ainsi optimiser l'absorption des ressources nécessaires pour le développement de la plante entière. Nous décrirons ici les deux principaux tropismes racinaires, que sont le gravitropisme et l'hydrotropisme, ainsi que leur interaction pour affiner l'orientation de la croissance racinaire. Le thigmotropisme, *i.e.* l'orientation de la croissance en réponse à un stimulus mécanique, sera discuté dans une tierce partie.

II.3.1. Le gravitropisme

Dans les racines, le signal de gravité est perçu au niveau de l'apex, dans les cellules COL différenciées en **statocytes** (Figure 11). Ces cellules particulières ont été identifiées comme lieu de graviperception grâce à des expériences d'ablation au laser sur des racines d'*Arabidopsis*. Il est apparu que l'ablation de la columelle centrale altérerait la perception gravitropique (Blancaflor *et al.*, 1998). Les statocytes contiennent de nombreux amyloplastes qui sédimentent en direction de la gravité, appelés des **statolytes**. La sédimentation serait permise par la densité importante des statolites ($1,5\text{g.cm}^{-3}$) par rapport au cytoplasme environnant ($1,1\text{g.cm}^{-3}$). Après une inclinaison de la racine, la sédimentation des statolites déclencherait une cascade de transduction du signal qui aboutirait à la mise en place d'une courbure gravitropique, permettant à la racine de réorienter sa croissance dans la direction de la gravité (Baldwin *et al.*, 2013). Des racines d'*Arabidopsis* transgéniques ne contenant pas d'amidon dans leur amyloplastes ont été conçues pour confirmer cette hypothèse. Dans les cellules COL de ces racines, les amyloplastes moins denses que chez les racines sauvages ne sédimentent pas ou peu après inclinaison des racines et ce défaut de sédimentation a été corrélé à une altération de la réponse gravitropique (Kiss *et al.*, 1989, 1999).

Dans les statocytes, le réseau dense et dynamique de filaments d'actine interagit transitoirement avec les statolites en réponse à une gravistimulation, ce qui entraînerait une sédimentation des amyloplastes selon des mouvements saltatoires (Hou *et al.*, 2003; Leitz *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2014). Cette interaction pourrait permettre d'affiner la réponse gravitropique. La sédimentation des amyloplastes ne semble pas être le seul mécanisme de graviperception, étant donné que les racines dont la coiffe a été complètement supprimée semblent toujours répondre, bien que plus faiblement, à une gravistimulation (Mancuso *et al.*, 2014). Ce deuxième mécanisme est suspecté d'être localisé dans la zone d'élongation distale mais reste à ce jour inconnu (Kiss *et al.*, 1999; Wolverton *et al.*, 2002; Mancuso *et al.*, 2014). De plus, les mécanismes ou acteurs permettant la transduction du signal mécanique en signal biochimique permettant la mise en place de la réponse gravitropique sont également inconnus. Deux modèles ont toutefois été proposés pour expliquer la transduction du signal. Le premier modèle suggère que la sédimentation des statolites exercerait une pression sur les membranes plasmique des statocytes, déclenchant l'ouverture de **canaux ioniques transmembranaires mécanosensibles** (Baluška and Hasenstein, 1997; Hamilton *et al.*, 2015). Le second modèle suggère quant à lui une interaction entre des ligands présents à la surface des statolites et des récepteurs localisés dans la membrane plasmique (Perbal and Driss-Ecole, 2003). Bien qu'aucun des deux modèles n'a pu être validé, il est connu que l'activation de la transduction du signal aboutit sur la mise en place d'un **gradient latéral d'auxine** le long de la racine inclinée (Ottenschlager *et al.*, 2003; Swarup *et al.*, 2005; Monshausen *et al.*, 2011) (Figure 11). Il a été mis en évidence que le gradient latéral d'auxine était permis en partie par la relocalisation rapide des transporteurs d'efflux d'auxine PIN3 et PIN7 vers la partie basale des statocytes après inclinaison de la racine (Friml *et al.*, 2002a; Kleine-Vehn *et al.*, 2010) (Figure 11). Cette relocalisation favoriserait le transport d'auxine des cellules COL vers le côté inférieur de la coiffe (Friml *et al.*, 2002a; Kleine-Vehn *et al.*, 2010). La relocalisation des PIN 3 et 7 n'est toutefois ni nécessaire ni suffisante pour expliquer à elle seule la réponse gravitropique (Harrison and Masson, 2008). Pour renforcer le transport d'auxine du côté inférieur de la racine inclinée, il a été montré que les protéines PIN2 étaient partiellement dégradées ou relocalisées du côté supérieur de la racine et efficacement maintenues sur la partie apicale des cellules du côté inférieur de la racine après inclinaison (Abas *et al.*, 2006). Le maintien ou la dégradation des PIN2 sur la membrane plasmique serait en fait régulé par l'auxine elle-même (Abas *et al.*, 2006). En effet, la faible quantité d'auxine sur le côté supérieur de la racine inclinée entraînerait l'internalisation et la dégradation dans la vacuole des PIN2.

Ce rétrocontrôle explique le fait que le gradient d'auxine en réponse à une gravistimulation devient de plus en plus prononcé de la coiffe jusqu'à la zone d'élongation (Abas *et al.*, 2006). La forte quantité d'auxine du côté inférieur de la racine inclinée entraînerait entre autres une **alcalinisation des parois cellulaires** notamment *via* l'activation de pompes à protons membranaires et l'induction de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) (Monshausen *et al.*, 2011). Du côté supérieur de la racine, une acidification des parois cellulaires est au contraire observée et dépendrait des ions Ca^{2+} (Monshausen *et al.*, 2011). L'alcalinisation des parois entraîne leur rigidification alors que l'acidification des parois induit la cassure des liaisons intermoléculaires (Cosgrove, 2000; Park and Cosgrove, 2012). Ces mécanismes entraînent alors une **élongation différentielle des cellules** entre les deux côtés de la racine, avec une élongation plus importante du côté supérieur par rapport au côté inférieur (Cosgrove, 2000; Monshausen *et al.*, 2011). C'est alors la croissance différentielle qui permet la mise en place de la **courbure gravitropique** et la réorientation de la croissance racinaire en direction du vecteur de gravité (Figure 11).

II.3.2. L'hydrotropisme

En conditions naturelles, la croissance verticale des racines peut être perturbée par divers stimuli, et notamment par les gradients de potentiels hydriques de leur environnement local. La perception de ces gradients de potentiels permet à la racine de mettre en place une élongation différentielle des cellules pour réorienter sa croissance en direction des sources d'eau. Contrairement à la perception gravitropique, peu de choses sont connues sur la perception des potentiels hydriques par les racines (pour revue, Dietrich 2018). Plusieurs expériences ont tenté de mettre en évidence la zone de perception du signal hydrique mais ont abouti sur des résultats contradictoires et difficiles à interpréter. Alors que certaines études ont supposé un rôle de la coiffe dans la perception (Takano *et al.*, 1995; Miyazawa *et al.*, 2008), en observant notamment que des racines ayant subi une ablation laser de la columelle présentait un hydrotropisme altéré, d'autres études ont démontré que la zone d'élongation racinaire était un lieu de perception plus probable (Dietrich *et al.*, 2017). En effet, Dietrich *et al.* (2017) ont montré qu'une microdissection ou une ablation laser de la coiffe et même du méristème n'altérerait pas l'hydrotropisme racinaire, suggérant que la zone d'élongation seule était capable de percevoir le signal et de déclencher une croissance différentielle. Les mécanismes moléculaires de la perception des gradients de potentiels hydriques ne sont pas plus connus que la zone de perception.

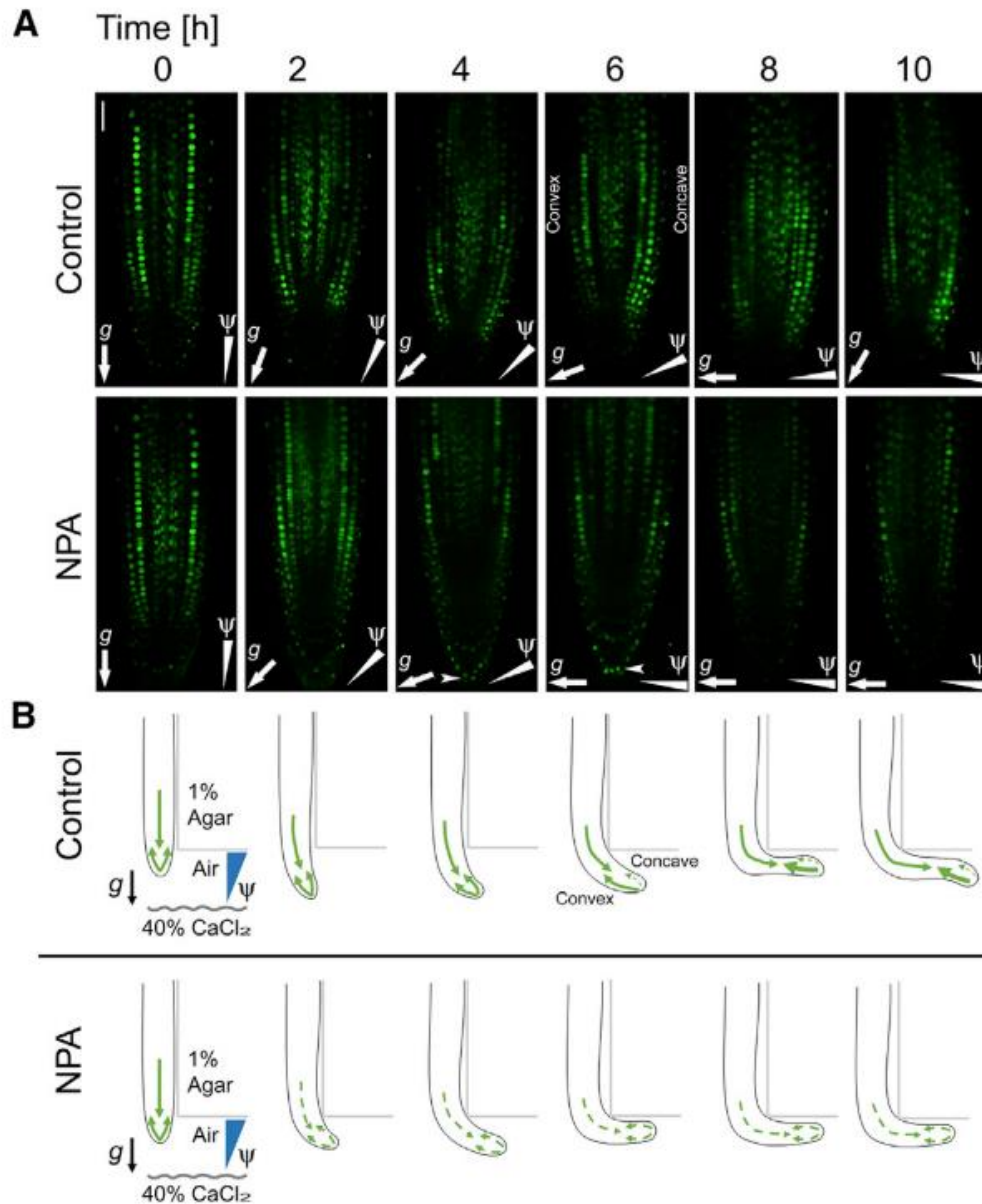


Figure 12 : L'hydrotropisme ne nécessite pas de transport asymétrique d'auxine (Shkolnik *et al.*, 2016).

(A) La réponse à l'auxine est observée via la construction DII-Venus dans l'apex de racines primaires d'*Arabidopsis* soumises à un stimulus hydrotropique. Lors de la courbure hydrotropique, aucun gradient latéral d'auxine n'est observé. Le transport asymétrique d'auxine mis en place après 6h de stimulation hydrotropique prend part à la réponse gravitropique qui suit la réponse hydrotropique.

(B) L'inhibition du transport de l'auxine n'empêche pas la mise en place de la courbure hydrotropique. Il semblerait que la réponse soit même plus rapide en présence de NPA que chez les racines contrôles.

Il est cependant supposé que l'hydrotropisme soit intrinsèquement lié à l'absorption d'eau par les poils absorbants et à son transport radial jusqu'au xylème. Les aquaporines notamment, canaux transmembranaires perméables aux molécules d'eau, pourraient contribuer à la signalisation hydrotropique. Chez les racines d'*Arabidopsis*, il a été montré qu'une importante quantité de PLASMA MEMBRANE INTRINSEQUE PROTEIN2 (PIP2, protéines de la famille des aquaporines) était retirée de la membrane plasmique et internalisée dans les cellules dans les 45 minutes suivant un stress salin (Boursiac *et al.*, 2008). La dégradation des PIP2 pourrait être renforcée par la répression de l'expression des gènes codants les PIPs observée en réponse à un stress salin (Boursiac *et al.*, 2005). De la même façon que pour le stress salin, la mise en place d'un faible potentiel hydrique durant l'hydrotropisme pourrait affecter la présence des aquaporines dans la membrane plasmique. Or, il a été montré que la conductivité hydraulique pouvait affecter le transport apoplastique d'ABA dans les racines (Freundl *et al.*, 1998). Pour rappel, l'ABA à de faibles concentrations induit la division et l'expansion des cellules dans la zone d'élongation racinaire. En réponse à un gradient de potentiel hydrique, la concentration d'ABA pourrait devenir asymétrique au sein de la racine, ce qui permettrait de déclencher la croissance différentielle (Dietrich *et al.*, 2017). Il a été montré que les composants de la signalisation agissant en aval de l'ABA étaient requis pour une réponse hydrotropique normale (Takahashi *et al.*, 2003). En revanche, contrairement au gravitropisme, la croissance différentielle de l'hydrotropisme ne nécessiterait pas la mise en place d'un gradient d'auxine dans la racine d'*Arabidopsis* (Figure 12, Shkolnik *et al.*, 2016). Un traitement des racines d'*Arabidopsis* aux inhibiteurs de transport de l'auxine n'altère pas l'hydrotropisme, et semble même accélérer la réorientation de la croissance racinaire (Figure 12) (Kaneyasu *et al.*, 2007; Shkolnik *et al.*, 2016). De même, l'expression des rapporteurs d'auxine DII-Venus et DR5::GFP est inchangée au cours de la réponse hydrotropique (Kaneyasu *et al.*, 2007; Ponce *et al.*, 2008; Shkolnik *et al.*, 2016). Ceci dit, l'auxine semble tout de même intervenir dans la réponse hydrotropique, le traitement des racines d'*Arabidopsis* avec des inhibiteurs de réponse à l'auxine ayant abouti à une altération de l'hydrotropisme (Shkolnik *et al.*, 2016). Enfin, alors que la production de ROS est requise pour déclencher la courbure gravitropique, elle semble inhiber l'hydrotropisme (Krieger *et al.*, 2016). Ces observations suggèrent donc que l'hydrotropisme et le gravitropisme sont contrôlés par des voies de signalisation distinctes. Les deux processus semblent toutefois interagir. En effet, les racines mutantes d'*Arabidopsis* agravitropiques (*pgm1-1*) présentent une réponse hydrotropique plus rapide que les racines sauvages et les racines sauvages soumises à un stress hydrotropique semblent moins sensibles à la gravité.

Il a été mis en évidence que la réorientation de croissance en direction d'une source d'eau était accompagnée de la dégradation simultanée des statolytes présents dans les cellules de la columelle, entraînant la répression de la réponse gravitropique au profit de la réponse hydrotropique (Takahashi *et al.*, 2003).

II.4. Ancrage de la racine : poils absorbants et racines latérales

L'ancrage de la racine dans le sol est une caractéristique racinaire qui agit de façon complémentaire à la croissance en longueur pour favoriser la progression racinaire dans le sol. En effet, si une racine n'est pas ancrée dans le sol, c'est-à-dire qu'elle n'adhère pas aux particules du sol, sa croissance en longueur face à une résistance mécanique donnée peut entraîner le déracinement de la plante. L'ancrage de la racine dans le sol est principalement favorisé par l'initiation de poils absorbants ainsi que par la mise en place d'un système racinaire complexe permis par la ramification de racines latérales.

Une fois que les cellules ont atteint leur taille finale au niveau de la zone d'élongation, elles entrent dans la zone de différenciation où elles acquièrent des caractéristiques spécialisées. Dans la zone de différenciation, les poils absorbants sont formés à partir des cellules de l'épiderme. Les cellules épidermiques se distinguent par leur capacité ou non à former des poils absorbants selon leur position relative aux cellules du cortex. Une cellule épidermique en contact avec deux cellules du cortex développera un poil alors que les cellules en contact avec une seule cellule corticale ne formeront pas de poil. Grâce à leur petit diamètre, les poils absorbants explorent un volume de sol par unité de surface plus important que les racines et augmentent ainsi significativement la surface de contact entre la racine et le sol (Jungk, 2001; Bengough *et al.*, 2016). Les poils absorbants sont essentiels pour l'absorption d'eau et de nutriments, pour l'interaction avec les microorganismes du sol et également pour l'ancrage des racines individuelles dans le sol (Datta *et al.*, 2011; Bengough *et al.*, 2016). Le rôle prépondérant des poils absorbants dans l'ancrage de l'apex racinaire a d'abord été suggéré par Stolzy et Barley (1968), qui ont observé que la force requise pour excaver une racine de pois augmentait d'un facteur 100 après émergence des poils absorbants. De même, (Czarnes *et al.* (1999) ont démontré que les poils absorbants favorisaient grandement l'adhésion entre le sol et les racines individuelles de maïs. Théoriquement, il a été suggéré que 165 poils absorbants seraient suffisants pour ancrer un apex racinaire de 1 mm de diamètre exerçant une pression de croissance de 0,5 MPa dans le sol (Bengough *et al.*, 2011). Dans la zone mature de la racine primaire d'*Arabidopsis*, alors que les cellules épidermiques se différencient pour former les poils absorbants, les cellules du péricycle génèrent les racines latérales qui se

ramifient à la racine primaire pour former un système racinaire complexe (Atkinson *et al.*, 2014). Les racines latérales émergent des cellules du péri-cycle opposées aux pôles de xylèmes et sont initiées lorsque ces cellules subissent plusieurs cycles de divisions anticlines générant une couche de primordium composé d'une dizaine de cellules de taille égale (Atkinson *et al.*, 2014). Les cellules se divisent ensuite de façon péricline pour former une couche cellulaire interne et une couche externe. Les divisions cellulaires anticlines et périclines suivantes permettent de former un primordium en dôme qui émerge de la racine primaire et donnera naissance à une racine latérale. Chez *Arabidopsis*, bien que les cellules du péri-cycle soient destinées à former des racines latérales dès qu'elles se retrouvent au niveau du méristème basal de la racine primaire, les premières divisions des cellules du péri-cycle sont détectées à partir de plusieurs millimètres du méristème (Casimiro *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2007). L'auxine aurait un rôle prépondérant dans la spécification des cellules du péri-cycle, les destinant à se diviser pour former des racines latérales (De Smet *et al.*, 2007). En conditions normales, toutes les cellules du péri-cycle ne se divisent pas pour former des racines latérales, bien qu'elles en aient la capacité (Boerjan *et al.*, 1995; Dubrovsky *et al.*, 2001, 2008). L'initiation des racines latérales survient à un rythme régulier, qui serait corrélé à une réponse oscillatoire de l'auxine dans les cellules du xylème adjacentes (De Smet *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2008). En effet, il a été montré que les oscillations de la réponse de l'auxine seraient visibles à des intervalles d'environ 15h et seraient associés à l'induction de nouveaux primordia de racines latérales dans les cellules du péri-cycle adjacentes (De Smet *et al.*, 2007). Il a été observé que cet espacement de l'initiation des racines latérales pouvait être altéré de manière auxine-dépendante durant les réponses tropiques de la racine d'*Arabidopsis* et de manière calcium-dépendante en réponse à des stimuli mécaniques (Ditengou *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2009). Tout comme les poils absorbants, la ramification de la racine primaire *via* la formation de racines latérales, aurait un rôle prépondérant dans l'ancrage du système racinaire (Bailey *et al.*, 2002). Il a été montré notamment que la force nécessaire pour tirer les racines d'*Arabidopsis* du sol était beaucoup plus importante chez les racines mutantes ayant une moindre ramification que chez les racines sauvages (Bailey *et al.*, 2002). Sur le même principe que les poils absorbants, la formation de racines latérales augmentent la surface de contact et l'adhésion entre la racine et le sol. L'ancrage de la racine fournit par l'émergence des poils absorbants et la ramification faciliterait la progression des racines dans un sol (Bengough *et al.*, 2016).

III. Réponses des racines à l'augmentation des contraintes mécaniques

Face à une augmentation de la résistance mécanique du sol ou substrat dans lequel elles progressent, les racines adaptent à la fois leur morphologie et leur physiologie afin d'optimiser leur croissance. Les principales modulations observées face à de fortes contraintes mécaniques sont la diminution de la croissance en longueur, l'augmentation du diamètre, et la réorientation de la croissance racinaire. Certaines modifications spécifiques à la coiffe ont également pu être observées en réponse à des contraintes mécaniques, comme l'augmentation de la production et de la sécrétion du mucilage ou encore la modulation de la forme de la coiffe. Au sein de cette partie seront discutées les différentes réponses des racines aux contraintes mécaniques de leur environnement, ainsi que les acteurs moléculaires putatifs permettant la mise en place de ces réponses.

III.1. Impact sur la poussée axiale : notions de pression de croissance critique

La résistance mécanique du sol ou du substrat dans lequel évolue la racine a un fort impact sur sa croissance longitudinale. En effet, une forte résistance mécanique implique une augmentation des contraintes axiales et des frottements qui s'opposent à la progression racinaire, obligeant la racine à augmenter en retour sa pression de croissance pour continuer à progresser. Pour prendre en compte la résistance mécanique du substrat sur le taux d'élongation relatif de la racine, Greacen et Oh ont modifié le modèle de Lockhart en y ajoutant le paramètre contrainte axial du sol σ sur la racine :

$$\dot{\epsilon} = \Phi \cdot (P - Y - \sigma) \quad (2)$$

Dans cette équation, les frottements du sol sur la zone d'élongation de la racine sont encore une fois négligés, car jugés très faibles par rapport à la contrainte axiale expérimentée par la racine. Etant donné que le système racine-sol est à l'équilibre, on estime que la force axiale exercée par la racine est égale en intensité à la force opposée par le sol sur la section transversale de la racine (Greacen and Oh, 1972). Ainsi, la pression de croissance axiale étant égale à la résistance mécanique du sol σ , **plus la résistance du sol est élevée, plus la racine devra exercer une pression de croissance élevée**. Par ailleurs, selon l'équation de Greacen et Oh, plus la résistance mécanique du sol augmente, plus le taux d'élongation relatif diminue.

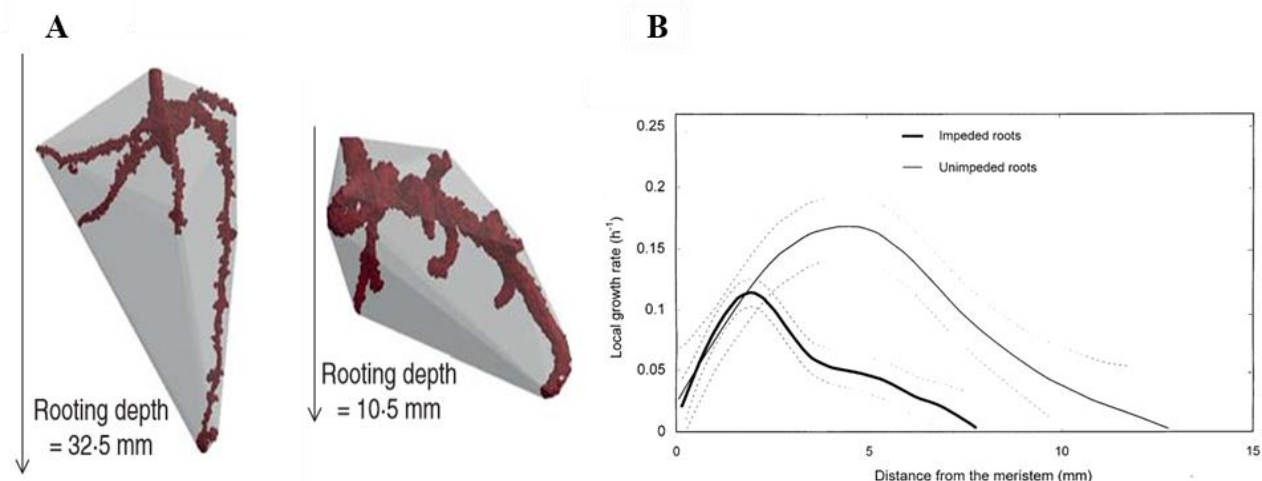


Figure 13 : Impact de la résistance mécanique du sol sur la croissance en longueur des racines

(A) Reconstitutions 3D de systèmes racinaires de tomates 10 jours après germination. A gauche, les racines progressent dans un sol meuble ($1,2 \text{ g.cm}^{-3}$) et à droite, les racines progressent dans un sol dense ($1,6 \text{ g.cm}^{-3}$). Dans le milieu dense, les racines contraintes présentent une diminution de l'élongation et donc de la profondeur de prospection, et une augmentation de leur diamètre (Tracy *et al.*, 2012).

(B) Profils de taux d'élongation élémentaire relatif (EER, « Local growth rate ») obtenus pour des racines primaires de *Pisum sativum* progressant dans un sol meuble (« Unimpeded roots », résistance pénétromètre de 0,5 Mpa) ou dans un sol dense (« Impeded roots », résistance pénétromètre de 1,5 Mpa). L'augmentation de la résistance mécanique du milieu induit une diminution du taux d'élongation élémentaire maximal (Croser *et al.*, 1999).

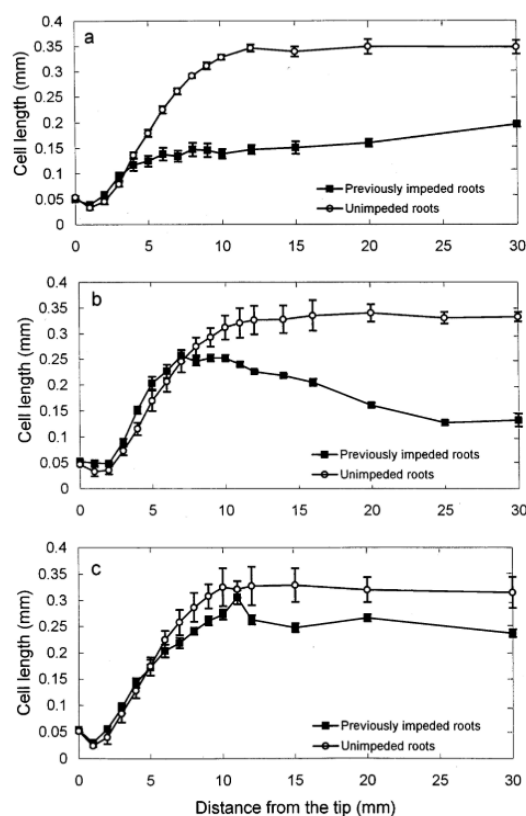


Figure 14 : Recouvrement de la croissance racinaire et de la longueur de la zone de croissance des racines de *Pisum sativum* (Croser *et al.*, 2000)

Profils de longueur des cellules en fonction de la distance à l'apex racinaire mesurés sur des racines non contraintes (« unimpeded ») et sur des racines qui ont été transvasé d'un sol dense à une solution hydroponique (« previously impeded »). Les mesures sont réalisées 0h (a), 24 h (b) et 48 (c) après le changement de milieu, *i.e.* après la suppression des contraintes mécaniques.

Expérimentalement, une diminution du taux d'élongation relatif et de la croissance primaire des racines a en effet été observée chez plusieurs espèces végétales en réponse à l'augmentation de la résistance mécanique du sol/substrat (Croser *et al.*, 1999; Bengough *et al.*, 2011; Bizet *et al.*, 2016) (Figure 13).

Selon l'équation de Greacen et Oh, l'augmentation de la pression de turgescence et/ou la diminution de Y favorisent le maintien de la croissance racinaire face à une augmentation de résistance mécanique du sol. Il a en effet été montré expérimentalement que, face à une forte rigidité du sol, la pression de turgescence augmentait dans les cellules en expansion, notamment *via* l'augmentation de la pression osmotique dans ces cellules (Atwell *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1996, 2001). Cette augmentation permettrait au potentiel hydrique de rester à l'équilibre. Cette osmorégulation semble être due à une accumulation de solutés dans l'apoplaste *via* le déséquilibre entre le déchargement du phloème et la récupération de solutés par les cellules. Il a été montré que la pression osmotique n'augmentait pas indéfiniment en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques sur le long terme, suggérant le déclenchement de régulations rétroactives (Clark *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que la pression osmotique dans les cellules en expansion des racines contraintes revenait à son niveau initial dans les 12 heures après la suppression du stress mécanique (Bengough *et al.*, 1997). En revanche, le recouvrement complet de la croissance axiale des racines nécessite deux à trois jours après la suppression du stress mécanique (Figure 14 ; Bengough and Young, 1993; Croser *et al.*, 1999), ce qui suggère que les propriétés mécaniques des parois cellulaires seraient affectées de façon durable par un stress mécanique. La réponse de croissance des racines face à un stress mécanique ou une contrainte axiale importante s'établirait en deux temps : (i) un premier changement rapide (dans les 30 premières minutes) pourrait être attribué à des évolutions de pression de turgescence (variations de P ou Y) et (ii) un changement plus tardif (à partir de 1h30 après l'application du stress) mènerait à un état stationnaire de taux d'élongation diminué (Bengough and Mackenzie, 1994). La deuxième phase de la réponse pourrait être attribuée à une rigidification des parois des cellules en expansion couplée ou non à une diminution du taux de production des cellules dans la zone de division méristématique de la racine. Il a en effet été montré que l'augmentation de la résistance mécanique du sol entraînait la formation d'une zone de croissance plus petite chez les racines de pois (*Pisum sativum*) (Figure 13B ; Croser *et al.*, 1999). L'établissement de profils de longueur cellulaires à 0h, 24h et 48h après la suppression du stress mécanique a mis en évidence que les cellules matures de la racine voyaient leur longueur diminuer en réponse

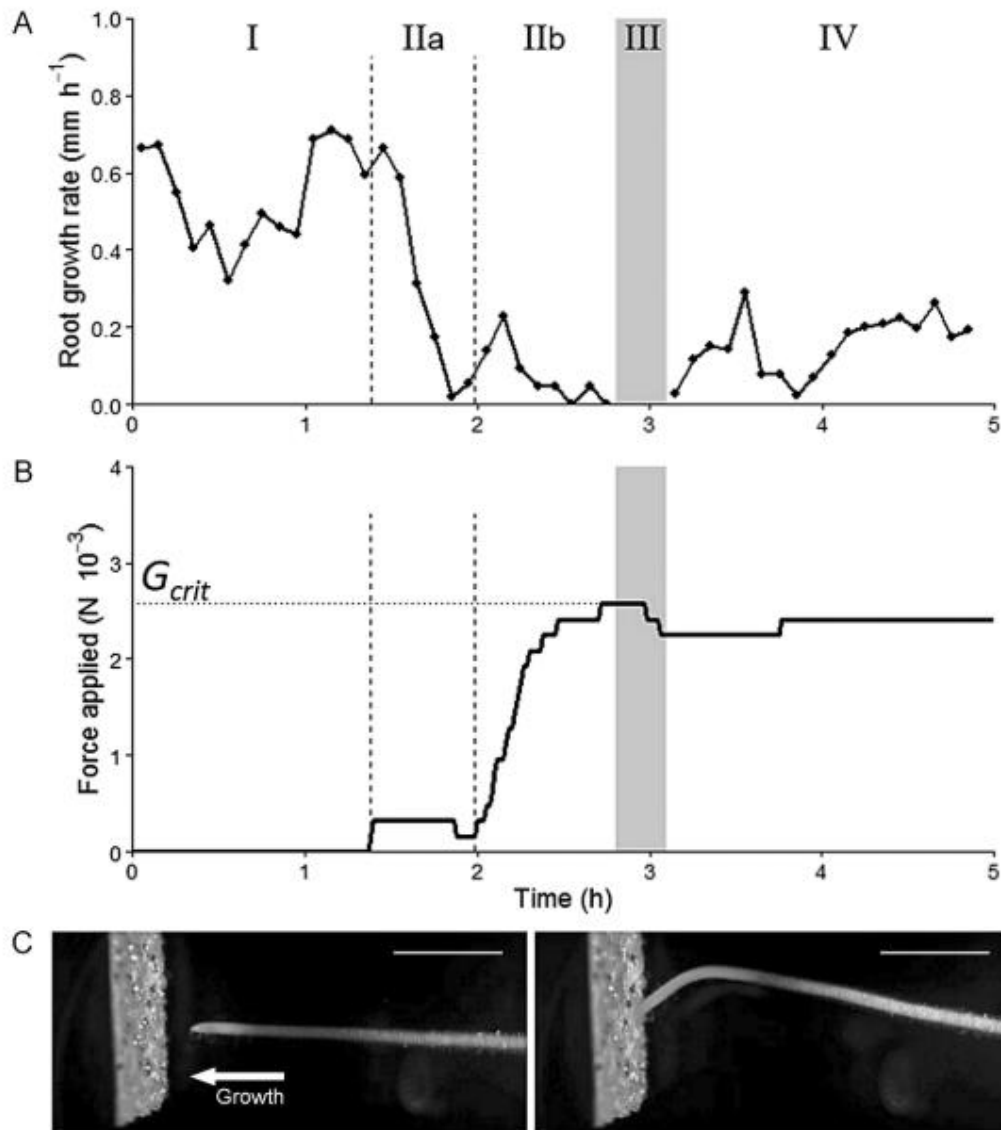


Figure 15 : Méthode expérimentale de mesure de la force critique de la croissance racinaire (Bizet et al., 2016)

Une racine adventive de peuplier croît en hydroponie jusqu'à rencontrer un obstacle rigide déformable. L'obstacle est une lamelle de verre encastrée à une extrémité et libre à l'autre extrémité. La vitesse de croissance (A) et la force appliquée par la racine sur l'obstacle (B) ont été mesurées en fonction du temps. Différentes phases sont distinguées : (I) Croissance de la racine avant contact avec l'obstacle, (II) Croissance de la racine contre l'obstacle avant courbure, (III) Flambement de la racine et (IV) Réorientation de la croissance racinaire.

au stress mécanique mais qu'elles retrouvaient la taille de cellules non contraintes deux jours après la suppression du stress (Figure 14; Croser *et al.*, 2000). Ce temps de 48h pourrait correspondre au temps nécessaire pour le renouvellement complet des cellules dans les zones de transition et d'élongation. Pour ce qui est de la production des cellules, il a été mis en évidence que le taux de prolifération cellulaire dans le MAR était inhibé par l'application d'un stress mécanique (Croser *et al.*, 1999). Cette diminution pourrait être attribuée à un allongement de la durée du cycle cellulaire (dû à un faible taux de croissance cytosolique) et/ou à une diminution du nombre de cellules en division (et donc à un méristème plus petit), mais ces hypothèses n'ont pas encore été confirmées.

➔ Pression de croissance maximale

Selon l'équation de Greacen et Oh, on peut estimer la pression de croissance maximale lorsque $\dot{\varepsilon} = 0$, selon l'expression suivante :

$$\sigma_{max} = P - Y \quad (3)$$

Ainsi, la pression de turgescence P au niveau cellulaire donne l'ordre de grandeur de la magnitude de la pression de croissance maximale qu'une racine est capable d'exercer pour progresser dans un sol. Or il est connu que l'ordre de grandeur de la pression de turgescence dans les cellules racinaires se situe autour de 0,5 MPa (Kolb *et al.*, 2017). Expérimentalement, cette pression maximale peut être calculée en mesurant la force axiale exercée par la racine qui croît contre un capteur de force. Selon les expérimentations, le capteur de force peut être un ressort calibré, une balance digitale, ou encore un bras de levier élastique. Par exemple, l'expérience de Bizet *et al.* (2016), a consisté à faire croître en hydroponie des racines adventives issues de boutures de peupliers et de placer sur la trajectoire des racines une lamelle en verre dont une extrémité était encastrée (Figure 15). Une calibration fine de la lamelle en verre a d'abord permis de déterminer la force nécessaire pour fléchir la lamelle (provoquer le déplacement de l'extrémité libre). Après le contact entre l'apex racinaire et la lamelle en verre, la racine de peuplier continue de croître plus ou moins perpendiculairement au capteur et le déforme progressivement grâce à l'application d'une force croissante (Figure 15B). La vitesse de croissance diminue brutalement et une réduction de la longueur de la zone de croissance de 30 % a également été observée (Figure 15) (Bizet *et al.*, 2016). Une heure et demie environ après le contact, la croissance de la racine s'arrête complètement avant d'induire la formation d'une courbure (Figure 15A, C).

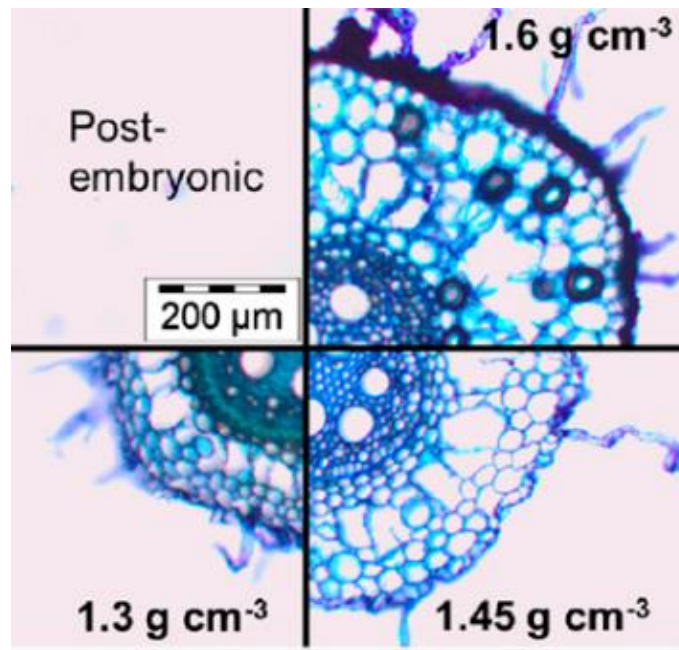


Figure 16 : Impact de la résistance mécanique du sol sur le diamètre des racines de blé (*Triticum aestivum*) (Colombi *et al.*, 2017)

Coupe transversale de racines post-embryonnaires de blé (3 cm de l'apex) 23 jours après semis. Le diamètre des racines est comparé pour trois densités apparentes de sol : une faible densité de $1,3 \text{ g.cm}^{-3}$, une forte densité de $1,6 \text{ g.cm}^{-3}$ et une densité intermédiaire de $1,45 \text{ g.cm}^{-3}$. L'augmentation de la densité du sol, et donc de sa résistance mécanique entraîne une augmentation significative du diamètre racinaire.

La déformation du capteur de force au moment de l'arrêt de croissance a permis d'obtenir la force maximale de pénétration racinaire F_{max} (Figure 15B, « Gcrit »). A partir de la valeur de F_{max} , il est possible d'obtenir la pression de croissance maximale de la racine selon l'équation suivante :

$$\sigma_{max} = \frac{F_{max}}{S} = \frac{F_{max}}{\pi d^2 / 4} \quad (4)$$

Où S est l'aire de la section transversale de la racine et d le diamètre de la racine. Les pressions de croissance maximale mesurées par ce type de méthode sont variables selon les espèces considérées mais sont toujours du même ordre de grandeur que la pression de turgescence cellulaire. Dans les travaux de Misra *et al.* (1986), la pression de croissance maximale a été mesurée à 0,5 MPa pour les racines de pois, 0,29 MPa pour les racines de coton et 0,24 MPa pour les racines de tournesol.

III.2. Augmentation du diamètre racinaire en réponse aux contraintes mécaniques

En réponse à une forte résistance mécanique du sol, alors que le taux d'élongation racinaire diminue, il a été observé chez plusieurs espèces une augmentation du diamètre des racines contraintes (Figure 16). L'épaississement racinaire pourrait être attribué soit à une augmentation du nombre de couches cellulaires soit à une augmentation du diamètre des cellules. Quelques études ont mis en évidence une légère augmentation du nombre de cellules dans la stèle et le cortex, probablement due à des divisions péricleines additionnelles dans le MAR (WILSON *et al.*, 1977). Cependant, il semblerait que l'augmentation du diamètre des racines contraintes soit principalement dû au gonflement des cellules dans les couches de cortex (WILSON *et al.*, 1977; Croser *et al.*, 1999). Chez les racines de maïs contraintes, il a été observé que ce gonflement cellulaire s'étendait sur 5 mm au niveau de la zone d'élongation après 6h de stress mécanique et concernait une zone de 30 mm (zone d'élongation et une partie de la zone mature) après 7 jours de stress (Verlag *et al.*, 2001). De plus, il a été mis en évidence que plus l'application du stress mécanique était prolongée, plus la zone de gonflement se rapprochait de l'apex racinaire (Verlag *et al.*, 2001). Cette observation corrobore le raccourcissement de la zone de croissance racinaire en réponse à une forte résistance mécanique du sol. Sur les racines de pois, il a été montré que la suppression

du stress mécanique entraînait le retour quasi-immédiat du diamètre racinaire à son niveau initial, alors que le taux d'élongation reste faible pendant plusieurs jours (Bengough and Young, 1993). Cela suggère donc que l'expansion radiale et l'expansion axiale des cellules sont contrôlées *via* des mécanismes distincts. Par ailleurs, il a été montré que l'orientation des microtubules corticaux était modifiée en réponse à un stress mécanique causant une extension ou une contraction des cellules (Muratov and Baulin, 2015). Les microtubules corticaux à leur tour pourraient induire un réassemblage des microfibrilles de cellulose de la paroi pour moduler le diamètre et/ou l'allongement des cellules. Chez des racines de maïs contraintes, il a été montré que les cellules de la zone d'élongation contenaient plus de microfibrilles orientées longitudinalement dans leur paroi (dans le sens de l'élongation) que chez les racines non contraintes (Veen, 1982). Cette réorientation impliquerait une rigidification axiale des parois et un assouplissement circonférentiel qui pourrait partiellement expliquer la diminution de l'élongation et l'augmentation de l'expansion radiale des racines face à de fortes résistances mécaniques (Bengough *et al.*, 2006).

III.3. L'augmentation du diamètre racinaire favorise la progression racinaire...

III.3.1. ... en réponse à une compaction du sol

Dans les sols homogènes et les gels, l'augmentation du diamètre près de l'apex racinaire permettrait d'atténuer les contraintes axiales imposées à l'apex, ce qui faciliterait la progression racinaire (Abdalla *et al.*, 1969). Le gonflement de la racine pourrait également déclencher la formation de fissures et leur propagation, permettant à la racine de progresser dans une voie de moindre résistance mécanique (Dorgan *et al.*, 2005). Dans les sols granulaires, le même type de mécanisme a été proposé, l'épaississement de la racine permettant de créer une voie de moindre résistance en éloignant les grains les uns des autres et donc en élargissant les pores (Abdalla *et al.*, 1969).

III.3.2. ... en réponse à un obstacle : rôle dans la résistance au flambement

L'augmentation du diamètre racinaire pourrait également offrir un avantage en réponse à un obstacle physique. En effet, il a été observé que les racines plus épaisses pénétraient plus facilement les couches de sol compact (Dexter and Hewitt, 1978; Materechera *et al.*, 1992; Chimungu *et al.*, 2015). Lorsqu'une racine progresse dans un pore ou dans un espace de faible résistance mécanique et qu'elle rencontre un obstacle de résistance plus forte, la racine doit générer une pression de croissance suffisante pour déplacer et/ou déformer cet obstacle.

Si la résistance est trop élevée pour permettre la pénétration racinaire, un **flambement** de la racine peut survenir. D'un point de vue mécanique, le flambement correspond à une instabilité élastique causant une flexion de la racine soumise à une force de compression au-dessus du seuil de compression critique. Le seuil de flambement d'une racine permet de déterminer si elle sera capable de pénétrer ou non un sol avec une résistance mécanique connue. En estimant que la racine est comme une poutre encastrée par les poils absorbants au niveau de sa zone mature et articulée au niveau de l'apex, la force de compression maximale à partir de laquelle la racine flambe peut être déterminée en utilisant la théorie des poutres :

$$F_B = \alpha \frac{EI}{l^2} \quad (5)$$

Où E est le module d'Young de la racine, l la longueur de la zone libre de la racine et I le moment de flexion qui dépend de la géométrie de la racine. La zone libre de la racine concerne typiquement la zone non encastrée, c'est-à-dire la zone allant de l'apex jusqu'à la position des premiers poils absorbants qui ancrent la racine. En estimant que la racine est un objet cylindrique de diamètre d , on obtient :

$$I = \frac{\pi d^4}{64} \quad (6)$$

La racine étant un système complexe avec une extrémité conique, non homogène, la mesure de la force critique de flambement est cantonnée généralement à une analyse dimensionnelle. L'expression de F_B peut être simplifiée comme suit :

$$F_B \sim \frac{Ed^4}{l^2} \quad (7)$$

Dans un premier temps, on voit dans cette expression que la Force critique de compression avant flambement est inversement proportionnelle au carré de la longueur de la portion libre de la racine. Cela suggère que pour un même diamètre et une même rigidité de la racine, plus la zone de croissance est petite plus la force de compression nécessaire pour que la racine flambe est importante. Ainsi, le raccourcissement de la zone de croissance observé chez les racines fortement contraintes pourrait faciliter leur progression rectiligne dans le sol.

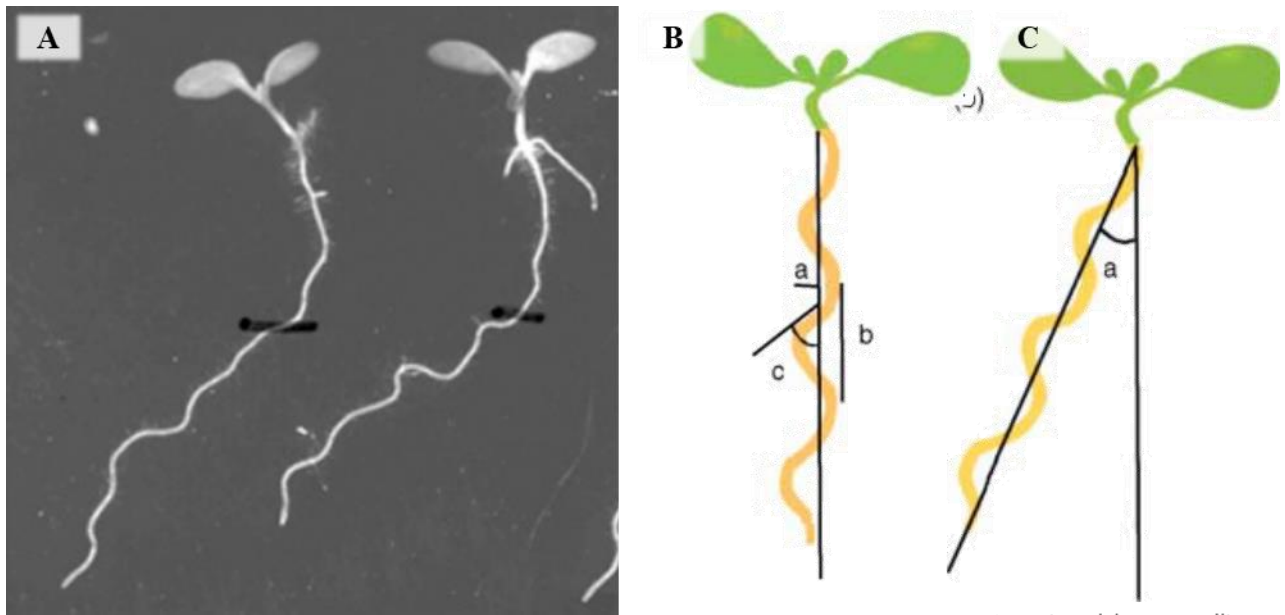


Figure 17 : Oscillations de croissances en réponse à une contrainte mécanique (Oliva and Dunand, 2007)

Lorsque les racines poussent à la surface d'un gel inclinée à 45° par rapport à la verticale, des déviations de croissance (*skewing*) sont observées (B) ainsi que des mouvements de croissance sinusoïdaux (*waving*) (C). Ces mouvements semblent être le résultat d'une interaction entre les circumnutations, mécanismes internes, et les tropismes (gravitropisme et thigmotropisme/hydrotropisme). (B) **a** représente l'amplitude d'une oscillation, **b** représente la période d'une oscillation et **c** représente l'angle d'une oscillation par rapport à la verticale. (C) **a** représente l'angle moyen de la racine par rapport à la verticale.

Ensuite, cette expression montre que la force critique de compression est fonction du diamètre racinaire à la puissance 4. Cela signifie qu'une racine épaisse avec un plus gros diamètre résistera mieux à de fortes contraintes axiales avant de flamber que des racines fines. Expérimentalement, Materechera *et al.* (1992) ont montré que les racines de dicotylédones qui sont généralement plus épaisses que les racines de monocotylédones étaient moins sujettes au flambement. Ces observations soutiennent l'hypothèse que l'augmentation en diamètre des racines en réponse à des fortes résistances mécaniques faciliterait la progression racinaire.

III.4. Orientation de la croissance ou thigmotropisme

III.3.1. Circumnutations et oscillations de croissance

L'apex racinaire croît en décrivant de petits mouvements hélicoïdaux, appelés circumnutations (Rivière *et al.*, 2017). L'apex racinaire décrit des mouvements circulaires, elliptiques, avec une période qui peut aller de quelques minutes à plusieurs heures. Ces oscillations, dites rythmiques, présentent des amplitudes et des fréquences variables selon l'espèce végétale considérée et peuvent varier en fonction de l'environnement. Il a été observé chez les racines de *Pisum sativum* que les circumnutations étaient circulaires et avaient une période de 2,5 h environ (Kim *et al.*, 2016) alors que chez le riz, les racines séminales présentent des oscillations hélicoïdales d'une période de 4,7 h (Chen *et al.*, 2016). L'origine de ces mouvements n'est à ce jour pas expliqué, bien qu'ils soient suspectés d'être régulés et contrôlés par des mécanismes endogènes (Johnsson, 1997; Bastien and Meroz, 2016; Kim *et al.*, 2016). Plus récemment, il a été mis en évidence que la régularité et la forme de ces oscillations pouvaient être affectées par des signaux externes tels que la lumière, la température ou encore la composition du milieu de culture (Buer *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2016). L'amplitude, la période, la forme et la direction des circumnutations semblent également être affectées par un stress mécanique ou un contact. Plusieurs études portant sur l'impact des stress mécaniques sur les oscillations de croissance des racines ont utilisé un même système expérimental : des graines d'*Arabidopsis* sont déposées à la surface d'un milieu gélifié (agar ou Phytigel) dans une boîte de pétri inclinée à un angle de 45° par rapport à la verticale (Figure 17). Dans ce modèle les racines croissent à la surface du gel de façon à ce qu'elles soient en contact avec le gel d'un côté et exposée à l'air de l'autre côté (Johnsson, 1997). La surface du gel représente dans ce système un obstacle empêchant la racine de croître en direction du vecteur de gravité.

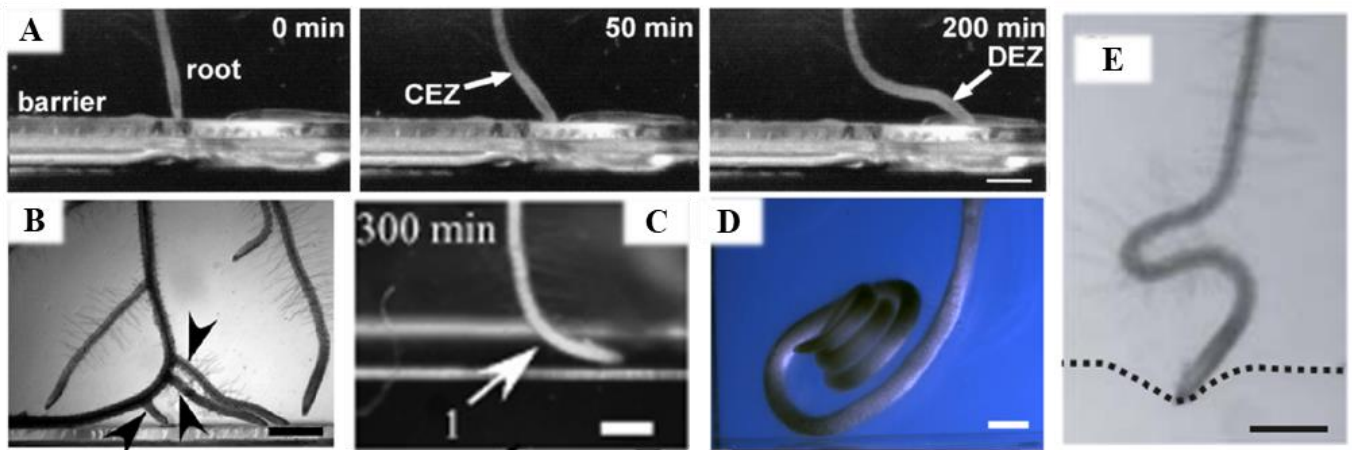


Figure 18 : Contournement d'un obstacle par l'apex racinaire

(A) Contournement d'une barrière en verre par la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*. Une première zone de courbure est initiée dans la zone d'élongation 50 minutes après le contact, permettant la déviation de l'apex. Une deuxième courbure est alors mise en place plus près de l'apex durant le contournement de l'obstacle (Massa and Gilroy, 2003).

(B) Initiations de racines latérales ectopiques lors du contournement de l'obstacle par la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* (Richter *et al.*, 2009). Les racines latérales sont initiées proches les unes des autres sur la face convexe de la racine.

(C-D) Le contournement de l'obstacle par une racine de *Phleum pratense* (C) et d'*Oriza sativa* (D) est différent de celui des racines d'*Arabidopsis thaliana* (Massa and Gilroy, 2003; Lourenço *et al.*, 2015).

(E) Courbure d'une racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une couche rigide de gel. La courbure est différente de celle observée en réponse à une barrière en verre, suggérant que la rigidité de l'obstacle influe sur la courbure de la racine (Yamamoto *et al.*, 2008).

Dans ce système, il a été mis en évidence que les racines décrivaient à la fois des déviations de croissance (« *skewing* »), et à la fois des mouvements de croissance sinusoïdaux (« *waving* ») (Figure 17 ; Thompson and Holbrook, 2004; Oliva and Dunand, 2007). Ses mouvements particuliers semblent être le résultat d'une interaction entre des mécanismes régulés de façon endogènes et des réponses de croissances à des signaux externes comme la gravité et le contact mécanique. Dans des systèmes expérimentaux plus proches d'un sol, il a également été mis en évidence que l'augmentation de la résistance mécanique renforçait les mouvements et oscillations des racines (Popova *et al.*, 2016), induisant alors une tortuosité plus importante des racines. L'augmentation de la tortuosité des racines en réponse à l'augmentation de la résistance mécanique serait partiellement due à une diminution de la perception gravitropique chez ces même racines (Popova *et al.*, 2016). Une hypothèse a été émise selon laquelle le stress mécanique inhiberait la perception de la gravité pour favoriser les oscillations et permettre à la racine d'orienter sa croissance vers une voie de moindre résistance (Massa and Gilroy, 2003; Popova *et al.*, 2016). De plus, les oscillations peuvent influencer l'angle d'incidence auquel une racine rencontre un milieu rigide ou un pan de sol compact. Or, il a été montré que l'angle d'incidence de l'apex racinaire jouait un rôle important dans la pénétration, les racines rencontrant une couche de milieu rigide avec un angle oblique pénétrant moins cette couche que les racines avec un angle perpendiculaire (Dexter and Hewitt, 1978).

III.3.2. Contournement d'un obstacle

Lorsque les racines sont confrontées à des résistances mécaniques trop fortes et qu'elles ne parviennent pas à générer une pression de croissance suffisante pour continuer à progresser en direction du vecteur de gravité, elles vont être amenée à réorienter leur croissance pour trouver un chemin de moindre résistance. La plupart des études qui ont portés sur l'orientation de la croissance racinaire en réponse à des stress mécaniques ont consisté à placer un obstacle sur la trajectoire de la racine. Selon les expérimentations, cet obstacle consistait en une barrière rigide impénétrable (Massa and Gilroy, 2003; Monshausen *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2014), une couche de gel rigide (Yamamoto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2017), ou encore un bras de levier flexible (Bizet *et al.*, 2016). Nous discuterons ici de ces études et donc du contournement de l'obstacle par les racines (Figure 18).

Dans l'ensemble de ces études, la réorientation de la racine après contact avec l'obstacle se manifeste par la courbure de la racine. La question des mécanismes contrôlant la mise en place de la courbure a été plusieurs fois abordée et reste sous investigation.

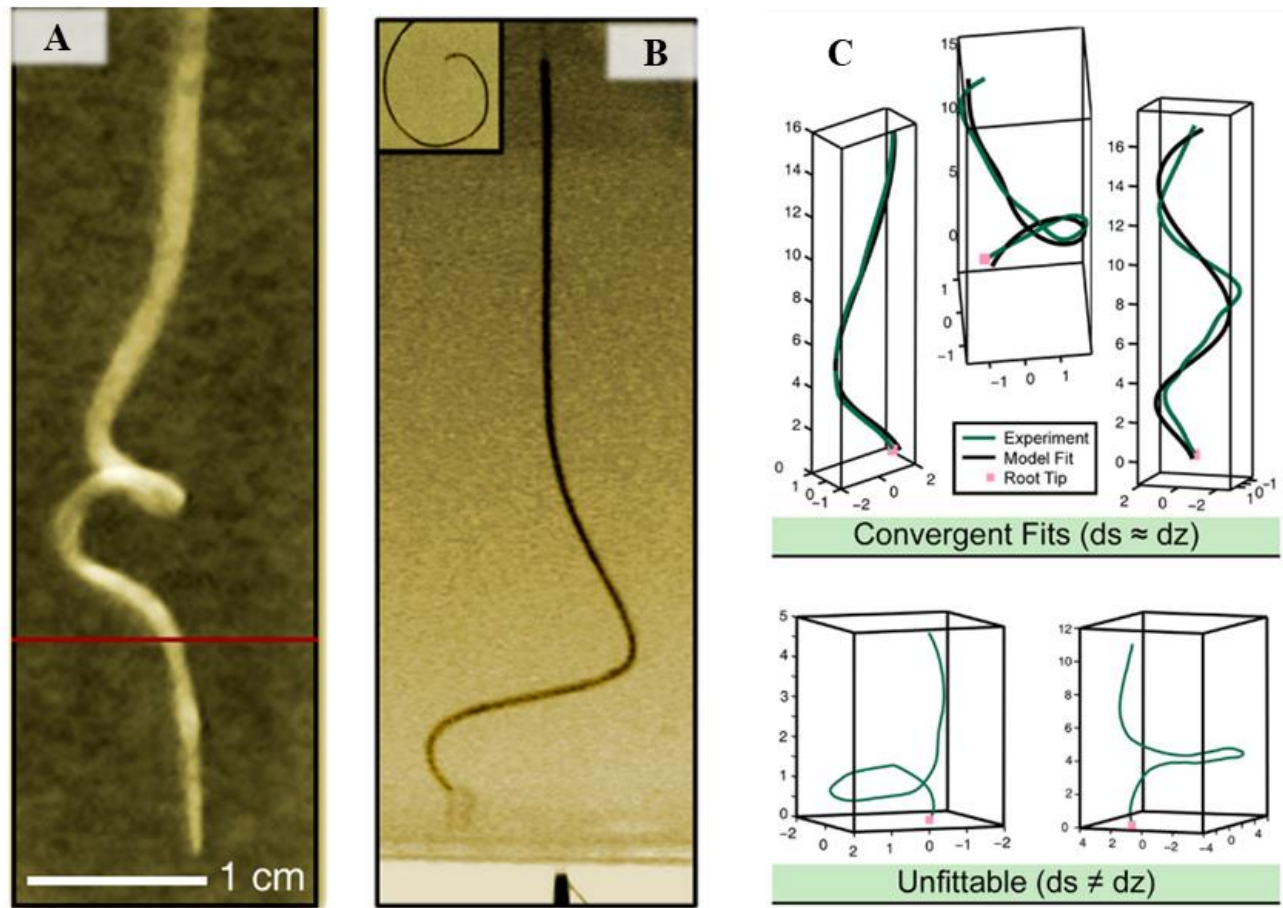


Figure 19 : Flambement des racines de *Medicago truncatula* dans des gels composés de deux couches de concentration en Agar croissante (Silverberg *et al.*, 2012)

- (A) Une racine primaire de *Medicago truncatula* rencontre une couche inférieure rigide de gel, entraînant l'initiation de plusieurs courbures. Selon les auteurs, ces courbures peuvent être assimilées à du flambement.
- (B) La courbure de la racine est comparée au flambement d'une poutre fine en acier soumise à une compression. Pour obtenir la courbure de la poutre en acier, la plaque inférieure dans laquelle la pointe de la poutre est ancrée subit une poussée vers le haut (pour imposer une compression) et une torsion.
- (C) Comparaison des modes de flambements racinaires avec les modes de flambement obtenus via des équations de la théorie des poutres. Les morphologies adoptées par les racines sont pour la plupart expliquées par les équations de flambement.

La courbure pourrait être mise en place de façon purement passive ou mécanique, de façon active *via* la mise en place d'une croissance différentielle, ou pourrait être due à l'interaction des deux phénomènes. En réponse à une barrière en verre, Massa et Gilroy (2003) ont observé l'initiation rapide d'une zone de courbure au niveau de la zone d'élongation, suivie de la déviation par glissement de l'apex racinaire (Figure 18A). Cette courbure apparaît dans les 10 minutes suivant le contact avec l'obstacle. Ce temps court laisse à penser que cette première courbure serait due à un flambement. Cette courbure présumée passive a été également observée et détaillée lorsque la racine rencontrait un obstacle moins rigide, tels qu'un bras de levier élastique ou une couche de gel dense. Selon les expérimentations, différents modes de flambement ont été observés. Il semblerait que ces différences puissent être dues à la rigidité de l'obstacle mais surtout au confinement latéral de la racine. Bizet *et al.* (2016) ont observé l'effet de ce confinement sur la réponse des racines de peupliers à un obstacle élastique. Les racines étaient cultivées soit en hydroponie (donc peu contraintes), soit dans une aiguille vide qui les entourait sans affecter leur croissance. Il a été mis en évidence au cours de cette étude que les racines de peuplier étaient capables de générer une force axiale 15 fois supérieure lorsqu'elles étaient confinées dans l'aiguille que lorsqu'elles étaient libres (Bizet *et al.*, 2016). Des expériences ont également consisté à faire pousser des racines d'*Arabidopsis thaliana* ou de *Medicago truncatula* dans des gels composés de plusieurs couches de résistance mécanique variable (Figure 18E). En général, ces gels sont composés d'une couche dense de forte concentration en agar ou Phytigel recouverte par une couche moins dense (Yamamoto *et al.*, 2008; Silverberg *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2017). Dans ce type d'expériences, plus la couche inférieure de gel est dense par rapport à la couche supérieure, moins les racines sont capables de pénétrer dans la couche inférieure et donc plus elles se réorientent *via* l'initiation d'une zone de courbure. Silverberg *et al.* (2012) ont comparé les modes de courbure des racines de *Medicago truncatula* aux modes de flambement d'une poutre fine en acier et aux modes de flambement obtenus *via* modélisation à partir d'équations de flambement pure (Figure 19). Dans leur système expérimental, il apparaît alors que la plupart des modes de courbures des racines sont identiques aux modes de courbures des poutres en acier (Figure 19B, C). Cette étude a permis aux auteurs d'attribuer la courbure observée à un flambement (Figure 19 ; Silverberg *et al.*, 2012). De plus, ils ont mis en évidence que le confinement latéral de la racine par la couche supérieure de gel impactait le mode de flambement de la racine (Silverberg *et al.*, 2012).

Il a été mis en évidence chez *Arabidopsis* que la courbure ou flambement de la racine face à un obstacle induisait l'initiation ectopique de racines latérales du côté convexe de la courbure (Richter *et al.*, 2009) (Figure 18B). Pour des racines qui progressent dans un environnement complexe, l'initiation de racines latérales en réponse à un stress mécanique, contribuerait à étoffer l'architecture du système racinaire, favorisant ainsi à la fois le volume de sol exploré et l'ancrage produit par le système racinaire.

Dans les diverses expérimentations, la mise en place de la première zone de courbure après le contact avec un obstacle rigide ou semi-rigide est généralement suivie d'une déviation de l'apex et d'une réorientation de la croissance. Chez les racines d'*Arabidopsis thaliana*, Massa et Gilroy (2003) ont observé lors de cette réorientation la mise en place d'une seconde zone de courbure dans les 3 heures suivant le contact entre l'apex racinaire et une lamelle de verre. Cette seconde zone de courbure, mise en place dans la direction opposée à la première courbure à 400µm de l'apex environ, donne à la racine une forme finale « en marche » (« *step-like shape* ») (Figure 18A). Les auteurs ont interprété cette forme comme le résultat de l'interaction des réponses gravitropique et thigmotropique (Massa and Gilroy, 2003). Chez les racines dont la columelle a été retirée au laser ainsi que chez les racines agravitropiques, la seconde courbure est moins importante que chez les racines sauvages, donnant à l'apex racinaire un angle de plus de 150° par rapport à la verticale au lieu de 136° (Massa and Gilroy, 2003). La mise en place de la seconde zone de courbure pourrait permettre à la racine de se réorienter plus facilement en direction du vecteur de gravité une fois l'obstacle contourné. La deuxième zone de courbure observée par Massa et Gilroy (2003) n'est pas observée chez toutes les espèces. Par exemple, les racines de *Phleum pratense* se réorientent de façon à ce que l'apex soit parallèle à l'obstacle alors que les racines du riz (*Oriza sativa*) s'enroulent sur elle-même à plusieurs reprises après le contact avec l'obstacle (Massa and Gilroy, 2003; Lourenço *et al.*, 2015) (Figure 18C, D).

III.4. Rôle de la coiffe dans la réponse aux contraintes mécaniques

Bien que peu étudiée, la coiffe a été suggérée à maintes reprises comme étant un tissu essentiel dans la progression de la racine dans un sol, à la fois grâce à sa forme spécifique et grâce à son action lubrifiante.

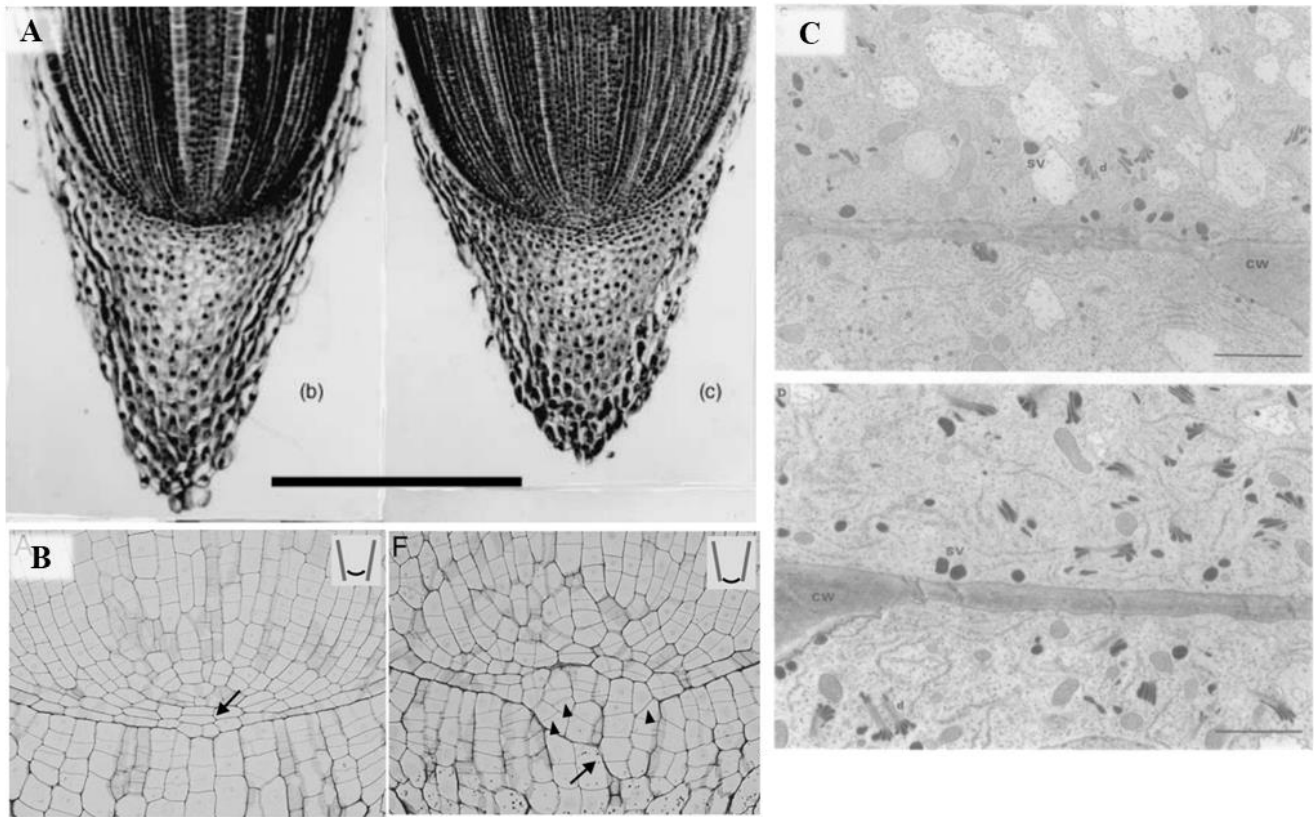


Figure 20 : Impact de la résistance mécanique du sol sur la coiffe des racines de *Zea mays*.

- (A) Impact sur la taille et la forme de la coiffe. A gauche, une racine progressant dans un sol meuble et à droite, une racine progressant dans un sol compact (Iijima *et al.*, 2003a). On observe que la taille et la forme de la coiffe sont altérées en réponse à la compaction du sol.
- (B) Impact sur les divisions des initiales de la coiffe. Des divisions périclinales ectopiques sont observées lorsque la racine de maïs est soumise à des contraintes mécaniques élevées (à droite). Ces divisions ectopiques altère la frontière entre le MAR et la coiffe racinaire (Potocka *et al.*, 2011).
- (C) Impact sur l'activité sécrétrice des cellules périphériques de la coiffe. Microscopie électronique de cellules LRC matures d'une racine poussant dans un sol meuble (haut) et d'une racine poussant dans un sol compact (bas). Lorsque la racine est contrainte, les cellules LRC contiennent plus de vésicules sécrétrices et de dictyosomes, permettant d'expliquer l'induction de la production et de la sécrétion de mucilage en réponse à une contrainte mécanique élevée (Iijima and Kono, 1992).

→ *Diminution des frottements entre le sol et la racine*

La coiffe racinaire semble avoir un rôle important dans la limitation des frottements entre le sol et les cellules en élongation de la racine, grâce à la sécrétion de mucilage et la desquamation des cellules bordantes. Il a été montré que l'élimination de la coiffe entraînait la diminution du taux d'élongation racinaire de 50% et l'augmentation du diamètre de 30% chez des racines de maïs progressant dans un sol compact (Iijima *et al.*, 2003b). Dans cette même étude, la résistance à la pénétration racinaire a été mesurée à 0,31 MPa pour les racines avec une coiffe intacte et à 0,52 MPa pour les racines dont la coiffe avait retirée (Iijima *et al.*, 2003b). Ces résultats suggèrent que les racines décoiffées subissent plus de frottements que les racines avec une coiffe intacte (Iijima *et al.*, 2003b,a). D'autre part, il a été montré que l'augmentation de la résistance mécanique du sol importante stimulait à la fois la sécrétion de mucilage et le nombre de cellules bordantes desquamées chez les racines de maïs (*Zea mays*) (Iijima *et al.*, 2000, 2003b; Potocka *et al.*, 2011). L'augmentation de la sécrétion de mucilage en réponse à une résistance mécanique élevée serait corrélée à un nombre plus important de dictyosomes et de vésicules sécrétrices dans les cellules de la coiffe, suggérant que l'activité sécrétrice des cellules de la coiffe est induite par les contraintes mécaniques (Iijima and Kono, 1992) (Figure 20C). L'augmentation de la desquamation des cellules bordantes en réponse à une résistance mécanique élevée entraînerait, quant à elle, le recouvrement total de la coiffe (contre 11% de recouvrement dans les sols meubles). Le recouvrement complet de la coiffe par les cellules bordantes, tout comme l'induction de la sécrétion de mucilage, permettrait de réduire les frottements entre le sol et l'apex racinaire. L'augmentation du nombre de cellules desquamées serait compensée par l'augmentation des taux de production de cellules de la coiffe. L'activité méristématique de la coiffe serait donc activée par les contraintes mécaniques (Iijima *et al.*, 2003a). L'induction des activités méristématiques et sécrétrices de la coiffe, ainsi que la desquamation plus importante des cellules pourraient être vues comme des caractéristiques adaptatives permettant de promouvoir la pénétration racinaire dans les sols compacts (Bengough and Mckenzie, 1997; Potocka and Szymanowska-pułka, 2018).

→ *Contrôle de la forme de l'apex : impact sur la répartition des contraintes mécaniques*

Les régulations de la production et de la desquamation des cellules en réponse à une contrainte mécanique importante entraîneraient la modification de la forme de la coiffe. En effet, il a été observé que les coiffes mécaniquement stressées apparaissaient souvent plus

courtes et plus étroites à la base (WILSON *et al.*, 1977; Souty and Rode, 1987; Iijima *et al.*, 2003a) (Figure 20A). Or, la forme et la taille de la coiffe sont des caractéristiques clés de la progression racinaire dans un sol. En effet, il a été montré que dans les sols compactés, le taux d'élongation racinaire était corrélé à la géométrie de la pointe des racines de blé (Colombi *et al.*, 2017). Colombi *et al.* (2017) ont mis en évidence que les racines dont l'apex avait un angle plus aigu progressaient plus vite dans un sol compact que les racines dont l'apex avait un angle obtus. Il semblerait que la géométrie de l'apex racinaire influence la résistance à la pénétration expérimentée par la racine en modulant la distribution des contraintes axiales concentrées autour de l'apex. Ainsi, un apex pointu entraînerait une concentration des contraintes sur une plus petite surface (à la pointe de l'apex) et un apex en dôme entraînerait une répartition homogène des contraintes autour de l'apex (Ruiz *et al.*, 2016; Colombi *et al.*, 2017). Or, d'un point de vue mécanique, une même quantité de contraintes concentrées sur une plus petite surface résultent en une force plus importante. Ces différentes études suggèrent donc qu'une racine avec un apex pointu doit générer une force de croissance plus faible qu'une racine avec un apex en dôme pour progresser dans un sol résistant (Colombi *et al.*, 2017).

D'autres régulations en réponses aux contraintes mécaniques ont été observées dans la coiffe racinaire, comme la vacuolisation des cellules méristématiques, une diminution du nombre des amyloplastés dans les statocytes ainsi qu'une altération de leur localisation et une orientation ectopique des divisions cellulaires (WILSON *et al.*, 1977; Massa and Gilroy, 2003; Potocka *et al.*, 2011) (Figure 20B). L'impact des contraintes mécaniques sur les statolites pourrait, comme dans le cas d'un stress hydrique, permettre à la racine de négliger la gravité pour se réorienter plus facilement et trouver une voie de moindre résistance mécanique.

IV. Quid de la perception des contraintes mécaniques ?

Lorsqu'une flexion est appliquée à une tige, il a été montré que l'intensité de la réponse de croissance dépendait non pas de la force appliquée mais de la somme des déformations longitudinales subies par la tige. Chaque cellule perçoit sa propre déformation et la réponse de croissance est corrélée à la somme des perceptions locales de cette déformation (Coutand and Moulia, 2000). Cette étude suggère que toutes les cellules végétales sont capables de percevoir et d'intégrer les signaux mécaniques. Chez les racines, peu d'études ont permis de comprendre les déformations des cellules dans un sol et la perception de ces déformations.

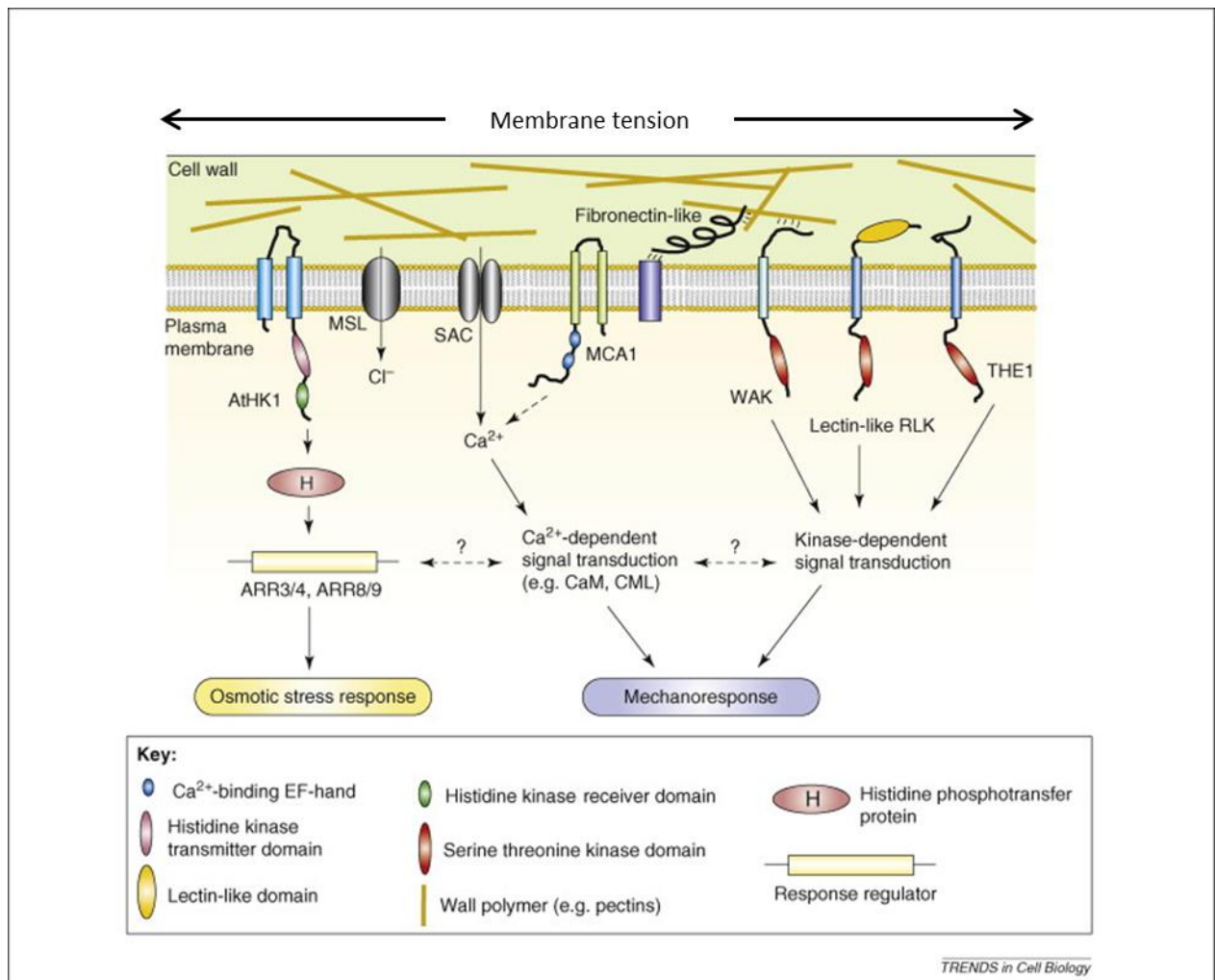


Figure 21 : Modèle hypothétique de la mécanotransduction et action des différents mécanorécepteurs putatifs (Monshausen and Gilroy, 2009)

Une contrainte de tension imposée à la membrane plasmique des cellules induit leur étirement. Cet étirement activerait l'ouverture de canaux ioniques (MCA, MSL), ce qui permettrait l'influx d'ions Ca²⁺ et Cl⁻ dans le cytosol. L'influx de calcium déclencherait une voie de transduction du signal mécanique calcium dépendante. Cette voie pourrait faire intervenir les Calmodulines (CaM) ou les Cam-Like (CML) qui à leur tour induiraient d'autres processus, tel que la régulation de l'expression de gènes, ... En parallèle de la voie de signalisation calcium dépendante, une voie de signalisation kinase dépendante pourrait être déclenchée à la suite de la perception du signal mécanique par des protéines comme les RLK (Receptor-Like Kinase) ou les WAK (Wall-Associated Kinase).

Les mécanismes de perception/transduction du signal mécanique ont principalement été étudiés lors du contournement d'un obstacle rigide par la racine ou lors de la flexion manuelle de la racine (Monshausen *et al.*, 2009). Dans les deux cas, l'étirement de la membrane plasmique induit par les contraintes de tension dans la zone convexe de la racine courbée semble être perçu et semble déclencher une cascade de signalisation semblable à celle observée dans la tige après flexion (Monshausen *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2014). Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux mécanismes impliqués dans la perception cellulaire de la déformation. Une des hypothèses implique l'action de canaux ioniques transmembranaires (Monshausen and Haswell, 2013).

IV.1. Les canaux ioniques transmembranaires

Lors de la courbure de la racine, l'étirement de la membrane plasmique des cellules activerait l'ouverture de canaux mécanosensibles (MS). L'état ouvert-fermé de ces canaux permet les mouvements d'ions (Ca^{2+} , Cl^- , *etc.*) dans la cellule, transformant le signal mécanique en signal électrochimique. Plusieurs canaux mécanosensibles ont été proposés, dont les membres de la famille des MSLs (MscS-Like) ou de la famille des MCAs (Mid1-Complementing Activity) (Figure 21, pour revues Monshausen and Gilroy, 2009; Monshausen and Haswell, 2013; Basu and Haswell, 2017).

➤ Les canaux MSLs

Les canaux MscS (MechanoSensitive Channel of Small Conductance) ont été découverts chez *Escherichia coli* il y a quelques dizaines d'années et sont à ce jour les canaux MS les mieux connus. Ce sont des canaux ioniques non sélectifs, dont l'ouverture est directement contrôlée par la tension dans la membrane plasmique et qui présente une importante conductance (1,2 nS) (Haswell, 2007). Les canaux MscS chez les *E.coli* servent essentiellement de valves de sécurité osmotique, protégeant les cellules de la rupture en cas de chocs hypo-osmotiques. Des homologues des canaux MscS, nommé Les MSLs, ont été identifiés chez de nombreuses espèces de bactéries, archées, algues et plantes (Basu and Haswell, 2017). Au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana*, 10 protéines MSL sont retrouvées avec des profils d'expression et de localisation cellulaire distincts (Pivetti *et al.*, 2003; Haswell, 2007). Sur la base des régions conservées, les MSLs peuvent être groupés en deux classes, les MSLs de classe I et les MSLs de classe II (Haswell, 2007). Les MSLs de classe I (AtMSL1-3) contiennent des séquences N-terminales prédisant leur localisation subcellulaire.

Alors que la séquence N-terminale de MSL1 prédit une localisation du canal sur les membranes des mitochondries, les séquences N-terminales de MSL2 et MSL3 prédit une localisation sur les membranes des plastes (Small *et al.*, 2004). Les canaux MSL2 et MSL3 semblent contrôler la morphologie, la taille et le nombre des organelles contenus dans une cellule (Haswell, 2007). Les MSLs de classe II (MSL4-10), quant à eux, ne contiennent pas de séquences de localisation subcellulaires identifiables, mais une localisation des canaux MSL9 et MSL10 sur la membrane plasmique des cellules d'*Arabidopsis thaliana* a été mise en évidence (Haswell *et al.*, 2008). AtMSL9 et 10 sont préférentiellement localisés dans l'apex des racines d'*Arabidopsis thaliana*, les tissus vasculaires racinaires ou aériens (Haswell *et al.*, 2008). Les membres de classe II MSL4, MSL5, MSL6, MSL9 et MSL10, qui présentent de fortes homologues de séquence, se sont avérés nécessaires dans les activités de canaux ioniques mécanosensibles (Haswell *et al.*, 2008; Peyronnet *et al.*, 2008). En effet, le quintuple mutant *msl4-1 msl5-2 msl6-1 msl9-1 msl10-1* ne présente aucune activité de transports d'ions à travers la membrane plasmique de protoplastes issus de cellules corticales de racines d'*Arabidopsis thaliana* (Haswell *et al.*, 2008). Cette étude a notamment fourni une évidence de l'activation par l'étirement de la membrane des canaux ioniques MSL9 et MSL10 (Haswell *et al.*, 2008). De plus, les études électrophysiologiques ont montré que les canaux MSLs de classe II présentaient une plus grande affinité pour le transport d'anions à travers la membrane plasmique, et notamment des ions Cl⁻ (Figure 21) (Haswell *et al.*, 2008; Peyronnet *et al.*, 2008). Ainsi, les canaux MSLs semblent jouer un rôle dans la mécanoperception, mais la nature de ce rôle et le mode d'action des canaux MSLs restent à ce jour inconnu. La croissance du quintuple mutant *msl4-1 msl5-2 msl6-1 msl9-1 msl10-1* en conditions de stress salins, osmotiques ou encore mécanique n'apparaît pas distincte de celle des plantules sauvages, ne permettant pas de définir leur rôle dans la mise en place des réponses des plantes aux stress abiotiques (Haswell *et al.*, 2008).

➤ Les canaux MCAs

Les canaux MCA1 et MCA2 sont des canaux calciques localisés dans la membrane plasmique des cellules végétales (Nakagawa *et al.*, 2007). Le gène MCA2 est exprimé dans l'ensemble de la plantule d'*Arabidopsis thaliana*, excepté dans la coiffe racinaire et dans la zone d'élongation racinaire (Yamanaka *et al.*, 2010). MCA1, quant à lui, est exprimé dans les tissus vasculaires des cotylédons, dans les feuilles, au centre de la rosette et dans l'apex racinaire, excepté la coiffe (Yamanaka *et al.*, 2010).

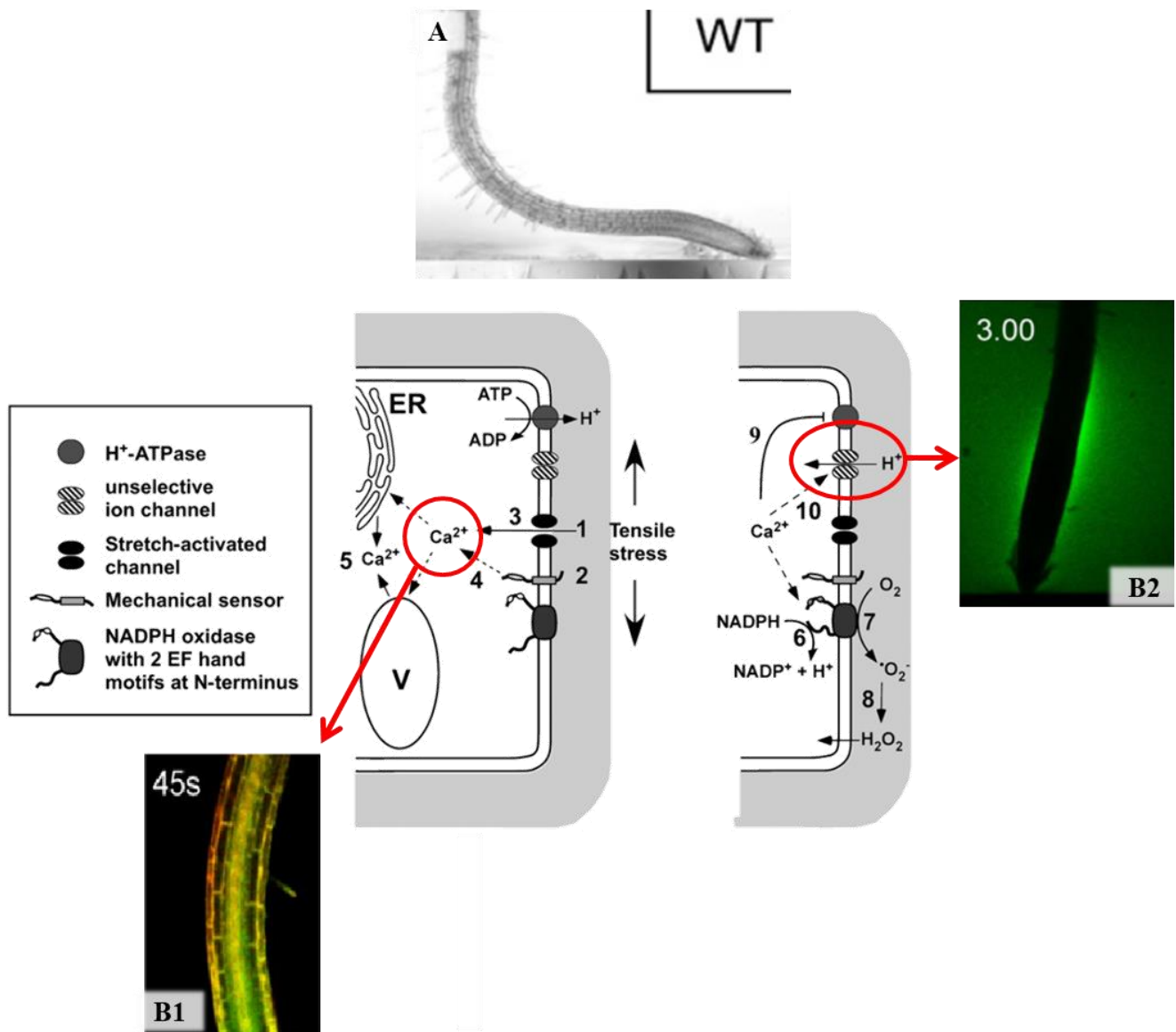


Figure 22 : Perception et transduction des signaux mécaniques lors du contournement d'un obstacle rigide par la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* (d'après Monshausen *et al.*, 2009)

Lors du contournement, la formation d'une zone de courbure entraîne une contrainte de tension sur les cellules de la face convexe de la racine, et une compression sur les cellules de la face concave. Les contraintes de tension induisent un étirement des membranes plasmiques des cellules de la face convexe de la racine. Cet étirement entraîne l'ouverture de canaux ioniques MS, qui permettrait entre autre l'influx de calcium cytosolique observé 45 secondes après initiation de la zone de courbure (B1). L'ouverture des canaux pourrait être renforcée par l'action de ligand (mechanical sensor). L'action des RLK et notamment de FERONIA a été proposée dans la mecanoperception. Une alcalinisation calcium-dépendante de la paroi des cellules de la face convexe de la racine a été observée dans les trois minutes suivant le contact de la racine avec l'obstacle (B2).

MCA1 et MCA2 sont des paralogues et présentent une très forte homologie de séquences (Kurusu *et al.*, 2013). En revanche, aucune homologie n'a été observée chez *Arabidopsis thaliana* entre les MCAs et d'autres canaux ioniques ou transporteurs transmembranaires (Kurusu *et al.*, 2013). Les canaux MCAs ont la capacité de compléter le phénotype létal du mutant *mid1* de *Saccharomyces cerevisiae*, défectueux pour des canaux calciques mécanosensibles (Nakagawa *et al.*, 2007). De plus, les canaux de la famille des MCAs auraient un rôle prépondérant dans l'influx de calcium cytosolique en réponse à un choc osmotique ainsi qu'à la suite d'un étirement de la membrane plasmique des cellules végétales (Figure 21) (Nakagawa *et al.*, 2007; Furuichi *et al.*, 2012; Kurusu *et al.*, 2012a,b). Ce rôle a été mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (AtMCA1, AtMCA2), chez *Oriza sativa* (AtMCA1) et chez *Nicotiana tabacum* (NtMCA1, NtMCA2) (Nakagawa *et al.*, 2007; Furuichi *et al.*, 2012; Kurusu *et al.*, 2012a,b).

Enfin, alors que le mutant *mca2* ne présente pas de phénotype particulier, la lignée mutante *mca1* d'*Arabidopsis thaliana*, n'exprimant pas le gène MCA1, présente des retards dans le développement de la rosette et de la hampe florale. De plus, une altération des capacités de pénétration des racines *mca1* dans une couche de gel résistance a été mise en évidence (Yamanaka *et al.*, 2010). Ces observations suggèrent que le canal calcique MCA1 serait crucial pour la mécanoperception chez les racines d'*Arabidopsis*, et qu'il participerait ainsi à la réponse des racines aux variations de contraintes mécaniques (Figure 21, Figure 22) (Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010).

IV.2. Les RLKs comme protéines clés de la mécanoperception

Chez les animaux, la perception et la transduction des signaux mécaniques semblent impliquer 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). Une déformation du milieu externe se traduit ainsi par une déformation du cytosquelette perçue à l'intérieur de la cellule. Chez les plantes, il a été émis l'hypothèse d'un réseau similaire, le continuum CPMCW (*Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall*) (Jaffe *et al.*, 2002). Il a été supposé l'existence de protéines intégrines-like capables de reconnaître les motifs RGD qui permettraient de relier les microtubules à la membrane plasmique, ce qui faciliterait l'ouverture et la fermeture des canaux mécanosensibles (Jaffe *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont permis d'identifier des protéines de la famille des Receptor-Like Kinase (RLK) qui pourraient être ces integrin-like (Figure 21; Gouget, 2005; Bellande *et al.*, 2017). Le RLK FERONIA (FER) a été récemment identifié comme étant un acteur clé de la mécanoperception dans la racine d'*Arabidopsis* (Shih *et al.*, 2014). Les mutants *fer2* et *fer4* d'*Arabidopsis* présentent en effet une altération de la signalisation calcique et des réponses de croissances à différentes stimulations mécaniques (Shih *et al.*, 2014). La mutation abolit l'influx cytosolique de Ca^{2+} après flexion de la racine d'*Arabidopsis* (Shih *et al.*, 2014). De plus, chez les mêmes mutants, l'induction de l'expression de gènes mécanosensibles connus est inhibée de façon significative (Shih *et al.*, 2014). En plus des réponses cellulaires, les racines *fer* présentent une altération de leurs capacités de pénétration dans des couches de gel rigides et de leur réorientation face à un obstacle rigide impénétrable (Shih *et al.*, 2014). Toutes ces observations suggèrent fortement un rôle du RLK FER dans la perception du signal mécanique dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. Cependant, l'interaction entre FER et les canaux mécanosensibles dans la perception du signal mécanique reste à définir.

IV.3. Rôle du calcium et des phytohormones dans la signalisation mécanique

L'étirement de la membrane plasmique des cellules de la racine entraîne un influx de calcium cytosolique très rapide (dès 1 secondes) et transitoire (Figure 21; Figure 22; Monshausen *et al.*, 2009). Cet influx n'a pas été observé du côté concave de la courbure ou de la flexion de la racine (Monshausen *et al.*, 2009). L'augmentation de Ca^{2+} dans le cytosol des cellules soumises à une tension résulte principalement d'un influx à travers la membrane plasmique, à partir de l'espace extracellulaire et ferait intervenir l'ouverture des canaux ioniques mécanosensibles et notamment de MCA1 (Figure 21; Figure 22; Monshausen and Haswell, 2013). Une alcalinisation extracellulaire couplée à une acidification du cytoplasme est observée dans les 10 secondes après l'étirement des cellules (Figure 22). Les modifications de pH suite à une stimulation mécanique semblent dépendre de l'influx de calcium cytosolique. En effet, l'inhibition de l'influx de calcium en réponse à un contact inhibe également l'augmentation du pH extracellulaire (Monshausen *et al.* 2009). Chez *Arabidopsis*, une hypothèse a été émise selon laquelle l'alcalinisation extracellulaire induite par l'influx cytosolique de Ca^{2+} pourrait être auxine-dépendante (Monshausen *et al.*, 2011). En effet, le traitement avec de l'auxine exogène de synthèse déclenche une hausse de calcium cytosolique dans les 7 à 14 secondes et l'interaction auxine- Ca^{2+} - pH a déjà été mise en évidence lors de la réponse gravitropique (Monshausen *et al.*, 2011).

Lors d'un contact de la racine avec un obstacle, l'auxine pourrait intégrer les signaux générés au sein de l'apex racinaire (Ca^{2+} , pH, ROS) et modulerait ainsi la croissance racinaire. Une interaction, ou coaction, entre l'auxine et l'éthylène a également été mise en évidence dans la réponse des racines aux contraintes mécaniques. En effet, le traitement de racines de tomates avec un inhibiteur d'action de l'éthylène inhibe la pénétration racinaire dans un sol compact (Zacarias and Reid, 1992; Santisree *et al.*, 2011). Or, un apport exogène d'auxine (NAA, 2, 4-D ou IAA) sur les racines traitées avec l'inhibiteur d'éthylène stimule de façon significative la pénétration des racines, restaurant quasiment la pénétration des racines non traitées (Santisree *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent alors que l'éthylène jouerait soit sur le transport soit sur la biosynthèse de l'auxine en réponse à un stress mécanique. Par ailleurs, une équipe a mis en évidence que les réponses des racines de peuplier (*Populus nigra*) à la flexion impliquait une interaction entre diverses voies de signalisations, impliquant entre autres la réponse à l'éthylène et l'intervention des ROS (Trupiano *et al.*, 2012). Il est également apparu que la flexion de ces racines entraînait l'accumulation de certaines hormones, dont l'auxine, les cytokinines et l'acide abscissique du côté concave de la racine de peuplier (De Zio *et al.*, 2018). L'acide jasmonique serait lui aussi impliqué dans la réponse des plantes aux stimulations mécaniques. Son implication a été mise en évidence dans la réponse des racines d'*Oriza sativa* à un contact avec une barrière mécanique (Lourenço *et al.*, 2015). Les racines de la lignée RNAi OsHOS1 n'exprimant pas l'E3-ubiquitine ligase HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1(OsHOS1) présentent une morphologie anormale en réponse à une barrière physique par rapport aux racines sauvages du riz. Lourenço *et al.* (2015) ont montré que le phénotype du mutant OsHOS1 pouvait être restauré par un traitement exogène d'acide jasmonique.

En conclusion, un rôle de l'auxine mais aussi de l'éthylène ou encore de l'acide jasmonique dans la signalisation mécanique des racines a été mis en évidence dans différentes études. Cependant, leur mode d'action ainsi que leurs mécanismes cibles permettant la mise en place des réponses de croissance des racines aux contraintes mécaniques restent vagues. Les multiples systèmes expérimentaux utilisés et la différence de fonctionnement racinaire entre les espèces végétales étudiées compliquent la compréhension précise de la cascade de signalisation menant de la perception du signal mécanique à la mise en place d'une réponse.

Objectifs

De nombreuses études se sont intéressées à la réponse des racines aux variations de contraintes mécaniques. Dans ces études, et selon leurs objectifs, différents systèmes expérimentaux ont été utilisés et des systèmes racinaires issus d'espèces végétales variables ont été étudiés. Alors que certains se sont concentrés sur la progression des racines d'espèces végétales de grandes cultures (maïs, riz, blé) dans un sol compacté, d'autres ont tenté de comprendre la réponse des racines de peuplier à un obstacle rigide, ou encore d'étudier la croissance des racines d'*Arabidopsis thaliana* dans des hydrogels plus ou moins résistants. De plus, différentes caractéristiques de la réponse des racines ont été observées, allant de l'architecture du système racinaire, aux acteurs moléculaires impliqués dans la signalisation mécanique, en passant par la division et l'élongation cellulaires. Le fonctionnement racinaire étant variable d'une espèce à l'autre, et la nature aussi bien que l'intensité des contraintes mécaniques étant diverses d'une étude à l'autre, il est difficile de mettre en commun les précédentes études pour avoir une vision globale de la réponse des racines aux contraintes mécaniques.

Ainsi, la première étape de cette thèse a été de mettre en place un système expérimental dans le but d'étudier les réponses de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* à des variations de contraintes mécaniques imposées par son substrat. Nous avons choisi d'étudier la progression des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* dans des milieux de croissance de type hydrogels, dont les propriétés mécaniques étaient variables. L'utilisation de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a l'avantage de permettre un phénotypage de lignées transgéniques ainsi que l'observation de marqueurs fluorescents en microscopie. De plus, sur la base de plusieurs études précédentes, nous avons émis l'hypothèse que les hydrogels, bien qu'éloignés des conditions de culture naturelles des plantes, représentaient des modèles simplifiés qui offraient une bonne visualisation des racines et qui permettaient de contrôler les contraintes mécaniques imposées aux racines (Yamamoto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2017).

De par sa localisation à l'extrémité de la racine, la coiffe racinaire est considérée comme étant le premier tissu à entrer en contact avec un changement des contraintes mécaniques axiales lorsque la racine progresse dans le sol en direction du vecteur de gravité.

Par ailleurs, l'importance de la coiffe dans la progression racinaire en réponse à des contraintes mécaniques élevées a déjà été suggérée (Iijima and Kono, 1992; Iijima *et al.*, 2003b; Colombi *et al.*, 2017). **Aussi, le deuxième objectif de ma thèse est de comprendre le rôle éventuel de la coiffe dans la mise en place des réponses des racines d'*Arabidopsis thaliana* face à une augmentation des contraintes mécaniques.** Pour répondre à cet objectif, nous avons émis deux hypothèses :

- (I) **La forme de la coiffe participe à la réponse des racines à une augmentation des contraintes mécaniques.** Selon les précédentes études (Ruiz *et al.*, 2016; Colombi *et al.*, 2017), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une coiffe pointue permettrait une capacité de pénétration plus importante des racines alors qu'une coiffe arrondie, en dôme ou émoussée entraînerait une diminution des capacités de pénétration racinaires.
- (II) **La coiffe racinaire est le siège de la perception des contraintes mécaniques,** permettant de déclencher une cascade de signalisation menant à la mise en place des réponses racinaires.

Pour explorer ces hypothèses, j'ai choisi de caractériser les réponses à une augmentation des contraintes mécaniques de racines issues de lignées mutantes affectées dans l'organisation et la mise en place de la coiffe racinaire. Ce travail est basé sur l'utilisation des lignées mutantes *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui présentent des coiffes altérées, en termes de morphologie, mais également de nombre de couches cellulaires, et dont le phénotype est restreint à la coiffe racinaire (Figure 7; Willemsen *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2010, 2014).

Dans la poursuite de ce travail, j'ai initié une étude visant *in fine* à **identifier les processus biologiques responsables de la mise en place des réponses de croissance des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales.** Si les mécanismes de perception et de transduction du signal mécanique commencent à être dévoilés au niveau de la tige, peu d'études ont permis d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la mécanoperception et la mécanotransduction au niveau des racines. Pour débiter ce projet, je me suis intéressée à des acteurs moléculaires dont l'implication dans la signalisation mécanique au niveau des racines a déjà été suggérée. **D'une part, j'ai étudié le rôle des canaux ioniques de la famille des MCAs et des MSLs dans la réponse des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales.**

Pour se faire, j'ai caractérisé les réponses à une augmentation des contraintes mécaniques axiales de racines issues des lignées mutantes *mca1-null*, n'exprimant pas le gène *MCA1*, et *msl15*, n'exprimant pas les 5 gènes *MSL4*, *MSL5*, *MSL6*, *MSL9* et *MSL10* (Haswell *et al.*, 2008; Iida *et al.*, 2014). J'ai émis l'hypothèse que, chez ces deux lignées mutantes, la mécanopercption pourrait être altérée, ce qui entraînerait une altération dans la mise en place des réponses des racines aux contraintes mécaniques. **D'autre part, j'ai commencé à étudier l'implication de l'auxine dans la mise en place des réponses des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales.** En adaptant le système expérimental à une observation microscopique, et en utilisant des marqueurs fluorescents (lignées DR5 ::GFP et DII-Venus), j'ai observé la cinétique de réponse à l'auxine *in vivo* lors de la progression des racines d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales.

Résultats

Pour répondre aux objectifs de cette thèse, les résultats sont présentés dans 4 chapitres distincts. **Un premier chapitre** est consacré à la caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels utilisés pour la culture des plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Les milieux que nous avons développés visent à mimer d'une part une augmentation à long terme des contraintes mécaniques réparties de façon homogène sur la circonférence de la racine (contraintes axiales, radiales et frottements) et d'autre part une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales. La croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* dans les milieux de culture de type hydrogels a été étudiée. **Le deuxième chapitre** porte donc sur les réponses de croissance des racines d'*Arabidopsis* à une augmentation à long terme ou à court terme des contraintes mécaniques. Dans **le troisième chapitre**, les réponses de croissance aux augmentations des contraintes mécaniques de racines affectées au niveau de la coiffe sont décrites. Cette troisième partie tend à déterminer l'importance de la coiffe racinaire dans la mise en place de la réponse mécanique. Le troisième chapitre fait l'objet d'un article soumis, nommé "How do alterations in root cap structure and integrity impact root responses to an increase in medium strength?" Enfin, **le quatrième chapitre** concerne des expérimentations préliminaires réalisées les derniers mois de la thèse, qui visent à identifier, à terme, des acteurs moléculaires de la perception et de la transduction de l'augmentation des contraintes mécaniques axiales. Ce chapitre présente des pistes de réflexions sur le rôle de mécanorécepteurs connus dans la perception des contraintes mécaniques et de l'auxine dans la transduction des contraintes mécaniques.

La présentation des résultats est suivie d'une discussion générale et perspectives. Après avoir discuté les points phares de la thèse, un modèle hypothétique de la signalisation mécanique, basé sur nos résultats ainsi que sur les résultats de précédentes études, est proposé dans la discussion générale.

Chapitre 1 : Caractérisation des propriétés mécaniques des milieux de culture à base de Phytigel

Les milieux de culture de type hydrogel à base d'Agar ou de Phytigel sont régulièrement utilisés dans la littérature en tant que sols-modèles pour la culture *in vitro* des plantes (Yamamoto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2017, 2018). Dans le cadre de la thèse, nous avons choisi de mimer des variations de contraintes mécaniques en développant deux sols-modèles de type hydrogels.

Les **milieux une-couche** sont composés d'une couche unique de milieu de culture de concentration en Phytigel homogène, qui est variable d'un milieu à l'autre (de 0,2 % à 1,2 %). Ce dispositif a été utilisé dans le but d'étudier les réponses de croissance des racines à une augmentation à long-terme des contraintes mécaniques axiales, radiales et des frottements.

Les **milieux deux-couches** consistent en la superposition de deux couches de milieu de culture de concentration en Phytigel similaire ou distincte. Ce dispositif tend à étudier les réponses de croissance des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales lors de leur contact la surface du milieu inférieur.

Afin d'estimer les variations de contraintes mécaniques relatives expérimentées par les racines lorsqu'elles progressent dans les différents milieux une-couche et deux-couches, les propriétés mécaniques de ces milieux ont été caractérisées selon deux approches expérimentales :

- (I) La rigidité des milieux une-couche a été évaluée en fonction de leur concentration en Phytigel par des tests de compression, permettant le calcul du module d'Young (Schiavi *et al.*, 2016)
- (II) La résistance mécanique à la pénétration des milieux une-couche et des milieux deux-couches a été estimée par la réalisation de tests de pénétrométrie.

I. Protocole de préparation des milieux de culture une-couche et deux-couches

Pour l'ensemble de nos expérimentations, nous avons utilisé le Phytigel (Sigma, P8169) en tant que gélifiant des milieux de culture. Le Phytigel présente de multiples avantages pour la *culture in vitro*, à la fois de par sa plus grande stabilité à la température, sa plus forte résistance mécanique et car il confère à l'hydrogel une meilleure clarté optique (Schiavi *et al.*, 2016).

Pour l'élaboration des milieux une-couche et deux-couches, le milieu de culture Murashige et Skoog (MS ½), adapté à la culture des plantes d'*Arabidopsis* a été utilisé. Ce milieu contient des macroéléments, microéléments, vitamines et saccharose ajoutés à une concentration précise (Annexe 1). Une fois tous les éléments ajoutés, le milieu est ajusté à un pH 5,7, additionné de Phytigel à la concentration souhaitée et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Après autoclavage, le milieu de culture est maintenu à température ambiante environ 10 minutes, puis versé en conditions stériles dans des boîtes de culture spécialement conçues pour notre étude. Les boîtes de culture sont formées de plaques de Polycarbonate assemblées de manière à obtenir une longueur de 100 mm, une largeur de 20 mm et une hauteur de 60 mm. Nos boîtes de culture spécifiques permettent de faire croître les racines verticalement à l'intérieur du milieu de culture et ainsi de les confiner sur toute leur longueur et leur circonférence.

Les **milieux une-couche** sont constitués de milieu de culture MS ½ contenant 0,2 % (p/v), 0,3 % (p/v), 0,4 % (p/v), 0,5 % (p/v), 0,8 % (p/v) ou 1,2 % (p/v) de Phytigel. Le milieu de culture stérile est versé dans les boîtes de culture, elles aussi préalablement stérilisées, à raison de 80 mL par boîte, correspondant à une hauteur de 40 mm. Les boîtes contenant le milieu de culture sont ensuite fermées par un couvercle de Polycarbonate et maintenues à température ambiante jusqu'à refroidissement complet et gélification du milieu de culture.

La préparation des **milieux deux-couches** consiste à couler l'une après l'autre, dans les cuves de culture décrites ci-dessus, deux couches de milieux de concentration en Phytigel distincte. Dans un premier temps, 60 mL de milieu MS/2 stérile contenant 0,2 % (p/v), 0,3 % (p/v) ou 0,5 % (p/v) de Phytigel sont versés dans chaque boîte de culture. Ces premiers 60 mL constituent la couche inférieure de milieu, qui atteint une hauteur de 30 mm. Afin de limiter la formation d'une croûte à la surface du milieu au cours du refroidissement, les boîtes de culture sont directement scellées puis disposées dans la glace.

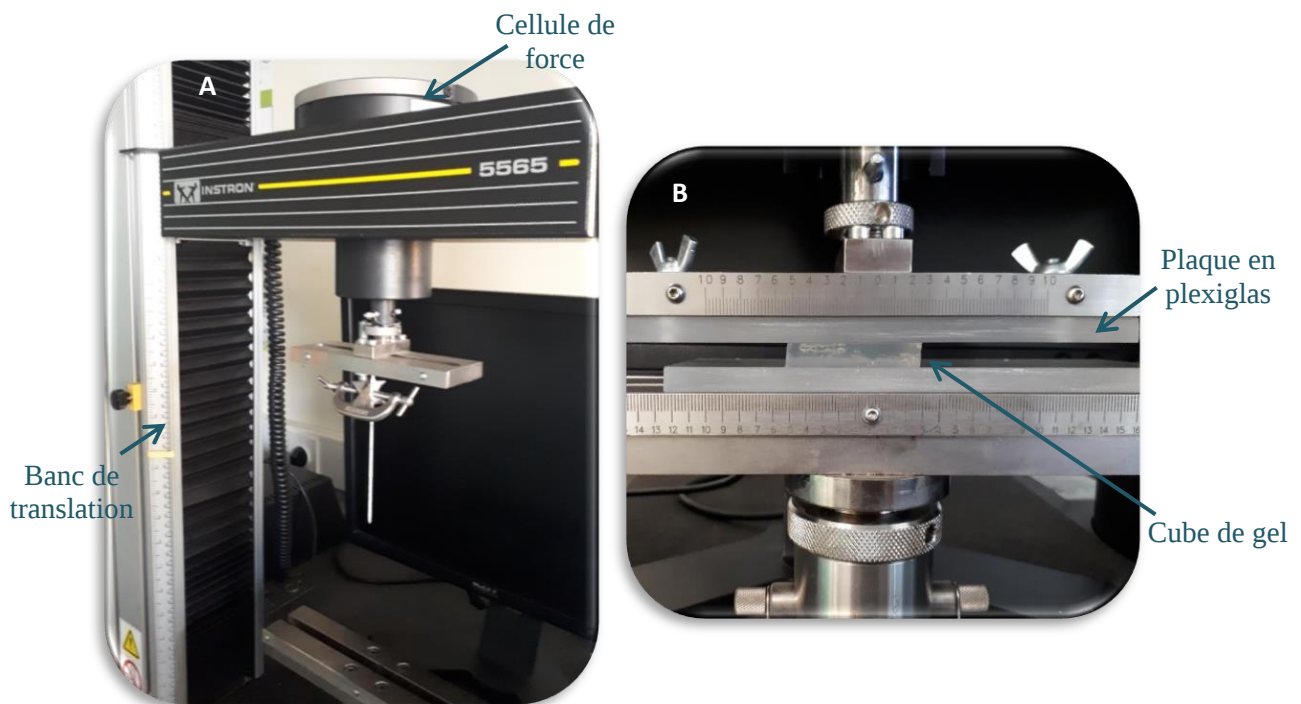


Figure 23 : Représentation de l'appareil (Instron) utilisé pour la caractérisation de la rigidité du milieu de culture en fonction de la concentration en Phytigel.

(A) L'Instron comprend un banc de translation, piloté par le logiciel dédié Bluehill 2, qui permet le déplacement verticale millimétrique de la plateforme. Une cellule de force de précision 100 N est fixée sur la plateforme. L'outil nécessaire à la réalisation des essais mécaniques est ensuite attaché à la cellule de force. (B) Représentation d'un cube de Phytigel placé entre deux plaques de plexiglas et soumis à une compression uniaxiale imposée par le déplacement vertical de la plaque supérieure. La plaque supérieure est reliée à la cellule de force qui enregistre la force de compression en fonction du déplacement de compression de la plaque.

Après une dizaine de minutes permettant la solidification du milieu, 20 mL de milieu stérile MS/2 contenant 0,2 % (p/v) de Phytigel sont versés délicatement au-dessus de la couche inférieure. Les 20 mL de milieu constituent la couche supérieure des milieux deux-couches, superposée à la couche précédente sur une hauteur de 10 mm. Les boîtes sont refermées puis maintenues à température ambiante jusqu'à refroidissement complet et gélification des deux couches de milieu. Par ce procédé, nous avons élaboré trois milieux deux-couches différents :

- Un milieu nommé 0,2-0,2 pour lequel les deux couches contiennent 0,2 % (p/v) de Phytigel.
- Un milieu 0,2-0,3 composé d'une couche supérieure contenant 0,2 % (p/v) de Phytigel et d'une couche inférieure contenant 0,3 % (p/v) de Phytigel.
- Un milieu 0,2-0,5 composé d'une couche supérieure contenant 0,2 % (p/v) de Phytigel et d'une couche inférieure contenant 0,5 % (p/v) de Phytigel

II. Propriétés mécaniques des milieux une-couche

II.1. Détermination de la rigidité des milieux en fonction de la concentration en Phytigel

II.1.1. Méthode : réalisation des tests de compression et calcul du module d'Young

Les tests de compression ont été réalisés sur des cubes de gel (Figure 23). Dans un premier temps, le milieu de culture MS ½ contenant du Phytigel à une concentration allant de 0,2 %, à 1,2 % a été préparé. Une fois autoclavé et légèrement refroidi, le milieu de culture a été versé en conditions stériles dans des boîtes de Petri rectangulaires sur une épaisseur de 10 mm. Après refroidissement complet du milieu de culture, les boîtes de Petri ont été scellées avec du parafilm et placées à 23°C. Après 5 jours, des cubes de gel de 20 mm de côté ont été découpés dans les boîtes de Petri. La hauteur des cubes a été mesurée précisément à l'aide d'un pied à coulisse numérique de précision 10^{-2} mm.

Chaque cube de gel a été placé sur un appareil Instron (Tensile testing machine, Instron 5565), constitué d'un banc de translation sur lequel une plaque en plexiglas reliée à une cellule de force de précision 100 N est fixée (Figure 23). Le logiciel Console Bluehill 2 permet ensuite de paramétrer le déplacement de la plaque (distance de déplacement et vitesse) et de collecter les données enregistrées par la cellule de force. Au cours de nos essais, une compression uniaxiale a été appliquée à la surface des cubes de gel par le déplacement vertical de la plaque de plexiglas à une vitesse constante de $0,5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

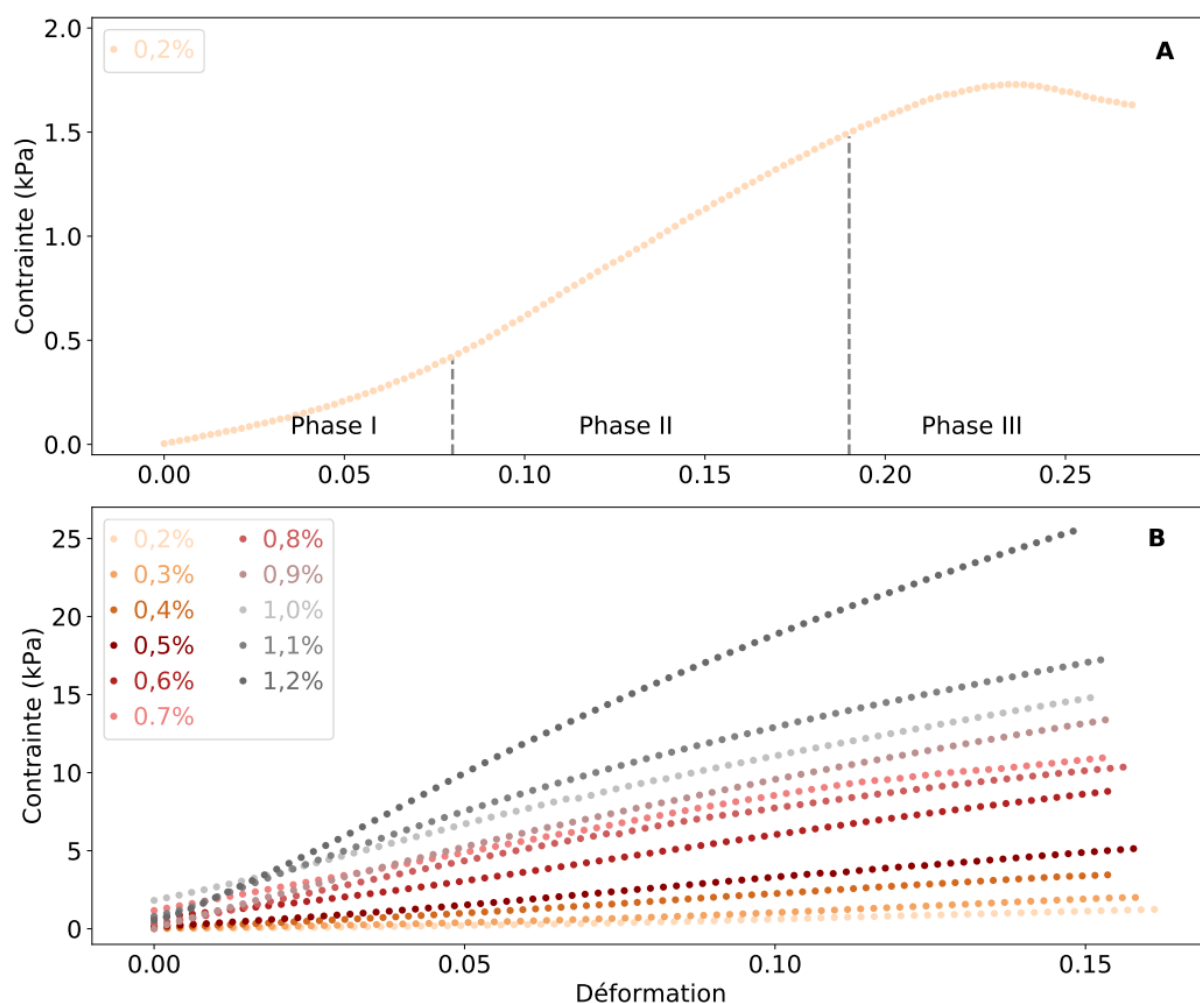


Figure 24 : Courbes de contrainte-déformation obtenues à la suite des tests de compression réalisés sur des cubes de gel de concentration croissante en Phytigel

- (A) Courbe contrainte-déformation représentant le comportement d'un cube de gel contenant 0,2 % de Phytigel soumis à une compression. La courbe présente trois phases, (I) une phase de contact entre la plaque de l'Instron et l'échantillon, (II) une phase de déformation élastique de l'échantillon et (III) une phase de déformation plastique de l'échantillon.
- (B) Courbes de contrainte-déformation obtenues après compression de cubes de gel contenant de 0,2 % à 1,2 % de Phytigel. La pente des courbes, représentative du module d'Young du matériau contraint, augmente avec la concentration en Phytigel.

Lors du déplacement de la plaque, le logiciel enregistre en temps réel les données de force de compression en fonction du déplacement de compression de la plaque. A partir de ces données, la contrainte de compression σ associée à la déformation du cube de gel ε a été calculée pour chaque concentration en Phytigel, selon les relations suivantes :

$$\sigma = \frac{F}{A}, \quad (8)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (9)$$

Où F est la force de compression (N), A est l'aire de surface transversale de l'échantillon sur laquelle la force est appliquée (m²), l_0 est l'épaisseur initiale de l'échantillon (m) et Δl est la variation d'épaisseur de l'échantillon, *i.e.* le déplacement de la plaque de plexiglas (m).

Le module d'élasticité E , ou module d'Young, a ensuite été calculé à partir du rapport entre la variation de contrainte $\Delta\sigma$ et la variation de déformation $\Delta\varepsilon$ dans le domaine de déformation élastique de l'échantillon, selon la loi de Hooke :

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (10)$$

Les tests de compressions ont été réalisés sur trois échantillons pour chaque concentration en Phytigel.

II.1.2. La rigidité du milieu augmente avec la concentration en Phytigel

La figure 24 présente les courbes de contrainte-déformation obtenues à partir des tests de compression. Pour l'ensemble des milieux une-couche et quelle que soit la concentration en Phytigel, les courbes présentent trois phases distinctes (Figure 24) :

- Une phase I qui représente la déformation du cube de gel lors de la mise en contact entre la plaque et la surface de l'échantillon. La contrainte augmente de façon non linéaire jusqu'à ce que la plaque soit parfaitement en contact avec l'ensemble de la surface de l'échantillon.
- Une phase II qui s'illustre par l'augmentation proportionnelle de la contrainte en fonction de la déformation de l'échantillon. Durant cette phase, la déformation de l'échantillon est dite élastique et la pente de la courbe traduit le module d'élasticité E .

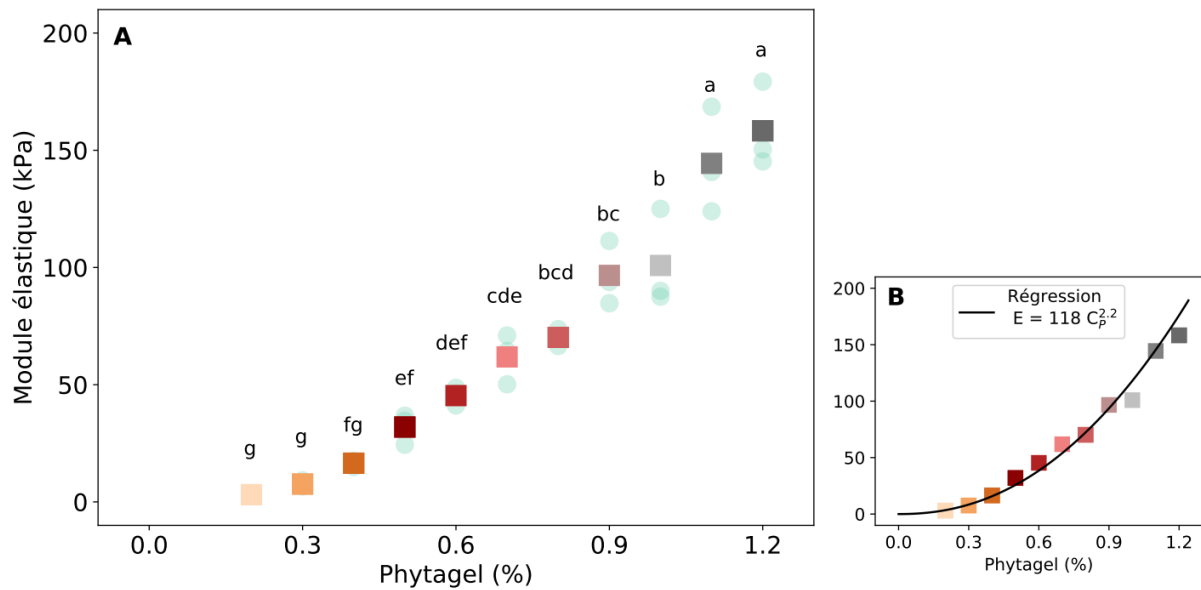


Figure 25 : Module d'Young ou module élastique E en fonction de la concentration croissante en Phytagel

(A) Module élastique des cubes de gel contenant de 0,2 % à 1,2 % de Phytagel. Pour chaque concentration en Phytagel, les points bleu clair indiquent les valeurs réelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, n=3. Les lettres indiquent les valeurs moyennes significativement différentes ($P < 0.05$, ANOVA suivie d'un test de Tukey). (B) La relation $E = f(\text{Concentration en Phytagel})$ peut être expliquée par la régression $E = 118P_c^{2.2}$, avec E le module élastique et P_c la concentration en Phytagel de l'échantillon. Cette relation indique que la rigidité des cubes de gel augmente avec leur concentration en Phytagel de façon non linéaire.



Figure 26 : Représentation d'un test de pénétration réalisé pour la caractérisation de la résistance mécanique des milieux de culture une-couche et deux-couche

(A) Représentation du déplacement vertical de l'aiguille utilisée comme pénétration dans un milieu deux-couche. L'aiguille est reliée à la cellule de force qui enregistre la force de compression au cours du déplacement de l'aiguille dans le milieu. (B) Gros plan de la pointe de l'aiguille utilisée pour tous les tests de pénétration. Nous avons choisi une aiguille dont la forme de la pointe était de géométrie similaire à la pointe d'une racine.

- Une phase III durant laquelle la contrainte n'augmente plus de manière proportionnelle à l'échantillon. Cette phase représente la déformation plastique de l'échantillon.

Les tests de compression, réalisés sur les cubes de gel de concentration en Phytigel croissante, ont montré que la pente de la phase II augmente avec la concentration en Phytigel (Figure 24B). Le module d'élasticité E des échantillons atteint une valeur moyenne de $3,1 \pm 0,1$ kPa pour le milieu à 0,2 % de Phytigel, $32,0 \pm 3,8$ kPa pour le milieu à 0,5 % de Phytigel, $70,1 \pm 2,1$ kPa pour le milieu à 0,8 % de Phytigel et $158,3 \pm 13,0$ kPa pour le milieu à 1,2 % de Phytigel (Figure 25A). Ainsi, le module d'élasticité augmente avec la concentration en Phytigel des échantillons de manière non-linéaire. La relation E en fonction de la concentration en Phytigel peut être expliquée par l'équation de régression $E = 118 C_P^{2,2}$ ($R^2 = 0,98$), avec E le module élastique et C_P la concentration en Phytigel (Figure 25B). Cette relation n'étant pas linéaire, il sera plus approprié par la suite de mentionner la rigidité des milieux plutôt que leur concentration en Phytigel.

II.2. Estimation de la résistance mécanique en fonction de la concentration en Phytigel

II.2.1. Méthode : Tests de pénétrométrie et calcul d'un travail

Les tests de pénétrométrie ont été réalisés sur les milieux une-couche contenant 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,8 %, et 1,2 % de Phytigel (Figure 26). Les différents milieux testés ont été préparés comme mentionné précédemment. Cinq jours après leur préparation, les milieux de cultures ont été placés sur l'appareil Instron, sur lequel a été fixée une aiguille de 2,5 mm de diamètre reliée à la cellule de force de précision 100 N (Figure 26). L'aiguille, qui fait office de pénétromètre, présente un angle à la pointe de 25° (Figure 26). Pour tous les tests réalisés, l'aiguille a été placée juste au-dessus de la surface du gel au début de l'expérimentation, avant d'être déplacée verticalement à une vitesse constante de $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, selon des modes opératoires préétablis sur le logiciel Console Bluehill 2.

Un premier déplacement vertical de l'aiguille de 5 mm a été programmé, permettant la pénétration de la pointe de l'aiguille dans le gel. Quelle que soit la concentration en Phytigel considérée, cette pénétration entraîne dans un premier temps une augmentation importante et

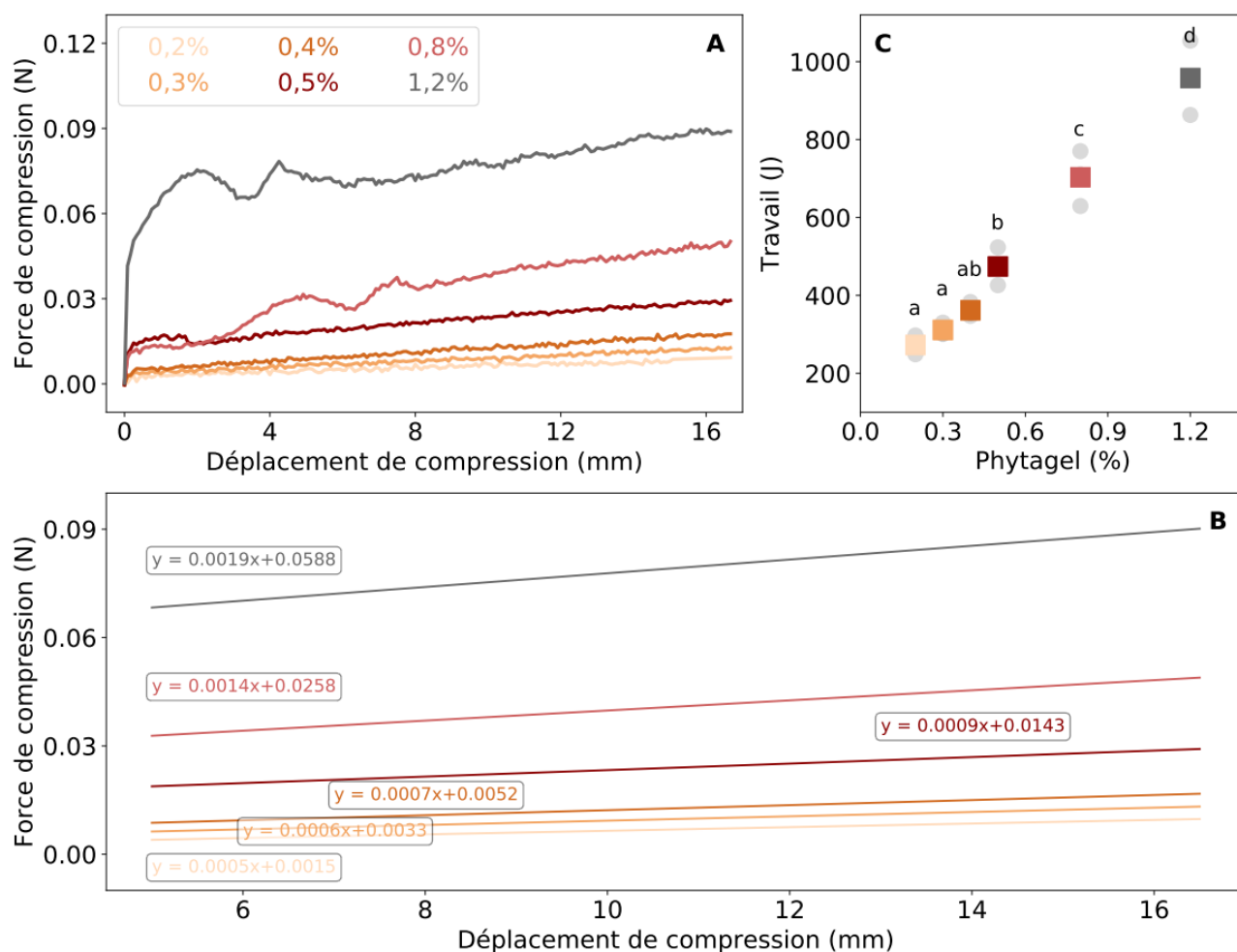


Figure 27 : Tests de pénétrométrie réalisés sur les milieux une-couche contenant de 0,2 % à 1,2 % de Phytagel

- (A) Force de compression mesurée en fonction du déplacement vertical de l'aiguille dans les différents milieux une-couche.
- (B) Régressions linéaires (de 5 à 17mm) des courbes force-déplacement obtenues pour les milieux une-couche contenant 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytagel. La pente des courbes augmente avec la concentration en Phytagel des échantillons.
- (C) Travail correspondant au déplacement de l'aiguille sur 1mm dans les milieux une-couche contenant 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytagel. Les ronds indiquent les valeurs réelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, $n=3$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P<0.05$, ANOVA suivie d'un test de Tukey).

rapide de la force de compression enregistrée par la cellule de force puis, dans un second temps, une chute brutale de cette force (après 2-3 mm). Après 5 mm, le déplacement de l'aiguille a été arrêté jusqu'à ce que la force de compression retourne à une valeur proche de 0 puis un nouveau déplacement vertical de l'aiguille a été programmé sur 20 mm. Les données de force de compression en fonction du déplacement de l'aiguille, récoltées au cours du second déplacement, ont alors été utilisées pour calculer un travail W , traduisant les échanges d'énergie qui s'opèrent lors du déplacement de l'aiguille. Pour un déplacement rectiligne $d\vec{u}$, le travail W de la force $\vec{F}$ se définit par :

$$W = \int_c \vec{F} \cdot d\vec{u} \quad (11)$$

Soit,

$$W = F \times u \times \cos(\widehat{F, u}) \quad (12)$$

Dans notre cas, le déplacement étant parallèle à la force et orienté dans le même sens, le $\cos(\widehat{F, u})$ est égale à 1. Les tests de pénétrométrie ont été conduits en triplicat sur les milieux une-couche.

II.2.2. La résistance mécanique à la pénétration des milieux de culture augmente avec la concentration en Phytigel

Au début de l'expérimentation, le déplacement vertical de l'aiguille du pénétromètre dans les gels induit une force qui augmente très rapidement pour atteindre une valeur « initiale » (Figure 27A). Cette augmentation rapide de la force de compression est visible pour le milieu une-couche contenant 1,2 % de Phytigel (Figure 27A). Cette force initiale augmente avec la concentration en Phytigel du milieu (Figure 27A).

Dans les milieux une-couche les moins concentrés en Phytigel (de 0,2 à 0,4 %), la brève augmentation de la force de compression est suivie d'une augmentation plus progressive, proportionnelle au déplacement de l'aiguille (Figure 27A). Pour les milieux les plus concentrés en Phytigel (de 0,5 % à 1,2 %), une relation linéaire entre la force de compression et le déplacement de l'aiguille est également visible, mais semble se mettre en place plus tardivement, après une phase de stabilisation de la force de compression (Figure 27A).

Pour chaque concentration en Phytigel, la relation Force-déplacement a été approchée par une régression linéaire à partir d'un déplacement de 5 mm (Figure 27B). La pente de cette régression linéaire est de 5.10^{-4} pour le milieu à 0,2 % de Phytigel et 19.10^{-4} pour le milieu à 1,2 % de Phytigel et augmente donc avec la concentration en Phytigel (Figure 27B). Or, la pente de cette portion linéaire de courbe traduit la force de frottements pour chaque millimètre parcouru par l'aiguille dans le gel. Ainsi, ces tests de pénétrométrie permettent d'illustrer que la force de frottement augmente avec la concentration en Phytigel du milieu.

A partir des données obtenues, le travail lié au déplacement de l'aiguille dans chaque gel a été calculé. Le travail regroupe à la fois la force initiale et la force de frottements pour chaque gel. Ce travail est de 273 ± 14 J (N.m) dans le milieu à 0,2 % de Phytigel, 474 ± 28 J dans le milieu 0,5 %, 703 ± 41 J dans le milieu à 0,8 % et 958 ± 55 J dans le milieu 1,2 % (Figure 27C). Ainsi, tout comme pour le module élastique des gels, l'énergie générée lors de la progression verticale de l'aiguille augmente de manière significative avec la concentration en Phytigel. Les tests de pénétrométrie sur milieux une-couche permettent de confirmer que l'augmentation de la concentration en Phytigel dans le milieu entraîne l'augmentation de la résistance à la pénétration du milieu.

III. Résistance mécanique à la pénétration de l'interface dans les milieux deux-couches

III.1. Méthode : tests de pénétrométrie sur les milieux deux-couches

Des tests de pénétrométrie ont également été réalisés sur les milieux deux-couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5. Ces milieux ont été préparés comme énoncé précédemment et placés sur l'appareil Instron. Les tests de pénétrométrie sur les milieux-deux couches ont été réalisés avec le même équipement que pour les milieux une-couche mais les déplacements verticaux de l'aiguille dans le milieu ont suivi un programme distinct.

Un premier déplacement vertical de l'aiguille a été programmé sur 10 mm, conduisant la pointe de l'aiguille juste au-dessus de la surface de la couche inférieure de milieu, que l'on appellera interface par la suite. Le déplacement de l'aiguille a été arrêté jusqu'à ce que la force de compression retourne à une valeur proche de 0 puis un nouveau déplacement vertical de l'aiguille a été programmé, sur 5 mm.

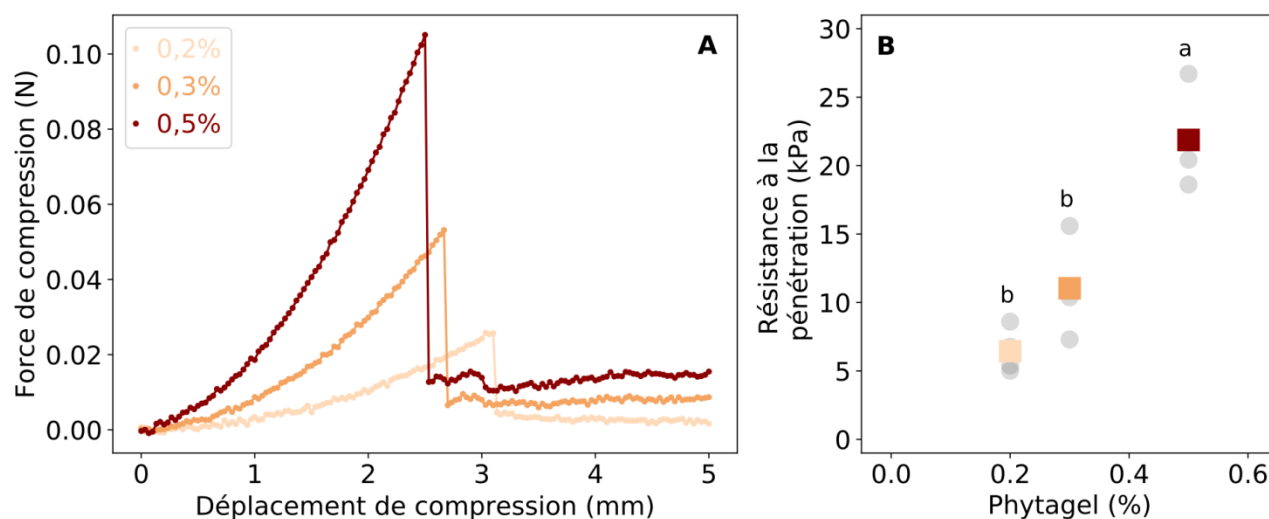


Figure 28 : Tests de pénétrométrie réalisés sur les milieux deux-couche contenant 0,2 % de Phytigel dans la couche supérieure et 0,2 %, 0,3 % et 0,5 % de Phytigel dans la couche inférieure

- (A) Force de compression mesurée en fonction du déplacement vertical de l'aiguille à partir du contact entre la pointe de l'aiguille et la surface de la couche inférieure de gel (0mm).
- (B) Force nécessaire pour générer la rupture de la surface de la couche inférieure de gel contenant 0,2 %, 0,3 % et 0,5 % de Phytigel. Les cercles indiquent les valeurs réelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, $n=4$. Les lettres indiquent les valeurs moyennes significativement différentes ($P<0,05$, ANOVA et test de Tukey)

A partir des données de force de compression en fonction du déplacement de l'aiguille, récoltées lors de ce second déplacement, la force maximale requise pour induire la rupture de l'interface et la pénétration de l'aiguille dans la couche inférieure de gel a été mesurée. Les tests de pénétrométrie sur les milieux deux-couches ont été répétés sur 4 boîtes de culture pour chaque condition.

III.2. L'interface implique une augmentation de la résistance mécanique, qui dépend de la concentration en Phytigel de la couche inférieure de milieu

Les courbes de force de compression en fonction du déplacement vertical de l'aiguille à partir du contact entre la pointe de l'aiguille et l'interface sont présentées en Figure 28A. Pour l'ensemble des milieux deux-couches et quelle que soit la concentration en Phytigel de la couche inférieure, les courbes présentent trois phases :

- (I) La force augmente fortement et rapidement avec le déplacement de l'aiguille. Cette phase correspond à la déformation de l'interface par le déplacement vertical de l'aiguille.
- (II) La force atteint un maximum après lequel elle retourne à un niveau beaucoup plus faible. La chute brutale de la force illustre la rupture de l'interface pour un certain déplacement vertical de l'aiguille (3,1 mm en moyenne pour le milieu 0,2 %)
- (III) La force augmente très progressivement et linéairement (sauf pour le milieu 0,2-0,2), de manière similaire à ce qui est observé dans les milieux une-couche.

Les tests de pénétrométrie révèlent que la pénétration dans la couche inférieure de milieu survient après une phase de déformation puis de rupture de l'interface et que cette rupture nécessite l'application d'une force beaucoup plus importante que la force requise pour la progression de l'aiguille dans la couche inférieure de gel (Figure 28A). La force nécessaire à la rupture de l'interface est de $0,032 \pm 0,004$ N pour une couche de gel contenant 0,2 % de Phytigel, $0,054 \pm 0,008$ N pour une couche à 0,3 % de Phytigel et $0,107 \pm 0,009$ N pour une couche à 0,5 % de Phytigel (Figure 28A). Ainsi, la force nécessaire pour induire la rupture de l'interface augmente avec la concentration en Phytigel (Figure 28A). La résistance mécanique à la pénétration de l'interface peut être estimée en divisant les valeurs de force par l'aire transversale de la pointe de l'aiguille. Cette résistance est de $6,44 \pm 0,94$ kPa pour l'interface du milieu 0,2-0,2, de $11,04 \pm 1,98$ kPa pour l'interface du milieu 0,2-0,3 et de $21,87 \pm 2,00$ kPa pour l'interface du milieu 0,2-0,5 (Figure 28B).

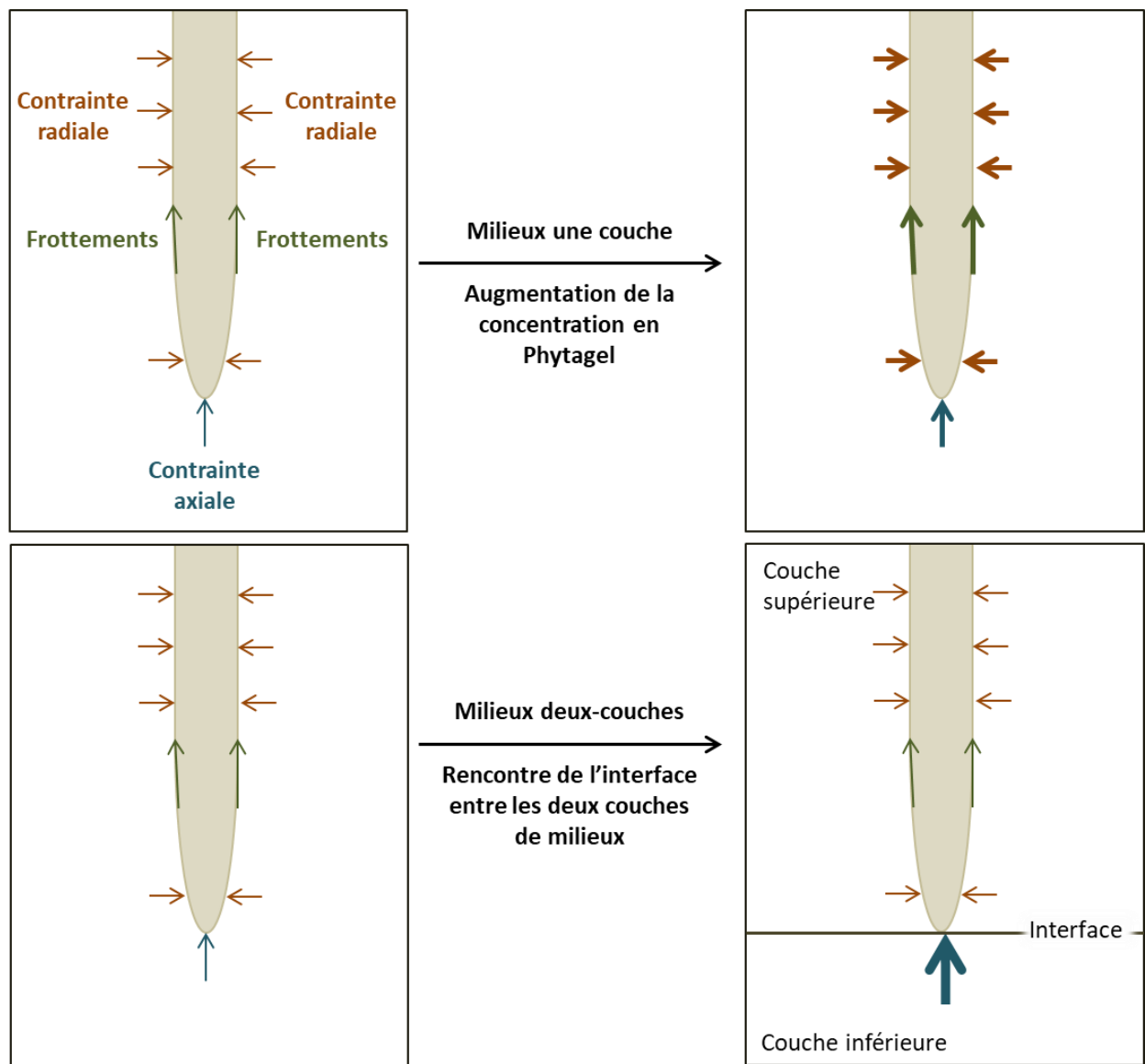


Figure 29 : Contraintes mécaniques imposées aux racines lors de leur croissance dans les milieux une-couche et dans les milieux deux-couches

Dans les milieux une-couche, l'augmentation de la concentration en Phytigel entraîne une augmentation de la rigidité du milieu, de la force de frottements et de la résistance mécanique à la pénétration. Cela suggère que la racine qui progresse dans un milieu de forte concentration en Phytigel est soumise à des contraintes mécaniques axiales, radiales et à des frottements plus importants que la racine qui progresse dans un milieu de faible concentration en Phytigel.

Dans les milieux deux-couches, la racine progresse dans une couche de milieu supérieure et rencontre la surface de la couche inférieure, ou interface, qui présente une forte résistance mécanique à la pénétration par rapport aux deux couches de milieu. Cela suggère que le contact entre l'apex racinaire et l'interface entraînera une augmentation très importante des contraintes mécaniques axiales. Cette augmentation sera d'autant plus importante que la couche de milieu inférieure sera concentrée en Phytigel.

Ces tests de pénétrométrie traduisent que l'augmentation de la concentration en Phytigel entraîne une augmentation de la résistance mécanique à la pénétration de la couche inférieure de gel.

IV. Conclusion et Discussion

Les résultats obtenus à l'issue des tests de compression et de pénétrométrie ont présenté une bonne reproductibilité et une bonne homogénéité des mesures pour une concentration en Phytigel donnée. Ces résultats suggèrent une bonne stabilité des milieux utilisés et confirment que les gels sont des modèles d'études simples appropriés à l'étude du comportement des racines dans un environnement contrôlé.

La réalisation de ces caractérisations mécaniques a démontré que la concentration en Phytigel des milieux de croissance influençait fortement les propriétés mécaniques des gels. En effet, l'augmentation de la concentration en Phytigel dans un milieu entraîne à la fois l'augmentation de la rigidité du milieu, de sa résistance mécanique à la pénétration et de celle de sa surface. Ces résultats indiquent que les gels sont des milieux appropriés pour étudier la réponse des racines aux variations des contraintes mécaniques du milieu (Yamamoto *et al.*, 2008; Silverberg *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2017). De plus, la caractérisation des propriétés mécaniques des milieux une-couche et deux-couches en fonction de la concentration en Phytigel permet d'estimer le niveau des variations de contraintes qui seront expérimentées par les racines.

Dans les milieux une-couche, les résultats obtenus illustrent une bonne homogénéité des milieux et une forte corrélation de la rigidité en fonction de la concentration en Phytigel. De plus, l'augmentation de la concentration en Phytigel dans ces milieux entraîne une augmentation correspondante de la force de frottements. Ainsi, ils confirment que les racines progressant dans ces milieux une-couche seront soumises à des contraintes mécaniques réparties de façon homogène sur l'ensemble de leur circonférence et dont l'intensité sera modulée par la concentration en Phytigel (Figure 29).

Dans les milieux deux-couches, les tests de pénétrométrie indiquent la présence d'une interface de forte résistance mécanique à la pénétration entre les deux couches de milieux, et ce même dans le milieu 0,2-0,2.

Cela confirme que, dans ces milieux, les racines seront soumises à une augmentation importante des contraintes mécaniques axiales lorsqu'elles entreront en contact avec la couche inférieure de gel (Figure 29). Cette augmentation sera dépendante de la concentration en Phytigel de la couche de milieu inférieure. Le milieu 0,2-0,2 sera considéré par la suite comme le milieu offrant la plus faible augmentation de résistance mécanique, le milieu 0,2-0,5 comme le milieu offrant la plus forte augmentation de résistance mécanique et le milieu 0,2-0,3 comme un milieu de résistance intermédiaire.

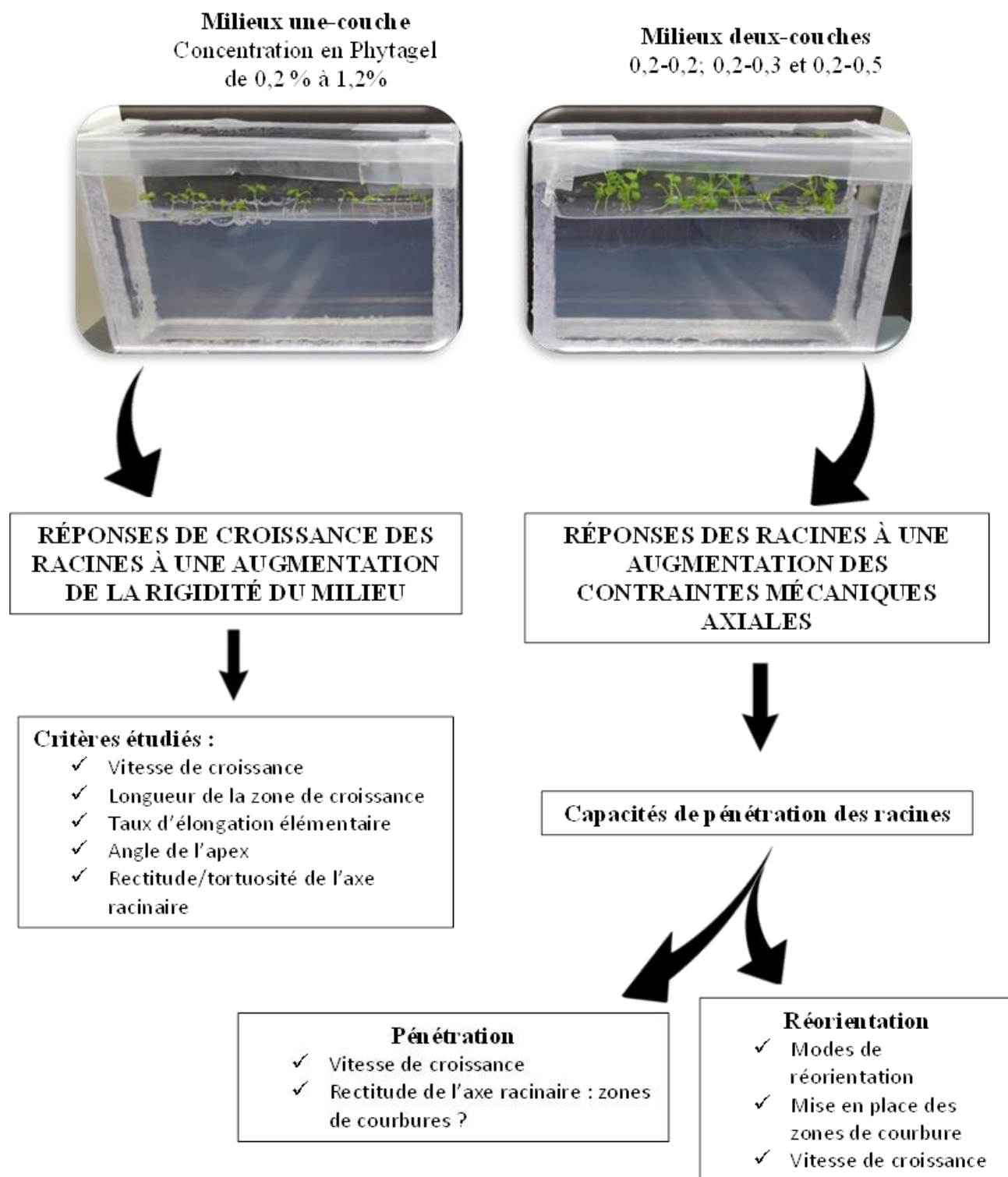


Figure 30 : Problématiques du chapitre 2 et critères d'études des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* progressant dans les milieux une-couche et deux-couches

Chapitre 2 : Réponses des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation des contraintes mécaniques

Si les réponses de croissance des racines aux contraintes mécaniques ont déjà été relativement bien décrites par le passé, il s'avère que ces réponses dépendent grandement de l'espèce végétale étudiée et du modèle expérimental choisi (sol réel, gels, milieux granulaires, hydroponie, etc.). Pour approfondir l'étude sur les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*, il était essentiel de débiter mes travaux de thèse par la caractérisation précise des réponses de croissance des racines aux variations de contraintes mécaniques et ce, dans notre système expérimental.

Dans les milieux une-couche de rigidité croissante, les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* sont soumises à une augmentation à long terme des contraintes mécaniques axiales, radiales et des frottements. Nous avons étudié la croissance racinaire en fonction de la rigidité du milieu en termes de vitesse et d'orientation (Figure 30). Ces études ont permis de comparer les réponses racinaires à l'augmentation des contraintes mécaniques du sol et à celles du gel. Elles permettent ainsi d'approfondir notre compréhension à la fois du comportement racinaire et du comportement des hydrogels.

Dans les milieux deux-couches, les racines progressent dans la couche de milieu supérieure avant d'entrer en contact avec l'interface de résistance mécanique à la pénétration plus élevée que les deux couches de milieux. La présence de cette interface permet d'étudier les réponses des racines à une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales (Figure 30). Dans un premier temps, les capacités de pénétration des racines dans la couche inférieure de milieu ont été étudiées en fonction de la résistance mécanique de l'interface. Ensuite, la vitesse de croissance des racines en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales a été étudiée, à la fois pour les racines ayant et n'ayant pas pénétré dans la couche inférieure de milieu. Enfin, la rectitude des racines et la mise en place de zones de courbure ont été précisément analysées en réponse l'augmentation des contraintes axiales.

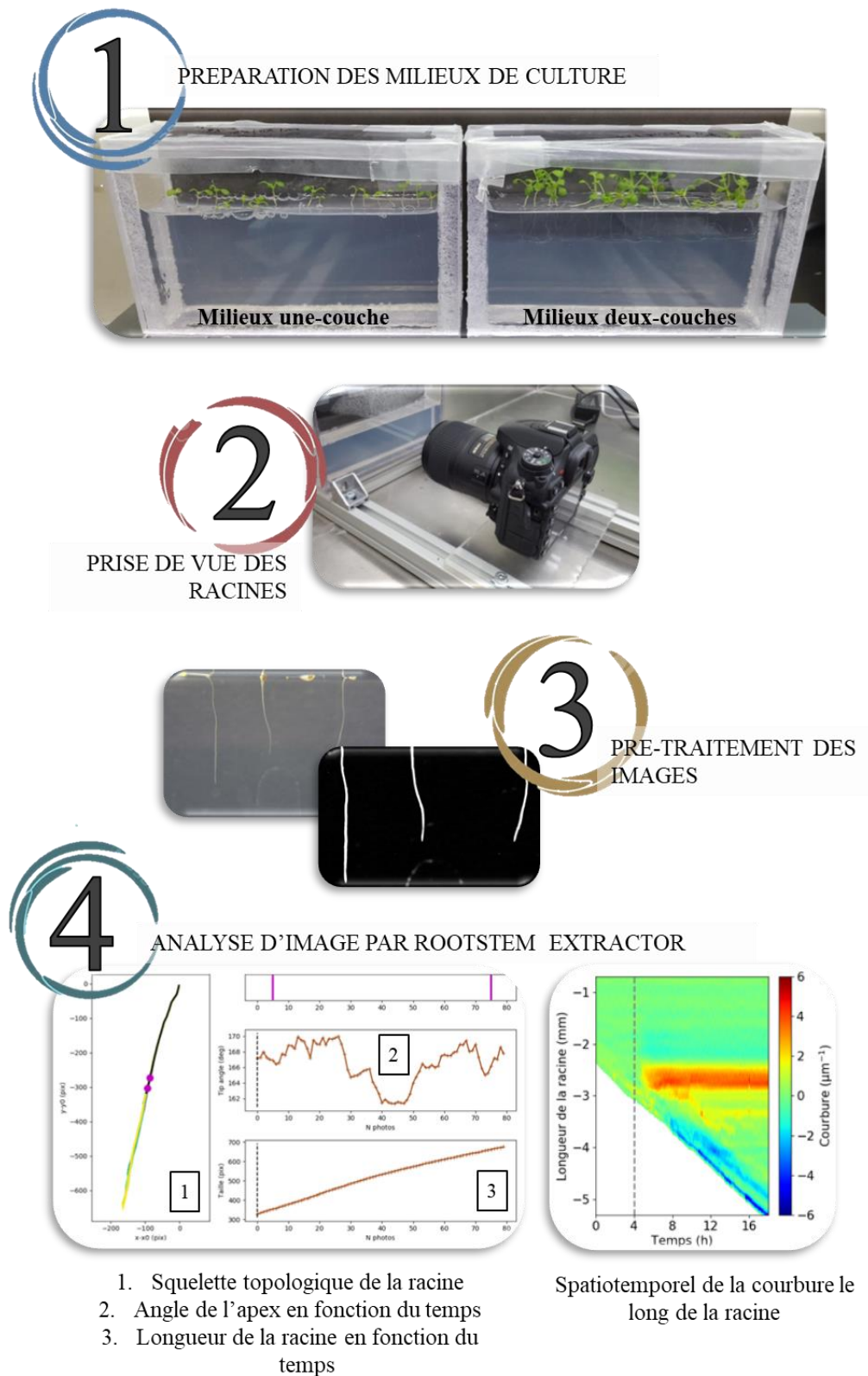


Figure 31 : Système expérimental de suivi de croissance et d'orientation des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

I. Réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation de la rigidité du milieu

I.1. Méthodes : Analyse des réponses de croissance des racines dans les milieux une-couche

I.1.1. Matériel végétal

Dans le cadre de ces expérimentations, les milieux une-couche contenant 0,2 % (p/v), 0,3 % (p/v), 0,4 % (p/v), 0,5% (p/v), 0,8% (p/v) et 1,2% (p/v) de Phytigel ont été utilisés. Les milieux de culture ont été préparés comme indiqué dans le matériel et méthodes du Chapitre 1 (Figure 31, étape 1). En parallèle, les graines d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia, Col-0) ont été stérilisées par une incubation dans une solution contenant 30 % (v/v) d'hypochlorite de sodium et 2 % (v/v) de Triton X-100. Après 10 minutes d'incubation, les graines ont été rincées cinq fois avec de l'eau UP (Ultra Pure). Après 30 minutes de séchage en conditions stériles, les graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été déposées délicatement à la surface du gel des milieux une-couche à l'aide d'un cure-dent stérile, et à raison de 10 graines par boîte de culture. Les boîtes de culture ont ensuite été scellées puis placées à 4°C pendant 2 jours. Les boîtes de cultures ont ensuite été placées en chambre de culture sous une photopériode de 16h et à une température de 23°C. L'éclairage de la chambre de culture présente un flux de photons constant de $47 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

I.1.2. Suivis de la croissance et de l'orientation des racines par analyse d'image

Après cinq jours en chambre de culture, les boîtes ont été placées devant un appareil photo à une distance de 250 mm environ, correspondant après mise au point à une échelle de 303 pixels. mm^{-1} . Nous avons choisi de ne pas effectuer la mise au point à distance minimale (qui offre une échelle de 644 pixels. mm^{-1}) pour ne pas nuire à l'éclairage des plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Les prises de vue des racines ont été réalisées à l'aide de deux appareils Nikon DSC D7100 équipés d'un objectif macro (NIKKOR 60 mm, ou TAMRON SP 60 mm) et de 56 mm de bague allonge (Kenko) insérée entre le boîtier et l'objectif (Figure 31, étape 2). Les bagues allonges permettent de réduire la distance de mise au point minimale, et ainsi d'augmenter le grandissement de l'objet photographié. Les prises de vue ont été acquises automatiquement avec le logiciel dédié DigiCamControl (v2.1.0), à raison d'une photo toutes les dix minutes pendant 12 heures pour les milieux une-couche.

L'ensemble des images issues des prises de vue séquentielles sont prétraitées à l'aide du logiciel Rawtherapee (opensource, v4.2.1). Le prétraitement des images permet de minimiser le poids des images tout en conservant la meilleure qualité possible, d'améliorer le contraste afin de faire ressortir la racine, et de diminuer le bruit de fond, ces étapes ayant pour but de faciliter les analyses de croissance par la suite (Figure 31, étape 3). Les images prétraitées ont ensuite été analysées avec RootStemExtractor, un programme développé au sein du laboratoire et décrit par Chauvet *et al.* (2016) (Figure 31, étape 4). Le programme permet l'extraction du squelette topologique de chaque racine sur les prises de vue. Sur la première image de la série, une ligne perpendiculaire à l'axe de la racine est tracée de part et d'autre de la racine à environ 2,5 mm de l'apex. Le programme identifie les deux bords extérieurs de la racine en analysant les maximums de gradients sur les profils de niveaux de gris et le premier point du squelette de la racine est défini comme le point médian entre les deux bords de la racine. La ligne perpendiculaire à l'axe de la racine est ensuite transposée le long de la racine jusqu'à l'apex, avec un pas de 0,3 pixel, afin d'estimer tous les points du squelette de la racine sur une image. L'orientation de la ligne varie le long de la racine pour rester constamment perpendiculaire à l'axe de la racine. Les coordonnées des points du squelette permettent alors d'évaluer la longueur de la racine sur chaque image et son inclinaison locale en fonction de l'abscisse curviligne (Figure 31, étape 4). L'analyse de l'ensemble des images d'une série *via* RootStem Extractor permet d'obtenir différentes mesures caractéristiques de la croissance racinaire. Dans un premier temps, RootStem Extractor fournit les valeurs de longueur de la racine et d'angle à l'apex en fonction du temps (Figure 31, étape 4). Un ajustement linéaire de la longueur de la racine en fonction du temps sur une durée de 12h permet d'obtenir la vitesse de croissance moyenne des racines dans les milieux une-couche. Les valeurs de l'angle de l'apex ont été utilisées pour l'analyse de la déviation de la croissance racinaire par rapport à la verticale et des oscillations de l'apex en fonction de la rigidité du milieu.

Par ailleurs, la dérivation de l'inclinaison locale donnée par le programme RootStem Extractor permet d'obtenir le spatiotemporel de la courbure le long des racines (Figure 31, étape 4). Pour chaque racine, le spatiotemporel de la courbure est représenté dans un graphique composé de trois dimensions : l'axe des abscisses correspond au temps (h), l'axe des ordonnées correspond à la longueur de la racine (mm) et les couleurs représentent l'intensité de la courbure (mm^{-1}). La couleur verte illustre une absence de courbure alors qu'une couleur bleue ou rouge illustre une courbure d'intensité indiquée par l'échelle couleur à droite du graphique (Figure 31, étape 4).

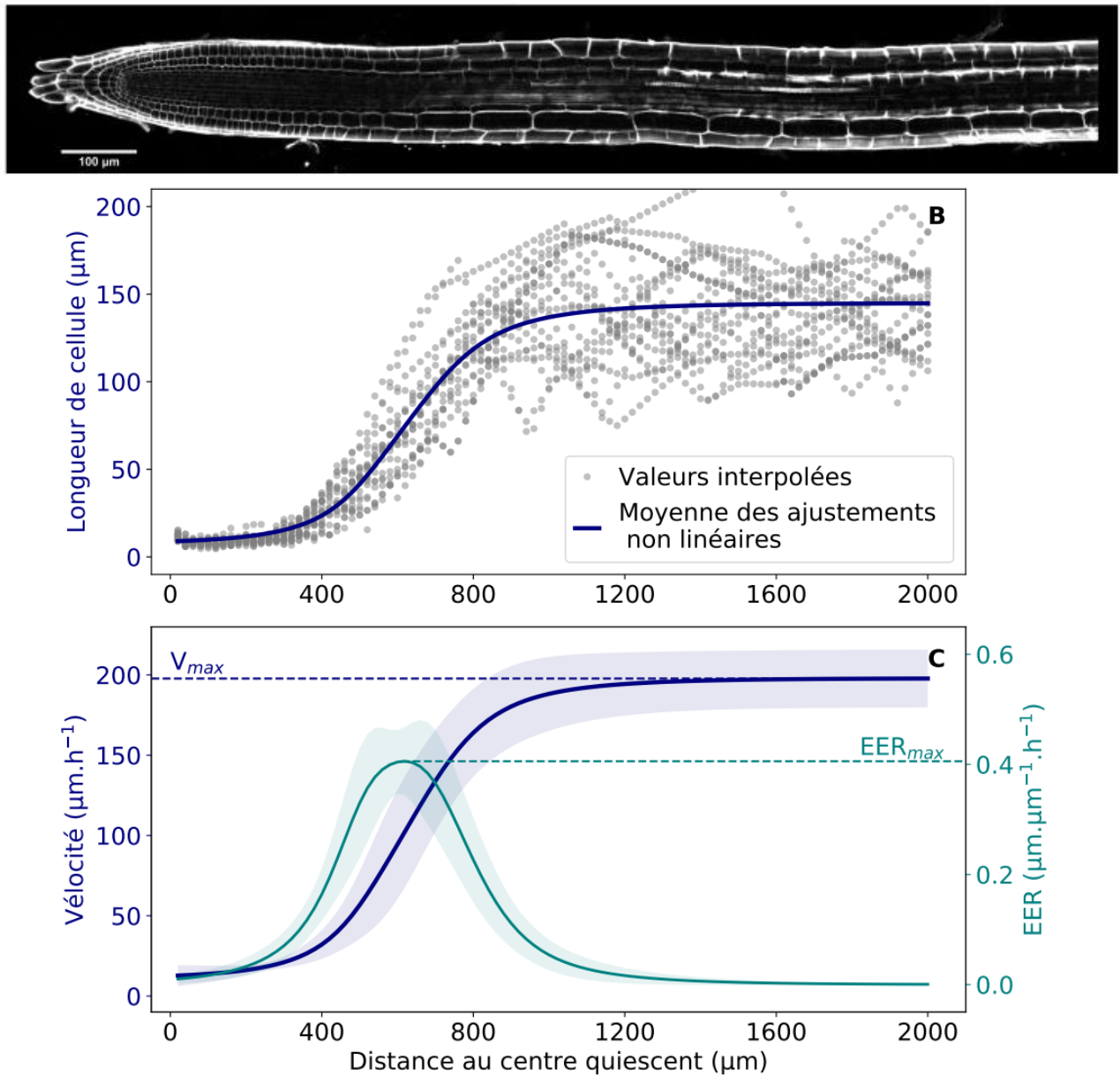


Figure 32 : Profils de longueur cellulaire, de vélocité et d'EER de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

(A) Illustration d'un plan longitudinal de l'apex d'une racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* observée en microscopie confocale à balayage laser, après coloration au PI. (B) Exemple d'un profil moyen de longueur cellulaire. Pour chaque racine, les valeurs de longueur cellulaire sont interpolées tous les 20 µm et tracées en fonction de la distance au centre quiescent. Des ajustements non linéaires sont réalisés et la moyenne de ces ajustements est représentée par la courbe bleue. (C) A partir des profils de longueur cellulaire, la vélocité locale le long de la racine a été calculée, et sa dérivée permet d'obtenir le taux d'élongation élémentaire le long de la racine. Le profil de vélocité indique un V_{max} , correspondant à la vitesse de croissance moyenne des racines. Le profil d'EER indique un EER_{max} illustrant la capacité d'allongement maximale des cellules. Les profils de vélocité et d'EER permettent également de déterminer la longueur de la zone de croissance des racines.

I.1.3. Analyse cinématique : des profils de longueur cellulaires aux taux d'élongation élémentaire

➔ Obtention des profils de longueur cellulaire à l'apex racinaire

Les profils de longueurs cellulaires ont été réalisés sur des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* cultivées dans des milieux une-couche contenant 0,2 % ou 1,2 % de Phytigel. La préparation des milieux et le semis des graines ont été réalisés comme énoncé précédemment. Après 5 jours en chambre de culture, les plantules d'*Arabidopsis* ont été délicatement extraites du milieu de culture et ont été déposées sur une lame de microscope. Les racines d'*Arabidopsis* ont été recouvertes d'une solution contenant $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'iodure de propidium (PI, P4170, Sigma). Une lamelle en verre a été déposée immédiatement sur les racines, sans rinçage de la solution PI. Les racines ont ensuite été observées sous un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM 800, Carl Zeiss Microscopy), avec un objectif x20. La longueur d'onde d'excitation des échantillons colorés au PI est de 488 nm et l'émission de la fluorescence du PI a été détectée en utilisant un filtre de transmission à partir de 560 nm. Les plans longitudinaux des 3 premiers mm de l'apex racinaire ont été acquis successivement. Les images ont été assemblées de manière semi-automatique sur Image J (Pack Fiji, v1.52f), à l'aide du plugin MosaicJ (Thévenaz and Unser, 2007), comme illustré sur la Figure 32A.

A partir des images microscopiques, la longueur des cellules de cortex, situées de part et d'autre de la coupe longitudinale, a été mesurée à partir du centre quiescent en utilisant le logiciel Fiji. Une fois les mesures réalisées, les valeurs de longueur de cellules en fonction de la distance au centre quiescent $L(x)$ ont été interpolées tous les $20 \mu\text{m}$ pour chaque file cellulaire en utilisant l'environnement de développement Python Spyder (Python 2.7, Spyder 3.3.1) (Figure 32B). Des ajustements non linéaires ont été réalisés sur les profils de longueur cellulaire, afin de transformer les données discontinues en un profil continu le long de la racine. Le profil de longueur cellulaire a ainsi été réalisé pour 8 à 10 racines primaires d'*Arabidopsis*, cultivées pour chaque concentration en Phytigel.

➔ Obtention des profils de vitesse

A partir des profils de longueur cellulaire, la longueur moyenne des cellules matures a été calculée pour chaque racine. Pour obtenir le taux de production de cellules (TPC) propre à chaque racine, la vitesse de croissance moyenne des racines dans les milieux une-couche 0,2 % et 1,2 %, obtenue précédemment par suivi de croissance et analyse d'image, a été divisée par la longueur moyenne des cellules matures. Ce taux permet d'estimer le nombre de cellules produites en une heure pour chaque racine. En régime permanent de croissance, il y a une correspondance entre la longueur locale des cellules $L(x)$ et la vitesse de déplacement locale des cellules en fonction de leur distance au centre quiescent $V(x)$ (Silk and Erickson, 1979; Silk, 1992; Liu *et al.*, 2013). Cette vitesse de déplacement locale, *i.e.* la vitesse à chaque position le long de l'axe racinaire, peut être calculée en multipliant la longueur locale des cellules $L(x)$ par le taux de production de cellules TPC pour chaque racine.

➔ Obtention des taux d'élongation élémentaire

Après obtention et ajustement des profils de vitesse, le taux d'élongation élémentaire EER (Elemental Elongation Rate), ou taux de changement de vitesse de déplacement des cellules, peut être calculé (Figure 32C). Ce taux indique la variation de longueur d'un segment de petite taille par unité de longueur et de temps le long de l'apex. Il reflète l'élongation relative des cellules composant les différents segments. Le taux d'élongation élémentaire local $EER(x)$ est obtenu par dérivation de la vitesse locale $V(x)$. Le profil d'EER en fonction de la distance au centre quiescent est représenté par une courbe en cloche caractéristique (Figure 32C).

A partir des profils de vitesse et d'EER, plusieurs critères de la croissance peuvent être mesurés (Figure 32C) :

- **V_{max} .** Ce critère est défini comme l'asymptote du profil de Vitesse. Dans notre expérimentation, la valeur de V_{max} d'une racine correspond à la valeur de vitesse de croissance moyenne obtenue par suivi de croissance et analyse d'image
- **La longueur de la zone de croissance (ZC).** Elle correspond à la distance entre le centre quiescent et le point pour lequel la vitesse atteint 94 % de V_{max} . La valeur de 94 % a été choisie sur la base des travaux de thèse de François Bizet et semble être un bon compromis permettant de considérer la quasi-totalité de la croissance sans tendre vers l'infini sur certains profils de courbe particuliers (Bizet, 2014).

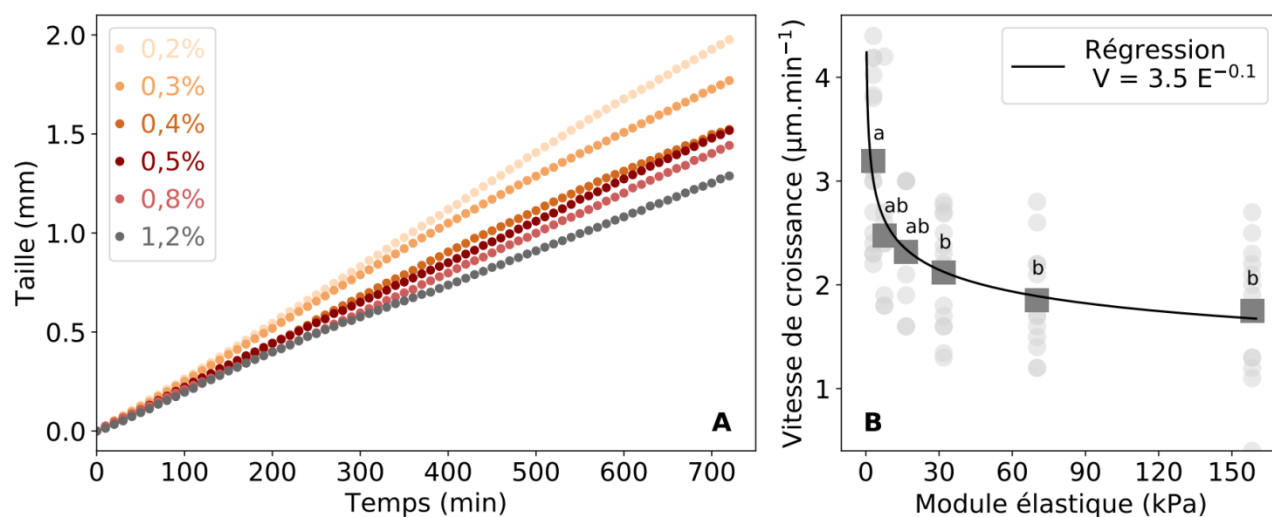


Figure 33 : Vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* progressant en fonction de la rigidité des milieux une-couche

- (A) Taille moyenne des racines primaires en fonction du temps dans les milieux contenant 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytigel. Les mesures ont été effectuées pendant 12h (720 min). La taille des racines au début de la mesure a été ramenée à 0mm.
- (B) Vitesse de croissance moyenne des racines primaires progressant dans les milieux contenant 0,2 % (3 kPa), 0,3 % (8 kPa), 0,4 % (17 kPa), 0,5 % (32 kPa), 0,8 % (70 kPa) et 1,2 % (158 kPa) de Phytigel. Les ronds indiquent les valeurs obtenues pour chaque racine et les carrés indiquent les valeurs moyennes, n=15. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA I et test de Tukey).

- **Le taux d'élongation élémentaire maximal (EER_{max}).** L'EER_{max} est défini comme étant la valeur maximale du profil d'EER et traduit la capacité d'allongement des cellules d'une racine (Figure 32C).

I.1.4. Analyses statistiques

Toutes les données issues des suivis de croissance, des profils de vitesse et d'EER ont été analysées de manière statistique en utilisant le logiciel R (Rstudio, R.3.3.4, <https://www.r-project.org/>). Dans un premier temps, un test de Shapiro-Wilk a été exécuté pour vérifier la distribution normale des données et un test de Bartlett a été exécuté pour vérifier l'homoscédasticité. Ensuite, dans les cas où seulement deux moyennes devaient être comparées (critères de croissance), un test T de Student a été appliqué aux données. Dans tous les cas où plus de deux moyennes devaient être comparées, une analyse de variances à un facteur (ANOVA I) a été appliquée aux données afin de déterminer si l'effet du facteur (rigidité du milieu) sur les variables (vitesse de croissance, déviation de l'apex, ...) était significatif. Lorsqu'un effet significatif a été observé, une analyse post-hoc a été réalisée, basée sur le test de Tukey. L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées en considérant un risque α de 0,05.

I.2. La rigidité du milieu impacte la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

La vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* ayant progressé dans les milieux une-couche contenant de 0,2 % à 1,2 % de Phytigel a été étudiée et est présentée dans la Figure 33. La taille des racines évolue de manière linéaire au cours des 12h de prises de vue et ce, pour l'ensemble des milieux de cultures, indiquant que la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis* est constante dans les milieux de culture quelle que soit leur rigidité (Figure 33A). Cette observation a permis de calculer la vitesse de croissance moyenne pendant 12 h en fonction de la rigidité du milieu. Lorsque les racines primaires d'*Arabidopsis* progressent dans un milieu contenant 0,2 % de Phytigel, caractérisé par une rigidité de 3 kPa, une vitesse de croissance moyenne de $3,19 \pm 0,22 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ est observée (Figure 33B). Dans un milieu contenant 0,5% de Phytigel, caractérisé par une rigidité de 32 kPa, les racines progressent à une vitesse moyenne de $2,1 \pm 0,15 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, qui est significativement plus faible que la vitesse moyenne dans le milieu 0,2 % (Figure 33B).

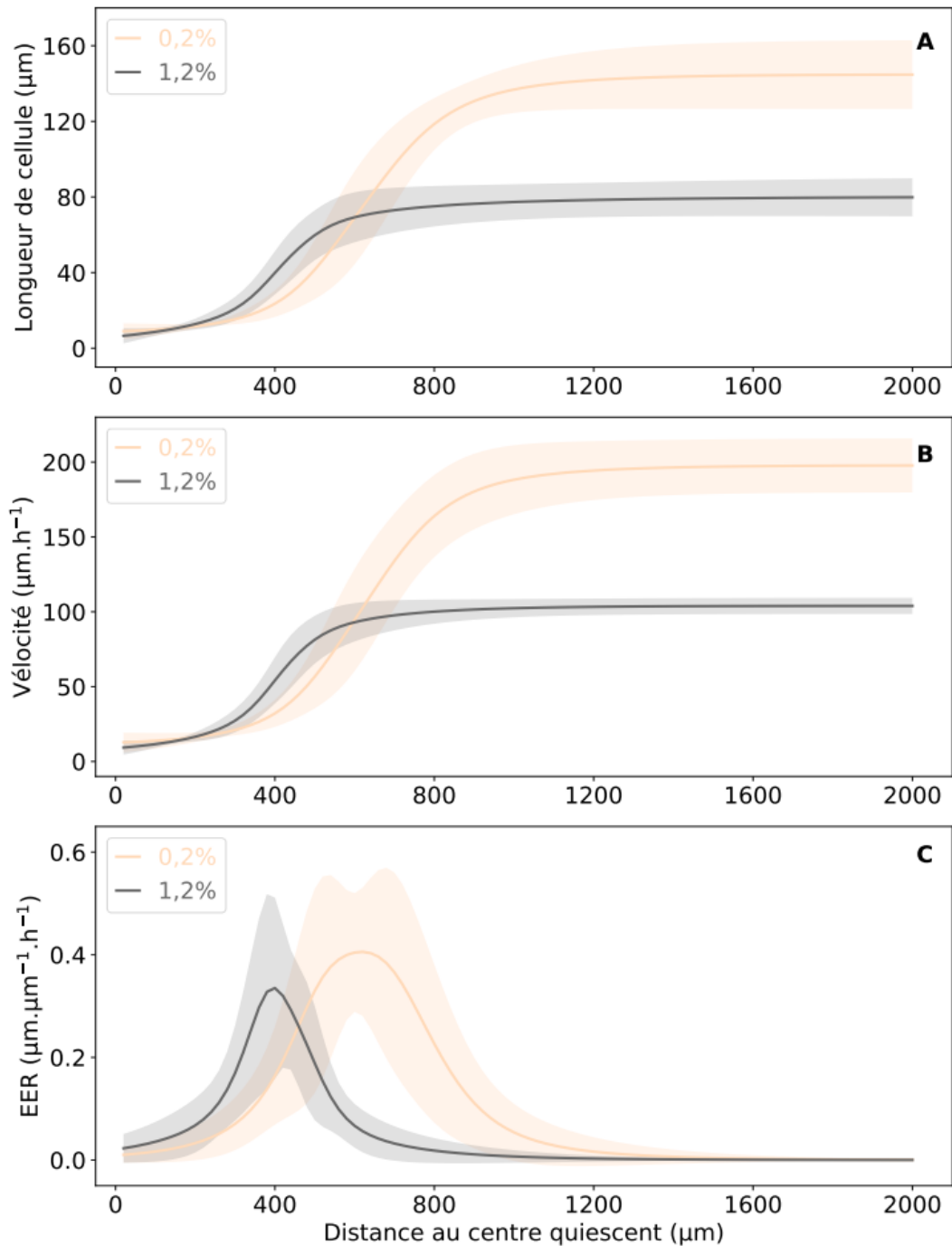


Figure 34 : Profils de longueur cellulaire de racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* qui ont progressé dans un milieu une-couche contenant 0,2 % ou 1,2 % de Phytagel.

(A) Profils de longueur cellulaire en fonction de la distance au centre quiescent réalisés sur des racines qui ont progressé pendant 5 jours dans un milieu une couche contenant 0,2 % de Phytagel (courbe beige), et 5 jours dans un milieu contenant 1,2 % de Phytagel (courbe grise). (B) Profils de vélocité en fonction de la distance au centre quiescent réalisés sur les racines dans le milieu 0,2 % et le milieu 1,2 %. (C) Profils d'EER en fonction de la distance au centre quiescent obtenus par dérivation des profils de vélocité. Pour les 3 graphiques, les moyennes $\pm$ l'écart type sont représentées, $8 \leq n \leq 10$.

Au-delà de cette rigidité, pour les milieux contenant 0,8% ($E = 70$ kPa) et 1,2% ($E = 158$ kPa) de Phytigel, la vitesse de croissance moyenne des racines ne diminue pas de manière significative (Figure 33B). La relation entre la vitesse de croissance moyenne des racines et la rigidité du milieu peut être approchée par l'équation de régression $V = 3.5 E^{-0.1}$ ($R^2 = 0.96$) avec V la vitesse de croissance et E la rigidité du milieu (Figure 33B). Cette équation indique que la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis* diminue en réponse à l'augmentation de la rigidité des milieux une-couche et ce, de façon non linéaire.

J'ai poursuivi cette étude par une analyse cinématique qui me permettra de préciser l'impact de la rigidité du milieu sur la zone de croissance des racines d'*Arabidopsis* (Figure 34). Tout d'abord, des profils de longueur cellulaire ont été réalisés sur des racines ayant progressé dans le milieu 0,2% de plus faible rigidité et le milieu 1,2% de plus forte rigidité (Figure 34A). Les profils de longueur cellulaire se caractérisent par trois phases qui illustrent la distinction de trois zones localisées à l'apex racinaire : (I) Une zone caractérisée par la présence de cellules de petite taille, localisée proche du centre quiescent, (II) une zone caractérisée par l'allongement progressif des cellules et (III) une zone caractérisée par des cellules de taille élevée et stable, localisée plus loin du centre quiescent (Figure 34A). Ces profils illustrent donc la zone de division, la zone d'élongation et le début de la zone de différenciation caractérisant l'apex des racines (Figure 34A). Après cinq jours de croissance dans le milieu de plus faible rigidité (0,2% de Phytigel), les cellules corticales de la zone mature des racines primaires d'*Arabidopsis* atteignent une longueur moyenne de 145 ± 5 μm (Figure 34A). En revanche, dans le milieu le plus rigide (1,2% de Phytigel), les cellules corticales de la zone mature présentent une longueur de 80 ± 2 μm , soit une diminution significative de 45 % par rapport au milieu le moins rigide (Figure 34A). Sur les profils de vitesse réalisés à partir des profils de longueur cellulaire, une différence significative de la vitesse maximale V_{max} est observée entre les racines ayant progressé dans le milieu 0,2 % ($197,9 \pm 4,5$ $\mu\text{m.h}^{-1}$) et celles ayant progressé dans le milieu 1,2 % ($103,9 \pm 1,5$ $\mu\text{m.h}^{-1}$) (Figure 34B). Les profils de vitesse et d'EER ont permis d'estimer que la longueur de la zone de croissance était de 917 ± 49 μm en moyenne chez les racines qui ont progressé dans un milieu 0,2 % et de 664 ± 56 μm en moyenne chez les racines qui ont progressé dans un milieu 1,2 %, ces longueurs moyennes étant significativement différentes (Figure 34B, C, Annexe 2). La diminution de la longueur de la zone de croissance en réponse à l'augmentation de la rigidité du milieu semble être due à un raccourcissement à la fois de la zone de division et de la zone d'élongation (phases I et II plus courtes ; Figure 34B, C).

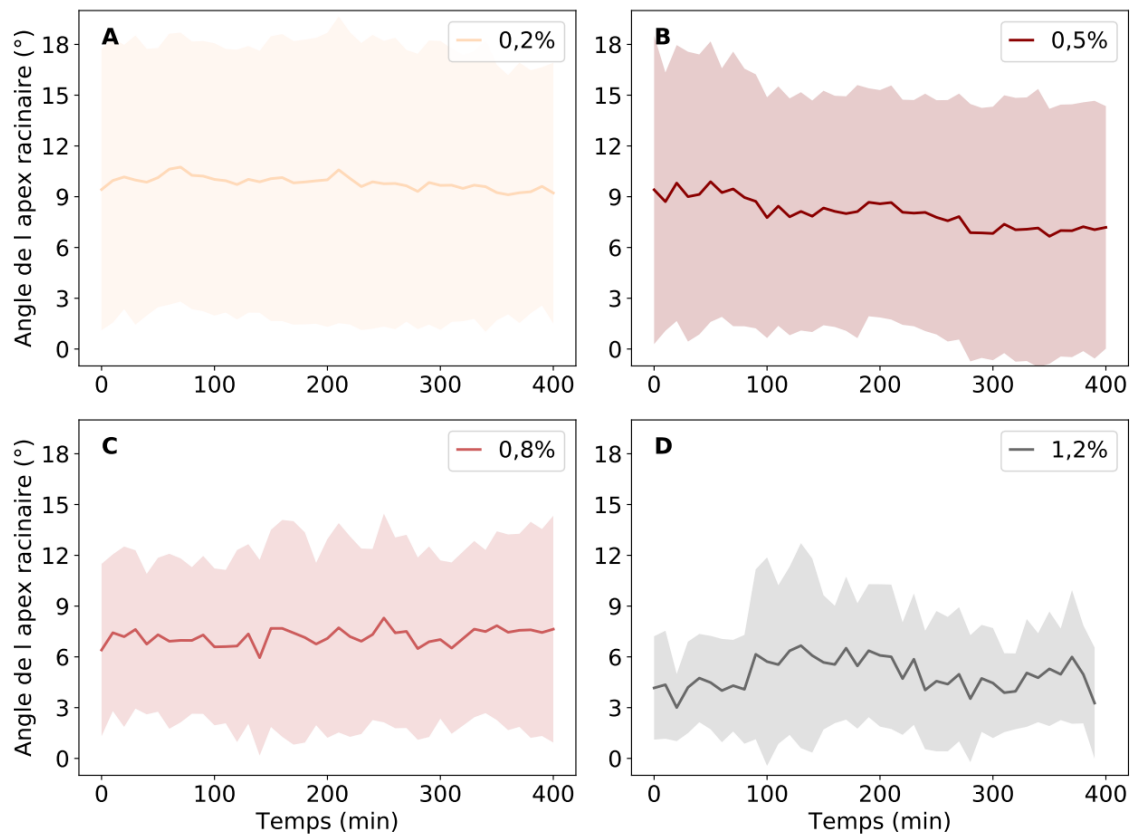


Figure 35 : Angle de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* au cours de leur croissance dans les milieux une-couche

L'angle de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 5 jours a été suivi durant 400 minutes lors de leur croissance dans des milieux une-couche contenant 0,2 % (A), 0,5 % (B), 0,8 % (C) et 1,2 % (D) de Phytigel. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de l'angle de l'apex $\pm$ l'écart type.

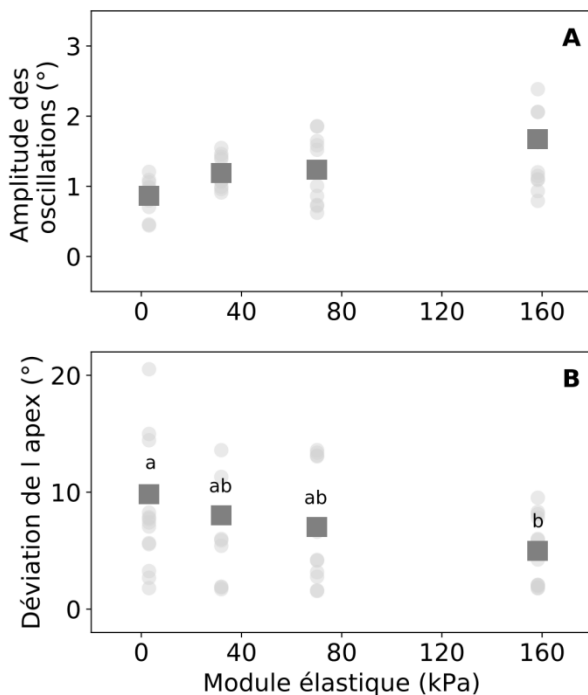


Figure 36 : Amplitude des oscillations et déviation de l'apex par rapport à la verticale chez les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* dans les milieux une-couche en fonction de la rigidité du milieu

(A) Amplitude moyenne des oscillations de l'apex suivies sur une durée de 420 minutes dans les milieux une-couche de rigidité croissante. Les ronds indiquent les valeurs individuelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, n=15. (B) Déviation de l'apex par rapport à la verticale en fonction de la rigidité du milieu. Les ronds indiquent les valeurs individuelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, n=15. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes (P<0,05, ANOVA I et test de Tukey).

En revanche, l'EER_{max}, de $0,52 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ chez les racines qui ont progressé dans le milieu 0,2 % et de $0,39 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ chez les racines qui ont progressé dans le milieu 1,2 %, n'apparaît pas significativement différent entre les deux conditions de croissance racinaire (Figure 34C). L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'augmentation de la rigidité du milieu affecte la vitesse de croissance des racines ainsi que la longueur de la zone de croissance sans affecter la capacité des cellules à s'allonger.

I.3. La rigidité du milieu impacte la rectitude des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

Afin de caractériser précisément la réponse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis* face à l'augmentation de la rigidité des milieux une-couche, nous avons étudié deux paramètres liés à la rectitude de la croissance racinaire :

L'angle de l'apex racinaire au cours du temps lors de la croissance des racines dans les milieux une-couche contenant 0,2 %, 0,5 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytigel (Figure 35, Figure 36)

La tortuosité des racines, *i.e.* l'intensité des zones de courbures le long de la racine, au cours de leur croissance dans les milieux une-couche contenant 0,2 %, 0,5 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytigel (Figure 37).

Le suivi de l'angle de l'apex au cours du temps a mis en évidence une succession d'oscillations de l'apex racinaire au cours de la croissance racinaire (Figure 35). Ces oscillations présentent une période courte, de l'ordre de quelques minutes (Figure 35). L'apex racinaire oscille avec une amplitude moyenne de $0,9 \pm 0,1^\circ$ dans le milieu de plus faible rigidité et de $1,7 \pm 0,3^\circ$ dans le milieu le plus rigide, correspondant à une augmentation de près de 89 % entre les deux milieux (Figure 36A). Les valeurs d'amplitude étant faibles et les erreurs standards importantes, l'augmentation d'amplitude en réponse à l'augmentation de rigidité du milieu n'est cependant pas significative. En plus de l'amplitude des oscillations, la déviation de l'apex par rapport à la verticale a été extraite du suivi de croissance des racines dans les milieux une-couche (Figure 36B). L'angle de l'axe racinaire est d'environ $10 \pm 2^\circ$ (par rapport à 0° , la verticale) dans le milieu de plus faible rigidité et de $5 \pm 1^\circ$ dans le milieu le plus rigide (Figure 36B). Ainsi, l'orientation de la croissance des racines est significativement plus verticale dans le milieu le plus rigide, suggérant qu'une forte rigidité de milieu confine la racine et réduit la capacité de déviation de l'apex racinaire.

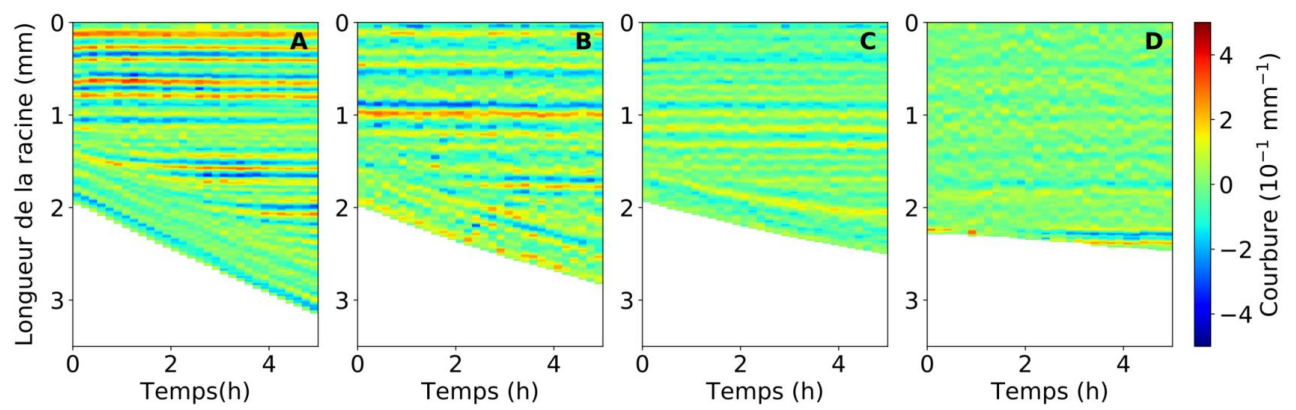


Figure 37 : Suivi spatiotemporel des zones de courbure des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* progressant dans des milieux une-couche de rigidité croissante

La longueur de la racine et l'intensité des zones de courbure le long de l'apex racinaire au cours du temps sont représentées sur une racine représentative progressant dans un milieu une-couche contenant 0,2 % (A), 0,5 % (B), 0,8 % (C) et 1,2 % (D) de Phytigel.

L'intensité des zones de courbures le long des racines a été analysée au cours de leur croissance dans les milieux contenant 0,2 %, 0,5 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytigel (Figure 37). Le long de la racine progressant dans le milieu de plus faible rigidité, de nombreuses zones de courbure, d'une intensité allant de 0,15 à 0,35 mm⁻¹, sont observées (Figure 37A). Ces zones de courbures sont représentées sur la figure 37A par une alternance de bandes horizontales de couleurs rouge et bleue. Les zones de courbure sont formées à environ 500 µm de l'apex racinaire correspondant à la zone de croissance (Figure 37A). Ces zones de courbures alternées (dans un sens et dans l'autre) illustrent une légère ondulation de la racine. Une autre zone de courbure est formée très proche de l'apex racinaire, à une dizaine de µm de l'extrémité (Figure 37). Contrairement aux premières, cette zone de courbure est maintenue à une distance constante de l'apex racinaire au cours de la croissance racinaire (Figure 37A). Le long de la racine ayant progressé dans un milieu contenant 0,5 % de Phytigel, des zones de courbure similaires à la racine présentée en A, bien que moins régulières, sont visibles (Figure 37B). En revanche, les zones de courbures perpendiculaires à l'axe de la croissance sont de moindre intensité, autour de 0,1 mm⁻¹ lorsque les racines progressent dans les milieux les plus rigides (contenant 0,8% et 1,2% de Phytigel) (Figure 37C, D).

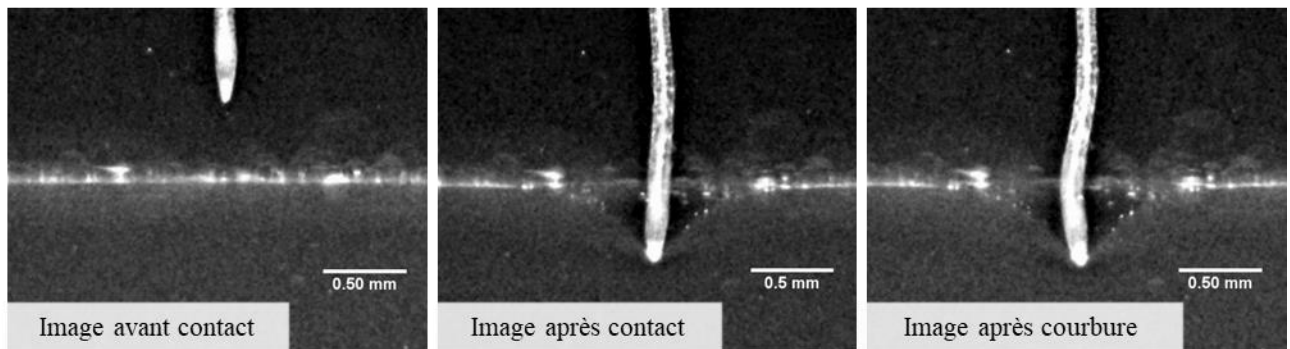
Ainsi, plus la rigidité du milieu est importante, moins les zones de courbure sont régulières et visibles. Ces observations suggèrent que l'augmentation de la rigidité du milieu entraîne une augmentation de la rectitude des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*.

II. Réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

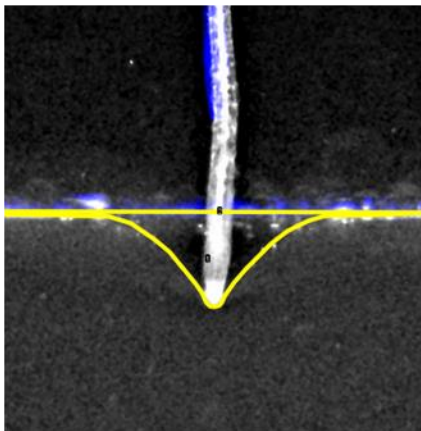
II.1. Méthodes : Analyse des réponses de croissance des racines dans les milieux deux-couches

Les milieux deux couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5 ont été préparés comme indiqué dans le Chapitre 1. Six boîtes de culture ont été préparées pour chaque milieu deux-couches. Les graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été stérilisées et déposées à la surface de la couche supérieure de milieu. Après 5 jours en chambre de culture, les boîtes de culture ont été placées devant les appareils photos Nikon et les prises de vue ont été automatisées toutes les 5 minutes pendant une durée de 24 heures. Les prises de vue séquentielles ont ensuite été prétraitées par Rawtherapee puis traitées par RootStem Extractor. Plusieurs mesures ont été réalisées à partir des prises de vue séquentielles dans chaque milieu deux-couches étudié : la force critique de rupture de l'interface en fonction de la concentration en Phytigel, la force

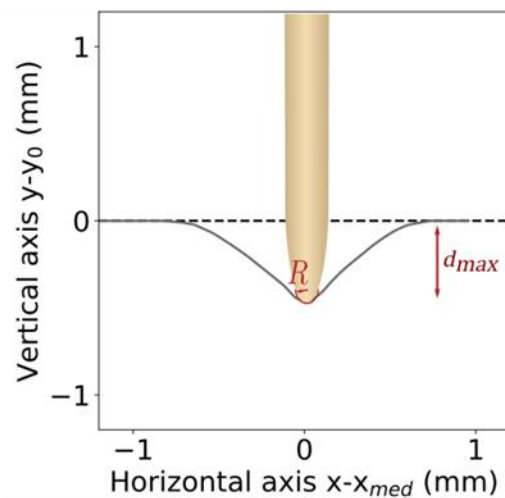
SÉLECTION DES IMAGES



- COMPARAISON DE LA FORME DE L'INTERFACE SUR LES DEUX IMAGES
- MESURE DE R



- INTERPOLATION DES COORDONNÉES DE L'INTERFACE
- MESURE DE d_{max}



- CALCUL DE LA FORCE CRITIQUE DE RUPTURE DE L'INTERFACE
- CALCUL DE LA FORCE DE CROISSANCE AXIALE CRITIQUE DE LA RACINE

Figure 38 : Etapes conduisant à l'estimation de la force critique de rupture de l'interface et de la force de croissance axiale critique des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

Les images choisies pour illustrer la méthodologie concernent une racine primaire qui n'a pas pénétré la couche inférieure du milieu 0,2-0,3. Cette série d'image a donc été utilisée pour l'estimation de la force de croissance axiale critique des racines. Pour estimer la force critique de rupture de l'interface, les images illustrant des racines qui ont pénétré la couche inférieure de milieu ont été utilisées. Après sélection des images, le processus suivi pour l'estimation des deux forces est le même.

critique de croissance axiale des racines, la vitesse de croissance et le spatiotemporel de la courbure.

A la suite de l'acquisition des images, les boîtes de culture ont été conservées 5 jours supplémentaires en chambre de culture, après quoi le nombre de racines primaires ayant pénétré la couche inférieure de milieu dans chaque boîte a été décompté. Pour chaque boîte, le taux de pénétration en pourcent a été calculé. La moyenne et l'erreur standard de l'ensemble des taux de pénétration obtenues pour un milieu deux-couches ont été calculées.

II.1.1. Mesure de la force exercée sur l'interface par la croissance axiale des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

Dans les milieux deux-couches, les prises de vue séquentielles permettent d'observer le déplacement de l'interface induit par la croissance racinaire (Figure 38). La force F nécessaire à l'apex racinaire pour induire ce déplacement a été estimée, en appliquant la théorie du contact entre une sphère élastique et un demi-espace élastique (Hanaor *et al.*, 2015), selon la relation :

$$F = \frac{4}{3} E^* R^{\frac{1}{2}} d^{\frac{3}{2}} \quad (13)$$

Où

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \quad (14)$$

Et R est le rayon de la racine à l'apex, d est la profondeur de déplacement de l'interface à un temps donné, E_1 , E_2 les modules élastiques de la couche inférieure de milieu et de la racine, respectivement, et ν_1 , ν_2 les coefficients de Poisson de la couche inférieure de milieu et de la racine, respectivement (Figure 38). Tel quel, nous n'avons pas les données suffisantes pour calculer la formule (14). Je me suis donc appuyée sur la littérature pour simplifier le calcul de E^* . Il a été montré que les coefficients de poisson des hydrogels et ceux des racines étaient tous deux proches de 0,5 (Ahearne *et al.*, 2005). De plus, le module d'élasticité des racines a été mesuré sur diverses espèces et semble se situer entre 10 et 100 MPa (Whiteley and Dexter, 1981; Loades *et al.*, 2013).

Or, nous avons mesuré un module d'élasticité entre 3 et 32 kPa pour des milieux de culture ayant une concentration en Phytigel située entre 0,2 % et 0,5 %. La relation (14) peut être modifiée de la façon suivante :

$$\frac{1}{E^*} = \frac{E_2 (1 - \nu_1^2) + E_1 (1 - \nu_2^2)}{E_1 E_2} = \frac{E_2 [(1 - \nu_1^2) + \frac{E_1}{E_2} (1 - \nu_2^2)]}{E_1 E_2} \quad (15)$$

$$\frac{1}{E^*} = \frac{(1 - \nu_1^2) + \frac{E_1}{E_2} (1 - \nu_2^2)}{E_1} \quad (16)$$

Or, si E_1 est très petit devant E_2 , alors $\frac{E_1}{E_2}$ est très inférieur à 1 et $\frac{E_1}{E_2} (1 - \nu_2^2)$ peut être négligé, donnant :

$$\frac{1}{E^*} \sim \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} \quad (17)$$

En utilisant les relations (13) et (17), nous avons calculé deux types de force :

- **La force critique de rupture de l'interface** en fonction de la concentration en Phytigel. Cette force, correspondant à la force que doit exercer la racine pour induire la rupture de l'interface, peut être calculée à partir des prises de vue séquentielles des racines ayant pénétré la couche inférieure dans les milieux **0,2-0,2 et 0,2-0,3**.
- **La force de croissance axiale critique des racines**, correspondant à la force axiale maximale que les racines sont capables d'exercer sur l'interface avant de se courber. Cette force peut être calculée à partir des prises de vue représentant les racines se réorientant après contact avec l'interface dans les milieux **0,2-0,3 et 0,2-0,5**.

Pour estimer les deux types de forces, nous avons sélectionné pour chaque racine une image avant le contact entre l'apex et l'interface et la dernière image avant rupture de l'interface ou avant initiation d'une zone de courbure dans la racine (Figure 38). Sur chaque image, les coordonnées en X et Y de l'interface ont été extraites sur Fiji puis interpolées afin de représenter graphiquement la forme de l'interface après contact par rapport à sa forme avant contact (Figure 38).

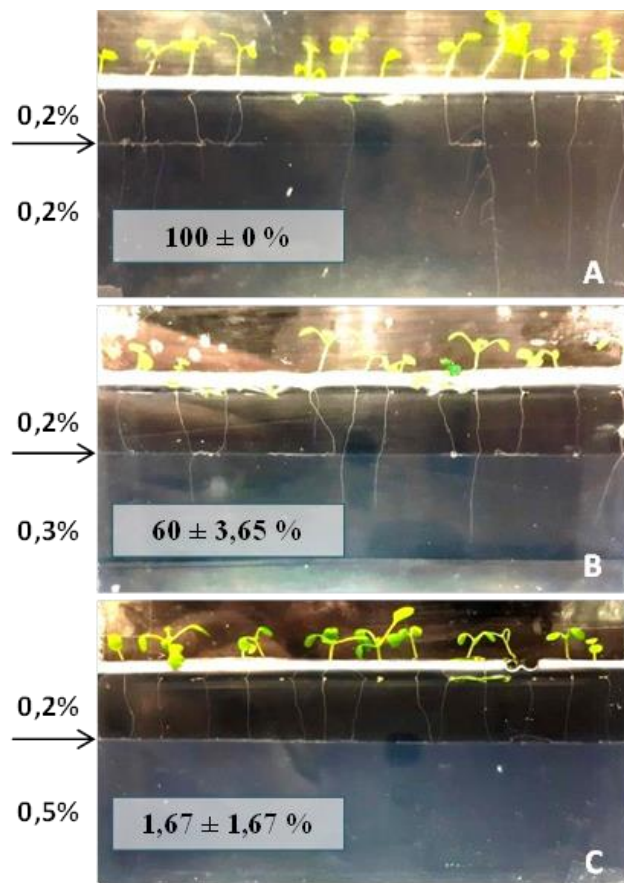


Figure 39 : Croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 (A), 0,2-0,3 (B), 0,2-0,5 (C)

Les images ont été acquises 8 jours après germination sur une cuve de culture représentative de chaque milieu deux-couches. Le taux de pénétration dans chaque condition $\pm$ l'erreur standard sont indiqués en bas à gauche de l'image. Les taux de pénétration indiqués sont des moyennes de pourcentage de racines qui ont pénétré dans le milieu inférieur dans chaque cuve de culture. Six cuves de culture ont été utilisées par conditions, avec 10 à 12 racines primaires par cuve.

La profondeur maximale de déplacement de l'interface par rapport à sa position initiale d_{max} a été calculée pour chaque racine (Figure 38). Ensuite, sur les images après contact (juste avant rupture de l'interface ou avant courbure de la racine), l'apex racinaire a été ajusté par un cercle dont le rayon R a été mesuré. Les forces critiques de rupture de l'interface ou de croissance axiale de la racine ont finalement été calculées en appliquant R et d_{max} aux relations ci-dessus.

II.1.2. Suivi de la croissance et de l'orientation des racines par analyse d'image

Dans les milieux deux-couches, la vitesse de croissance moyenne des racines a été calculée toutes les 5 minutes sur une durée allant de 300 minutes avant le contact de l'apex avec l'interface jusqu'à 600 minutes après le contact. Dans les cas où les racines pénètrent la couche inférieure, une moyenne de la vitesse de croissance est calculée pour chaque racine individuellement sur les 300 minutes avant contact, puis sur la période allant du contact à la rupture de l'interface et sur la période allant de la rupture de l'interface jusqu'à 600 minutes après contact. Si il y a réorientation de la racine, une moyenne de la vitesse de croissance est calculée sur les 300 minutes avant contact, puis sur la période allant du contact jusqu'à la mise en place complète des zones de courbures et enfin sur la période allant de la réorientation à 600 minutes après le contact. Dans le cadre de l'analyse statistique des données, une ANOVA II a été exécutée sur les vitesses de croissance obtenues en fonction du temps considéré (avant contact, après contact,...) et du milieu considéré (0,2-0,2, 0,2-0,3 ou 0,2-0,5). L'ANOVA II a été réalisée après vérification de la distribution normale et de l'homoscedasticité des données. Dans le cas où l'ANOVA II a donné une Pvalue inférieure à 0,05, un test Post Hoc, basé sur le test de Tukey a été réalisé.

Enfin, le spatiotemporel de la courbure des racines ayant pénétré la couche de milieu inférieure et des racines ayant réorienté leur croissance après contact avec l'interface a été analysé dans les différents milieux deux-couches.

II.2. Les capacités de pénétration des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* sont impactées par la résistance mécanique de l'interface

Face à la plus faible augmentation de résistance mécanique (milieu 0,2-0,2), toutes les racines pénètrent dans le milieu inférieur (Figure 39A). En revanche, 60 % des racines pénètrent dans

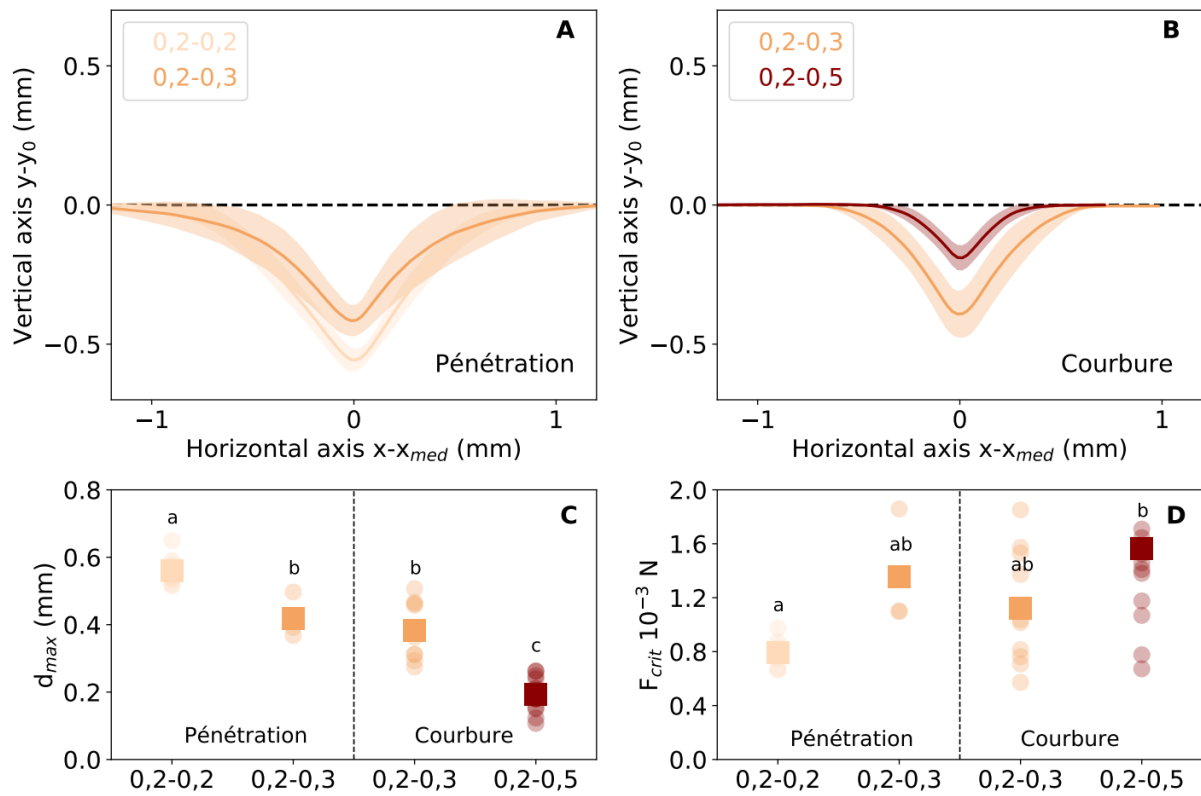


Figure 40 : Comparaison des forces critiques de rupture de l'interface et de croissance axiale des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

(A) Représentation du déplacement maximal de l'interface des milieux deux-couches 0,2-0,2 et 0,2-0,3, avant rupture de l'interface et pénétration des racines dans la couche inférieure. (B) Représentation du déplacement maximal de l'interface des milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5, avant initiation d'une zone de courbure chez les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*. Les valeurs moyennes $\pm$ l'écart type sont représentées, $6 \leq n \leq 10$.

(C) Déplacement maximal de l'interface induit par la croissance racinaire avant pénétration dans les milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 et avant réorientation dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5. (D) Force critique de rupture de l'interface dans les milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 et force axiale critique des racines primaires dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5. Les ronds indiquent les valeurs individuelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, $6 \leq n \leq 10$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes avec $P < 0.05$ (ANOVA et test de Tukey).

le milieu présentant une augmentation intermédiaire de la résistance mécanique (milieu 0,2-0,3), et aucune ne parvient à pénétrer dans le milieu présentant la plus forte augmentation de résistance mécanique (milieu 0,2-0,5) (Figure 39B, C). Ainsi, comme attendu le taux de pénétration des racines dans la couche inférieure diminue significativement en réponse à l'augmentation de la résistance mécanique de l'interface. Pour caractériser les capacités de pénétration des racines dans mes conditions expérimentales, j'ai estimé la force critique nécessaire à la racine pour induire la rupture de l'interface en fonction de la concentration en Phytigel. Cette force a ensuite été comparée à la force axiale critique que les racines étaient capables de générer avant d'initier une zone de courbure.

➔ Force critique de rupture de l'interface

Dans le milieu 0,2-0,2, la rupture de la surface de la couche inférieure contenant 0,2 % de Phytigel intervient après un déplacement de l'interface sur une profondeur moyenne de $0,56 \pm 0,02$ mm (Figure 40A, C). Dans le milieu 0,2-0,3, la rupture de la surface de la couche 0,3 % intervient après un déplacement sur une profondeur significativement plus faible de $0,42 \pm 0,04$ mm (Figure 40A, C). Ceci corrobore les caractérisations mécaniques des milieux deux-couches et suggère que la surface de la couche 0,2 % est plus élastique que la surface de la couche 0,3 %. D'après mes estimations, ces déplacements maximaux de l'interface correspondent à une force critique de rupture de $0,79 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$ N pour le milieu 0,2-0,2, et une force critique de rupture de $1,35 \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$ N pour le milieu 0,2-0,3 (Figure 40D). Ainsi, la force que les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* doivent exercer pour induire la rupture de l'interface n'est pas significativement différente lorsque la couche inférieure contient 0,3 % de Phytigel que lorsqu'elle contient 0,2 % de Phytigel.

➔ Force critique de croissance axiale de la racine

Dans le milieu 0,2-0,3, les racines qui ne pénètrent pas dans la couche inférieure déplacent l'interface d'une profondeur maximale de $0,38 \pm 0,03$ mm (Figure 40B, C). D'après mes estimations, ce déplacement est permis par l'application d'une force équivalente à $1,12 \pm 0,14 \cdot 10^{-3}$ N (Figure 40D). Ainsi, la force requise pour la rupture de la surface de la couche inférieure contenant 0,3 % de Phytigel n'est pas significativement différente de la force de croissance axiale critique des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 40D) Cette proximité et la variabilité intrinsèque de forces de croissance des racines au sein d'un même génotype permettent d'expliquer que certaines racines pénètrent la couche inférieure 0,3 % et d'autres non.

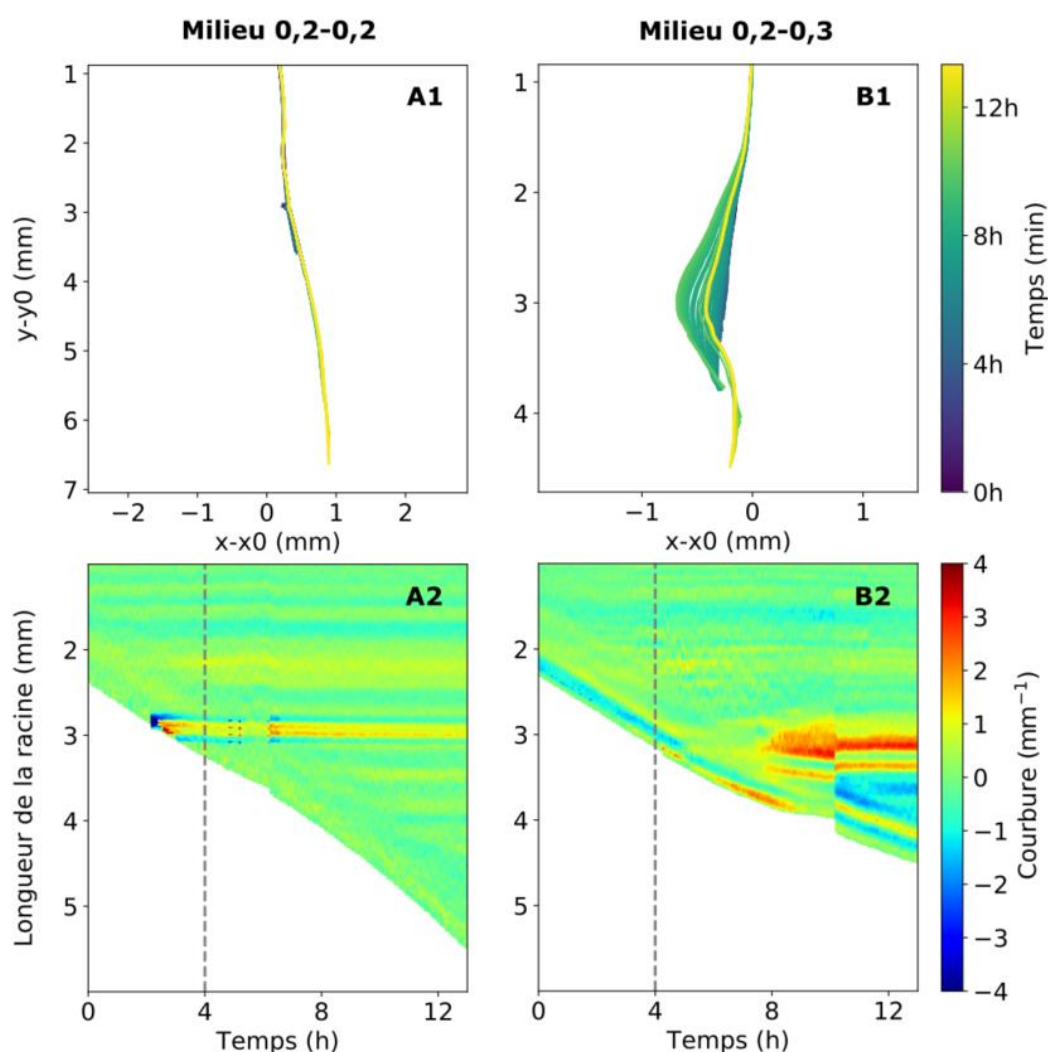


Figure 41 : Caractérisation spatiotemporelle des zones de courbure formées chez les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* au cours de leur pénétration dans la couche inférieure des milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B).

(A1, B1) Squelettes d'une racine représentative au cours de sa pénétration dans la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 (A1) ou 0,2-0,3 (B1). Une ligne représente le squelette de la racine à un temps donné. Les squelettes de la racine obtenus toutes les 5 minutes sur une durée totale de 13h ont été assemblés. (A2, B2) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine représentative au cours de sa pénétration dans la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 (A2) ou 0,2-0,3 (B2). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

En comparaison, dans le milieu 0,2-0,5, les racines déplacent l'interface sur une profondeur maximale de $0,19 \pm 0,01$ mm (Figure 40B, C). Ce déplacement correspond à une force exercée par les racines de $1,56 \pm 0,14 \cdot 10^{-3}$ N (Figure 40D). Les valeurs de force axiale critique des racines ne sont pas significativement différentes entre les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5. Or, les tests de pénétrométrie ont révélé que la résistance mécanique de la couche inférieure contenant 0,5 % de Phytigel était significativement plus élevée que celle de la couche contenant 0,3 % de Phytigel. Etant donné que la force axiale critique des racines est la même dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5, ceci explique qu'aucune racine ne parvienne à pénétrer la couche inférieure contenant 0,5 % de Phytigel.

II.3. Pénétration et Réorientation : la résistance mécanique de l'interface impacte la rectitude des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

La rectitude des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* a été analysée lors de leur progression dans les milieux deux couches, avant et après contact avec l'interface, chez les racines ayant pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 (Figure 41) et chez les racines n'ayant pas pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5 (Figure 42

L'analyse pour le milieu **0,2-0,2** a montré que, pour la plupart des racines, aucune zone de courbure n'était initiée, et l'apex n'était pas ou peu dévié lors de la pénétration dans la couche inférieure de milieu (Figure 41A). Le graphique illustrant le spatiotemporel de la courbure présente des bandes de couleur jaune et bleu clair, indiquant de faibles zones de courbures initiées de façon plus ou moins régulière au cours de la croissance racinaire (Figure 41A). Ces zones de courbure illustrent les oscillations de croissance classiques des racines et ne semblent que peu impactées par la pénétration dans la couche inférieure de gel.

Dans le milieu **0,2-0,3**, le suivi de la mise en place des zones de courbure chez les racines ayant pénétré la couche inférieure a montré que certaines de ces racines ne pénètrent pas directement (Figure 41B). Pour la racine représentée en Figure 41B, la zone de courbure est initiée dans les 3 heures suivant le contact, à 500 μ m de l'apex racinaire (Bande jaune/rouge). Cette courbure atteint une intensité maximale de 2 mm^{-1} dans l'heure suivant sa formation. Une seconde zone de courbure est ensuite initiée 6 heures après le contact (Figure 41, bande bleue) toujours à 500 μ m de l'apex. Cette seconde courbure présente une intensité maximale de $1,5 \text{ mm}^{-1}$. En analysant de façon parallèle les vidéos et le graphe spatiotemporel, j'ai observé que les zones de courbures étaient initiées au cours du déplacement de l'interface.

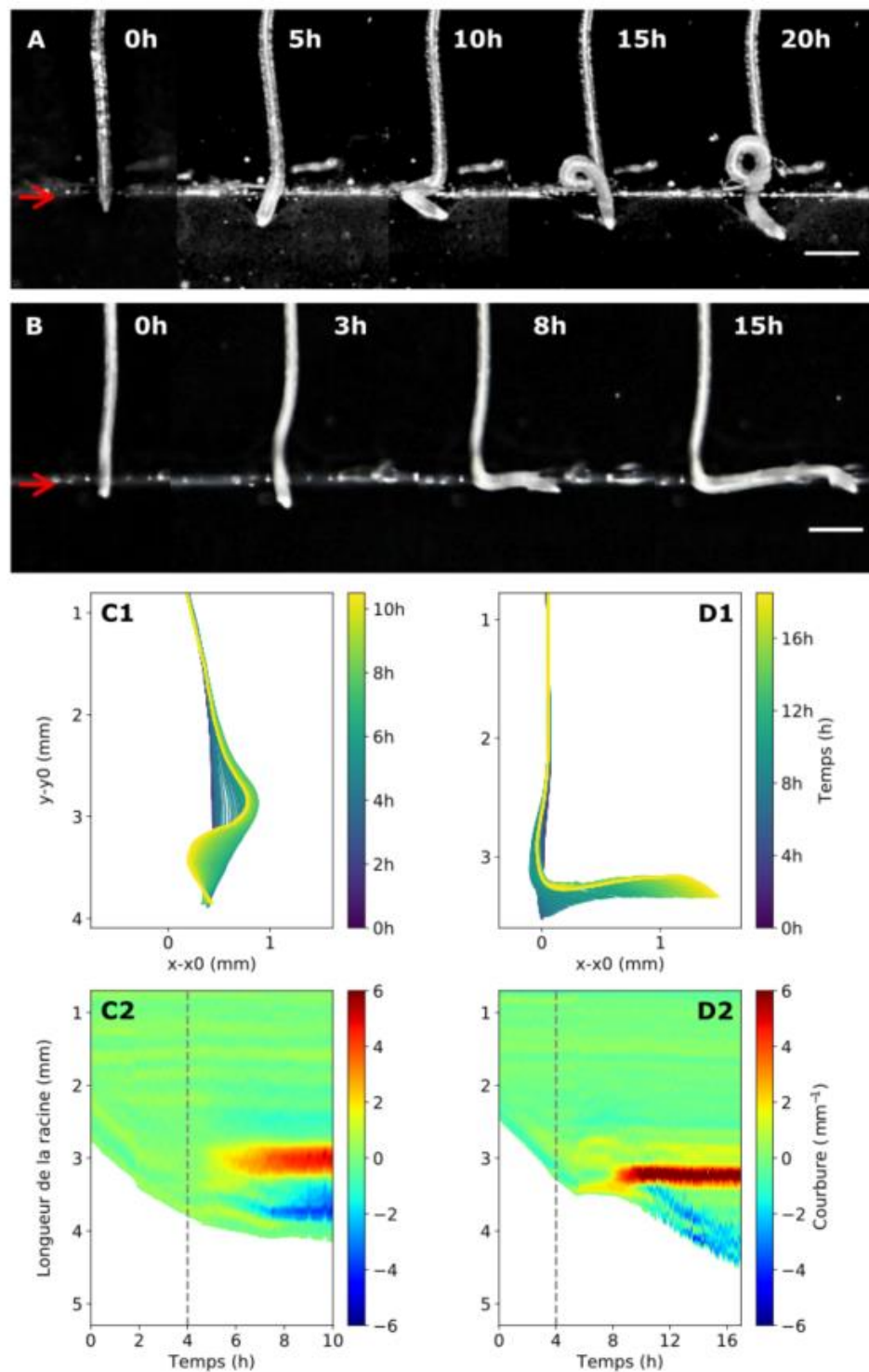


Figure 42 : Réorientation de l'apex de racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* dans les milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5.

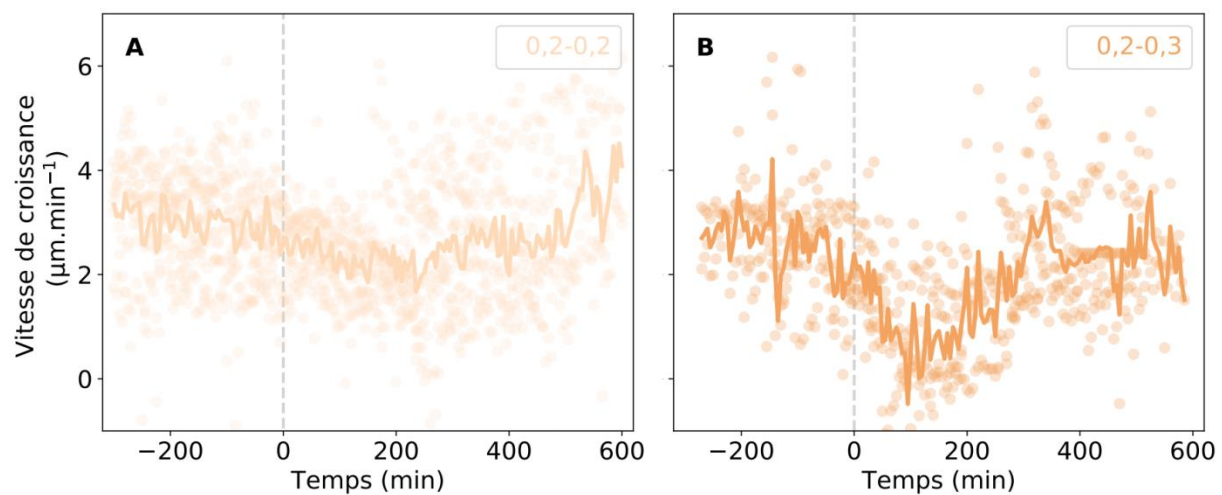
(A-B) Cinétique de réorientation de l'apex d'une racine représentative ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 (A) ou 0,2-0,5 (B). La barre d'échelle correspond à 500µm. (C1, D1) Squelettes d'une racine ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 (C1) ou 0,2-0,5 (D1). (C2, D2) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine au cours de sa réorientation à l'interface du milieu 0,2-0,3 (C2) ou 0,2-0,5 (D2). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

Une fois que la croissance racinaire a entraîné la rupture de l'interface, les zones de courbure sont maintenues pendant toute la période de progression de la racine dans la couche inférieure de milieu (Figure 41B).

Dans le même milieu **0,2-0,3**, les racines qui ne parviennent pas à pénétrer la couche inférieure de milieu forment une boucle après contact avec l'interface (Figure 42). La cinétique de mise en place de cette boucle a été analysée en détail et un exemple d'une racine représentative est présenté (Figure 42A). Après contact entre l'apex racinaire et l'interface, une zone de courbure se met en place dans les 2 à 4 heures (Figure 42A, C). Cette zone de courbure est initiée à $515 \pm 98 \mu\text{m}$ en moyenne de l'apex racinaire et atteint une intensité maximale de $5,0 \pm 1,4 \text{ mm}^{-1}$. Alors que la zone de courbure s'intensifie, l'apex racinaire n'est pas ou peu dévié, et la racine continue de croître plus ou moins à la verticale contre la surface de la couche inférieure de gel. Après quatre heures de croissance, soit 4-8 heures après l'initiation de la première zone de courbure, une seconde zone de courbure apparaît (Figure 39A, C). Cette seconde zone se forme également à $280 \pm 40 \mu\text{m}$ de l'apex racinaire et atteint une intensité maximale ($3,0 \pm 0,5 \text{ mm}^{-1}$) non significativement différente de celle de la première courbure (Annexe 2). Alors que les deux zones de courbure sont formées, l'apex n'est toujours pas dévié et la croissance verticale de la racine entraîne la formation d'une boucle (Figure 42A, 15h). Dans l'exemple représentatif présenté en Figure 39A, 3 zones de courbures sont initiées avant déviation de l'apex. Une fois que l'apex est dévié, la croissance de la racine est réorientée de façon à longer l'interface du milieu.

Dans le milieu **0,2-0,5**, la cinétique et le mode de réorientation de l'apex racinaire en réponse au contact avec l'interface sont distincts de ceux décrits précédemment (Figure 42B). La forme finale observée, ressemblant à une marche, est due à la mise en place de deux courbures (Figure 42B, D) :

- La première zone de courbure présente des caractéristiques de mise en place proches de celles de la première zone initiée dans le milieu 0,2-0,3, à la fois en termes d'intensité maximale, de distance par rapport à l'apex et de longueur finale (Annexe 2, Figure 42D). Contrairement au milieu 0,2-0,3, l'initiation de cette première zone de courbure entraîne une déviation de l'apex le long de l'interface. L'apex racinaire est ainsi réorienté de façon parallèle à l'interface (Figure 42D). De manière intéressante, la première courbure reste localisée et est maintenue dans une même zone de la racine.



Vitesse de croissance ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)

Milieu deux-couches	Avant contact	Après contact	Après pénétration
0,2-0,2	$2,99 \pm 0,27^a$	$2,21 \pm 0,18^a$	$2,71 \pm 0,37^a$
0,2-0,3	$2,54 \pm 0,23^a$	$1,00 \pm 0,20^b$	$2,49 \pm 0,47^a$

Figure 43 : Vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* pénétrant dans la couche inférieure des milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B)

(A, B) Les mesures ont été réalisées toutes les 5 min de -300 min à +600 min après le contact entre l'apex racinaire et l'interface. Les points indiquent les valeurs individuelles et les lignes indiquent les valeurs moyennes, $n=6$. Le tableau indique les vitesses de croissance moyennes $\pm$ l'erreur standard calculées avant le contact de l'apex racinaire avec l'interface (de -300 à 0 min), au cours du déplacement de l'interface par la croissance racinaire (après contact) et après la pénétration de la racine dans la couche inférieure dans les milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

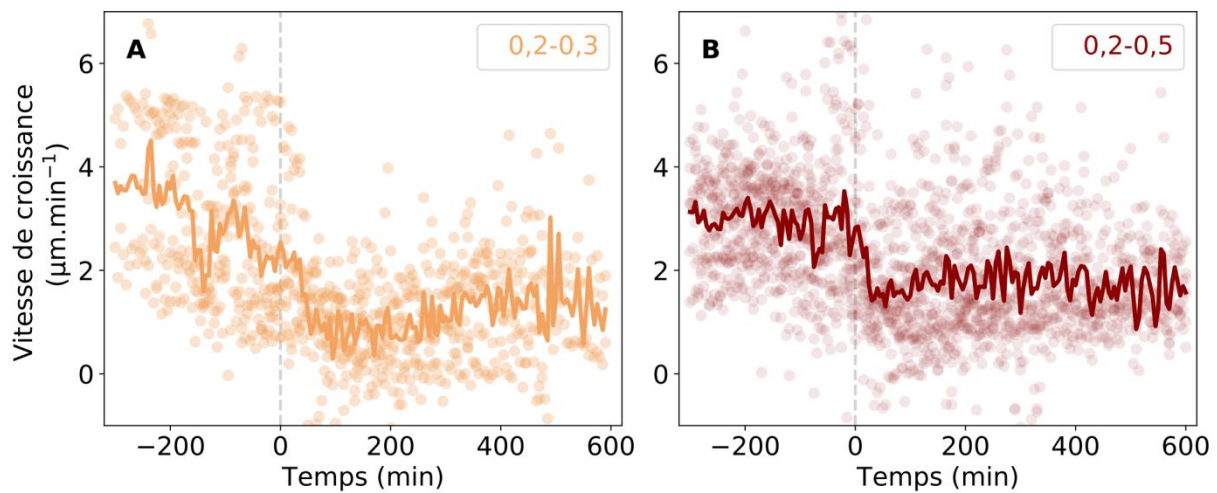
- Après déviation de l'apex racinaire, une seconde zone de courbure est initiée rapidement, soit 2-3 heures après l'initiation de la première zone de courbure. Cette seconde zone, dans un sens inverse à la première, atteint une intensité maximale de $3,36 \pm 0,4 \text{ mm}^{-1}$ qui n'est pas significativement différente de celle atteinte par la première zone de courbure (Figure 42D). La seconde zone de courbure se forme en moyenne à une distance de $276 \pm 23 \text{ }\mu\text{m}$ de l'extrémité racinaire et est maintenue constamment à cette distance au cours de la croissance (Figure 42D). Par ailleurs, la zone verte, *i.e.* la zone non courbée de la racine entre les deux zones de courbures s'allonge au cours du temps, indiquant que la zone de croissance racinaire se situe entre les deux zones de courbure.

II.4. Les contraintes mécaniques axiales induisent une réduction de la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

La vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques axiales a été étudiée dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5. Dans le milieu **0,2-0,2**, la vitesse de croissance moyenne des racines progressant dans la couche supérieure est de $2,99 \pm 0,27 \text{ }\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, et donc équivalente à la vitesse de croissance moyenne des racines progressant dans un milieu une-couche contenant 0,2 % de Phytigel (Figure 43A).

Au cours de la phase de déplacement de l'interface, les racines présentent une vitesse de croissance moyenne de $2,21 \pm 0,18 \text{ }\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ qui n'apparaît pas significativement différente de la vitesse de croissance avant le contact (Figure 43A). La vitesse moyenne après la rupture de l'interface et au cours de la progression dans la couche inférieure contenant 0,2 % de Phytigel est finalement de $2,71 \pm 0,37 \text{ }\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ (Figure 43A). Ces résultats indiquent que la vitesse de croissance des racines n'est pas affectée de façon significative par la pénétration de la couche supérieure à la couche inférieure contenant toutes deux 0,2 % de Phytigel.

Dans le milieu **0,2-0,3**, les racines présentent une vitesse de croissance moyenne de l'ordre de $2,5 \text{ }\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ lors de leur progression dans la couche supérieure de milieu (Figure 43B, Figure 44A).



Vitesse de croissance ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)			
Milieu deux-couches	Avant contact	Pendant réorientation	Après réorientation
0,2-0,3	$2,57 \pm 0,42^a$	$1,09 \pm 0,17^c$	—
0,2-0,5	$2,95 \pm 0,21^a$	$1,85 \pm 0,25^b$	$1,78 \pm 0,20^b$

Figure 44 : Vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* ne pénétrant pas la couche inférieure des milieux deux-couche 0,2-0,3 (A) et 0,2-0,5 (B).

(A, B) Les mesures ont été réalisées toutes les 5 min de -300 min à +600 min après le contact entre l'apex racinaire et l'interface. Les points indiquent les valeurs individuelles et les lignes indiquent les valeurs moyennes, $8 \leq n \leq 12$. Le tableau indique les vitesses de croissance moyennes $\pm$ l'erreur standard calculées avant le contact de l'apex racinaire avec l'interface (de -300 à 0 min), au cours de la réorientation et une fois la réorientation achevée dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5. Dans le milieu 0,2-0,3, les prises de vue 2D ne permettent pas de suivre la croissance durant toute la durée ainsi qu'à la suite de la réorientation. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

Cette vitesse de croissance n'apparaît pas significativement différente entre les racines qui pénètrent la couche inférieure de milieu ($2,54 \pm 0,23 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$) et celles qui réorientent leur croissance après contact avec l'interface ($2,57 \pm 0,42 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$) (Figure 43B, Figure 44A). Après le contact avec l'interface, les racines qui pénètrent dans la couche inférieure présentent une vitesse de croissance moyenne de $1,00 \pm 0,20 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, correspondant à une diminution significative de 61 % par rapport à la vitesse de croissance avant contact (Figure 43B). Cette diminution est observée dans les minutes suivant le contact entre l'apex racinaire et l'interface. Après rupture de l'interface et pénétration des racines dans la couche inférieure, un recouvrement complet de la vitesse de croissance initiale est observé (Figure 43B). Pour les racines qui ne pénètrent pas la couche inférieure, le contact avec l'interface entraîne également une diminution significative de 58 % de la vitesse de croissance moyenne (Figure 44A). Ainsi, dans le milieu 0,2-0,3, l'augmentation des contraintes mécaniques axiales entraîne une diminution significative de la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* et ce, de façon similaire pour les racines qui pénètrent et celles qui ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu.

Dans le milieu **0,2-0,5**, face à la plus forte augmentation de résistance mécanique, la vitesse de croissance, de $2,95 \pm 0,21 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ au cours des 300 minutes avant contact, atteint une valeur moyenne de $1,85 \pm 0,25 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ après contact avec l'interface et au cours de la réorientation de l'apex, soit une diminution significative de 37 % (Figure 44B). Une fois la réorientation de l'apex racinaire achevée, i.e. après mise en place complète des deux zones de courbure, la vitesse de croissance atteint une valeur moyenne de $1,78 \pm 0,20 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ (Figure 44B). Ainsi, la vitesse de croissance des racines ne retrouve pas son niveau initial et ce, même 600 minutes après le contact avec l'interface (Figure 44B).

En conclusion, ces résultats montrent que l'augmentation des contraintes mécaniques axiales dans les milieux deux-couches induit une diminution de la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* et que cette diminution dépend de la résistance mécanique de l'interface. Les observations faites dans le milieu 0,2-0,2 suggèrent l'existence d'un seuil d'augmentation des contraintes mécaniques à partir duquel une réponse est observée.

Dans les milieux deux couches, des réponses de croissance distinctes sont observées en fonction de l'augmentation de la résistance mécanique de l'interface. Face à une faible augmentation de la résistance mécanique, les racines sont capables de générer une force suffisante pour induire la rupture de l'interface et pénétrer dans la couche de milieu inférieure.

Cette pénétration n'affecte pas de manière significative la croissance et la rectitude des racines. Face à une augmentation intermédiaire de la résistance mécanique de l'interface, certaines racines génèrent une force suffisante pour pénétrer et celles qui ne pénètrent pas subissent des courbures entraînant la formation de boucles. Enfin, face à la plus forte augmentation de la résistance de l'interface, les racines ne parviennent pas à générer une force suffisante pour rompre l'interface et réorientent leur croissance *via* la mise en place de deux zones de courbures, conduisant à une croissance le long de l'interface.

III. Discussion

III.1. L'augmentation de la rigidité du milieu impacte la croissance racinaire et l'orientation des racines

Dans les milieux une-couche, nous avons observé une nette diminution de la vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une augmentation de la rigidité du milieu. De plus, nous avons montré que la longueur de la zone de croissance des racines diminuait en réponse au stress mécanique. Les diminutions de la croissance racinaire et de longueur de zone de croissance sont des réponses communes à l'augmentation de la résistance mécanique d'un sol, décrites auparavant chez *Zea mays* (Iijima and Kono, 1991; Konôpka *et al.*, 2009), chez *Lupinus angustifolius* (Chen *et al.*, 2014), chez *Triticum aestivum* (Colombi *et al.*, 2017) ou encore chez *Pisum sativum* (Croser *et al.*, 2000), pour ne citer que quelques études. Ces observations n'avaient cependant pas encore été faites sur des racines d'*Arabidopsis thaliana* progressant dans des hydrogels de rigidité croissante.

La croissance axiale des racines implique à la fois la prolifération des cellules dans la zone de division et leur expansion anisotrope dans la zone d'élongation. Il a été suggéré que l'inhibition de la croissance racinaire en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques pouvait être attribuée à une diminution du taux de production de cellules et/ou à une expansion longitudinale des cellules plus faible (Bengough *et al.*, 1997; Croser *et al.*, 1999, 2000). En réponse à l'augmentation de la rigidité du milieu de culture, nous avons observé que la longueur de la zone de croissance et notamment de la zone de division semblait être impactée négativement.

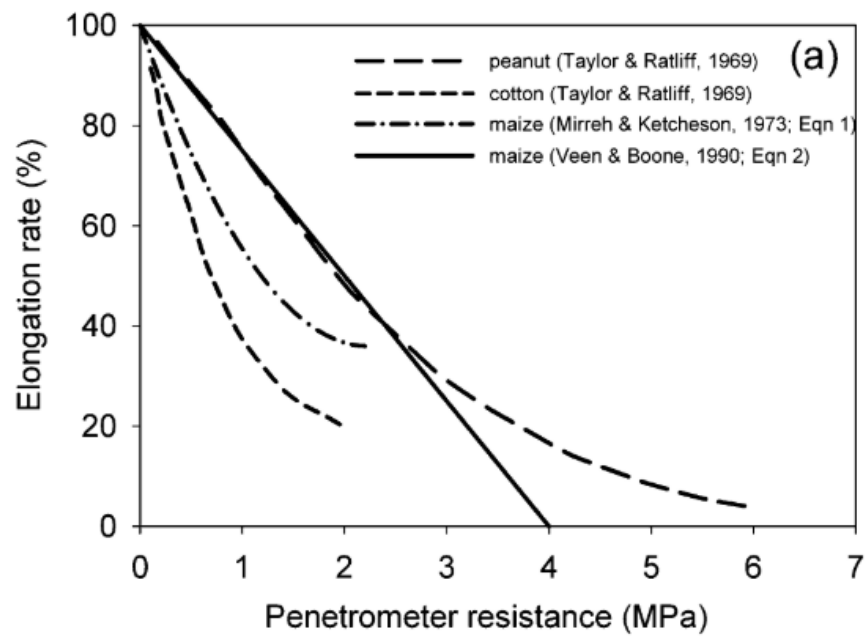


Figure 45 : Taux d'élongation racinaire en fonction de la résistance mécanique du substrat chez plusieurs espèces végétales (d'après Bengough et al., 2011).

Par ailleurs, nous avons observé que la capacité des cellules à s'allonger (EER_{max}) n'était pas affectée de manière significative par l'augmentation de la rigidité du milieu. L'absence de lien entre la vitesse de croissance racinaire et l' EER_{max} a déjà été mentionnée par Bizet (2014) qui avait observé que des racines de peuplier avec un EER_{max} similaire pouvaient avoir des vitesses de croissance très variables. Bien qu'il soit préférable de confirmer ces résultats par une analyse cinématique *in vivo*, nos observations suggèrent que l'inhibition de la croissance en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques dans les gels serait attribuable à une diminution de la production des cellules plutôt qu'à une diminution de leur élongation. Par ailleurs, il a très récemment été démontré que le taux de production de cellules était le principal moteur de la croissance, alors que le taux d'élongation élémentaire promouvait les ajustements à court terme de la croissance racinaire (Youssef *et al.*, 2018).

Notre étude a montré que la relation entre la vitesse de croissance racinaire et la rigidité du milieu était non linéaire. Des relations non linéaires entre le taux d'élongation racinaire et la résistance mécanique à la pénétration du sol ont été observées dans d'autres études, portant sur la cacahuète, le coton ou encore le maïs (Figure 45; Bengough *et al.*, 2011). Cette relation non linéaire pourrait être expliquée par deux hypothèses.

- (I) Une hypothèse a déjà été énoncée selon laquelle l'apex racinaire modifierait sa forme sous une contrainte très importante, libérant les contraintes mécaniques expérimentées à l'apex de la racine et diminuant de fait la perception de ces contraintes par la racine. La diminution de la perception des contraintes à l'apex de la racine permettrait le maintien de l'élongation racinaire en réponse à des contraintes mécaniques élevées (Jin *et al.*, 2013). Cette hypothèse n'a pas encore été réellement confirmée.
- (II) Nos résultats du Chapitre 1 montrent que les milieux rigides sont aussi les plus fragiles. Sous l'action d'une contrainte, il est plus facile d'initier des fissures et de les propager dans le milieu contenant 1,2 % de Phytigel que dans le milieu contenant 0,2 % de Phytigel. Dans les milieux les plus rigides, la racine initierait donc une fissure plus facilement pour progresser tout en allégeant les contraintes mécaniques expérimentées. Ainsi, cela expliquerait que la vitesse de croissance ne soit plus impactée significativement à partir d'une certaine rigidité du milieu.

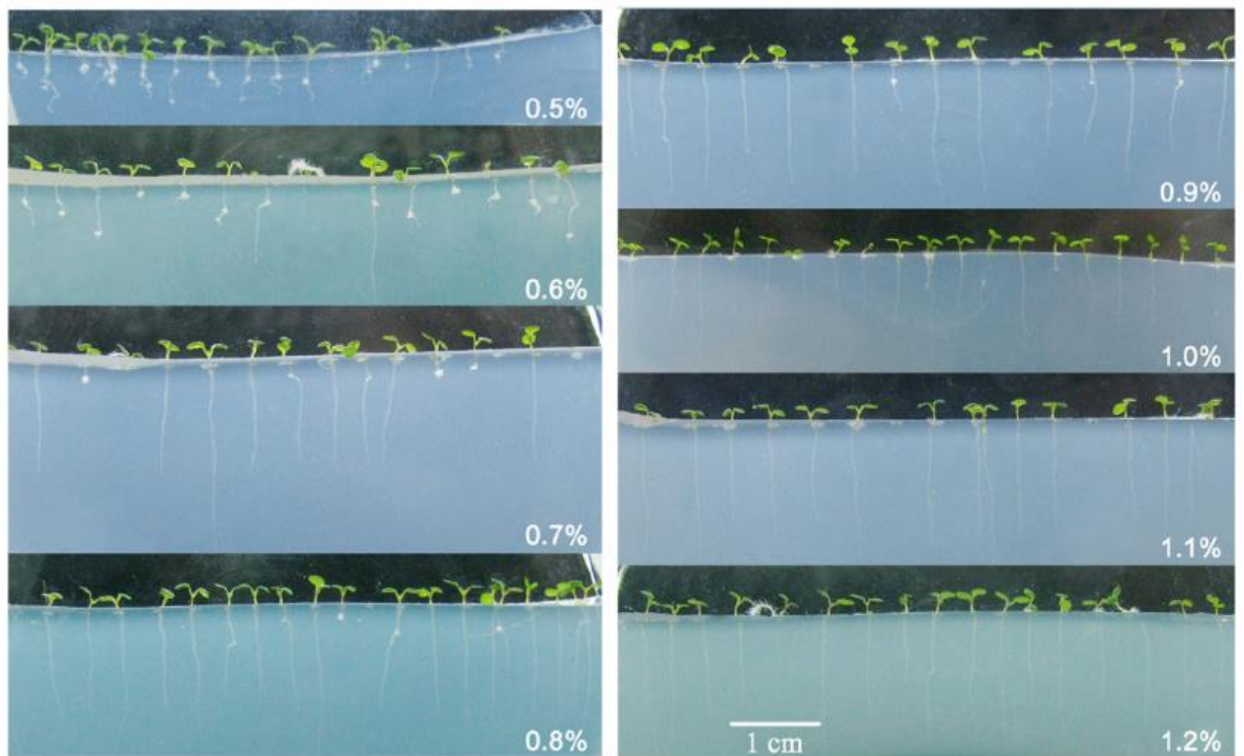


Figure 46 : Croissance hélicoïdale des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* dans des milieux une-couche de concentration en Agar croissante (d'après Yan et al., 2018).

La croissance hélicoïdale des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*, importante dans les milieux contenant 0,5% ou 0,6 % d'Agar, et inhibée en réponse à l'augmentation de la concentration en Agar

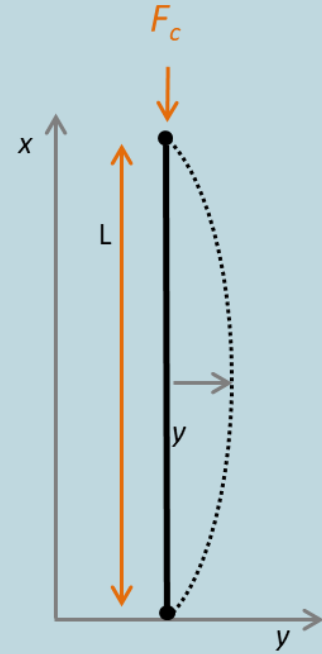
En réponse à une augmentation des contraintes mécaniques homogènes, nous avons observé, en plus de la diminution de la croissance racinaire, une diminution de la déviation de la croissance racinaire et une diminution de la tortuosité. Ces résultats sont contraires aux études précédentes portant sur le sol, qui avaient mis en évidence l'augmentation à la fois des oscillations de croissance et de la tortuosité en réponse à une forte résistance mécanique du sol (Buer *et al.*, 2000; Popova *et al.*, 2016). En revanche, ils concordent avec une étude portant sur la croissance hélicoïdale des racines d'*Arabidopsis thaliana* dans des hydrogels de concentration en Agar croissante (Yan *et al.*, 2018). Cette étude a en effet démontré que l'augmentation de la concentration en Agar dans des gels une-couche favorisait la rectitude racinaire (Figure 46; Yan *et al.*, 2018). Les différences de réponses observées selon le modèle expérimental utilisé pourraient s'expliquer par la grande différence de comportement mécanique entre un sol (matériau granulaire) et un hydrogel (milieu continu). La diminution de la tortuosité en réponse à l'augmentation de la rigidité du milieu encourage notre seconde hypothèse énoncée précédemment. En effet, dans les milieux rigides, si la racine progresse dans des fissures, son déplacement latéral serait plus limité et la racine longerait simplement la fissure, du fait du rapport contraintes radiales / contraintes axiales plus élevé que dans les milieux les moins rigides.

III.2. Les milieux deux-couches permettent une caractérisation mécanique partielle des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

Dans les milieux deux-couches, les racines progressent dans une couche supérieure de faible résistance mécanique avant d'entrer en contact avec la surface de la couche inférieure, impliquant une augmentation de la résistance mécanique à la pénétration. De la concentration en Phytigel de la couche inférieure dépend l'augmentation de la résistance à la pénétration et ainsi la force que les racines doivent générer pour induire la rupture de l'interface et pénétrer la couche inférieure. Nous avons estimé que la force de croissance maximale que les racines étaient capables de générer était de l'ordre de 10^{-3} N. Cette force est du même ordre de grandeur que la force critique mesurée chez les racines adventives de peuplier cultivées en hydroponie (Bizet *et al.*, 2016). Bizet *et al.* (2016) ont démontré une corrélation fortement linéaire (de rapport 1:1) entre la force de croissance axiale critique et la force critique de flambement des racines. Selon la loi d'Euler, la force critique de flambement d'une racine qui s'apparente à une poutre élancée, dépend du diamètre, de la longueur de flambement et de la rigidité de la racine (Box 4.1).

Box 4.1 : Flambement d'une poutre élancée

Lorsqu'une poutre élancée est sollicitée en compression dans le sens de sa plus grande longueur, elle peut se retrouver dans un état d'instabilité et passer de l'état mécanique de compression normale à un état de flexion. En pratique, une très légère déviation de l'effort de compression ou un léger défaut dans la géométrie de la poutre engendrent un petit moment de flexion qui, par géométrie, va s'amplifier et générer de grands déplacements. La théorie de résistance des matériaux (RDM) permet de prédire la force critique F_c à partir de laquelle cette instabilité se produit.



Equations :

$$-EIy'''' = F_c y'' \quad (1)$$

$$-EIy'' = F_c y \quad (2)$$

$$y'' = -\frac{F_c}{EI} y = -\omega^2 y \quad (3)$$

$$y = A + B \cos \omega x + C \sin \omega x \quad (4)$$

Avec E le module d'Young de la poutre et I le moment de flexion qui dépend de la géométrie de la poutre. Pour une poutre cylindrique de diamètre d , I se définit par :

$$I = \frac{\pi d^4}{64} \quad (5)$$

Les conditions limites imposent :

$$y(0) = 0 \Rightarrow A = B = 0 \quad (6)$$

$$y(L) = 0 = C \sin \omega L \Rightarrow \omega L = k\pi F_c = k^2 \frac{\pi^2 EI}{L^2} \quad (7)$$

On obtient alors l'équation de premier ordre :

$$F_c = k^2 EI \frac{\pi^2}{L^2} \quad (8)$$

Pour une poutre articulée-articulée (exemple), $k = 1$

Pour une poutre encastree-articulée, $k = 2$

$$\text{pour } k = 1 \text{ alors } F_c = \frac{\pi^2 EI}{L^2} \quad (9)$$

Pour calculer la rigidité E de la poutre à partir de la force critique F_c :

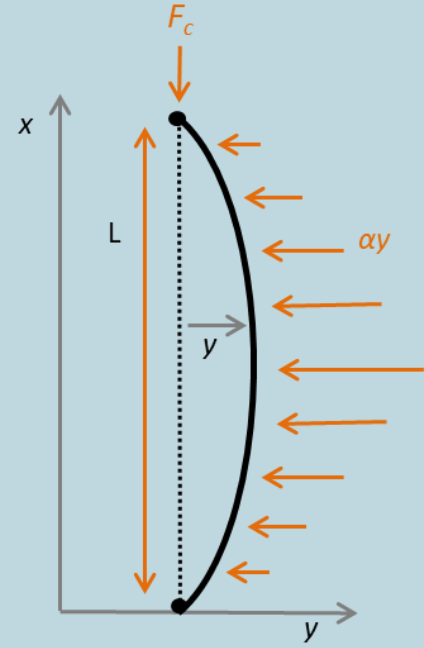
$$E = F_c \frac{L^2}{\pi^2 I} \quad (10)$$

Cette affirmation est vraie pour une poutre qui n'est pas contrainte latéralement. Grâce à cette loi, Bizet *et al.* (2016) ont estimé la rigidité des racines de peuplier à 32 MPa à partir de la force de croissance critique qu'ils avaient mesuré. Si l'on applique cette relation (Box 4.1, équation 9) aux racines d'*Arabidopsis* que nous avons étudiées, en estimant que le diamètre racinaire est de 130 μm en moyenne et que la longueur totale de la racine est de 10 mm environ (la hauteur de la couche supérieure de milieu), nous obtenons une rigidité de l'ordre de 400 MPa. D'après ces estimations, la rigidité des racines d'*Arabidopsis* serait très importante par rapport à celle des racines de peuplier, mais aussi par rapport à celles de l'orge, de la luzerne, du soja, du tournesol, du blé, du maïs qui ont toutes présenté une rigidité située entre 10 et 100 MPa (Whiteley and Dexter, 1981; Loades *et al.*, 2013).

Les précédentes mesures de rigidité des racines ont été menées soit *in vivo* sur des racines en hydroponie, soit *via* des tests de traction réalisés sur des apex racinaires excisés (Whiteley and Dexter, 1981; Bizet *et al.*, 2016). Dans nos conditions expérimentales, les racines progressent dans une couche supérieure de milieu qui offre un support aux poils absorbant pour ancrer la racine dans son milieu environnant. Cet ancrage implique une diminution de la longueur de la racine L_R à prendre en compte dans le calcul. Nous pouvons estimer que la longueur à prendre en compte, *i.e.* la longueur de la portion non ancrée de la racine, est équivalente à la distance séparant l'extrémité de la coiffe de la fin de la zone d'élongation. En réalisant les profils de vitesse et d'EER sur des racines ayant progressé dans un milieu une-couche contenant 0,2 % de Phytigel, nous avons estimé que la zone de croissance mesurait en moyenne 920 μm à partir du centre quiescent. En ajoutant la longueur du centre quiescent à l'extrémité de la coiffe, la longueur de la portion non ancrée des racines peut être estimée à environ 1 mm. En prenant en compte cette longueur dans le calcul précédent, la valeur de la rigidité des racines d'*Arabidopsis* approche des 10 MPa, ce qui est plus cohérent avec les précédentes études. Enfin, dans notre système expérimental, la couche de milieu supérieure confine la racine sur toute sa circonférence. Ce milieu impose des forces latérales qui s'opposent au flambement de la racine et qui s'apparentent à des forces de rappel. La force de rappel locale imposée à la racine est proportionnelle au déplacement latéral de la racine et à la rigidité de la couche supérieure de milieu (Box4.2). En agrégeant la relation précédente de la force critique de flambement (Box4.1) avec les forces de rappel latérales, nous pouvons en déduire que la force critique de flambement de la racine qui progresse dans un milieu deux-couches est dépendante non seulement de la rigidité, de la longueur et du diamètre de la racine mais également de la rigidité de la couche supérieure de milieu et de la surface de contact entre ce milieu et la

Box 4.2 : Flambement d'une poutre élancée plongée dans un milieu élastique

Si la poutre est plongée dans un milieu élastique, tout déplacement latéral de la poutre se traduit par l'ajout d'une force linéique latérale de rappel qui va tendre à ramener la poutre à son état vertical initial. Le milieu agit donc localement comme des petits ressorts de rappel. La force de rappel locale est donc proportionnelle au déplacement latéral de la poutre. Elle est aussi proportionnelle à la rigidité du milieu et donc au module d'Young du milieu environnant. La solution de ce problème de mécanique a été proposée par Landau et Lifshitz (Landau L.D et Lifshitz E.M., Theory of elasticity, vol. 7, Pergamon Press)



(10)

L'équation (1) devient alors

$$-EIy'''' = F_c y'' + \alpha y$$

Avec αy la force latérale de rappel linéique exercée par le milieu en tout point de la poutre. Or, on peut calculer cette force de rappel en fonction de la rigidité du matériau environnant :

$$dF = \sigma ds = \sigma P dl = y E_m P dl$$

avec P la longueur caractéristique de la surface de contact où s'applique la force de rappel du milieu sur la poutre, E_m le module d'Young du milieu élastique environnant, σ la pression de rappel exercée par le sol sur la poutre et dS l'élément de surface de la poutre sur laquelle s'exerce la force de rappel.

Reporté dans l'équation 10, on peut donc écrire :

$$-EIy'''' = F_c y'' + E_m P y \quad (11)$$

La résolution de cette équation par Landau indique que la condition sur la force critique nécessaire au flambage de la poutre s'écrit :

$$F_c = \frac{\pi^2 EI}{L^2} \left(k^2 + \frac{E_m P L^4}{k^2 \pi^4 EI} \right) \quad (12)$$

En développant l'équation, on peut aussi la lire comme ceci :

$$F_c = \frac{\pi^2 EI}{L^2} + \frac{E_m P L^2}{\pi^2} \quad (13)$$

Le calcul de la rigidité de la poutre à partir de la force critique s'écrit donc :

$$E = \left(F_c - \frac{E_m P L^2}{\pi^2} \right) \frac{L^2}{\pi^2 I} \quad (14)$$

racine (Box4.2, équation 12). Ainsi, la force critique de flambement augmente avec la rigidité du milieu (Box4.2) Cette déduction a été observée expérimentalement par Bizet *et al.* (2016), qui ont estimé que les racines de peuplier génèrent une force jusqu'à 15 fois supérieure lorsqu'elles progressaient dans une aiguille qui les contraignait latéralement. La prise en compte de la rigidité de la couche supérieure de milieu implique une diminution de notre précédente estimation de la rigidité des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* (Box3.2, équation 14). Pour aller plus loin, il serait intéressant de mesurer expérimentalement la rigidité et le coefficient de poisson des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*.

III.3. La réponse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales implique à la fois des mécanismes passifs et actifs

→ *La vitesse de croissance est affectée à plus ou moins long terme en réponse à l'augmentation des contraintes axiales*

Dans les milieux deux-couches, après avoir progressé dans la couche de milieu supérieur, les racines entrent en contact avec l'interface et la déplacent tout en croissant en direction du vecteur de gravité. Quelle que soit l'augmentation de la résistance mécanique du milieu imposée par l'interface, une diminution de la vitesse de croissance des racines a été observée lors de cette phase de déformation de l'interface. Cette diminution de vitesse de croissance est non significative dans les milieux présentant la plus faible augmentation de résistance (0,2-0,2) alors qu'elle est importante dans les milieux présentant une plus forte augmentation de la résistance mécanique (0,2-0,3 et 0,2-0,5). Ces observations suggèrent que la déformation de l'interface entraîne une accumulation des contraintes mécaniques axiales à l'apex racinaire, qui dépend de la concentration en Phytigel de la couche inférieure. Pour les racines qui parviennent à induire la rupture de l'interface, un recouvrement de la vitesse de croissance initiale a été observé dans l'heure suivant la pénétration dans la couche inférieure de milieu. La rupture de l'interface, permettant la pénétration, entraîne le relâchement partiel des contraintes imposées à l'apex racinaire, comme il a pu être observé lors des tests de pénétrométrie. La rapidité de recouvrement de la vitesse de croissance en réponse à la diminution des contraintes mécaniques axiales suggère que la diminution de vitesse de croissance était au moins en partie due à une contraction longitudinale des cellules. En revanche, les racines qui ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu ne semblent pas retrouver leur vitesse de croissance initiale.

Après avoir atteint leur force axiale critique, une zone de courbure est initiée chez ces racines et l'apex est plus ou moins dévié, suggérant une transition partielle des contraintes mécaniques axiales vers des contraintes radiales asymétriques. L'absence de recouvrement de la vitesse de croissance après relâchement partiel des contraintes mécaniques axiales après déviation de l'apex des racines suggère une perception de ces contraintes qui permettrait la mise en place d'une réponse de croissance.

Ainsi, l'inhibition de la croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques axiales pourrait impliquer à la fois une contraction des cellules d'origine mécanique et la régulation active des mécanismes de croissance. Bizet *et al.* (2016) ont également observé une diminution voir un arrêt de la croissance chez les racines adventives de peuplier confrontées à un obstacle flexible. En accord avec notre hypothèse, leur étude a permis d'observer que la diminution de vitesse de croissance était accompagnée d'une diminution de 30 % de la longueur de la zone de croissance et d'une contraction des cellules au début de la zone mature, suggérant le couplage de processus actifs et passifs (Bizet *et al.*, 2016).

➔ *La réorientation de l'apex racinaire serait déclenchée par un flambement qui serait ou non suivi d'une réponse active*

Lorsque les racines ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu, que ce soit dans le milieu 0,2-0,3 ou 0,2-0,5, une première zone de courbure est mise en place une fois que la racine a atteint une force de croissance axiale « seuil » pour déplacer l'interface. Pour comprendre si cette première zone de courbure, point de départ de la réorientation de la croissance racinaire, est le résultat d'un processus actif ou simplement d'un flambement, sa cinétique de mise en place peut être comparée à celle de la courbure gravitropique résultant d'une élongation différentielle des cellules de part et d'autre de la racine. Après une inclinaison à 90° des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*, la courbure gravitropique est initiée à partir d'une demi-heure après stimulus mais sa mise en place progressive est achevée après plus de 4 heures (Baldwin *et al.*, 2013). Dans notre cas, la première zone de courbure est initiée plus d'une heure après contact avec l'interface mais le délai pour atteindre sa forme finale est court, de l'ordre de l'heure. Par ailleurs, ce type de courbure a déjà été observé chez les racines de *Medicago truncatula* progressant dans des milieux deux-couches de concentration en Agar croissante (Silverberg *et al.*, 2012).

Dans cette étude, les auteurs ont modélisé le flambement d'une poutre fine en appliquant la théorie des poutres et ont comparé les modes de flambement obtenus par modélisation aux courbures observés chez les racines de *Medicago truncatula*. Selon leur étude, la formation des zones de courbure serait expliquée par une combinaison entre un flambement hélicoïdal et une torsion simultanée de l'apex racinaire (Silverberg *et al.*, 2012). Ces arguments suggèrent que la mise en place de la première zone de courbure serait au moins en partie déclenchée par un flambement.

A la suite de l'initiation de la première zone de courbure, selon l'augmentation de résistance mécanique considérée, une déviation de l'apex peut être observée. Face à une augmentation intermédiaire de la résistance mécanique, l'apex n'est pas dévié et la croissance axiale de l'apex racinaire se poursuit, induisant l'initiation de nouvelles zones de courbures. L'initiation successive de ces zones de courbures entraîne la formation de boucles. Face à la plus forte augmentation de la résistance mécanique, la déviation de l'apex est suivie de la mise en place d'une deuxième zone de courbure dont les caractéristiques sont distinctes de celles de la première zone de courbure et qui donne à la racine une forme de marche. Ainsi, il semblerait que la déviation de l'apex conditionne la suite de la réorientation de la racine. Or, le fait que l'apex soit dévié ou non semble être déterminé par la résistance mécanique à la pénétration de l'interface. Une interface de résistance mécanique intermédiaire permet à l'apex racinaire de déplacer l'interface de façon conséquente. Ainsi, l'apex se retrouve contraint axialement et latéralement par l'interface, ce qui prévient sa déviation après courbure de la racine. En revanche, une interface de résistance mécanique plus élevée est peu déformée par l'apex racinaire qui est alors libre de dévier à la suite de la première courbure.

Lorsque l'apex est dévié, la mise en place de la deuxième zone de courbure permet à l'apex racinaire de se réorienter en direction du vecteur de gravité. La forme finale de la racine en marche, grâce à la formation des deux zones de courbures, a déjà été observée chez les racines d'*Arabidopsis thaliana* confrontées à un obstacle rigide et a été décrite comme le résultat de l'interaction entre la réponse gravitropique et la réponse au contact (Massa and Gilroy, 2003). En effet, il a été mis en évidence chez des racines agravitropiques que la seconde zone de courbure était moins intense (Massa and Gilroy, 2003). De plus, nous avons observé que, contrairement à la précédente, cette seconde zone de courbure se déplaçait avec l'apex racinaire lors de la croissance le long de l'interface.

L'ensemble de ces observations suggèrent que la seconde zone de courbure est établie de façon active, vraisemblablement *via* une croissance différentielle de part et d'autre de la racine, et qu'elle est au moins en partie attribuée à la réponse gravitropique de l'apex racinaire.

Chapitre 3 : Implication de la coiffe racinaire dans la mise en place des réponses à une augmentation des contraintes mécaniques

Le deuxième objectif de cette thèse est d'étudier le rôle de la coiffe racinaire dans la mise en place des réponses des racines à une augmentation des contraintes mécaniques. Plusieurs études illustrent une participation importante de la coiffe dans la progression de la racine dans un sol (Iijima and Kono, 1992; Bengough and McKenzie, 1997; Iijima *et al.*, 2003b; Potocka *et al.*, 2011). Tout d'abord, il a été mis en évidence que la production et la sécrétion de mucilage par les cellules de la coiffe permet de diminuer les frottements entre la racine et le milieu environnant, facilitant ainsi la progression racinaire dans un sol compacté ou résistant (Iijima *et al.*, 2003a,b). Ensuite, de par sa position à l'extrémité de la racine, la coiffe contribue très largement à la forme de l'apex racinaire. Or, la forme de l'apex racinaire influence la distribution des contraintes mécaniques axiales imposées à l'apex racinaire (Ruiz *et al.*, 2016; Colombi *et al.*, 2017). Il a été montré chez les racines de blé que la géométrie de l'apex racinaire était corrélée au taux d'élongation de ces racines dans un sol compact, les racines avec un apex pointu progressant plus vite que celles avec un apex en dôme ou émoussé (Iijima *et al.*, 2003a,b; Colombi *et al.*, 2017). Il est aussi important de noter que la coiffe présente une homéostasie dans sa taille, sa forme et son nombre de cellules (Barlow, 2003).

Sur la base des précédentes études, nous avons émis l'hypothèse que la coiffe racinaire, de par sa taille et sa forme, influence la progression racinaire face à une forte résistance mécanique. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les réponses à une augmentation des contraintes mécaniques de racines issues des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* *fez-2*, *smb-3*, et *brn1-1 brn2-1*. Les gènes *FEZ*, *SMB*, *BRN1* et *BRN2* codent des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la division, de la différenciation et de la desquamation des cellules de la coiffe racinaire. Leur mutation respective entraîne des altérations de la forme et du nombre de cellules de la coiffe racinaire, sans toutefois présenter de phénotype en dehors de la coiffe.

Après avoir caractérisé la morphologie et la géométrie de l'apex des racines de chacune des lignées transgéniques, nous avons analysé d'une part la réponse gravitropique et d'autre part la croissance et l'orientation de l'apex des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans les milieux une-couche et deux-couches. La comparaison des réponses des racines transgéniques avec celles des racines sauvages (Col-0) nous a permis de mieux comprendre la nature du rôle de la coiffe dans la réponse des racines à une augmentation à court terme ou à long terme des contraintes mécaniques.

I. Caractérisations morphologiques de l'apex des racines primaires des lignées d'*Arabidopsis thaliana* *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*

I.1. Méthodes : caractérisation du diamètre, de la longueur et de la géométrie de la coiffe racinaire

Les graines des lignées de perte d'expression *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* nous ont été fournies par l'équipe de B.Scheres (Willemsen *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2010, 2014). Les lignées mutantes ont été obtenues par des insertions T-DNA (Lignées Salk). L'insertion *fez-2* (SALK_025663) est localisée dans le second intron du gène *FEZ*, et résulte en un allèle nul (Willemsen *et al.*, 2008). L'insertion *smb-3* (SALK_143526) est localisée juste après le premier exon du gène *SMB*, produisant également un allèle nul (Willemsen *et al.*, 2008). Enfin, pour le double mutant *brn1-1 brn2-1*, une insertion (SALK_151986) est localisée dans le troisième exon du gène *BRN1* et la deuxième insertion (SALK_151604) est localisée dans le premier exon du gène *BRN2*. Comme les précédentes, ces insertions entraînent la formation d'un codon stop et rendent les allèles *brn1-1* et *brn2-1* nuls (Bennett *et al.*, 2010).

Les racines issues des lignées *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* ont été étudiées au travers de différentes caractérisations phénotypiques : des mesures de diamètre, une caractérisation de la taille et de la géométrie de la coiffe racinaire. Pour ces caractérisations, du milieu de culture MS ½ contenant 0,5 % (p/v) de Phytigel a été préparé puis coulé en conditions stériles dans des boîtes de Petri. Les graines issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* ont été stérilisées et déposées à la surface du milieu de culture.

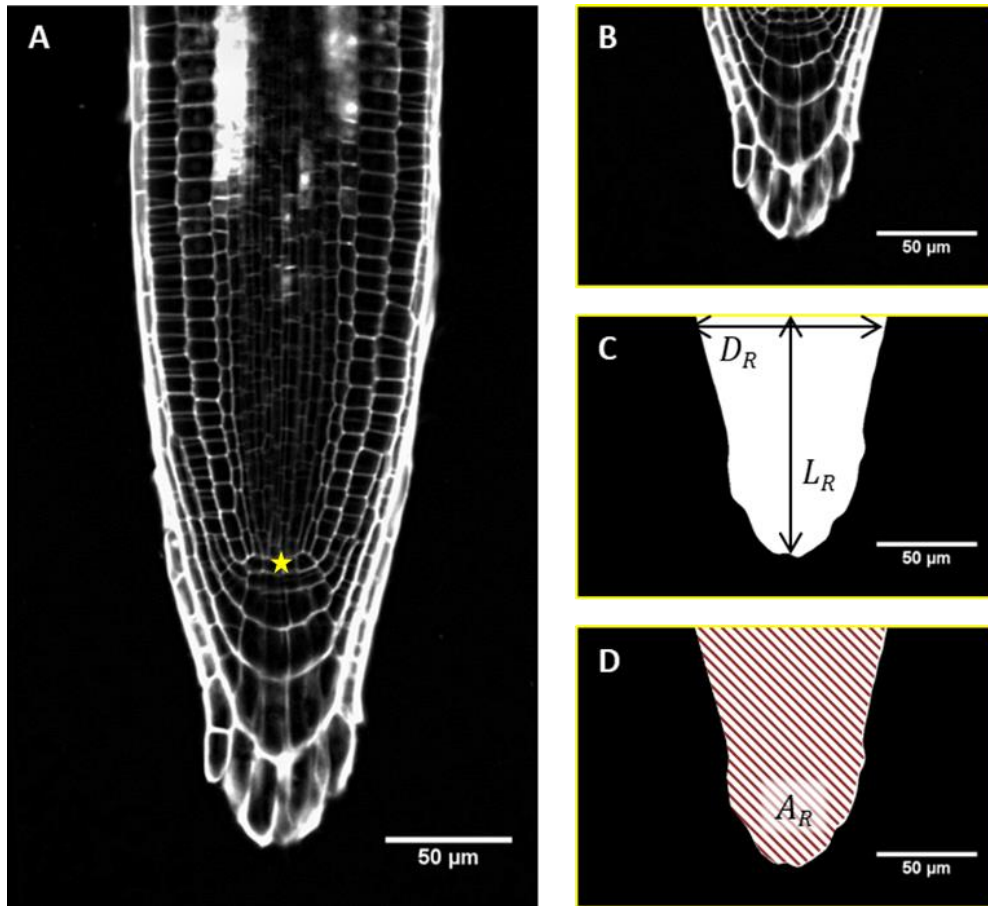


Figure 47 : Etapes illustrant la caractérisation morphologique de l'apex des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*.

(A) Plan médian longitudinal de l'apex d'une racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* Col-0, après coloration avec la technique mPS-PI et observation au microscope confocal à balayage laser. Le diamètre des racines est mesuré au niveau du centre quiescent (QC), indiqué par une étoile jaune, et à 500 μm de l'apex, au niveau de la zone d'élongation (EZ). (B) Région issue du plan médian longitudinal de l'apex racinaire conservée pour l'analyse de la géométrie de l'apex. (C) Image seuillée qui permet de délimiter les contours de l'apex racinaire. Le diamètre au niveau du centre quiescent D_R et la longueur de la coiffe L_R sont mesurés sur chaque racine. (D) Aire de l'apex racinaire A_R considérée pour le calcul de l'inverse Sharpness Index (iSI).

Après cinq jours en chambre de culture, les racines ont été prélevées et traitées selon une technique nommée « modified Pseudo-Schiff Propidium Iodide » (mPS-PI) et décrite par Truernit *et al.* (2008). Les racines ont tout d'abord été incubées à 4 °C pendant au minimum 12 h dans une solution contenant 50 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique glacial. Après cette étape de fixation, les racines ont été incubées une première fois dans une solution d'acide périodique à 1 % (v/v) pendant 40 minutes à température ambiante et une seconde fois dans du réactif de Schiff pendant 1 à 2 h. Le réactif de Schiff contient 100 mL de sodium métabisulfite, 0,15N de HCl et 100 µg.mL⁻¹ de PI (Iodure de Propidium). Après coloration, les racines ont été déposées sur une lame de microscopie et recouvertes d'une solution de chloral hydrate contenant 4 g de chloral hydrate, 1 mL de glycérol et 2 mL d'eau. Les lames ont été conservées la nuit à température ambiante dans un environnement humide après quoi, l'excès de chloral hydrate a été supprimé. Quelques gouttes d'une solution de Hoyer, contenant 30 g de gomme arabique, 200 g de chloral hydrate, 20 g de glycérol et 50 mL d'eau, ont été déposées sur les racines qui ont ensuite été recouvertes d'une lamelle e verre.

Après trois jours, les racines ont été observées avec un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM 800) avec un objectif x20. A partir du plan longitudinal médian de chacune des racines, la zone de la racine localisée entre le centre quiescent et la pointe de la racine a été sélectionnée (Figure 47A, B). En utilisant le logiciel d'analyse d'image Fiji, un seuillage de l'image a été réalisé pour obtenir une image binaire contenant uniquement des pixels blancs ou noirs (Figure 47C). Le seuillage permet au logiciel de repérer les limites de l'apex racinaire et ainsi d'extraire des images différents paramètres tels que l'aire de la zone considérée (zone blanche), son périmètre, sa plus grande longueur et sa plus grande largeur. La plus grande longueur correspond à l'axe vertical L_R allant du centre quiescent jusqu'à l'extrémité de la coiffe et la plus grande largeur correspond au diamètre D_R de la racine au niveau du centre quiescent (Figure 47C). A partir de ces mesures, un indice d'acuité de l'apex racinaire, que l'on appellera *inverse Sharpness Index (iSI)* a été calculé selon la formule suivante :

$$iSI = \frac{A_R - (L_R * D_R)/2}{L_R * D_R - (L_R * D_R)/2} \quad (18)$$

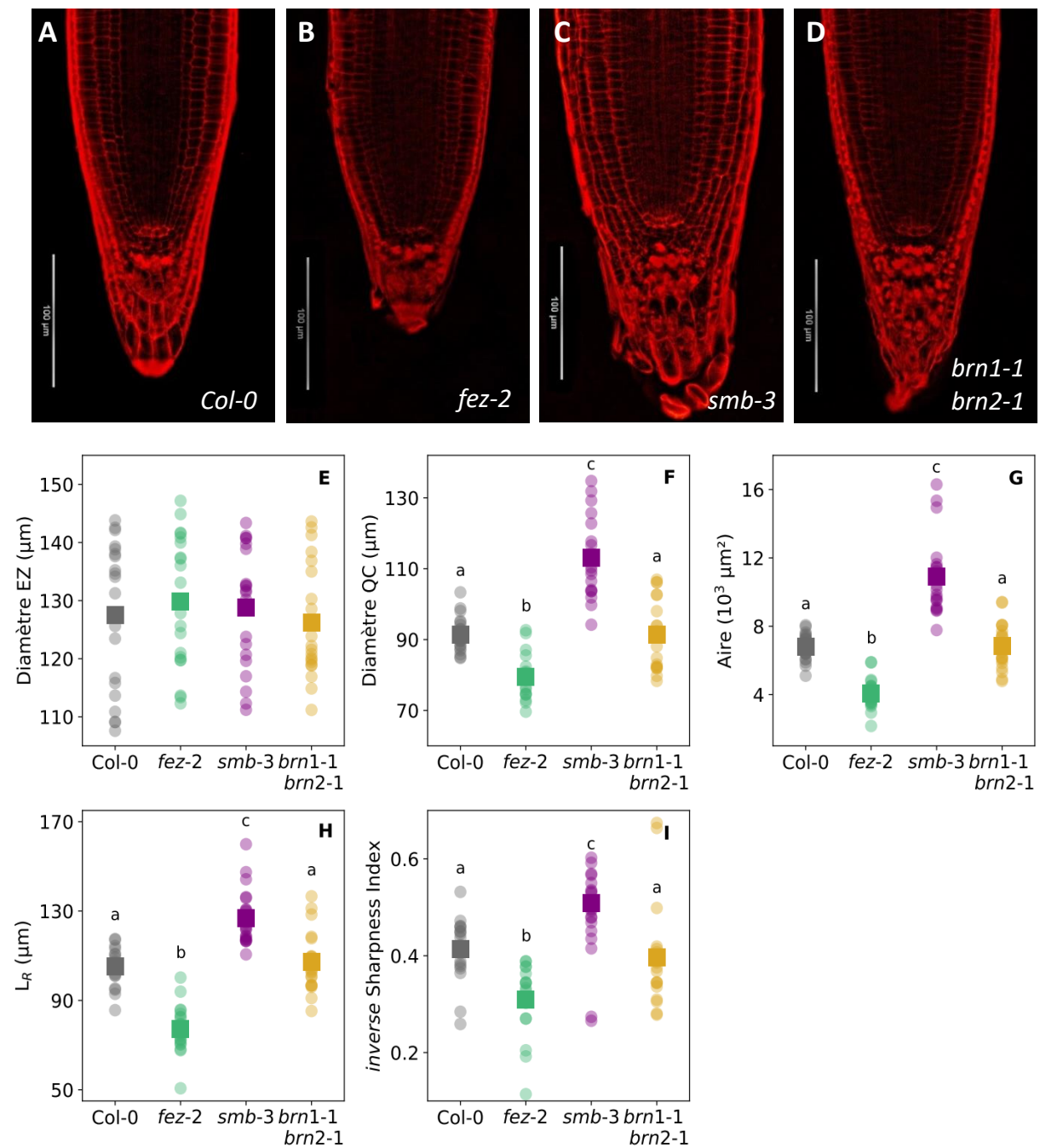


Figure 48 : Caractérisation de l'apex des racines de la lignée sauvage Col-0 et des lignées transgéniques *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*.

(A-D) Plan médian longitudinal issu de l'observation en microscopie confocale à balayage laser des racines Col-0 (A), *fez-2* (B), *smb-3* (C) et *brn1-1 brn2-1* (D). Les barres blanches correspondent à 100μm. (E-I) Paramètres extraits de l'analyse des images des apex racinaires issus des 4 lignées. (E) Diamètre au niveau de la zone d'élongation, à 500μm de l'apex. (F) Diamètre au niveau du centre quiescent. (G) Aire de l'apex racinaire du centre quiescent à l'extrémité de l'apex. (H) Longueur L_R du centre quiescent à l'extrémité de la coiffe. (I) Indice iSI de géométrie de l'apex. Les ronds indiquent les valeurs individuelles, les carrés indiquent les valeurs moyennes, n=20. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes (P<0,05, ANOVA I et test de Tukey).

Où A_R est l'aire de l'apex racinaire du centre quiescent jusqu'à l'extrémité de la coiffe (Figure 47D). Comme son nom l'indique, un faible iSI indique un apex de géométrie pointue et un fort iSI indique un apex de géométrie plus rectangulaire. L' iSI a été calculé pour 20 racines de chacune des quatre lignées étudiées. Les images microscopiques ont également été utilisées pour mesurer le diamètre des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* au niveau du centre quiescent (noté QC) et à une distance de 500 μm de l'extrémité racinaire, au niveau de la zone d'élongation (noté EZ).

I.2. La taille et la géométrie de la coiffe sont altérées chez les racines *fez-2*, et *smb-3* mais pas chez les racines *brn1-1 brn2-1*

La fonction des gènes *FEZ*, *SMB*, *BRN1* et *BRN2* ainsi que les conséquences de leur mutation sur l'organisation de la coiffe racinaire d'*Arabidopsis thaliana* ont été précisément décrites par l'équipe de B.Scheres (Willemsen *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2010, 2014). La mutation du gène *FEZ* conduit à la formation chez les racines *fez-2* d'une coiffe caractérisée par un nombre restreint d'assises cellulaires (Figure 48B) par rapport à la coiffe de la lignée sauvage d'*Arabidopsis* (Figure 48A). En effet, la coiffe des racines *fez-2* comporte généralement une seule couche cellulaire de coiffe latérale (3 couches chez les racines Col-0) et une couche cellulaire de columelle en moins par rapport aux racines sauvages. A l'opposé, la mutation de *SMB* entraîne une accumulation ectopique de cellules indifférenciées de la columelle et de cellules de coiffe latérale sur la couche la plus externe de la coiffe (Figure 48C). La coiffe du mutant *smb-3* comporte une couche cellulaire additionnelle de cellules indifférenciées de la columelle et la couche de coiffe latérale la plus externe remonte jusqu'à la fin de la zone d'élongation. Enfin, le double-mutant *brn1-1 brn2-1* se caractérise par une accumulation importante de cellules matures de la columelle qui ont la particularité de ne pas être desquamées. La double mutation n'a en revanche pas d'effet sur l'organisation et la formation des cellules de la coiffe latérale. Mise à part l'accumulation des cellules matures, la coiffe du double mutant est donc organisée de façon similaire à celle des racines sauvages.

A partir des images des coupes longitudinales médianes de l'apex racinaire, j'ai mesuré le diamètre des racines au niveau de la zone d'élongation. Le diamètre moyen des racines obtenu est de l'ordre de 130 μm et n'est pas significativement différent entre les lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*, suggérant que les mutations n'altèrent pas l'organisation radiale de la racine (Figure 48E).

En revanche, le diamètre moyen au niveau du centre quiescent (D_R) correspond à $91 \pm 1 \mu\text{m}$ pour les racines Col-0, $79 \pm 1 \mu\text{m}$ pour les racines *fez-2*, $113 \pm 2 \mu\text{m}$ pour les racines *smb-3* et $91 \pm 2 \mu\text{m}$ pour les racines *brn1-1 brn1-2* (Figure 48F). Ainsi, comparés aux racines sauvages, l'apex des racines *fez-2* est significativement plus étroit alors que l'apex des racines *smb-3* est significativement plus large. En revanche, aucune différence de diamètre n'est observée chez les racines *brn1-1 brn2-1*. Dans le même sens, l'aire transversale de l'apex ainsi que la longueur du centre quiescent jusqu'à l'extrémité de la coiffe (L_R) sont significativement plus faibles chez les racines *fez-2* et significativement plus importantes chez les racines *smb-3* par rapport aux racines sauvages et aux racines *brn1-1 brn2-1* (Figure 48G, H).

La géométrie de l'apex racinaire, et plus précisément son acuité a été analysée par la détermination de l'*inverse* Sharpness Index (iSI). L'iSI moyenne obtenu est de $0,41 \pm 0,01$ à l'apex des racines sauvages, indiquant que l'apex de ces racines a une forme légèrement plus proche du triangle que du rectangle (Figure 48I). Chez les racines *brn1-1 brn2-1*, l'iSI moyen est de $0,40 \pm 0,02$ et n'est pas significativement différent de celui des racines sauvages (Figure 48I). L'apex des racines *fez-2* est caractérisé par un iSI moyen de $0,31 \pm 0,01$, significativement plus faible que celui obtenu pour les racines sauvages, illustrant une géométrie plus proche d'un triangle (Figure 48I). Au contraire, l'apex des racines *smb-3* présentent un iSI de $0,51 \pm 0,03$, significativement plus important que celui obtenu pour les racines sauvages et illustrant une géométrie plus rectangulaire (Figure 48I).

Ainsi, contrairement à la double mutation *brn1-1 brn2-1*, les mutations de *FEZ* et *SMB* conduisent à une modification de la taille et de la géométrie de l'apex des racines. Nous disposons donc d'une lignée mutante *fez-2*, caractérisée par un apex de taille réduite et de forme pointue. A l'opposé, les racines du mutant *smb-3* présentent une coiffe de plus grande taille et de forme rectangulaire. Les coiffes des racines de la lignée mutante, *brn1-1 brn1-2*, possèdent des caractéristiques proches de celles de la lignée sauvage Col-0.

II. Réponse gravitropique des racines primaires des lignées *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*

II.1. Méthode : Analyse de la réponse gravitropique

Pour observer la réponse gravitropique des racines issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*, du milieu MS ½ contenant 0,5 % de Phytigel a été préparé et coulé en conditions stériles dans des boîtes de Petri rectangulaires. Les graines ont été stérilisées puis déposées à la surface du milieu de culture sur deux rangées, à raison de 8 graines par rangée. Trois boîtes de Petri ont ainsi été préparées par génotype. Après cinq jours dans la chambre de culture, les boîtes de Petri placées préalablement à la verticale ont été retournées à -90° et placées devant les appareils photos présentés dans le Chapitre 2. Pour cette expérimentation, les bagues allongées entre l'objectif et le boîtier ont été retirées et les appareils photos ont été placés à 37 cm des boîtes de Petri, résultant en une échelle après mise au point de 70,3 pixels. mm⁻¹. Les prises de vue ont été automatisées toutes les 5 min pendant 500 min. Les prises de vue séquentielles ont ensuite été prétraitées à l'aide de Rawtherapee et traitées à l'aide de RootStem Extractor comme nous l'avons décrit dans le Chapitre 2. La longueur des racines et l'angle de l'apex ont été extraits sur chacune des images. L'extraction de la longueur des racines au cours du temps a permis de calculer la vitesse de croissance des racines au cours de la réponse gravitropique. L'extraction de l'angle de l'apex racinaire au cours du temps m'a permis de calculer la vitesse de réorientation de l'apex pour chacune des lignées. A partir de ces données, la réponse gravitropique $\tilde{\Delta}$ des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* a été estimée, en se basant sur le modèle proposé par l'équipe MECA et validé sur les tiges de coléoptiles (Chauvet *et al.*, 2016). Ce modèle se définit par le rapport suivant :

$$\tilde{\Delta} = R_{EZ} \frac{d\theta_{apex}/dt}{dL/dt} \quad (19)$$

Où R_{EZ} est le rayon de la racine dans la zone de courbure, *i.e.* dans la zone d'élongation, θ_{apex} est l'angle de l'apex, et L est la longueur de la racine. Dans cette relation, $d\theta_{apex}/dt$ correspond à la vitesse de réorientation des racines (en rad.min⁻¹) et dL/dt correspond à la vitesse de croissance des racines (en µm.min⁻¹). La réponse gravitropique $\tilde{\Delta}$ est sans dimension.

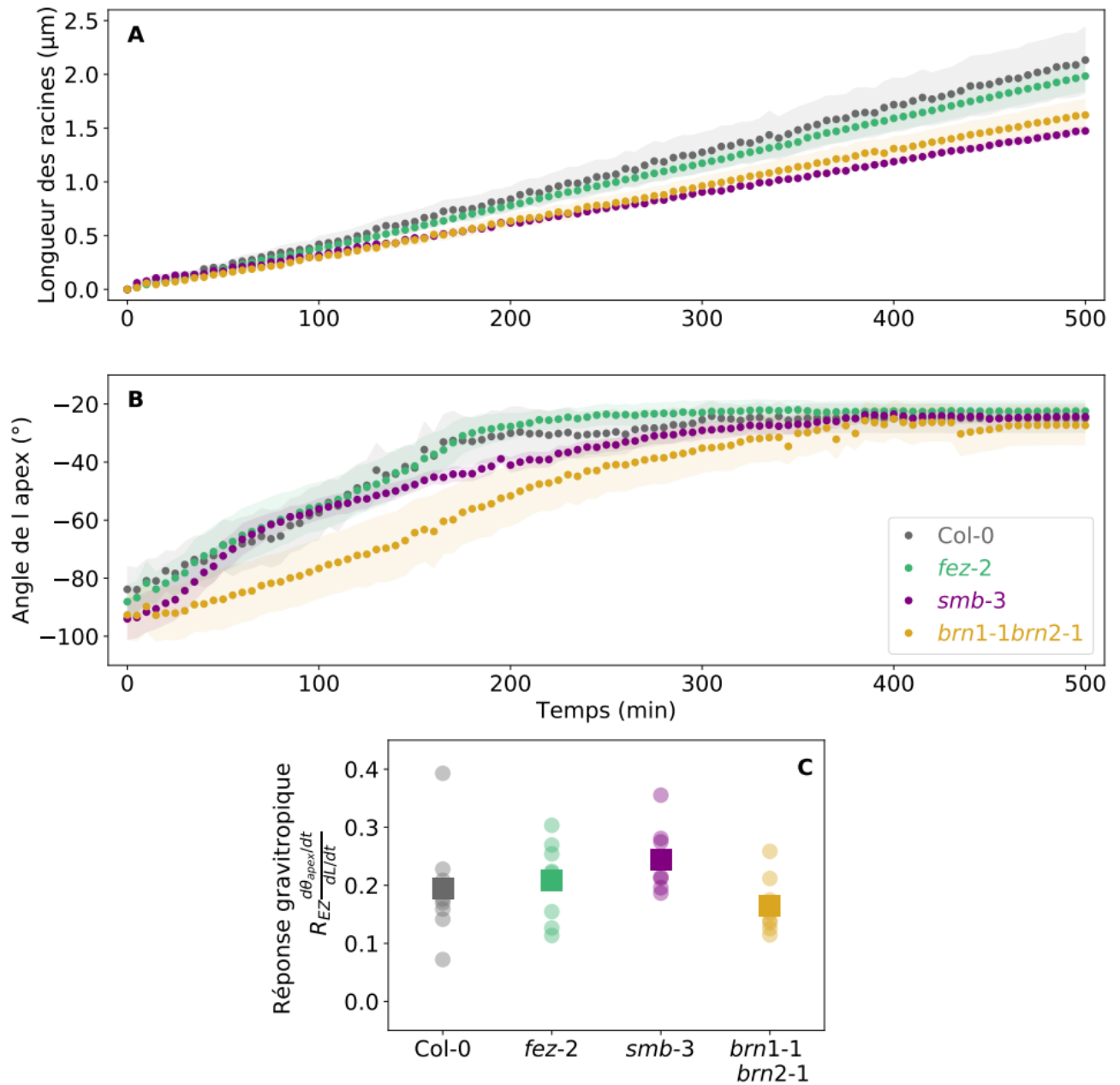


Figure 49 : Réponse gravitropique des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues des lignées Col-0, *fez-2*, et *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*

(A-B) Taille des racines (A) et angle de l'apex (B) en fonction du temps après gravistimulation à 90° des racines primaires issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*. Les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées.

(C) Réponse gravitropique des racines primaires, calculée à partir du rayon des racines dans la zone de courbure, de la vitesse de réorientation de l'apex racinaire et de la vitesse de croissance. Les ronds indiquent les valeurs individuelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, $n = 8$.

II.2. Les altérations de la coiffe des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* n'entraînent pas d'altération de la réponse gravitropique

La réorientation de l'apex des racines issues de la lignée sauvage Col-0 et des lignées mutantes *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*, placées à -90° par rapport à la verticale, peut être décomposée en plusieurs phases (Figure 49B). Au cours des trente premières minutes suivant la gravistimulation, l'angle de l'apex des racines évolue peu (Figure 49B). Après ce court temps de latence, l'angle de l'apex des racines augmente progressivement avec une vitesse de réorientation plus ou moins linéaire (Figure 49B). Enfin, dans les 200 à 300 minutes suivant la gravistimulation, l'angle de l'apex des racines atteint une valeur finale et se stabilise entre -22 et -27° pour l'ensemble des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* (Figure 49B).

Au cours de la réorientation de l'apex des racines gravistimulées, la vitesse de croissance moyenne est de $4,2 \pm 0,6 \text{ m.min}^{-1}$ pour les racines Col-0, de $4,0 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{m.min}^{-1}$ pour les racines *fez-2*, de $2,9 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{m.min}^{-1}$ pour les racines *smb-3* et de $3,3 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{m.min}^{-1}$ pour les racines *brn1-1 brn2-1* (Figure 49A). La croissance des racines est stable et non significativement différente pour l'ensemble des lignées. La vitesse de réorientation de l'apex, quant à elle, est de $0,32 \pm 0,07 \text{ }^\circ.\text{min}^{-1}$ pour les racines Col-0, de $0,32 \pm 0,05 \text{ }^\circ.\text{min}^{-1}$ pour les racines *fez-2*, de $0,26 \pm 0,03 \text{ }^\circ.\text{min}^{-1}$ pour les racines *smb-3* et de $0,024 \pm 0,01 \text{ }^\circ.\text{min}^{-1}$ pour les racines *brn1-1 brn2-1*. En appliquant la relation (11) aux valeurs de vitesse de réorientation et de vitesse de croissance pour l'ensemble des racines, la réponse gravitropique est estimée à $0,19 \pm 0,04$ pour les racines Col-0, $0,21 \pm 0,03$ pour les racines *fez-2*, $0,25 \pm 0,02$ pour les racines *smb-3* et $0,16 \pm 0,02$ pour les racines *brn1-1 brn2-1* (Figure 49C). Les valeurs de réponse gravitropique ne sont pas significativement différentes sur la base d'une ANOVA entre les différentes lignées.

Ainsi, ces résultats suggèrent que la réponse gravitropique n'est pas altérée chez les racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* par rapport aux racines sauvages.

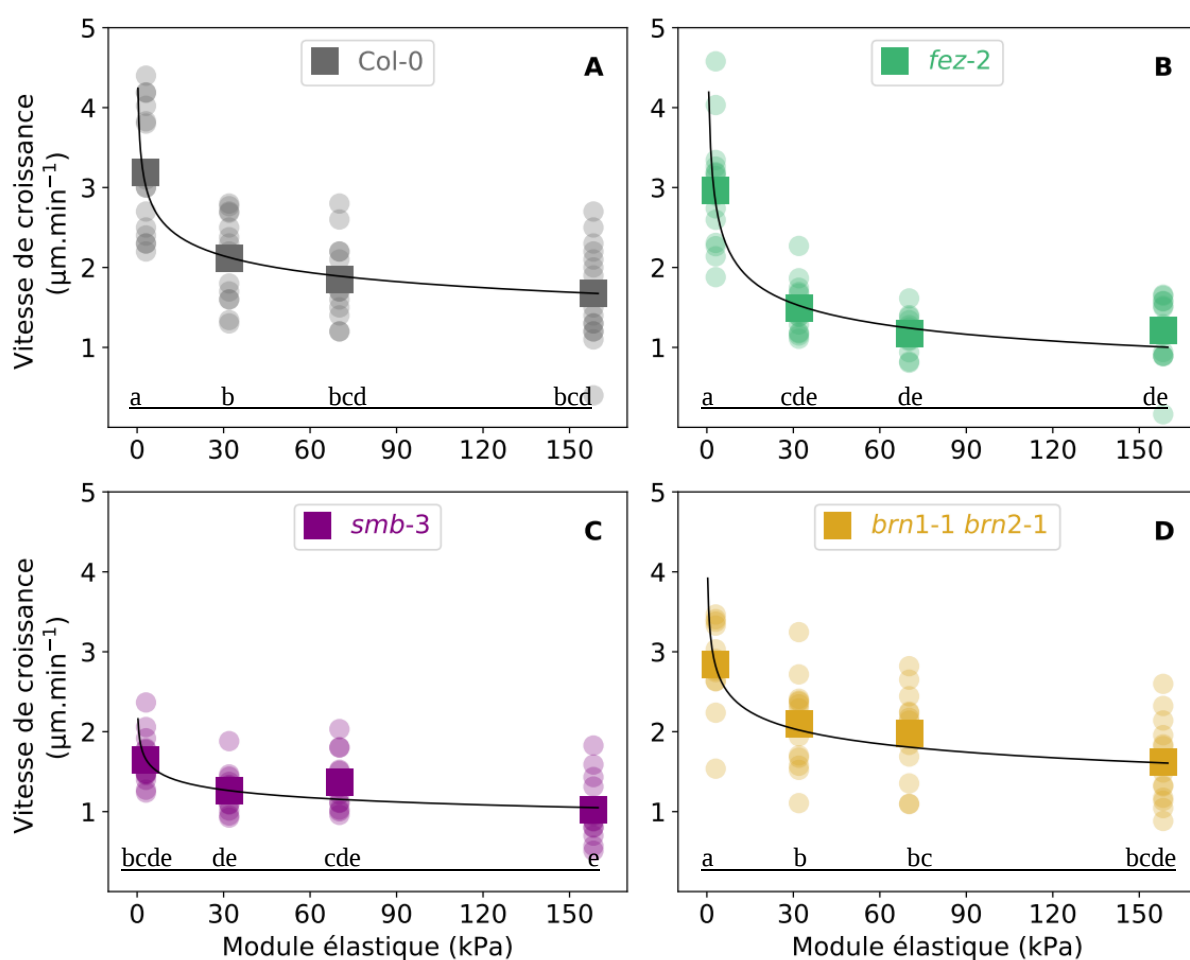


Figure 50 : Vitesse de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* en fonction de la rigidité du milieu

La vitesse de croissance des racines Col-0 (A), *fez-2* (B) *smb-3* (C) et *brn1-1 brn2-1* (D) progressant dans des milieux une-couche contenant 0,2 % (E = 3kPa), 0,5 % (E= 32 kPa), 0,8 % (E = 70 kPa) et 1,2 % (E = 158 kPa) de Phytigel a été mesurée pendant 12 heures. Les ronds représentent la vitesse de croissance moyenne pour une racine et les carrés représentent la vitesse de croissance moyenne pour 15 racines. Les courbes noires représentent la régression non linéaire de la vitesse de croissance en fonction de la rigidité du milieu pour chaque lignée. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes en fonction du génotype et de la rigidité du milieu (P<0,05, ANOVA II et test de Tukey).

III. Impact des altérations de la coiffe sur les réponses de croissance des racines à une augmentation de la rigidité du milieu

La croissance des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans les milieux une-couche contenant 0,2 %, 0,5 %, 0,8 % et 1,2 % de Phytigel a été étudiée selon le même mode opératoire que celui décrit dans le Chapitre 2. Tout d'abord, les vitesses de croissance moyennes des racines mutantes en fonction de la rigidité du milieu ont été extraites des prises de vue séquentielles réalisées sur une durée de 12 heures (Figure 50). Les données de vitesse de croissance ont été comparées statistiquement en fonction du génotype et de la rigidité du milieu sur la base d'une ANOVA II suivie d'un test de Tukey. Pour rappel, la rigidité du milieu est de 3 kPa pour une concentration en Phytigel de 0,2 %, de 32 kPa pour 0,5 % de Phytigel, de 70 kPa pour 0,8 % de Phytigel et de 158 kPa pour 1,2 % de Phytigel. La vitesse de croissance des racines *fez-2* et *brn1-1 brn2-1* n'est pas significativement différente de celle des racines Col-0 lorsqu'elles progressent dans un milieu de faible rigidité (à 0,2 %) (Figure 50). En revanche, la vitesse de croissance racinaire de la lignée *smb-3* est près de deux fois plus faible ($1,7 \pm 0,1 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$) que celle des racines sauvages dans le milieu une-couche contenant 0,2 % de Phytigel (Figure 50C). Comme décrit dans le chapitre précédent, la vitesse de croissance des racines sauvages diminue significativement entre un milieu de rigidité 3 kPa et un milieu de rigidité 32 kPa (Figure 50A). Au-delà de cette rigidité, la vitesse de croissance n'est pas significativement affectée par l'augmentation de la rigidité du milieu (Figure 50A). Une diminution de vitesse de croissance est également observée pour les racines *fez-2* dont la vitesse moyenne est de $3,0 \pm 0,2 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à une rigidité de 3 kPa, de $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à une rigidité de 32 kPa, et de $1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à des rigidités de 70 kPa et 158 kPa (Figure 50B). Comparée aux racines sauvages, la vitesse de croissance des racines *fez-2* est significativement plus affectée par l'augmentation de 3 kPa à 32 kPa de la rigidité du milieu (Figure 50A, B). En revanche, la vitesse de croissance des racines *smb-3* n'est pas significativement différente en fonction de la rigidité du milieu, indiquant que la croissance des racines *smb-3* est peu affectée par l'augmentation de la rigidité du milieu (Figure 50C). Concernant les racines *brn1-1 brn2-1*, la vitesse de croissance moyenne est de $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à une rigidité de 3 kPa, de $2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à une rigidité de 32 kPa, de $2,0 \pm 0,2 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à une rigidité de 70 kPa et de $1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ face à une rigidité de 158 kPa (Figure 50D).

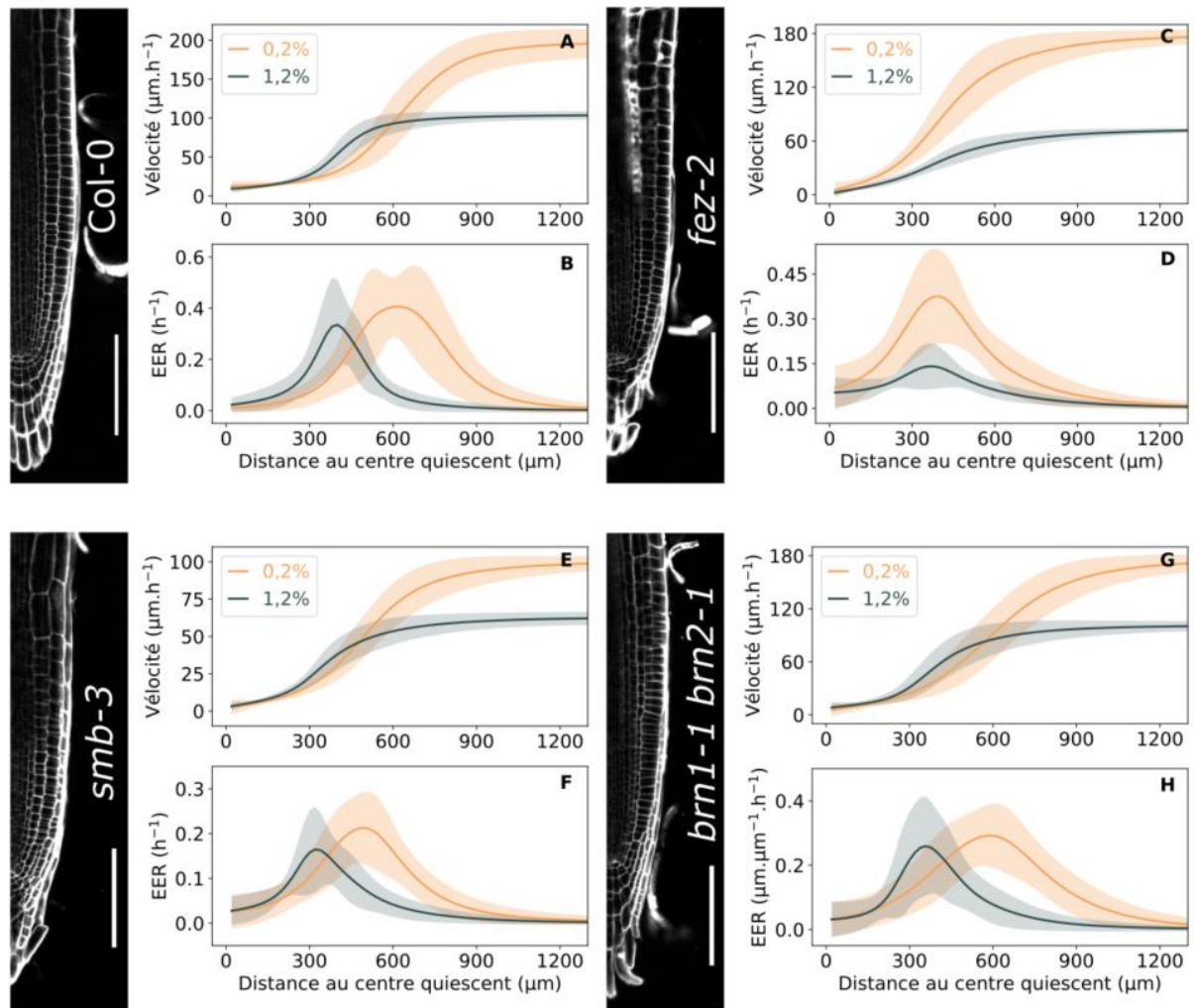


Figure 51 : Profils de vélocité et d'EER obtenus pour les racines Col-0 (A-B), *fez-2* (C-D), *smb-3* (E-F) et *brn1-1 brn2-1* (G-H) dans les milieux une couche contenant 0,2% de Phytigel ou 1,2% de Phytigel.

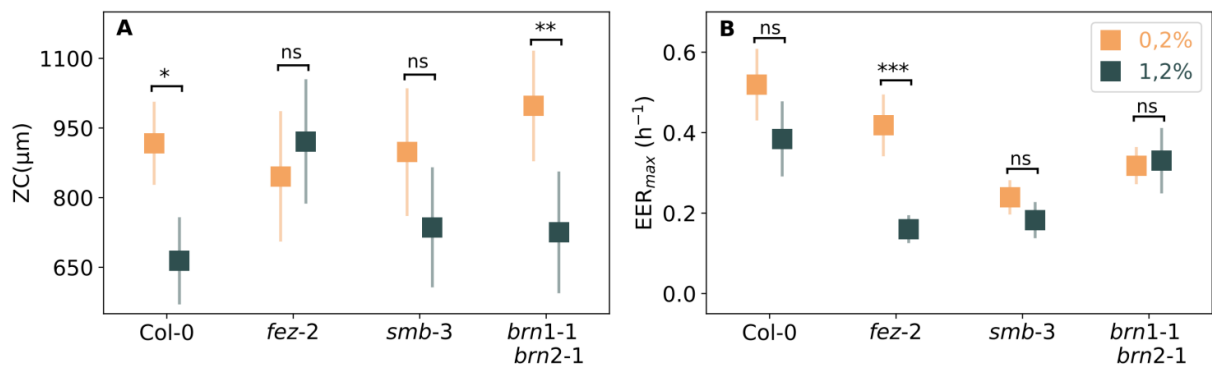


Figure 52 : Longueur de la zone de croissance (ZC, A) et EER_{max} (B) des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans les milieux un-couche contenant 0,2% ou 1,2% de Phytigel.

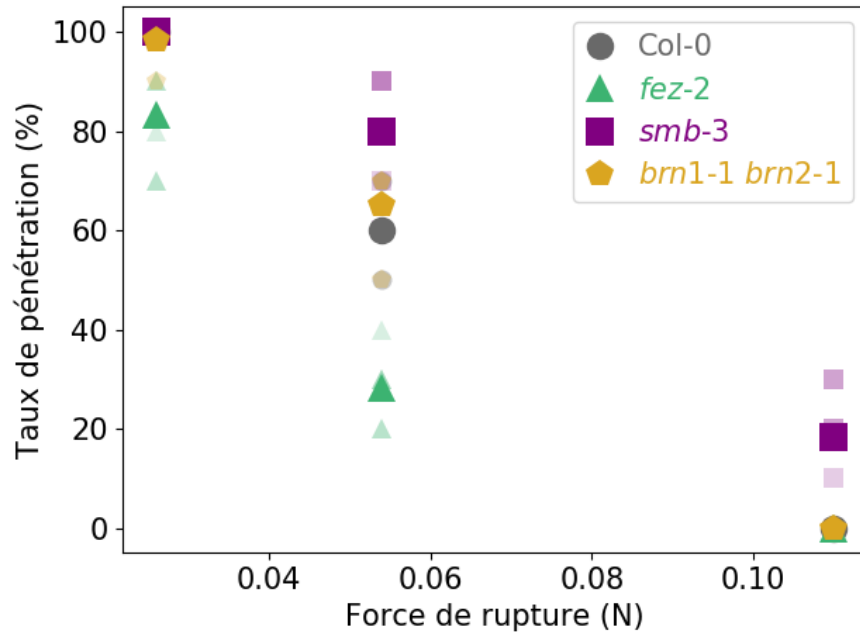
Les moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $n=8$. Des tests T de Fisher ont été réalisés pour comparer les moyennes entre les deux milieux, pour chaque génotype. Les étoiles indiquent des moyennes significativement différentes ($\alpha=0,05$; $*P<0,05$; $**P<0,01$; $***P<0,001$). Ns indique les moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

La croissance des racines *brn1-1 brn2-1* est donc affectée par l'augmentation de la rigidité du milieu de manière identique à celle des racines sauvages.

Pour comprendre ces fluctuations de vitesse de croissance, des profils de longueur cellulaire ont été établis pour l'apex des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui ont progressé dans le milieu le moins rigide (0,2 % de Phytigel, $E = 3$ kPa) et dans le milieu le plus rigide (1,2 % de Phytigel, $E = 158$ kPa). A partir de ces profils de longueur cellulaire et des vitesses de croissance obtenues précédemment, des profils de vélocité et d'EER ont pu être réalisés (Figure 51). Tout d'abord, ces profils m'ont permis de déterminer la taille de la zone de croissance et la capacité d'allongement des cellules des racines mutantes et de les comparer avec celles obtenues précédemment chez les racines sauvages. Dans le milieu 0,2 %, la zone de croissance mesure en moyenne 846 ± 84 μm chez les racines *fez-2*, 898 ± 72 μm chez les racines *smb-3* et 997 ± 67 μm chez les racines *brn1-1 brn2-1* (Figure 52A). Pour rappel, la longueur de la zone de croissance chez les racines sauvages dans le milieu 0,2% de Phytigel a été estimée à 917 ± 49 μm . L'analyse statistique des données, basée sur une ANOVA II et un test de Tukey (Annexe 3), indique qu'il n'y a pas de différence significative de longueur de la zone de croissance entre les quatre lignées. Ces résultats suggèrent donc que les mutations *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* n'entraînent pas de modification de la zone de croissance à l'apex des racines. Lorsque les racines progressent dans un milieu contenant 1,2 % de Phytigel, une diminution significative de la longueur de la zone de croissance est observée pour les racines *brn1-1 brn2-1* et pour les racines sauvages, alors que la zone de croissance des racines *fez-2* et *smb-3* est caractérisée par une longueur équivalente dans les milieux de plus faible et de plus forte rigidité (Figure 52A).

Dans le milieu contenant 0,2% de Phytigel, l'EER_{max} est estimé à une valeur moyenne de $0,42 \pm 0,05$ h⁻¹ chez les racines *fez-2*, $0,24 \pm 0,02$ h⁻¹ chez les racines *smb-3* et $0,31 \pm 0,03$ h⁻¹ chez les racines *brn1-1 brn2-1* (Figure 52B). L'analyse statistique basée sur une ANOVA II suivie d'un test de Tukey indique que l'EER_{max} des racines *fez-2* n'est pas significativement différent de celui des racines sauvages ($0,52 \pm 0,05$ h⁻¹), alors que celui des racines *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* apparaît significativement plus faible (Annexe 3). Dans le milieu le plus rigide contenant 1,2% de Phytigel, une diminution significative de l'EER_{max} est observée uniquement pour les racines *fez-2* (Figure 52B).

Ces résultats indiquent que l'augmentation de la rigidité du milieu affecte la vitesse de croissance des racines sauvages et des racines *brn1-1 brn2-1* en diminuant la longueur de la



Milieu deux-couches	Col-0	<i>fez-2</i>	<i>smb-3</i>	<i>brn1-1 brn2-1</i>
0,2-0,2	100 ± 0 ^a	83 ± 5 ^{bc}	100 ± 0 ^a	98 ± 2 ^{ab}
0,2-0,3	60 ± 3 ^e	28 ± 4 ^f	80 ± 5 ^{cd}	65 ± 4 ^{de}
0,2-0,5	0 ± 0 ^g	0 ± 0 ^g	18 ± 5 ^f	0 ± 0 ^g

Figure 53 : Taux de pénétration des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans les milieux deux-couches, en fonction de la résistance mécanique de l'interface

Les taux de pénétration sont présentés en fonction de la force de rupture de l'interface mesurée en pénétrométrie dans les milieux 0,2-0,2 (0,026 N), 0,2-0,3 (0,054 N) et 0,2-0,5 (0,11 N). Les taux de pénétration calculés pour chaque lignée correspondent au pourcentage de racines qui ont pénétré la couche inférieure de milieu. Les symboles légèrement transparents correspondent au taux de pénétration obtenu pour chaque boîte de culture et les symboles pleins correspondent à la moyenne des taux de pénétration obtenus sur 6 boîtes de culture. Dans le tableau, les moyennes de pourcentage ± l'erreur standard sont présentées. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes (Test non paramétrique de Scheirer-Ray-Hare).

zone de croissance mais sans avoir d'impact sur la capacité d'allongement des cellules. Cela suggère que, chez ces deux lignées, le taux de production des cellules est régulé en réponse à l'augmentation à long terme des contraintes mécaniques. Chez les racines *fez-2*, l'augmentation de la rigidité du milieu entraîne une diminution de la capacité d'allongement des cellules, sans affecter la longueur de la zone de croissance. Cela suggère une régulation de l'élongation cellulaire chez les racines *fez-2* en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques, et que cette régulation entraînerait une forte diminution de la vitesse de croissance. Enfin, pour les racines *smb-3*, l'augmentation de la rigidité du milieu n'a d'impact significatif ni sur la longueur de la zone de croissance, ni sur le taux d'élongation des cellules, expliquant la faible diminution de la vitesse de croissance de ces racines en réponse à l'augmentation à long terme des contraintes mécaniques.

IV. Impact des altérations de la coiffe sur les réponses de croissance des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

Les réponses de croissance des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales ont été étudiées dans les milieux deux couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5 qui présentent des augmentations croissantes de résistance mécanique du milieu. Les capacités de pénétration des racines mutantes dans les milieux deux-couches ont été étudiées, *via* le calcul du taux de pénétration et de la force critique de croissance axiale des racines. La réponse des racines mutantes à l'augmentation des contraintes mécaniques axiales, en termes de courbure et de vitesse de croissance ont été caractérisées. Les différentes données obtenues ont faits l'objet d'analyses statistiques, basées sur une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Tukey. Les résultats précis issus des analyses statistiques sont présentés en Annexe.

IV.1. Les capacités de pénétration des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* sont altérées chez les lignées *fez-2* et *smb-3*

Dans le milieu deux-couches **0,2-0,2**, seulement 80 % des racines mutantes *fez-2* parviennent à pénétrer la couche inférieure alors que l'ensemble des racines sauvages, et des racines mutantes *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* sont capables d'induire la rupture de l'interface permettant

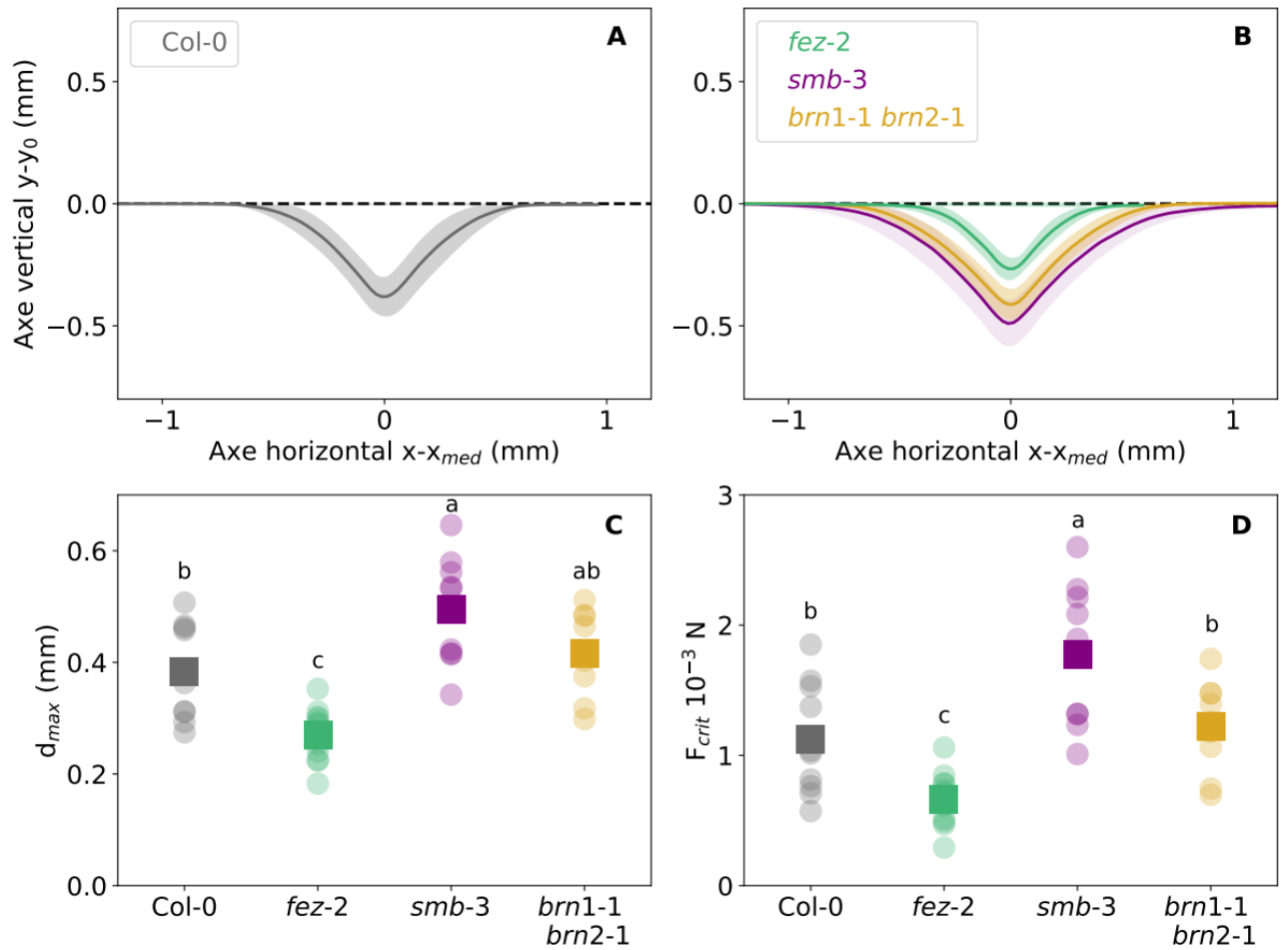


Figure 54 : Force critique de croissance axiale des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans le milieu deux-couche 0,2-0,3

(A-B) Représentation du déplacement maximal de l'interface du milieu 0,2-0,3, avant initiation d'une zone de courbure chez les racines primaires des lignées Col-0 (A), *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* (B). Les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont représentées, $9 \leq n \leq 11$

(C) Déplacement maximal de l'interface induit par la croissance racinaire avant initiation d'une zone de courbure chez les racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans le milieu 0,2-0,3. (D) Force axiale critique des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans le milieu 0,2-0,3. Les ronds indiquent les valeurs individuelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, $9 \leq n \leq 11$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes avec $P < 0,05$ (ANOVA I et Test de Tukey).

la pénétration dans la couche inférieure (Figure 53). Dans le milieu **0,2-0,3**, une pénétration dans la couche inférieure contenant 0,3 % de Phytigel est observée pour 60 % des racines sauvages, 28 % des racines *fez-2*, 80 % des racines *smb-3* et 65 % des racines *brn1-1 brn2-1* (Figure 53). Enfin, dans le milieu **0,2-0,5** qui offre la plus grande augmentation de résistance mécanique, aucune des racines sauvages, *brn1-1 brn2-1* et *fez-2* ne pénètrent la couche inférieure alors que 20 % des racines *smb-3* sont capables d'induire la rupture de l'interface (Figure 53). **Ainsi, les racines *fez-2*, caractérisées par un apex de géométrie pointue, présentent un taux de pénétration significativement plus faible que les racines sauvages. En revanche, les racines *smb-3*, caractérisées par un apex de géométrie rectangulaire, présentent un taux de pénétration significativement plus élevé. Les racines *brn1-1 brn2-1* présentent quant à elles un taux de pénétration identique à celui des racines sauvages.**

J'ai analysé si ces variations de taux de pénétration racinaire entre les lignées mutantes et la lignée sauvage pouvaient s'expliquer par des variations de force critique de croissance axiale. L'estimation de la force critique axiale des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* a été réalisée selon la méthode décrite dans le Chapitre 2. Pour cela, le déplacement maximal de l'interface a été mesuré dans le milieu 0,2-0,3 pour les racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* ne parvenant pas à pénétrer la couche de milieu inférieure (Figure 54A, C). J'ai choisi de n'effectuer les mesures que sur le milieu 0,2-0,3, qui présente la plus grande disparité de taux de pénétration entre les quatre lignées. Dans le milieu 0,2-0,3, les racines *fez-2* qui ne pénètrent pas la couche inférieure déplacent l'interface d'une profondeur maximale moyenne de $0,27 \pm 0,01$ mm avant de subir l'initiation d'une zone de courbure ($0,37 \pm 0,03$ mm pour les racines Col-0) (Figure 54A, C). Ce déplacement correspond à une force critique de $0,66 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$ N, significativement plus faible que celle des racines sauvages ($1,12 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$ N) (Figure 54C, D). Les racines *smb-3* déplacent quant à elles l'interface d'une profondeur maximale moyenne de $0,49 \pm 0,03$ mm, correspondant à une force critique de $1,77 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$ N, significativement plus importante que celle des racines sauvages (Figure 54C, D).

Enfin, les racines *brn1-1 brn2-1* déplacent l'interface d'une profondeur maximale de $0,42 \pm 0,02$ mm avant de courber, correspondant à une force critique de flambement de $1,22 \pm 0,09 \cdot 10^{-3}$ N, équivalente à celle des racines sauvages (Figure 54C, D). Ainsi, la force critique que les racines sont capables d'exercer sur l'interface du milieu 0,2-0,3 est significativement plus faible chez les racines *fez-2* et significativement plus élevée chez les racines *smb-3* par rapport aux racines sauvages. En revanche, la force critique, et donc la capacité de pénétration des racines *brn1-1 brn2-1* n'est pas altérée.

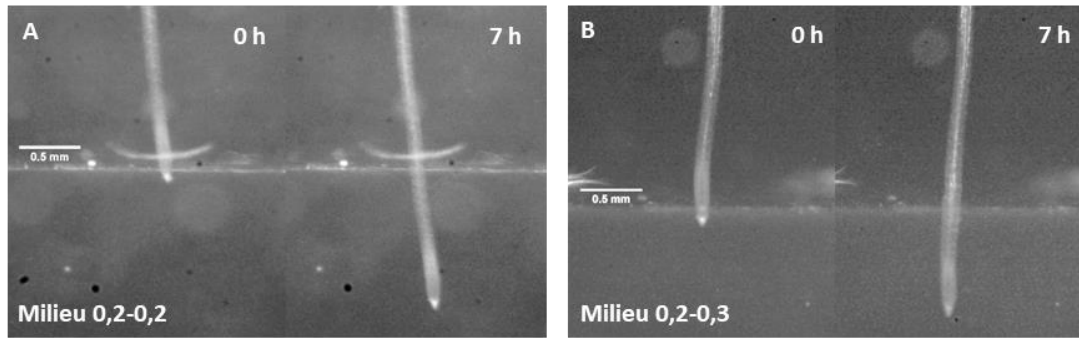


Figure 55 : Pénétration des racines *fez-2* dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B). Cinétique de pénétration d'une racine issue de la lignée *fez-2* dans la couche inférieure de milieu, à 0 h et 7 h après le contact entre l'apex racinaire et l'interface.

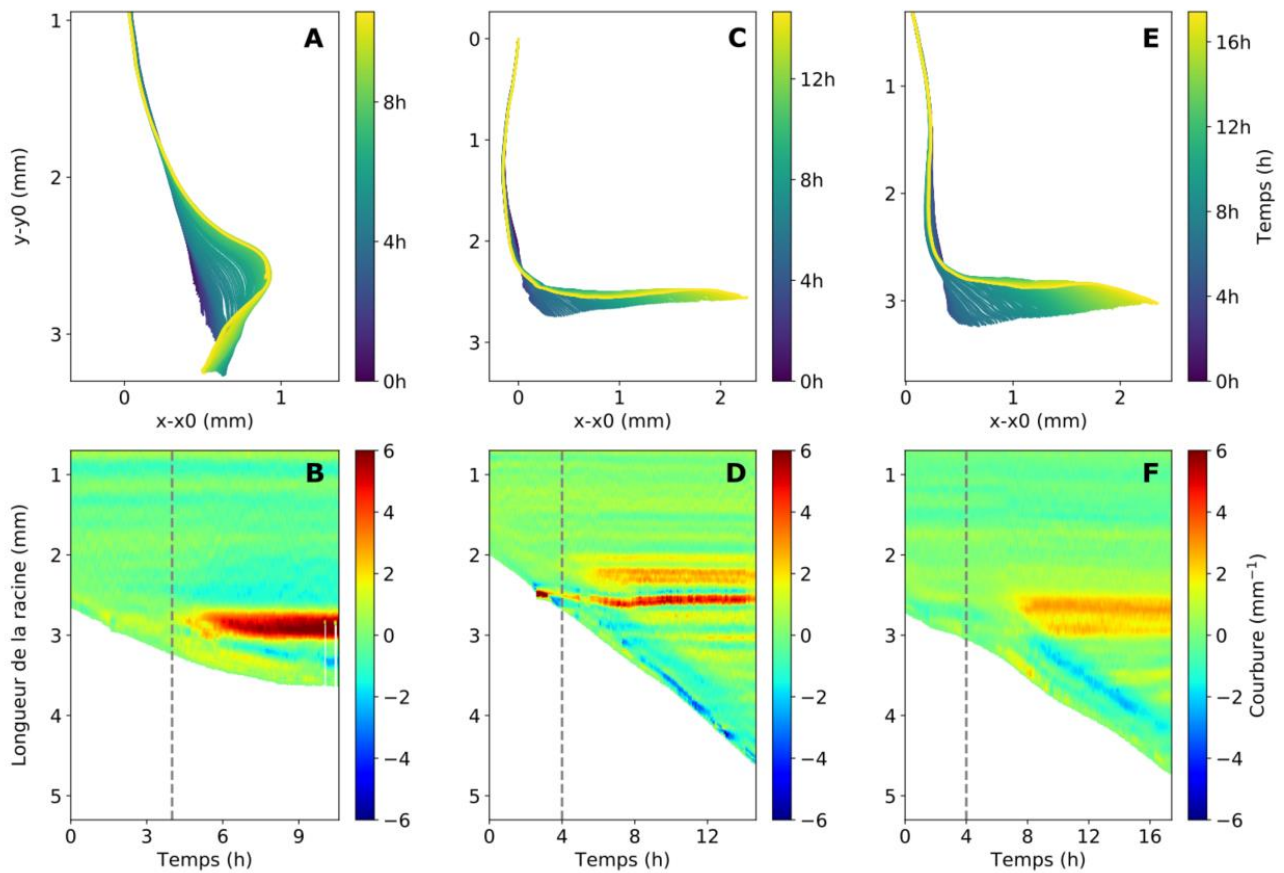


Figure 56 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée *fez-2* dans les milieux deux-couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5.

(A, C, E) Squelettes d'une racine ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 (A), 0,2-0,3 (C) ou 0,2-0,5 (E). Les apex des racines *fez-2* se réorientent en boucles dans le milieu 0,2-0,2 et en marche dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5. (B, D, F) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine au cours de sa réorientation à l'interface du milieu 0,2-0,2 (B), 0,2-0,3 (D) ou 0,2-0,5 (F). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

Ces résultats suggèrent que l'altération (positive ou négative) des forces critiques axiales chez les lignées transgéniques est responsable de l'altération correspondante (positive ou négative) du taux de pénétration racinaire. De plus, les disparités de capacités de pénétration suggèrent que les mutations *fez-2* et *smb-3* ont un impact sur la force critique générée par la croissance axiale de l'apex racinaire.

IV.2. La mise en place des zones de courbure des racines en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales diffère chez les lignées *fez-2* et *smb-3*

→ Racines *fez-2*

Nous avons observé que 80 % des racines *fez-2* pénétraient la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 et 28 % pénétraient la couche inférieure du milieu 0,2-0,3. Pour l'ensemble de ces racines, aucune zone de courbure n'est initiée après le contact entre l'apex et l'interface et ce, quelle que soit la résistance mécanique de l'interface (Figure 55). En revanche, nous avons observé que certaines racines sauvages qui pénétraient la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 initiaient une zone de courbure avant de finalement induire la rupture de l'interface et pénétrer la couche inférieure.

Dans le milieu 0,2-0,2, les 20% de racines *fez-2* qui ne pénètrent pas la couche inférieure développent une boucle à la suite du contact avec l'interface. La mise en place de la boucle semble proche de celle observée chez les racines sauvages qui ne pénètrent pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 (Figure 56A). Une première zone de courbure est initiée à 500 μm de l'apex et atteint une intensité maximale de 4 mm^{-1} (Figure 56B).

Les racines *fez-2* qui ne pénètrent pas la couche inférieure dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5 présentent quant à elles un mode de réorientation de l'apex en forme de marche, permis par la mise en place de deux zones de courbure (Figure 56C, E). Dans ces deux milieux, une première zone de courbure est initiée entre 1 à 3 h après le contact entre l'apex racinaire et l'interface (Figure 56D, F). Cette zone de courbure survient à une distance de $603 \pm 33 \mu\text{m}$ de l'apex racinaire dans le milieu 0,2-0,3 et $664 \pm 64 \mu\text{m}$ dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 56D, F). La courbure atteint une intensité maximale de $3,4 \pm 0,7 \text{ mm}^{-1}$ dans le milieu 0,2-0,3 et de $2,3 \pm 0,5 \text{ mm}^{-1}$ dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 56D, F). La première courbure formée chez les racines *fez-2* dans le milieu 0,2-0,5 est significativement moins intense que la première courbure formée chez les racines sauvages dans le même milieu ($4,7 \pm 0,5 \text{ mm}^{-1}$) (Annexe 5).

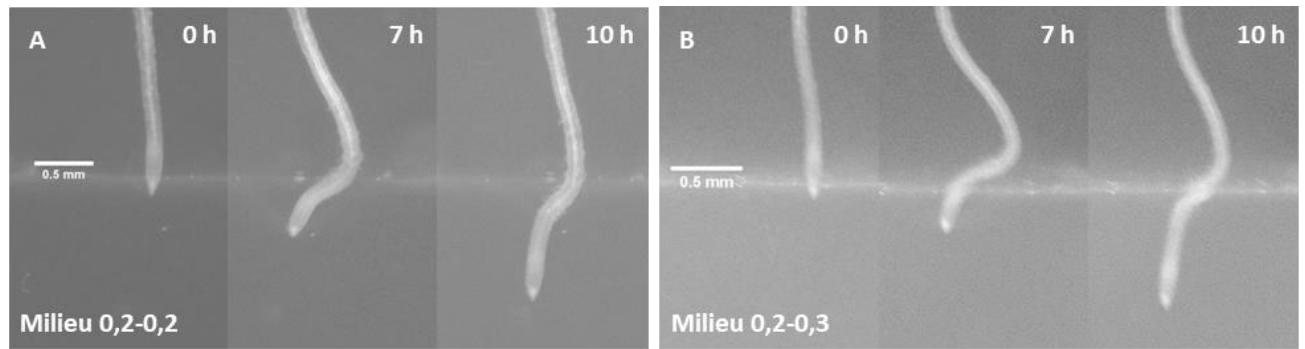


Figure 57 : Pénétration des racines *smb-3* dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 (A) et 0,2-0,3 (B). Cinétique de pénétration d'une racine issue de la lignée *smb-3* dans la couche inférieure de milieu, 0 h, 7h et 10 h après le contact entre l'apex racinaire et l'interface.

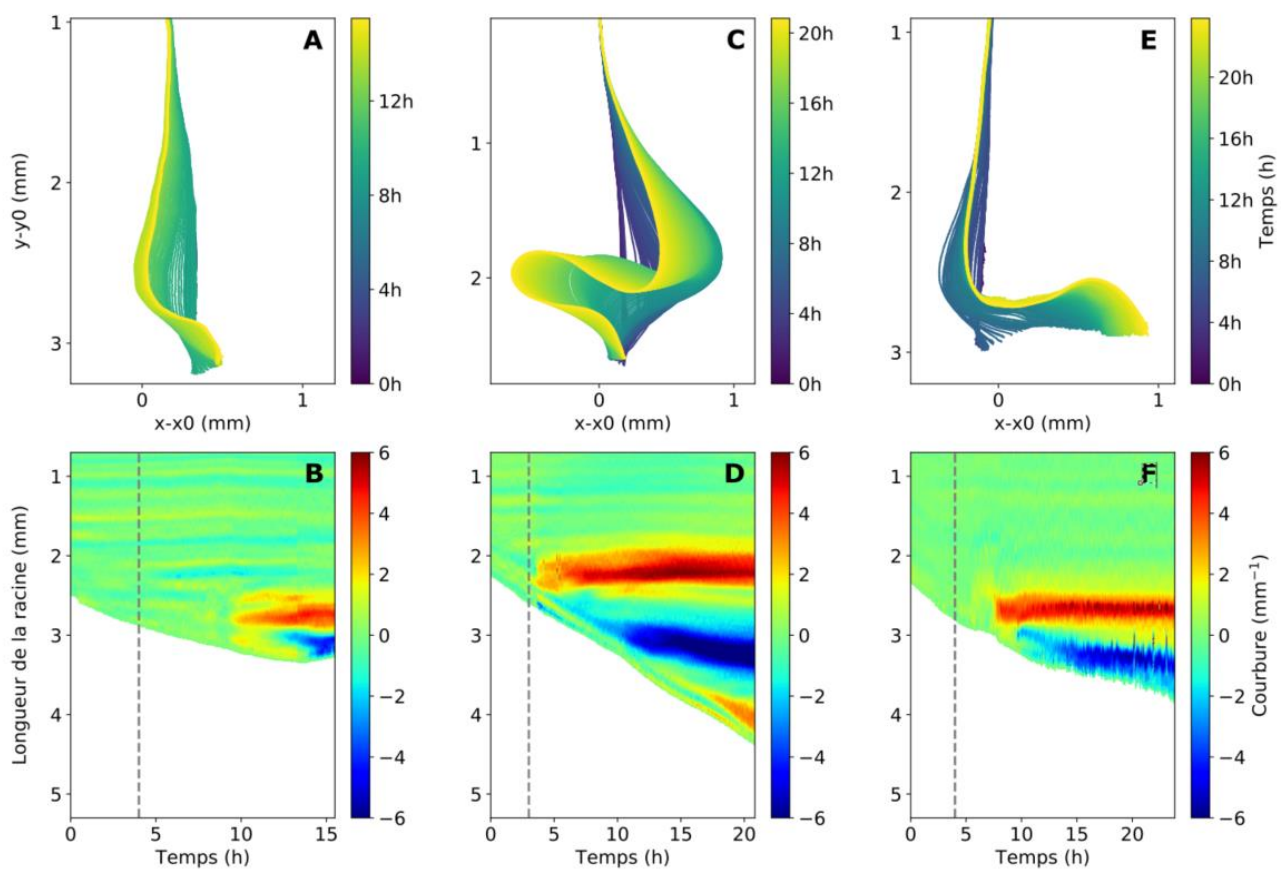


Figure 58 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée *smb-3* dans les milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5.

(A, C, E) Squelettes d'une racine ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 (A) ou 0,2-0,5 (C-E). Les apex des racines *smb-3* se réorientent en boucles dans le milieu 0,2-0,3 (A). (B, D, F) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine au cours de sa réorientation en boucles dans le milieu 0,2-0,3 (B), en vague dans le milieu 0,2-0,5 (D) et en marche dans le milieu 0,2-0,5 (E). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

Enfin, la première courbure formée chez les racines *fez-2* concerne une zone totale de 977 ± 58 μm de longueur dans le milieu 0,2-0,3 et de 946 ± 140 μm de longueur dans le milieu 0,2-0,5, ce qui est significativement plus important que chez les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (540 ± 50 μm) (Figure 56D, F, Annexe 5). Dans l'heure suivant la mise en place de la première zone de courbure, une deuxième zone de courbure est mise en place chez les racines *fez-2* ne pénétrant pas la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5 (Figure 56D, E). Les caractéristiques de mise en place de la deuxième zone de courbure ne sont pas significativement différentes entre les racines *fez-2* dans le milieu 0,2-0,3 et les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (Annexe 5). En revanche, pour les racines *fez-2* dans le milieu 0,2-0,5, l'intensité de la deuxième zone de courbure est significativement plus faible que celle observée chez les racines sauvages dans le même milieu (Figure 56F, Annexe 5).

Ainsi, la réorientation de l'apex des racines *fez-2* en réponse à la plus forte augmentation des contraintes mécaniques axiales (milieu 0,2-0,5) présente des caractéristiques distinctes de celle des racines sauvages : la première courbure survient plus loin de l'apex, concerne une zone plus étendue et les deux courbures mises en place sont de plus faible intensité.

➔ *Racines smb-3*

Dans les milieux deux-couches, les racines *smb-3* ont présenté de meilleures capacités de pénétration dans la couche inférieure que les racines sauvages. Cependant, le suivi spatiotemporel de la rectitude des racines au cours de leur pénétration dans les milieux deux-couches a révélé que plusieurs racines *smb-3* initiaient une zone de courbure avant la rupture de l'interface, de façon similaire aux racines sauvages dans le milieu 0,2-0,3, et ce même dans le milieu 0,2-0,2 (Figure 57). Tout comme pour les racines sauvages, les zones de courbure formées au cours de la phase de déplacement de l'interface par l'apex des racines *smb-3* sont maintenues après rupture de l'interface et pénétration dans la couche inférieure de milieu.

Les racines *smb-3* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 développent une boucle, similaire à celle formée chez les racines sauvages dans le même milieu (Figure 58A). L'analyse spatio-temporelle nous indique qu'une première zone de courbure est initiée à 398 ± 53 μm de l'apex dans les 6 heures suivant le contact de l'apex racinaire avec l'interface (Figure 58B). Ce temps important peut être justifié par le fait que la vitesse de croissance des racines *smb-3* est environ deux fois plus faible que celle des racines sauvages dans un milieu contenant 0,2 % de Phytigel.

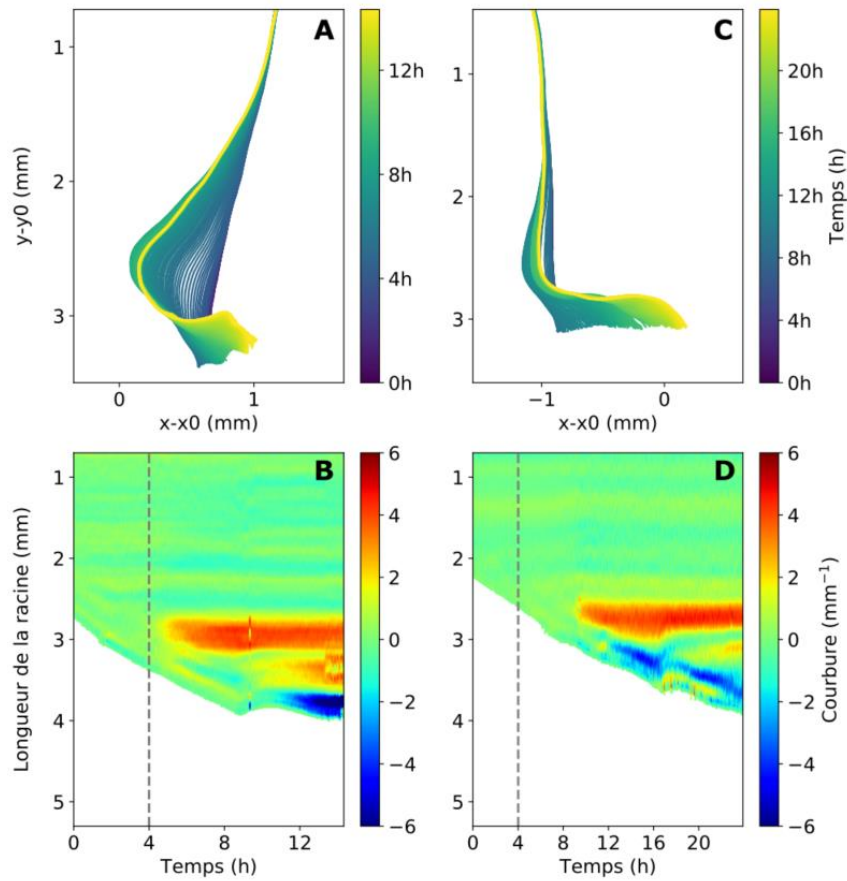


Figure 59 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée *brn1-1 brn2-1* dans les milieux deux-couches 0,2-0,3 et 0,2-0,5.

(A, C) Squelettes d'une racine ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,3 (A) ou 0,2-0,5 (C). Les apex des racines *brn1-1 brn2-1* se réorientent en boucles dans le milieu 0,2-0,3 (A) et en marche dans le milieu 0,2-0,5 (C).

(B, D) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine au cours de sa réorientation en boucles dans le milieu 0,2-0,3 (B), et en marche dans le milieu 0,2-0,5 (D). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

La première zone de courbure atteint une intensité maximale moyenne de $4,5 \text{ mm}^{-1}$ (Figure 58B). La seconde zone de courbure formée atteint quant à elle une intensité de $7,4 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ en moyenne, qui est significativement plus importante que celle des racines sauvages (Figure 58B, Annexe 4).

Dans le milieu 0,2-0,5, les racines *smb-3* qui ne pénètrent pas la couche inférieure présentent plusieurs modes de réorientation. Certaines racines forment une boucle, de façon similaire au milieu 0,2-0,3, d'autres présentent plusieurs zones de courbures survenant successivement et entraînant la formation de vagues (Figure 58C) et quelques racines présentent un mode de réorientation en marche proche de celui des racines sauvages dans les mêmes conditions (Figure 58E). Dans le cas de la réorientation en vague, des zones de courbures sont initiées régulièrement à une distance de $300 \text{ } \mu\text{m}$ de l'apex racinaire et atteignent une intensité maximale d'environ 6 mm^{-1} (Figure 58D). De la même façon que pour la réorientation en boucles, les zones de courbures sont initiées successivement jusqu'à déviation de l'apex racinaire le long de l'interface. La réorientation en marche de l'apex des racines *smb-3* résulte de la mise en place d'une première zone de courbure dans les 5 premières heures suivant le contact avec l'interface, à une distance de $407 \pm 32 \text{ } \mu\text{m}$ de l'apex racinaire qui est suivie d'une deuxième zone de courbure initiée à $368 \pm 44 \text{ } \mu\text{m}$ de l'apex racinaire (Figure 58F). Les deux courbures atteignent une intensité maximale d'environ 5 mm^{-1} qui n'apparaît pas significativement différente par rapport à l'intensité des courbures des racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 58F, Annexe 5).

Cette analyse a montré que la réorientation de l'apex des racines *smb-3* en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques axiales différait de celle des racines sauvages.

➔ *Racines brn1-1 brn2-1*

Nous avons observé que les capacités de pénétration des racines *brn1-1 brn2-1* dans les milieux deux-couches étaient similaires à celles des racines sauvages. De plus, les racines *brn1-1 brn2-1* qui pénètrent la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 présentent des réponses similaires à celles des racines sauvages. Aucune racines *brn1-1 brn2-1* dans le milieu 0,2-0,2 et seulement certaines dans le milieu 0,2-0,3 développent une zone de courbure au cours de la phase de déplacement de l'interface, avant rupture de l'interface et pénétration dans la couche inférieure.

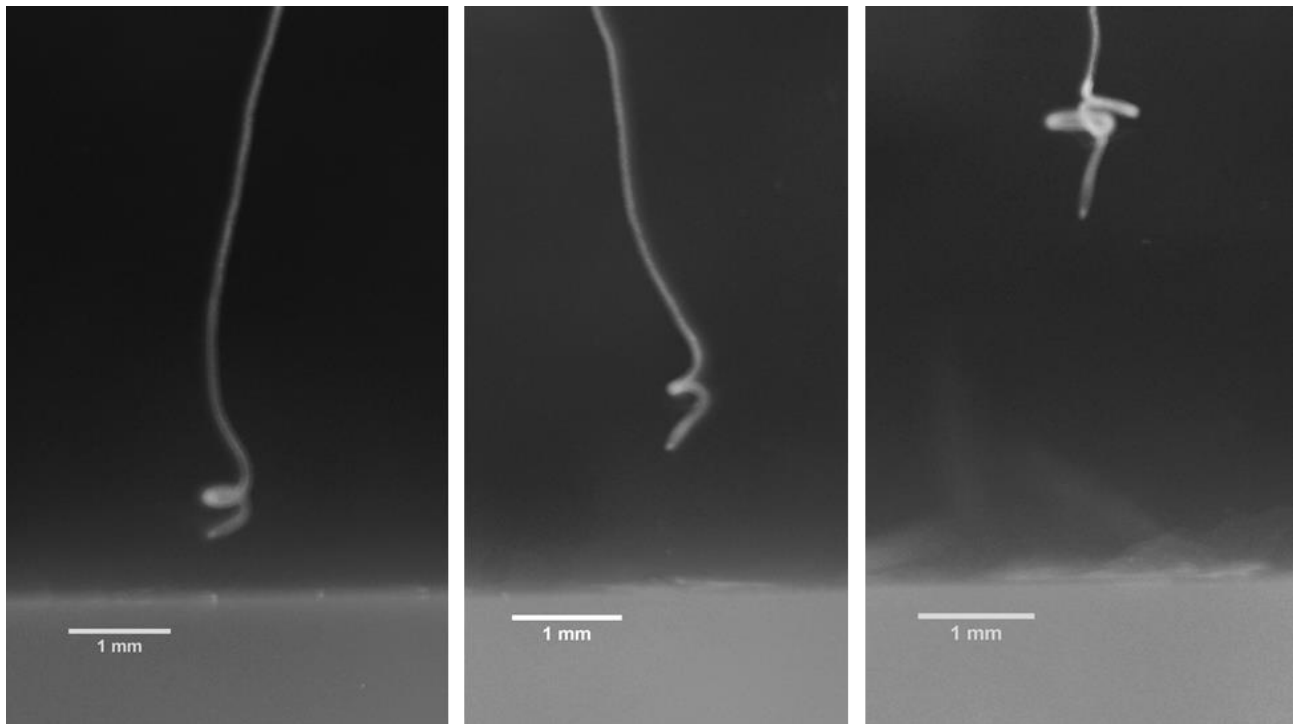


Figure 60 : Boucles formées au cours de la progression de trois racines primaires distinctes issues de la lignée *brn1-1 brn2-1* dans la couche supérieure du milieu 0,2-0,5

Dans le milieu 0,2-0,3, les racines *brn1-1 brn2-1* qui ne pénètrent pas dans la couche inférieure développent une boucle, similaire à celle des racines sauvages dans les mêmes conditions (Figure 59A). Les caractéristiques de mise en place des zones de courbure menant à la formation de la boucle sont très similaires entre les racines *brn1-1 brn2-1* et les racines sauvages (Figure 59B, Annexe 4).

Dans le milieu 0,2-0,5, les racines *brn1-1 brn2-1* présentent toutes un mode de réorientation en marche (Figure 59C). La première zone de courbure est initiée dans les 2 h suivant le contact à une distance de $518 \pm 48 \mu\text{m}$ de l'apex. Une fois mise en place, la zone de courbure s'étend sur une distance de $698 \pm 52 \mu\text{m}$ et atteint une intensité maximale de $3,4 \pm 0,5 \text{ mm}^{-1}$ (Figure 59D). La seconde zone de courbure est initiée environ deux heures après la première, à $334 \pm 32 \mu\text{m}$ de l'apex. Cette seconde zone de courbure atteint une intensité maximale de $3,0 \pm 0,5 \text{ mm}^{-1}$ qui n'est pas significativement différente de celle des racines sauvages (Figure 59D, Annexe 5). Dans l'ensemble des milieux deux-couches, nous avons observé que certaines racines *brn1-1 brn2-1*, avant même d'entrer en contact avec l'interface des deux couches de milieux, développent des courbures successives menant à la formation de boucles (Figure 60). Dans tous les cas observés, plusieurs boucles sont formées puis l'apex racinaire retrouve sa croissance verticale en direction de l'interface. Ce comportement a été observé à différentes distances de l'interface, allant jusqu'à 5 mm.

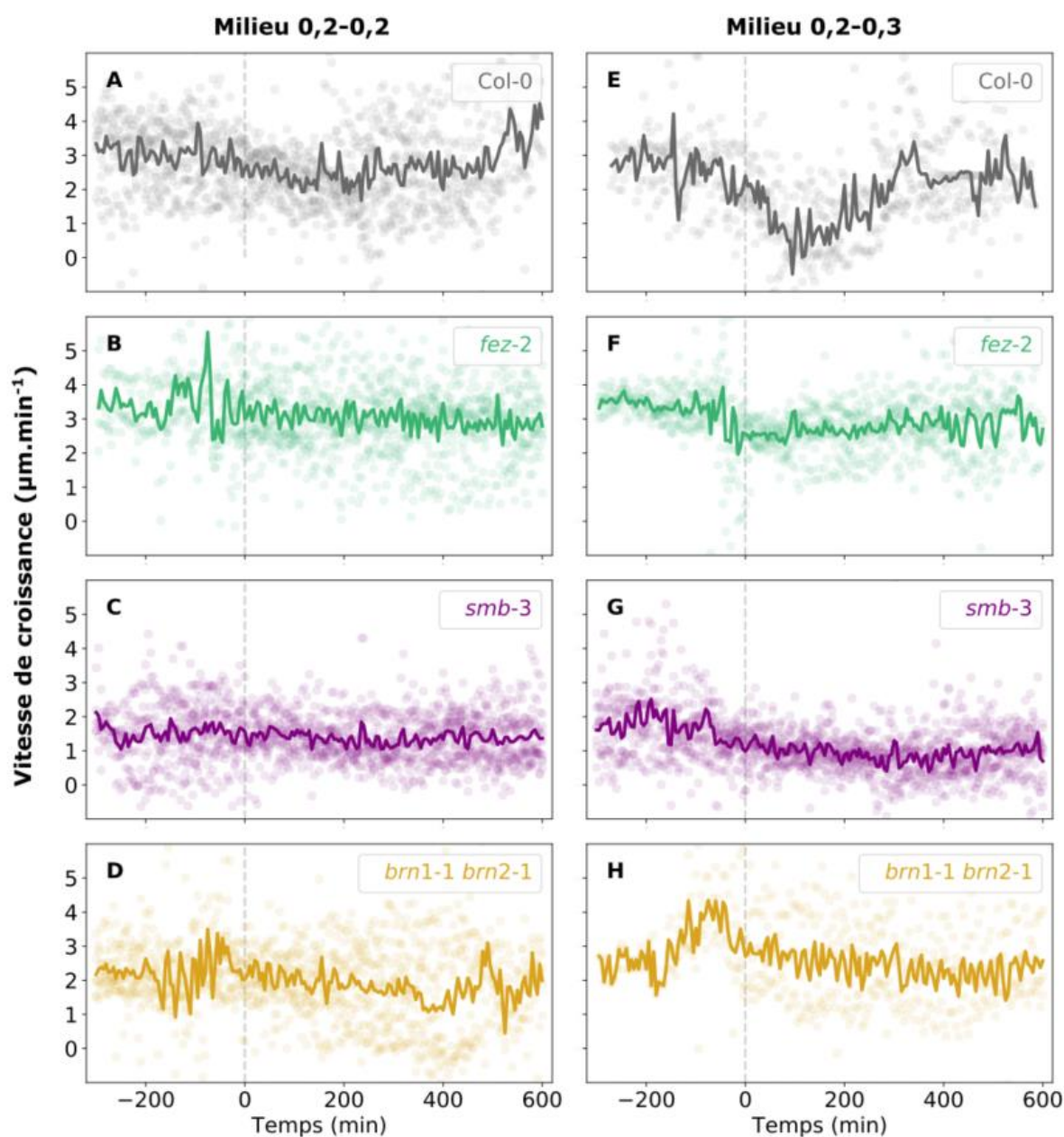


Figure 61 : Vitesse de croissance des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* pénétrant dans la couche inférieure dans les milieux deux couches 0,2-0,2 (A-D) et 0,2-0,3 (E-H).

Les mesures ont été réalisées toutes les 5 min de -300 min à +600 min après contact entre l'apex racinaire et l'interface, pour les racines qui ont pénétré dans les milieux 0,2-0,2 (A-D) et 0,2-0,3 (E-H). Les lignes indiquent les valeurs moyennes et les points indiquent les valeurs individuelles, $6 \leq n \leq 10$. La ligne en pointillés indique le moment du contact entre l'apex racinaire et l'interface.

IV.3. La vitesse de croissance des racines *fez-2* n'est pas affectée par une augmentation des contraintes mécaniques axiales

La vitesse de croissance moyenne des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* a été calculée d'une part pour les racines ayant pénétré dans la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 et d'autre part pour les racines ayant réorienté leur croissance dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5.

Dans le milieu **0,2-0,2**, les racines *fez-2* présentent une vitesse de croissance initiale de $3,32 \pm 0,36 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ dans la couche supérieure (Figure 61B). Au cours de la phase de déplacement de l'interface, la vitesse de croissance moyenne des racines *fez-2* est de $3,06 \pm 0,26 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, ce qui n'est pas significativement différent de la vitesse dans la couche supérieure (Figure 61). La croissance des racines *fez-2* est ensuite maintenue après rupture de l'interface et pénétration des racines dans la couche inférieure (Figure 61, Annexe 6). De la même façon que pour les racines *fez-2*, la vitesse de croissance des racines *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* au cours de la pénétration dans la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 ne varie pas de manière significative (Figure 61C-D, Annexe 6).

Dans le milieu **0,2-0,3**, la vitesse de croissance des racines *fez-2* pénétrant la couche inférieure passe d'une valeur moyenne de $3,22 \pm 0,16 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ avant contact à $2,57 \pm 0,21 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ durant la période de contact, et à une valeur de $2,86 \pm 0,21 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ après pénétration, soit une diminution non significative de 20 % (60 % chez Col-0) (Figure 61F). Ainsi, la vitesse de croissance des racines *fez-2* n'est pas affectée par la pénétration dans la couche contenant 0,3 % de Phytigel. Concernant les racines *smb-3*, la pénétration dans la couche inférieure 0,3 % entraîne une diminution de la vitesse de croissance qui passe de $1,65 \pm 0,18 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ avant contact à $0,99 \pm 0,06 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ pendant le déplacement de l'interface et à $0,95 \pm 0,18 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ après pénétration, soit une diminution de 42 % (Figure 61G). La vitesse de croissance des racines *brn1-1 brn2-1* passe quant à elle d'une valeur moyenne de $3,18 \pm 0,43 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ avant contact à $2,90 \pm 0,59 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ après contact puis à $2,52 \pm 0,49 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ après pénétration, ce qui représente une diminution de 20 %, là encore non significative (Figure 61H, Annexe 6).

Dans le milieu **0,2-0,3**, les racines *fez-2* qui ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu, tout comme celles qui pénètrent, ne présentent pas de diminution significative de la vitesse de croissance (Figure 62B, Annexe 7).

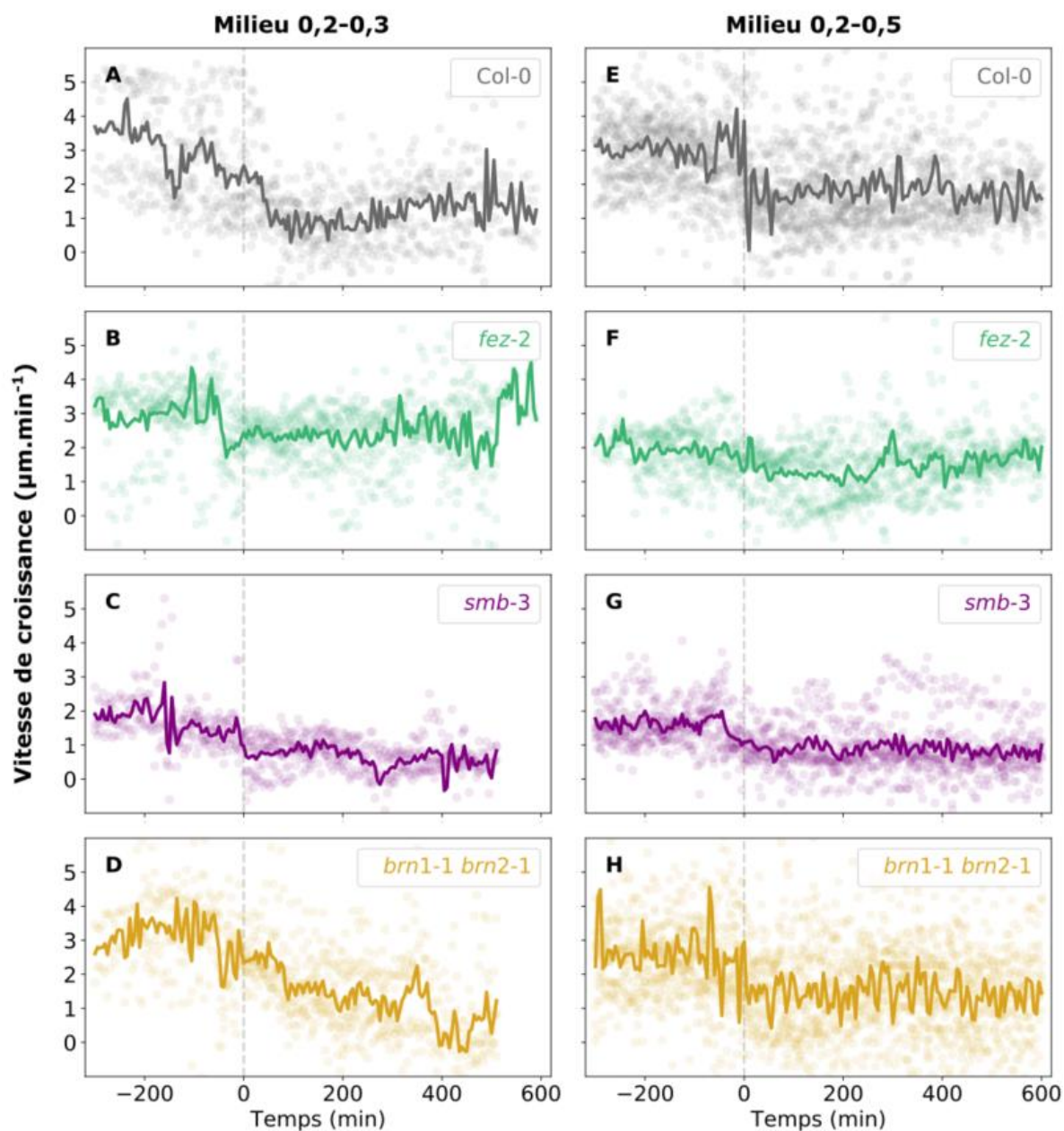


Figure 62 : Vitesse de croissance des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* se réorientant après contact avec l'interface dans les milieux 0.2-0.3 (A-D) et 0.2-0.5 (E-H).

Les mesures ont été réalisées toutes les 5 min de -300 min à +600 min après contact entre l'apex racinaire et l'interface, pour les racines qui n'ont pas pénétré dans la couche inférieure dans les milieux 0,2-0,3 (A-D) et 0,2-0,5 (E-H). Les lignes indiquent les valeurs moyennes et les points indiquent les valeurs individuelles, $8 \leq n \leq 12$. La ligne en pointillés indique le moment du contact entre l'apex racinaire et l'interface.

En revanche, pour les racines *smb-3* ne pénétrant pas la couche inférieure, le contact avec l'interface est suivi d'une diminution significative de 54% de la vitesse de croissance, passant d'une valeur moyenne de $1,36 \pm 0,33 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ à une valeur moyenne de $0,63 \pm 0,12 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ (Figure 62C, Annexe 7). Une diminution significative de la vitesse de croissance des racines *brn1-1 brn2-1* ne pénétrant pas la couche inférieure est également observée rapidement après contact avec l'interface, passant de $3,16 \pm 0,24 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ à $1,40 \pm 0,20 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ (56 %) (Figure 62, Annexe 7).

Dans le milieu **0,2-0,5**, le contact entre les racines *fez-2* se réorientant et l'interface n'entraîne pas de variation significative de la vitesse de croissance (Figure 62, Annexe 7). En revanche, une diminution significative de la vitesse de croissance, de 44 % pour les racines *smb-3* et de 42 % pour les racines *brn1-1 brn2-1*, est observée après le contact avec l'interface (Figure 62, Annexe 7). Ces diminutions sont équivalentes à la diminution de vitesse de croissance observée chez les racines sauvages après contact avec l'interface du milieu 0,2-0,5 (-37%, Figure 62E). Pour les lignées *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*, tout comme pour la lignée sauvage, un recouvrement partiel de la vitesse de croissance est observé une fois la réorientation finalisée, c'est-à-dire que la vitesse de croissance ne retrouve pas son niveau initial même 600 minutes après le contact avec l'interface (Figure 62, Annexe 7).

En réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales, ni la pénétration ni la réorientation de l'apex des racines *fez-2* ne sont accompagnées d'une diminution de la vitesse de croissance, et ceci contrairement à ce qui a été observé chez les racines sauvages. Chez les racines *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*, l'augmentation des contraintes mécaniques axiales entraîne une diminution de la vitesse de croissance similaire à celle observée chez les racines sauvages.

En conclusion, les expérimentations menées dans les milieux une-couche et les milieux deux-couches ont révélé des phénotypes bien distincts entre les lignées mutantes *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*. Les principales observations que nous avons faites sont présentées dans les Tableaux 1, 2 et 3. De façon intéressante, les racines *fez-2* et *smb-3*, dont la coiffe est altérée en termes de géométrie, de taille et de nombre de couches cellulaires, présentent des réponses de croissance à une augmentation des contraintes mécaniques notoirement différentes de celles des racines sauvages. De plus, à la fois les altérations morphologiques de la coiffe et les altérations des réponses des racines dans les milieux une-couche et deux-couches sont opposées entre les racines *fez-2* et *smb-3*.

	Col-0	<i>fez-2</i>	<i>smb-3</i>	<i>brn1-1 brn2-1</i>
<i>inverse</i> Sharpness Index				
Acuité de l'apex	0,41	0,31 Acuité +	0,51 Acuité -	0,40 Acuité =
Vitesse de croissance 0,2 %-1,2 %	- 45 %	- 59 %	- 36 %	- 43 %
Longueur de la zone de croissance 0,2 %-1,2 %	-28 %	+ 9 % (ns)	- 18 % (ns)	-29 %
EER _{max} 0,2 %-1,2 %	- 25 % (ns)	- 62 %	- 25 % (ns)	+ 6 % (ns)

Tableau 1. Géométrie de la coiffe et principales réponses des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* à une augmentation de la rigidité du milieu. Pour l'iSI, les valeurs moyennes pour chaque génotype sont rappelées. Les pourcentages indiqués représentent le pourcentage du taux de diminution de vitesse de croissance, de longueur de zone de croissance ou d'EER_{max} entre les milieux contenant 1,2% et 0,2% de Phytigel. Les cases vertes et rouges indiquent une valeur significativement plus faible ou plus important, respectivement, que la valeur obtenue pour les racines sauvages. Les indications « ns » précisent que la diminution observée entre les deux conditions pour un même génotype n'est pas significative. Les mêmes codes sont utilisés pour les tableaux suivants.

	Col-0	<i>fez-2</i>	<i>smb-3</i>	<i>brn1-1 brn2-1</i>
Force critique (10 ⁻³ N)	1,12	0,66	1,77	1,22
Vitesse pénétration 0,2-0,3 Avant/Après contact	-60 %	-20 % (ns)	-42 %	-20 % (ns)
Réorientation 0,2-0,2	x	Boucle	x	x
Réorientation 0,2-0,3	Boucle	Marche	Boucle	Boucle
Réorientation 0,2-0,5	Marche	Marche	Boucle Vague Marche	Marche (Boucles avant contact)

Tableau 2. Réponses principales des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

Ces résultats suggèrent donc un lien entre la morphologie de la coiffe racinaire et la mise En revanche, les racines *brn1-1 brn2-1*, dont aucun phénotype particulier à l'apex n'a pu être mis en évidence au cours de nos expérimentations, ne présentent pas de modifications dans leurs réponses de croissance à l'augmentation à long terme ou à court terme des contraintes mécaniques.

V. Discussion

V.1. La géométrie de la coiffe ne semble pas être le facteur principal modulant les réponses des racines aux contraintes mécaniques.

Sur la base des études précédentes, nous avons émis l'hypothèse que la coiffe jouait un rôle dans les réponses des racines à une augmentation des contraintes mécaniques, en contrôlant la forme de l'apex racinaire et ainsi en modulant la distribution des contraintes mécaniques axiales autour de l'apex. Colombi *et al.* (2017) ont récemment montré chez le blé qu'un apex racinaire pointu augmentait la concentration des contraintes mécaniques axiales à l'extrémité de l'apex tandis qu'un apex en dôme permettait une distribution homogène des contraintes axiales sur toute la circonférence de l'apex (Colombi *et al.*, 2017). Du fait de cette distribution des contraintes axiales, un apex racinaire pointu favoriserait l'initiation et la propagation de fissures et diminuerait la résistance mécanique expérimentée par la racine. Ces mêmes auteurs ont d'ailleurs mis en évidence que la géométrie de l'apex racinaire était corrélée à la vitesse de croissance des racines dans un sol avec une densité apparente élevée (Colombi *et al.*, 2017). Les racines de blé dont l'apex est pointu progressent plus vite dans un sol dense que les racines dont l'apex est arrondi ou émoussé (Colombi *et al.*, 2017).

Pour valider notre hypothèse, nous avons étudié les réponses à une augmentation des contraintes mécaniques des racines *fez-2* et *smb-3*, dont la formation et l'organisation de la coiffe sont modifiées. Nous avons montré que l'altération de la formation de la coiffe chez les lignées mutantes conduisait à une modification de la taille et de la géométrie de l'apex des racines : l'apex racinaire de *fez-2* est plus pointu et à l'opposé, l'apex des racines *smb-3* est plus rectangulaire que celui des racines sauvages. En réponse à une augmentation à long terme et simultanée des contraintes mécaniques radiales, axiales et de frottements, nous avons observé que la croissance des racines *fez-2* était plus affectée que celle des racines sauvages. en place des réponses des racines à une augmentation des contraintes mécaniques.

		Col-0	<i>fez-2</i>	<i>smb-3</i>	<i>brn1-1 brn2-1</i>
1^{ère} zone de courbure (flambement)	Position/ apex (μm)	540	664	407	518
	Etendue (μm)	602	946	512	698
	Intensité (μm^{-1})	4,7	2,3	4,8	3,4
2^{ème} zone de courbure (active)	Position/ apex (μm)	276	335	245	334
	Etendue (μm)	350	503	368	471
	Intensité (μm^{-1})	3,4	1,7	5,2	3,0
Vitesse de croissance		-43 %	-20 % (ns)	-44 %	-43 %

Tableau 3. Caractéristiques de mise en place de la réorientation en marche dans le milieu 0,2-0,5 pour les racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1*

Le taux d'élongation élémentaire de ces racines, et non la longueur de la zone de croissance, diminue significativement en réponse à l'augmentation de la rigidité du milieu. Au contraire, la croissance des racines *smb-3* n'est pas affectée significativement par l'augmentation à long terme des contraintes mécaniques, pas plus au niveau de la longueur de la zone de croissance, qu'au niveau du taux d'élongation élémentaire. Dans les milieux deux-couches, face à une forte augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales, les racines *fez-2* présentent de faibles capacités de pénétration par rapport aux racines sauvages tandis que les racines *smb-3* présentent de plus fortes capacités de pénétration. Ainsi, les résultats obtenus dans les milieux une-couche et deux-couches sont opposés à ce qui était attendu. Dans l'étude de Colombi *et al.* (2017), la croissance des racines de plusieurs variétés de blé, caractérisées par des apex de géométries distinctes, ont été comparées en réponse à une augmentation de la densité apparente du sol. Contrairement à cette étude, notre expérimentation est basée sur l'utilisation de plantes dont la fonction d'un gène a été mutée et dont le nombre de cellules de la coiffe est modifié. Dans notre étude, l'effet de la géométrie de la coiffe sur la réponse aux contraintes mécaniques pourrait être compensé par l'effet d'une autre altération due aux mutations des gènes *FEZ* et *SMB*. Nos résultats suggèrent donc que la géométrie de la coiffe ne serait pas le facteur principal modulant la mise en place des réponses des racines aux contraintes mécaniques.

Pour confirmer cela, des expérimentations plus approfondies doivent être menées, notamment pour étudier la rigidité de la coiffe des racines sauvages et des racines mutantes. La perte et l'accumulation de couches cellulaires de coiffe chez les racines *fez-2* et *smb-3*, respectivement, pourraient altérer sa rigidité. Or, un matériau mou, peu rigide, se déforme de façon plus importante sous la contrainte qu'un matériau rigide. Dans notre système expérimental, une coiffe moins rigide se déformerait donc plus au contact de l'interface entre les deux milieux qu'une coiffe plus rigide.

Dans notre système expérimental deux-couches, nous avons montré que les racines mutantes qui étaient altérées dans leur capacité de pénétration présentaient également une force critique distincte de celle des racines sauvages. Les racines *fez-2*, présentant un taux de pénétration plus faible, subissent un flambement à partir d'une force axiale plus faible que les racines sauvages. Au contraire, les racines *smb-3*, qui pénètrent en plus grand nombre la couche inférieure, supportent une force axiale plus importante que les racines sauvages avant de flamber.

Dans le chapitre 2, nous avons expliqué que la force critique de flambement des racines dépendait principalement de quatre critères : la longueur de la zone susceptible de flamber, le diamètre et la rigidité de la racine dans la zone où survient le flambement et le confinement latéral de la racine. La géométrie de la coiffe ou la rigidité de la coiffe ne sont pas *a priori* des critères influençant la valeur de la force critique de flambement des racines. Ainsi, la différence de force critique que nous avons estimé entre les racines sauvages et les racines mutantes renforcent l'idée que la géométrie de la coiffe n'est pas un facteur principal modulant les réponses des racines aux contraintes mécaniques.

V.2. Les cellules de la coiffe racinaire seraient impliquées dans la mise en place des réponses des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* aux contraintes mécaniques

Chez les racines mutantes, si la géométrie de la coiffe ne semble pas être responsable des altérations de réponses racinaires aux contraintes mécaniques que nous avons observées par rapport aux racines sauvages, il serait envisageable que le nombre ectopique de couches cellulaires de coiffe soit en cause. Nous allons dans cette partie de la discussion développer des arguments en faveur de cette hypothèse.

La caractérisation morphologique des racines *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans un milieu peu contraignant a révélé qu'il n'y avait pas de différences significatives de la longueur de la zone de croissance ou du diamètre au niveau de la zone d'élongation des racines mutantes par rapport aux racines sauvages. De plus, dans les milieux deux-couches, le confinement latéral est identique pour toutes les racines, étant donné qu'elles progressent dans une couche supérieure contenant 0,2 % de Phytigel, quel que soit le milieu et le génotype. Le seul paramètre que nous n'étions pas en mesure de mesurer expérimentalement est la rigidité des racines. Ainsi, mis à part la rigidité des racines, les caractéristiques morphologiques ne nous permettent pas d'expliquer avec certitude les altérations de capacités de pénétration chez les racines *fez-2* et *smb-3*. Il est crucial de noter que ces caractéristiques ont été mesurées à un temps donné sur des racines extraites de leur milieu de culture. *In vivo*, il serait envisageable que les racines modulent de façon dynamique leur diamètre, leur zone de croissance ou même leur rigidité à la suite du contact avec l'interface. Il a été montré par le passé que la présence d'un obstacle ou la compaction d'un sol entraînait des modifications rapides telles que l'initiation de racines latérales, le raccourcissement de la zone de croissance, l'augmentation

du diamètre racinaire (Croser *et al.*, 1999; Verlag *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2009; Bizet *et al.*, 2016). Bizet *et al.* (2016) ont observé une diminution importante de l'EER_{max} chez les racines de peuplier dans les heures suivant le contact avec un obstacle rigide (maximum 4 h). Dans la zone d'élongation, il a également été suggéré qu'une forte contrainte mécanique pouvait induire la réorientation des microtubules corticaux et, par extension, des microfibrilles de cellulose présentes dans les parois cellulaires, ce qui restreindrait l'expansion axiale des cellules et favorisait leur gonflement latéral (Bengough *et al.*, 2011). Une étude a également mis en lien la diminution de la zone de croissance en réponse à une compaction du sol avec la rigidification des parois des cellules en expansion (Croser *et al.*, 1999). L'origine de cette rigidification n'a à ce jour pas été explorée mais plusieurs hypothèses ont vu le jour, suggérant par exemple l'induction de la biosynthèse d'auxine ou d'éthylène, ou encore des modulations transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles des enzymes de la paroi comme les XTH ou les EXPANSINS (Kimbrough *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2008; Lourenço *et al.*, 2015).

Dans notre système expérimental de milieux deux-couches, le déclenchement de telles voies de signalisation en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques axiales conduirait à l'augmentation de la résistance au flambement des racines, en diminuant la longueur de la zone racinaire sujette au flambement, ou en augmentant la rigidité de la racine. Cela favoriserait indirectement la pénétration des racines dans la couche inférieure de milieu. Chez les racines *fez-2*, qui présentent de faibles capacités de pénétration, il serait envisageable que ce type de mécanismes soit affecté par le nombre restreint de couches cellulaires de coiffe latérale et de columelle. Cette hypothèse peut être appuyée par les diverses caractéristiques des réponses aux contraintes mécaniques que nous avons observé chez les racines *fez-2*. Dans un premier temps, nous avons observé que les longueurs de la zone de croissance et des cellules matures n'étaient pas affectées de manière significative par l'augmentation des contraintes mécaniques. De plus, en réponse à une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales, nous avons observé que le flambement des racines *fez-2* survenait dans une zone plus éloignée de l'apex que chez les racines sauvages. Mis en commun avec l'absence de modulation de la vitesse de croissance après contact avec l'interface, ces résultats suggèrent une absence de régulation de la zone de croissance en réponse à un stress mécanique chez les racines *fez-2*. Autre fait intéressant, lors de la réorientation en marche de ces mêmes racines face à la plus forte augmentation de contraintes axiales, nous avons observé que la seconde zone de courbure était quasiment inexistante.

Massa et Gilroy (2003) ont attribué cette deuxième zone de courbure en partie à la réponse gravitopique de la racine. Or, selon nos expérimentations, la réponse gravitropique ne semble pas être altérée chez les racines *fez-2*. Ces observations suggèrent d'une part que la mise en place de la deuxième zone de courbure illustre une réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques axiales plutôt qu'une réponse à la gravité et d'autre part, que les couches cellulaires de la coiffe participeraient à la mise en place de cette deuxième zone de courbure. Ainsi, les différents résultats obtenus sur les racines *fez-2* suggèrent qu'il y a un lien entre les cellules de la coiffe et la mise en place des réponses de croissance aux contraintes mécaniques. Pour les racines *smb-3*, qui présentent, au contraire des racines *fez-2*, des couches de coiffe additionnelles, leurs importantes capacités de pénétration laissent à penser que les couches de coiffe supplémentaires pourraient impliquer des régulations rapides de la zone de croissance favorisant ainsi la pénétration des racines dans la couche de milieu inférieur.

Le cas des racines *brn1-1 brn2-1* est plus difficile à interpréter. Chez le double mutant, les cellules matures COL ne sont pas desquamées et restent ainsi attachées au reste de la coiffe. L'impact de la mutation sur le fonctionnement de la coiffe et notamment sur des mécanismes tel que la production et la sécrétion de mucilage n'est pas clair. Il est actuellement difficile de déterminer si l'absence de desquamation des cellules matures COL chez les racines *brn1-1 brn2-1* permet de réduire ou d'augmenter les frottements entre les racines et leur substrat. En revanche, il a été observé que le reste de la coiffe n'apparaissait pas désorganisé et que les cellules de la coiffe latérale n'étaient aucunement impactées par la double mutation (Bennett *et al.*, 2010). D'après nos expérimentations, il semblerait que les racines *brn1-1 brn2-1* ne présentent pas d'altérations significatives des réponses aux contraintes mécaniques par rapport aux racines sauvages, que ce soit dans les milieux une-couche et deux couches. Le fait que les racines *brn1-1 brn2-1*, qui sont affectées uniquement au niveau des cellules de la columelle, ne présentent aucun phénotype dans nos conditions expérimentales, suggère que les cellules de la coiffe latérale seraient particulièrement importantes dans la perception et/ou la transduction du signal mécanique.

Chapitre 4 : Vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la réorientation des racines en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

Les études décrites dans les chapitres précédents nous ont permis de décrire précisément la cinétique de réponse des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales. Bien que la réorientation puisse être déclenchée par une instabilité mécanique, une réponse active de la racine ne peut être exclue. Aussi, nous proposons dans ce dernier chapitre d'explorer la part active de la réponse des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales. En prenant en compte les données de la littérature, nous avons initié cette étude en se basant sur l'implication de certains acteurs moléculaires, auparavant identifiés comme étant impliqués dans la mise en place des réponses des racines aux variations de contraintes mécaniques.

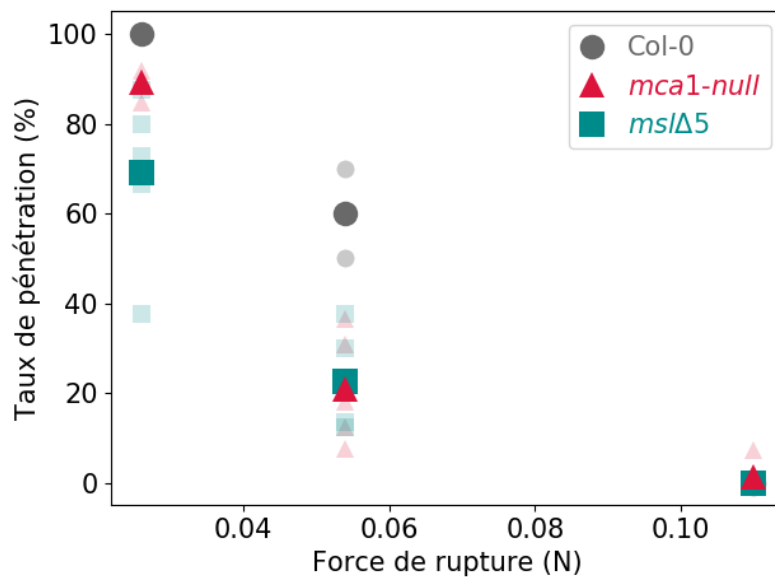
En réponse à une courbure de la racine d'*Arabidopsis thaliana*, il a été observé que l'étirement des membranes plasmiques des cellules du côté convexe de la racine entraînait un influx de calcium cytosolique rapide et transitoire, une production de ROS, une acidification intracellulaire ainsi qu'une alcalinisation extracellulaire (Monshausen *et al.*, 2009). Il a été suggéré que ces réponses seraient induites par l'activation de canaux ioniques mécanosensibles localisés dans la membrane plasmique.

Le canal ionique MCA1 est une protéine localisée dans la membrane plasmique des cellules de l'apex racinaire et dont l'activité dans l'influx de calcium cytosolique en réponse à un choc osmotique ou un étirement de la membrane plasmique a été démontré chez *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* et *Nicotiana tabacum* (Nakagawa *et al.*, 2007; Furuichi *et al.*, 2012; Kurusu *et al.*, 2012a,b). De plus, chez le mutant de perte d'expression (Knockout, KO) *mca1-null*, les racines ont présenté des difficultés de pénétration dans une couche de gel de forte concentration en Agar (Nakagawa *et al.*, 2007). Dans la continuité de ces travaux, et en partenariat avec l'équipe de H. Iida (Département de Biologie appliquée, Université de Science de Tokyo, Japon), nous avons choisi d'étudier le rôle de MCA1 dans la réponse à une

augmentation des contraintes mécaniques axiales, par l'analyse des réponses de croissance des racines *mca1-null* dans les milieux deux-couches.

Les canaux ioniques de la famille des MSL de classe II sont des protéines transmembranaires, dont les gènes codants sont exprimés dans de nombreux tissus dont l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana* (Haswell *et al.*, 2008). Parmi les 7 protéines MSL de classe II, les membres MSL4, MSL5, MSL6, MSL9 et MSL10 sont activés par l'étirement des membranes plasmiques, et ont donc une activité mécano-dépendante (Haswell, 2007). Malgré cela, leur rôle dans la perception des variations de contraintes mécaniques et dans la mise en place des réponses dans la plante a été peu étudié. Par ailleurs, les racines du quintuple mutant *msl4-1 msl5-2 msl6-1 msl9-1 msl10-1* ne semblent pas être affectées dans leur croissance en réponse à des stress salin, osmotique ou encore mécanique (Haswell *et al.*, 2008). A titre d'exemple, les réponses des racines du quintuple mutant face à un obstacle rigide (lamelle en verre) n'ont pu être distinguées des réponses des racines sauvages (Haswell *et al.*, 2008). Pour aller plus loin, nous avons tenté d'étudier la réponse des racines du quintuple mutant, que nous appellerons *msl15*, à une augmentation des contraintes mécaniques axiales dans les milieux deux-couches.

Après la perception, s'il en est, de l'augmentation des contraintes mécaniques axiales, nous émettons l'hypothèse qu'une mécanotransduction vers la zone de croissance racinaire permettrait la mise en place des réponses de croissance observées dans le Chapitre 2, et notamment de la réorientation de l'apex racinaire. Parmi les acteurs putatifs de la mécanotransduction, l'auxine pourrait être impliquée dans la mise en place des réponses aux contraintes mécaniques (Santisree *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2017). L'auxine est une phytohormone primordiale à la croissance et au développement racinaire, intervenant dans la division et l'élongation cellulaire, l'organogénèse, la réponse gravitropique, ... (Pacifici *et al.*, 2015). Pour étudier le rôle de l'auxine dans la mécanotransduction, nous avons analysé la réponse à l'auxine au cours de la réorientation de l'apex racinaire dans les milieux deux-couches, en utilisant les lignées d'*Arabidopsis thaliana* DR5::GFP et DII-Venus.



Taux de pénétration (%)			
Milieu deux-couches	Col-0	<i>mca1-null</i>	<i>mslΔ5</i>
0,2-0,2	100 ± 0 ^a	89 ± 5 ^a	69 ± 7 ^b
0,2-0,3	60 ± 3 ^b	21 ± 4 ^c	23 ± 4 ^c
0,2-0,5	0 ± 0 ^d	1 ± 1 ^d	0 ± 0 ^d

Figure 63 : Taux de pénétration des racines *mca1-null* et *mslΔ5* dans les milieux deux-couche 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5, en fonction de la résistance mécanique du milieu

Les taux de pénétration sont présentés en fonction de la force de rupture de l'interface mesurée en pénétrométrie dans les milieux 0,2-0,2 (0,026 N), 0,2-0,3 (0,054 N) et 0,2-0,5 (0,11 N). Les taux de pénétration calculés pour chaque lignée correspondent au pourcentage de racines qui ont pénétré la couche inférieure de milieu. Les symboles légèrement transparents correspondent au taux de pénétration obtenu pour chaque boîte de culture et les symboles pleins correspondent à la moyenne des taux de pénétration obtenus sur 6 boîtes de culture. Dans le tableau, les moyennes de pourcentage ± l'erreur standard sont présentées. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes (Test non paramétrique de Scheirer-Ray-Hare).

I. Réponses de croissance des racines primaires issues des lignées *mca1-null* et *msl45* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

Les graines d'*Arabidopsis* issues de la lignée transgénique *mca1-null* ont été fournies par l'équipe de H. Iida (Département de Biologie appliquée, Université de Science de Tokyo, Japon). La mutation *mca1-null* a été obtenue par l'insertion d'un T-DNA 28 paires de base en amont du quatrième exon du gène *MCA1* (Nakagawa *et al.*, 2007). L'insertion mène à l'absence d'ARNm de *MCA1* dans la plantule d'*Arabidopsis*.

Les graines issues de la lignée transgéniques *msl45* nous ont été fournies par l'équipe de J-M. Frachisse (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNRS, Gif sur Yvette-Paris-Saclay campus, France). Les mutations ont également été obtenues par l'insertion de séquences T-DNA dans les gènes codants correspondants (Haswell *et al.*, 2008).

Les réponses de croissance des racines *mca1-null* et *msl45* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales ont été étudiées dans les milieux deux couches 0,2-0,2, 0,2-0,3, 0,2-0,5, dans les conditions identiques à celles décrites précédemment.

I.1. Le taux de pénétration des racines primaires, et non la force critique axiale, est restreint chez les lignées *mca1-null* et *msl45*

Dans le milieu 0,2-0,2, présentant la plus faible augmentation de résistance mécanique à la pénétration, nous avons observé que seulement 89 % des racines *mca1-null* et 69 % des racines *msl45* pénétraient dans la couche inférieure de milieu. Pour rappel, toutes les racines sauvages parviennent à pénétrer la couche inférieure contenant 0,2 % de Phytigel (Figure 63). Dans le milieu 0,2-0,3, 21 % des racines *mca1-null* et 23 % des racines *msl45* pénètrent la couche inférieure de milieu, contre 60 % des racines sauvages (Figure 63). Enfin, dans le milieu 0,2-0,5 dont la rupture de l'interface nécessite une force de 0,11N, quasiment aucune racine des lignées *mca1-null* et *msl45*, tout comme aucune racine sauvage, ne pénètrent la couche inférieure contenant 0,5 % de Phytigel (Figure 63). Ainsi, les racines *mca1-null* et *msl45* présentent un taux de pénétration significativement plus faible que celui des racines sauvages.

En utilisant la méthode précédemment décrite, la force de croissance axiale critique des racines *mca1-null* et *msl45* a été estimée dans le milieu 0,2-0,3 (Figure 64). Le déplacement de l'interface par la croissance des racines *mca1-null* et *msl45* ne parvenant pas à pénétrer la

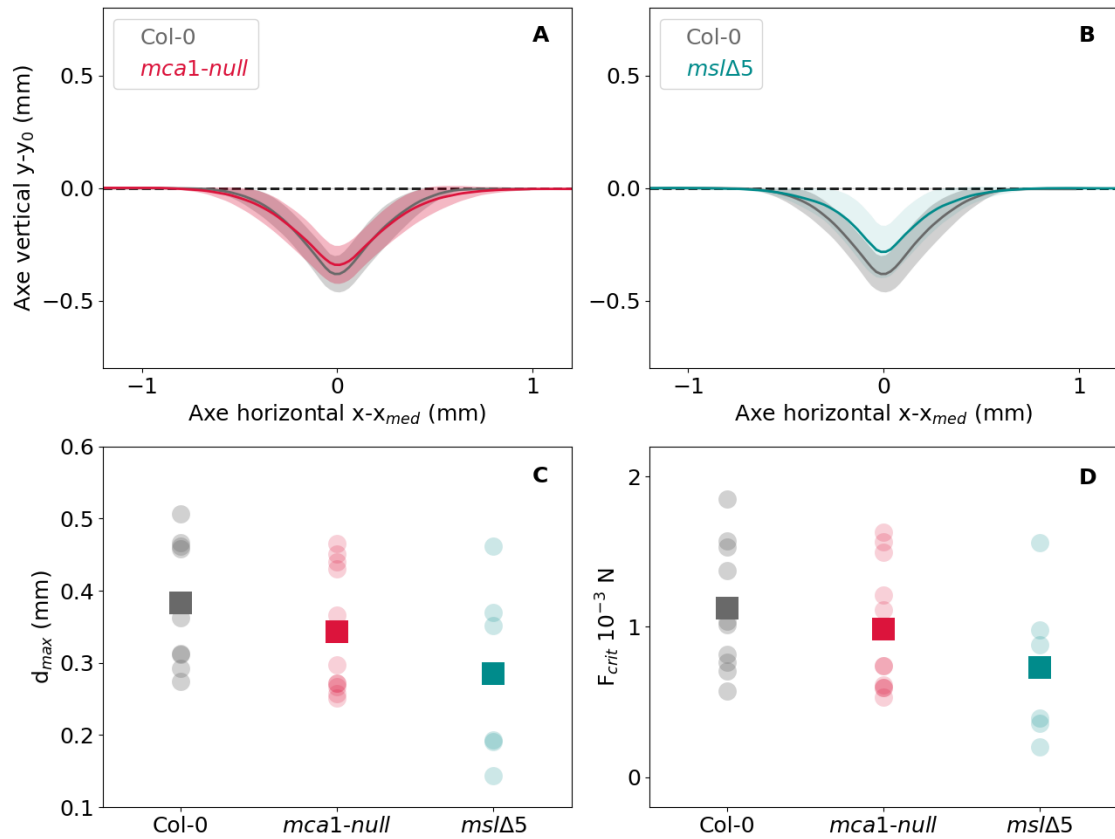


Figure 64 : Force axiale critique des racines *mca1-null* et *mslΔ5* dans le milieu deux-couches 0,2-0,3

(A-B) Représentation du déplacement maximal de l'interface du milieu 0,2-0,3, avant initiation d'une zone de courbure chez les racines primaires des lignées Col-0, *mca1-null* (A) et *mslΔ5* (B). Les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont représentées, $8 \leq n \leq 11$. (C-D) Déplacement maximal de l'interface avant initiation d'une zone de courbure et (C) force axiale critique des racines Col-0, *mca1-null* et *mslΔ5* dans le milieu 0,2-0,3 (D) Les ronds indiquent les valeurs individuelles et les carrés indiquent les valeurs moyennes, $8 \leq n \leq 11$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes avec $P < 0,05$ (ANOVA I et Test de Tukey).

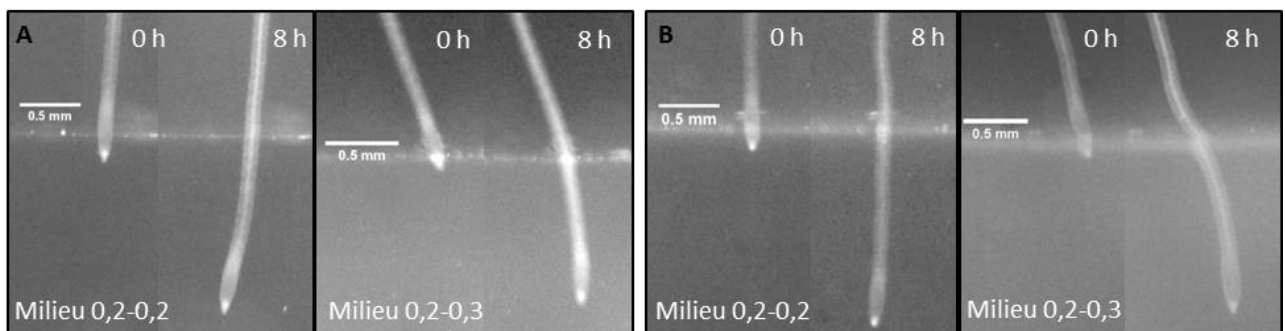


Figure 65 : Pénétration des racines *mca1-null* (A) et *mslΔ5* (B) dans les milieux deux-couches 0,2-0,2 et 0,2-0,3. Cinétique de pénétration d'une racine issue de la lignée *mca1-null* (A) ou *mslΔ5* (B) dans la couche inférieure de milieu, à 0 h et 8 h après le contact entre l'apex racinaire et l'interface.

couche inférieure de milieu a été mesuré juste avant l'initiation d'une zone de courbure (Figure 64A, B). Les racines *mca1-null* déplacent l'interface d'une profondeur maximale moyenne de $0,34 \pm 0,03$ mm, distance non significativement différente de celle des racines sauvages ($0,37 \pm 0,03$ mm) (Figure 64A, C). Ce déplacement a permis d'estimer la force axiale critique des racines *mca1-null* à une valeur moyenne de $0,99 \pm 0,13 \cdot 10^{-3}$ N ($1,12 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$ N pour les racines Col-0) (Figure 64D). Les racines *msl15*, quant à elles, déplacent l'interface d'une profondeur maximale de $0,29 \pm 0,05$ mm avant d'initier une zone de courbure (Figure 64B, C). Selon nos calculs, ce déplacement est permis par une force moyenne de $0,73 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$ N, non significativement différente de la force critique des racines sauvages (ANOVA II, Figure 64D).

Ces résultats suggèrent que les plus faibles taux de pénétration observés chez les racines mutantes ne sont pas dus à une altération des forces critiques de croissance axiale.

I.2. La réorientation de l'apex des racines primaires face à la plus forte augmentation des contraintes mécaniques axiales est altérée chez les lignées *mca1-null* et *msl15*

Une analyse des prises de vue séquentielles des racines *mca1-null* et *msl15* progressant dans les milieux deux-couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5 a été réalisée de manière identique à celle décrite dans les chapitres précédents. Cette analyse a permis d'analyser la cinétique et les caractéristiques de la réorientation de l'apex des racines *mca1-null* et *msl15* face à une augmentation des contraintes mécaniques axiales et de les comparer à celles des racines sauvages.

Chez la lignée sauvage, nous avons observé que la pénétration dans la couche inférieure de milieu n'affectait pas la rectitude des racines dans le milieu 0,2-0,2 alors qu'elle était accompagnée de la formation de zones de courbure chez certaines racines dans le milieu 0,2-0,3. En revanche, chez les lignées mutantes *mca1-null* et *msl15*, aucune zone de courbure n'est formée au cours de la phase de déplacement de l'interface par l'apex racinaire, que ce soit dans le milieu 0,2-0,2 ou 0,2-0,3 (Figure 65).

Lorsque les racines sauvages ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu, ces dernières développent une à plusieurs boucles pour une couche inférieure contenant 0,3 % de Phytigel alors qu'elles développent une forme finale en marche lorsque la couche inférieure contient 0,5% de Phytigel.

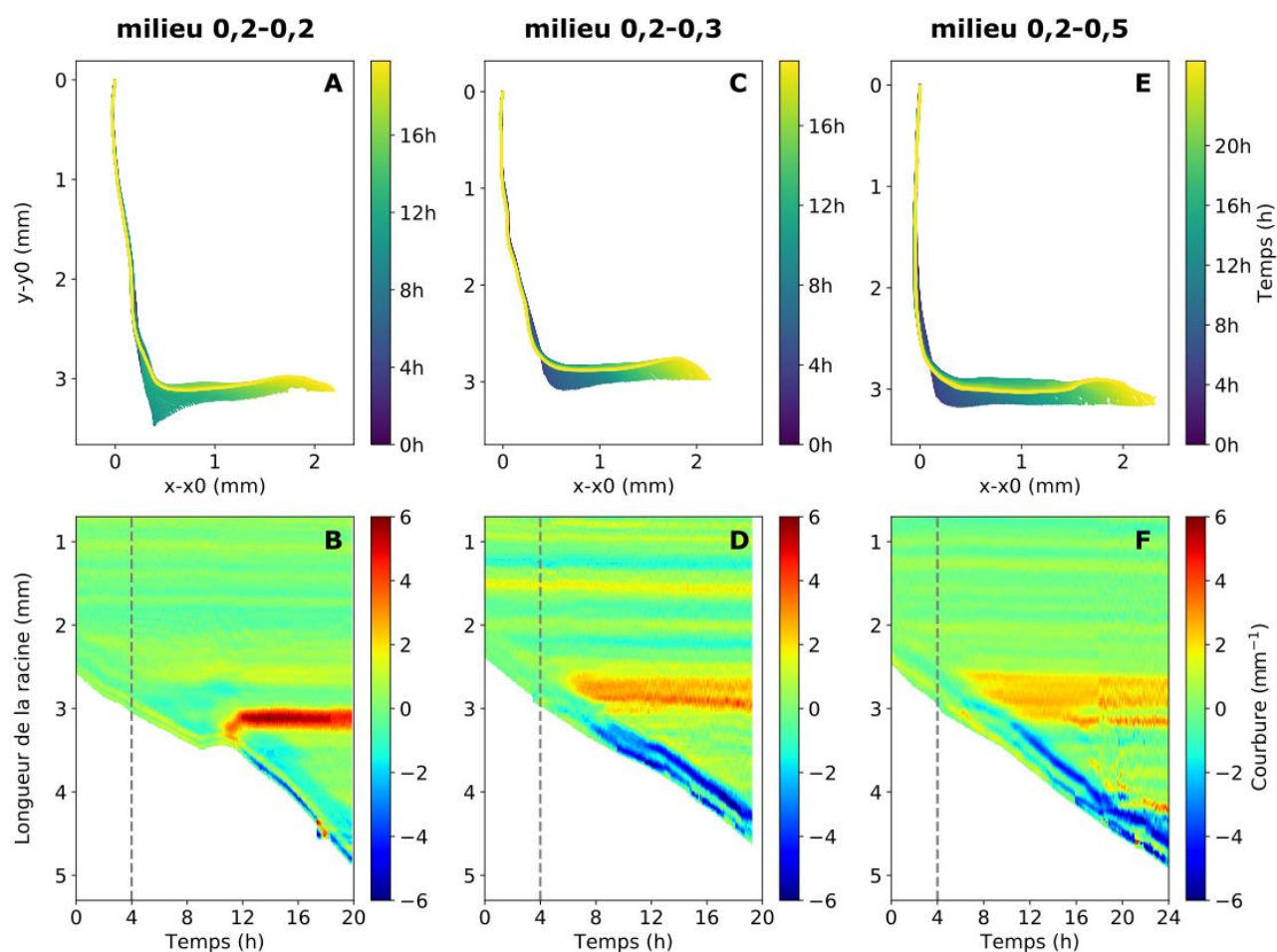


Figure 66 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la lignée *mca1-null* dans les milieux deux-couches 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5

(A, C, E) Squelettes d'une racine ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 (A), 0,2-0,3 (C) ou 0,2-0,5 (E). Les racines *mca1-null* se réorientent en marche dans les trois milieux deux-couches. (B, D, F) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine au cours de sa réorientation à l'interface du milieu 0,2-0,2 (B), 0,2-0,3 (D) ou 0,2-0,5 (F). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

En comparaison, les apex des racines *mca1-null* et *msl15* qui ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu se réorientent de façon largement majoritaire *via* la mise en place de deux zones de courbures, aboutissant à une forme finale en marche et ce, quel que soit le milieu deux-couches considéré (0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5) (Figure 66, Figure 67).

➔ *Racines mca1-null*

Chez les racines *mca1-null* dont l'apex est réorienté dans le milieu 0,2-0,2, une première zone de courbure est initiée dans les 4 h suivant le contact avec l'interface (Figure 66A). Cette première zone est initiée en moyenne à $679 \pm 78 \mu\text{m}$ de l'apex racinaire et atteint une intensité maximale de $3,6 \pm 0,6 \text{ mm}^{-1}$ (Figure 66A). Une fois complètement établie, la première courbure concerne une zone racinaire de $391 \pm 62 \mu\text{m}$ (Figure 66B, Annexe 9). La mise en place de la première zone de courbure lors de la réorientation de l'apex des racines *mca1-null* dans le milieu 0,2-0,2 est distincte de celle des racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5. En effet, par rapport aux racines sauvages, la première zone de courbure des racines *mca1-null* est mise en place à une plus grande distance de l'apex ($679 \mu\text{m}$ contre $540 \mu\text{m}$ pour les racines Col-0) et s'étend sur une distance beaucoup plus faible ($391 \mu\text{m}$ contre $602 \mu\text{m}$ chez les racines Col-0). Une seconde zone de courbure est alors initiée dans les 2h suivant la première, à $320 \pm 29 \mu\text{m}$ de l'apex (Figure 66B). La seconde zone de courbure, qui s'étend sur une distance de $388 \pm 79 \mu\text{m}$ atteint une intensité maximale moyenne de $4,0 \pm 0,7 \mu\text{m}^{-1}$ (Figure 66B).

Dans le milieu 0,2-0,3, la première zone de courbure est initiée dans les 3 h suivant le contact avec l'interface, à $622 \pm 35 \mu\text{m}$ de l'apex (Figure 66D). Par rapport à la première zone de courbure dans le milieu 0,2-0,2, celle mise en place dans le milieu 0,2-0,3 s'étend sur une distance significativement plus importante (Figure 66B, D ; Annexe 9). La seconde zone de courbure, quant à elle, n'est pas significativement différente de celle observée dans le milieu 0,2-0,2 (Figure 66B, D ; Annexe 9).

Enfin, dans le milieu 0,2-0,5, la première zone de courbure est formée à $745 \pm 33 \mu\text{m}$ de l'apex racinaire dans les 3 h suivant le contact (Figure 66E). Il apparaît que la première zone de courbure dans le milieu 0,2-0,5 est formée significativement plus loin de l'apex que chez les racines sauvages dans le même milieu (Annexe 9). De plus, cette zone de courbure s'étend sur une distance de $828 \pm 45 \mu\text{m}$ après formation, ce qui est significativement plus important que chez les racines sauvages ($602 \pm 64 \mu\text{m}$) (Figure 66, Annexe 9).

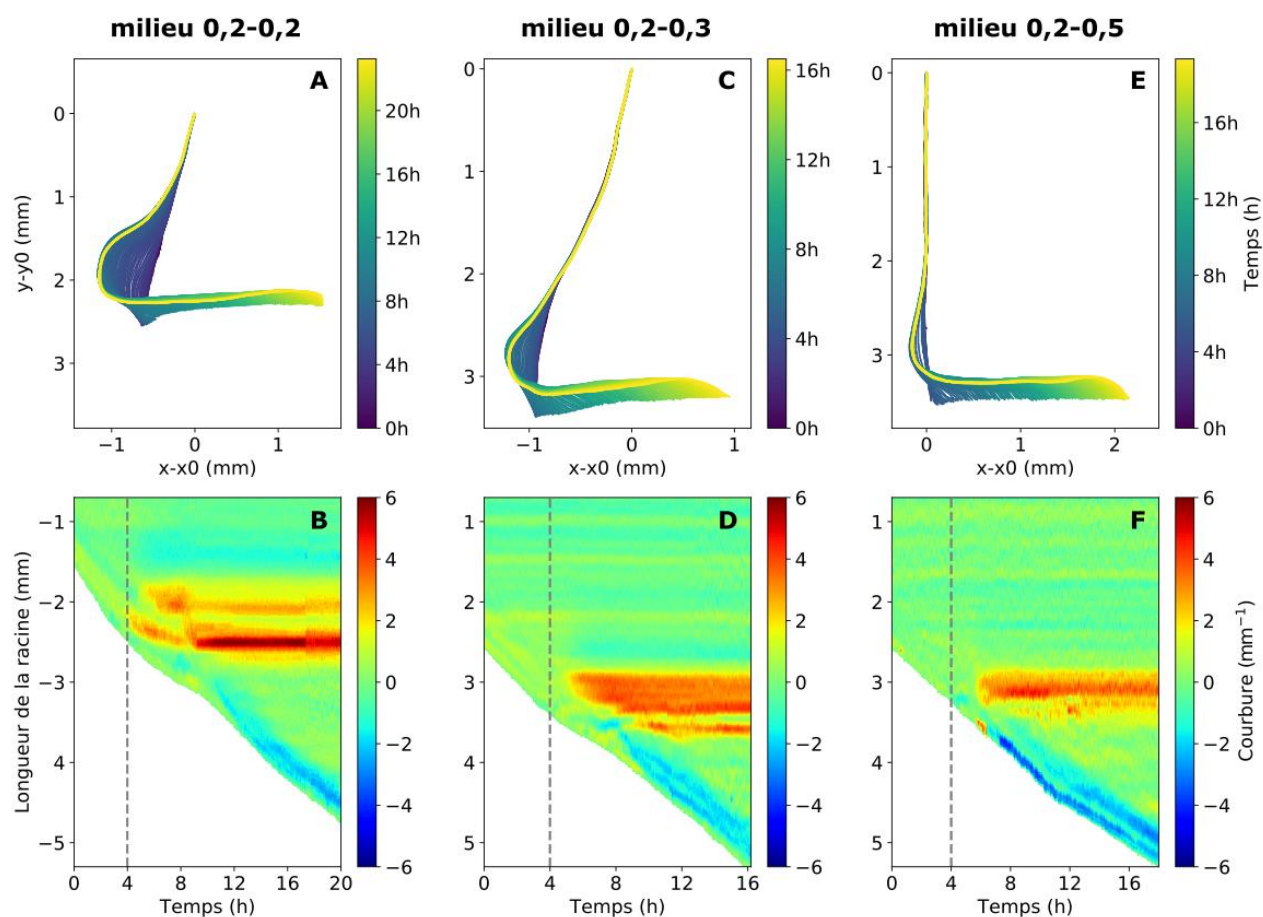


Figure 67 : Réorientation de l'apex des racines primaires issues de la *msl15* dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5

(A, C, E) Squelettes d'une racine ne pénétrant pas la couche inférieure du milieu 0,2-0,2 (A), 0,2-0,3 (C) ou 0,2-0,5 (E). Les racines *msl15* se réorientent en marches dans les trois milieux deux-couches. (B, D, F) Suivis spatiotemporels des zones de courbures formées à l'apex d'une racine au cours de sa réorientation à l'interface du milieu 0,2-0,2 (B), 0,2-0,3 (D) ou 0,2-0,5 (F). La ligne en pointillés indique le contact entre la pointe racinaire et l'interface, qui a lieu 4 heures après le début de la prise de vue.

En revanche, aucune différence significative de mise en place de la deuxième zone de courbure n'est observée entre les racines *mca1-null* et les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (Annexe 9).

Chez les racines *mca1-null*, il semblerait que l'augmentation de la résistance mécanique de l'interface impacte la longueur totale de la première zone de courbure. La réorientation en marche des racines *mca1-null* dans le milieu 0,2-0,3 est celle dont les caractéristiques se rapprochent le plus de la réorientation en marche des racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5. En comparaison, la réorientation des racines *mca1-null* dans le milieu 0,2-0,5 est quelque peu différente de celle des racines sauvages dans le même milieu, en termes d'étendue et de distance à l'apex (Figure 66, Tableau 4, Tableau 5).

→ Racines *msl15*

Comme pour les racines *mca1-null*, les apex racinaires issus de la lignée *msl15* qui ne pénètrent pas la couche inférieure de milieu se réorientent principalement en forme de marche (Figure 67). Dans les trois milieux deux-couches, une première zone de courbure est initiée dans les 2 à 4 h après le contact de l'apex racinaire avec l'interface à une distance moyenne de 724 ± 64 μm dans le milieu 0,2-0,2, de 448 ± 57 μm dans le milieu 0,2-0,3 et de 536 ± 33 μm dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 67). Ainsi, la première zone de courbure est formée à une distance significativement plus petite de l'apex racinaire dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5 par rapport au milieu 0,2-0,2 (Annexe 10). L'intensité maximale de cette première courbure varie entre les trois milieux, allant d'une valeur moyenne de $6,0 \pm 0,7$ mm^{-1} dans le milieu 0,2-0,2 à une valeur moyenne de $3,5 \pm 0,4$ mm^{-1} dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 67, Annexe 10). La première zone de courbure s'étend sur une distance de 787 ± 76 μm dans le milieu 0,2-0,2, de 717 ± 116 μm dans le milieu 0,2-0,3 et de 1016 ± 79 μm dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 67). L'étendue de la première zone de courbure chez les racines *msl15* est significativement plus importante dans le milieu 0,2-0,5 que dans les milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 (Annexe 10). De la même façon, son étendue est significativement plus importante que la celle de la première zone de courbure des racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (Annexe 10).

La seconde zone de courbure, quant à elle, se forme dans les trois milieux dans les 2 h après l'initiation de la première zone de courbure (Figure 67). Cette seconde zone s'étend sur une distance de 220 μm dans le milieu 0,2-0,2, 320 μm dans le milieu 0,2-0,3 et 400 μm dans le milieu 0,2-0,5 (Figure 67).

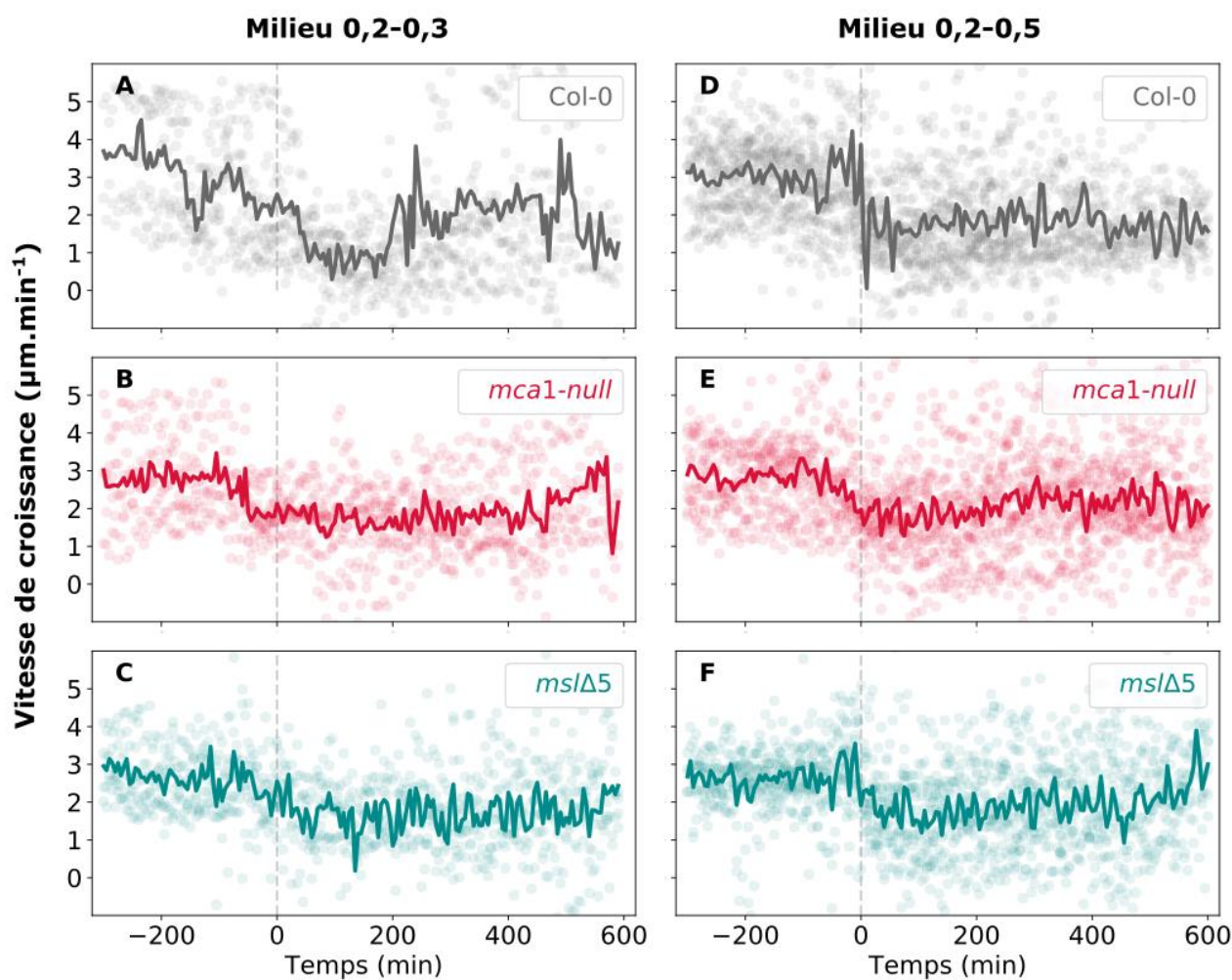


Figure 68 : Vitesse de croissance des racines Col-0, *mca1-null* et *mslΔ5* se réorientant après contact avec l'interface dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5

Les mesures ont été réalisées toutes les 5 min de -300 min à +600 min après contact entre l'apex racinaire et l'interface, pour les racines qui n'ont pas pénétré dans la couche inférieure dans les milieux 0,2-0,3 (A-C) et 0,2-0,5 (D-F). Les lignes indiquent les valeurs moyennes et les points indiquent les valeurs individuelles, $8 \leq n \leq 12$. La ligne en pointillés indique le moment du contact entre l'apex racinaire et l'interface.

L'analyse spatiotemporelle n'a révélée aucune différence significative entre la seconde zone de courbure des racines *msl15* dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5 (Figure 67, Annexe 10). Les caractéristiques de cette seconde zone de courbure ne sont pas non plus significativement différentes entre les racines *msl15* et les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (Annexe 10).

Cette analyse a montré que, chez les racines *msl15*, l'augmentation de la résistance mécanique de l'interface entraîne une diminution de la distance de formation de la première zone de courbure par rapport à l'apex racinaire, une augmentation de son étendue et une diminution de l'intensité maximale de la première courbure.

I.3. La vitesse de croissance des racines *mca1-null* et *msl15* n'est pas affectée significativement par l'augmentation des contraintes mécaniques axiales

Pour les racines *mca1-null* et *msl15* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5, la vitesse de croissance a été mesurée toutes les 5 min de 300 min avant le contact avec l'interface jusqu'à 600 minutes après le contact avec l'interface (Figure 68). De la même façon que dans les chapitres précédents, une moyenne de la vitesse de croissance des racines a été calculée pour trois phases caractéristiques : (i) une phase correspondant à la progression de la racine dans la couche supérieure avant le contact avec l'interface, (ii) une phase allant du contact entre l'apex et l'interface jusqu'à la mise en place complète des deux zones de courbures et (iii) une phase correspondant à la progression de l'apex le long de l'interface, après réorientation. Une comparaison statistique des moyennes de vitesse de croissance ont ensuite été réalisées sur la base d'une ANOVA II (un facteur génotype et un facteur phase 1, 2 ou 3) suivie d'un test de Tukey (Annexe 12).

Dans le milieu **0,2-0,3**, la vitesse de croissance des racines *mca1-null* et *msl15* dans la couche supérieure contenant 0,2 % de Phytigel atteint une valeur moyenne de $2,52 \pm 0,38 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ et de $2,60 \pm 0,31 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, respectivement (Figure 68B, C ; Annexe 12). Ces vitesses de croissance ne sont pas significativement différentes de celles des racines *mca1-null* et *msl15* dans un milieu une-couche contenant 0,2 % de Phytigel (Annexe 12).

	Col-0	<i>mca1-null</i>	<i>mslA5</i>
Fonction du/des gène(s)	x	Code un canal calcique	Codent des canaux ioniques non sélectifs
Résistance au flambement (10 ⁻³ N)	1,12	0,99	0,73
Vitesse pénétration 0,2-0,3	-61 %	-39 % (ns)	+5% (ns)
Réorientation 0,2-0,2	x	Marche	Marche
Réorientation 0,2-0,3	Boucle	Marche	Marche
Réorientation 0,2-0,5	Marche	Marche	Marche

Tableau 4. Phénotypes principaux des racines Col-0, *mca1-null* et *mslA5* dans les milieux deux-couches

		Col-0	<i>mca1-null</i>	<i>mslA5</i>
1^{ère} zone de courbure (flambement)	Position/ apex (µm)	540	745	536
	Etendue (µm)	602	828	1016
	Intensité (µm ⁻¹)	4,7	3,3	3,5
2^{ème} zone de courbure (active)	Position/ apex (µm)	276	399	296
	Etendue (µm)	350	471	508
	Intensité (µm ⁻¹)	3,4	2,0	2,7
Vitesse de croissance		-40 %	-22 % (ns)	-29 % (ns)

Tableau 5. Caractéristiques de mise en place de la réorientation en marche dans le milieu 0,2-0,5 pour les racines Col-0, *mca1-null* et *mslA5*

Après le contact avec l'interface, la vitesse de croissance des racines *mca1-null* atteint une valeur moyenne de $1,83 \pm 0,36 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ et celle des racines *msl45* atteint une valeur moyenne de $1,64 \pm 0,22 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, soit une diminution non significative de 27% et 37%, respectivement (Figure 68B, C). Pour les racines sauvages, le contact avec l'interface du milieu 0,2-0,3 est suivi d'une diminution significative de 58% de la vitesse de croissance (Figure 68A, Annexe 12). Ainsi, le contact avec l'interface de résistance mécanique intermédiaire impacte significativement moins la vitesse de croissance des racines *mca1-null* et *msl45* que celle des racines sauvages.

Dans le milieu **0,2-0,5**, aucune diminution significative de la vitesse de croissance des racines *mca1-null* et *msl45* n'est observée après le contact entre l'apex et l'interface (-22% pour les racines *mca1-null* et -33% pour les racines *msl45*) alors qu'une diminution significative de 37% est observée chez les racines sauvages (Figure 68E, F ; Annexe 12). Par ailleurs, une absence de variations significatives de la vitesse de croissance a également été observée pour les racines *mca1-null* et *msl45* qui ont pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 (Annexe 11).

En conclusion, l'analyse n'a pas permis de détecter d'influence significative des contraintes mécaniques sur la vitesse de croissance des racines issues des lignées *mca1-null* et *msl45*. De plus, la réorientation de l'apex des racines mutantes présentent des caractéristiques distinctes par rapport à la réorientation de l'apex des racines sauvages après le contact avec l'interface de plus forte résistance mécanique. Ceci ajouté aux différences significatives de taux de pénétration ainsi que de modes de réorientation observés pour les racines *mca1-null* et *msl45* par rapport aux racines sauvages, ces résultats suggèrent un rôle des gènes *MCA1* et *MSLs* (*MSL4*, 5, 6, 9, 10) dans la réponse des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales. Par ailleurs, bien que l'apex de quasiment toutes les racines *mca1-null* et *msl45* se réorientent selon une forme finale en marche après le contact avec l'interface des milieux deux-couches, certaines caractéristiques de cette réorientation sont affectées par l'augmentation de la résistance mécanique de l'interface. Il apparaît que ces caractéristiques ne sont pas affectées de la même manière chez les racines *mca1-null* et chez les racines *msl45*. Par exemple, l'étendue de la première zone de courbure est diminuée chez les racines *mca1-null* et augmentée chez les racines *msl45* en réponse à l'augmentation de la résistance mécanique de l'interface. Ces résultats suggèrent que le gène *MCA1* et les gènes *MSL4*, 5, 6, 9 et 10 pourraient intervenir dans la réponse des racines à une augmentation des contraintes mécaniques axiales *via* des voies de signalisation distinctes.

II. Réponse de l'auxine au cours de la réorientation en marche de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

II.1. Méthode : observation microscopique de la réponse à l'auxine

Pour l'observation microscopique de l'auxine, nous avons utilisé deux lignées transgéniques : la lignée DR5::GFP et la lignée DII-Venus.

Les graines portant la construction pDR5::GFP ont été fournies par l'équipe de F.Ditengou (Université de Freiburg, Allemagne, Ulmasov et al., 1997). Pour cette construction, la séquence codante du gène *DR5*, dont l'expression est induite par l'auxine, a été fusionnée avec la séquence codant la GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP). La protéine DR5 ::GFP est synthétisée et fluoresce, dans les 2 à 4 heures après l'arrivée d'auxine dans la cellules.

Les graines portant la construction DII-Venus ont été acquises sur le NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, N799173). Cette construction est basée sur la fusion d'une séquence codant une protéine fluorescente jaune appelée VENUS et d'une séquence codant un domaine d'interaction à l'auxine AUX/IAA nommé Domain II (DII), exprimée sous un promoteur constitutif 35S (Brunoud *et al.*, 2012). La protéine DII-Venus codée par le gène rapporteur est rapidement dégradée en réponse à l'auxine. Ainsi, l'absence d'un signal fluorescent jaune dans les tissus de la lignée DII-Venus indique indirectement la présence de l'auxine (Brunoud *et al.*, 2012). En ce sens, la lignée DII-Venus et la lignée DR5::GFP fonctionnent de manière antagoniste pour la visualisation de l'auxine.

Pour l'observation microscopique *in vivo* de l'auxine lors de la réorientation des racines, nous avons préparé un milieu deux couches contenant 0,5 % de Phytigel dans la couche supérieure et 0,8 % de Phytigel dans la couche inférieure. La méthode de préparation du milieu double a été adaptée à une observation sous microscope et cette nouvelle méthode a nécessité une adaptation de la concentration en Phytigel des deux couches de milieu. Pour préparer le milieu deux-couches, du milieu MS $\frac{1}{2}$ contenant 0,8 % et 0,5 % de Phytigel a été préparé comme énoncé dans le Chapitre 1. Le milieu MS $\frac{1}{2}$ contenant 0,8 % de Phytigel a été coulé dans des boîtes de Petri rondes de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 5 mm. Les boîtes de Petri ont été disposées sous la hotte, entrouvertes, jusqu'à refroidissement complet et gélification du milieu. Après environ 20-30 minutes, le milieu de culture a été découpé à 50 mm du bord de la boîte de Petri à l'aide d'un scalpel stérile et la partie supérieure du milieu a été retirée, laissant un vide de 40 mm dans chaque boîte de Petri.

Ensuite, le milieu de culture contenant 0,5 % de Phytigel a été coulé dans l'espace libre des boîtes de Petri sur une épaisseur de 5 mm. Il est important de couler le deuxième milieu délicatement de façon à ce qu'il ne déborde pas sur la couche de milieu 0,8 % déjà solidifiée. Après refroidissement complet du second milieu de culture, le gel a été à nouveau découpé à l'aide d'un scalpel de manière ce que la couche de milieu 0,5 % mesure 10 mm de hauteur.

Six graines issues des lignées DR5::GFP et DII-Venus ont été stérilisées comme décrit précédemment et déposées sur la tranche de 5 mm d'épaisseur à la surface de la couche de milieu contenant 0,5 % de Phytigel. Les boîtes de Petri ont ensuite été scellées avec du parafilm et disposées à la verticale en chambre de culture pendant 5 jours. Lorsque l'apex des racines se situait à quelques millimètres de l'interface des deux couches de milieu, les boîtes de Petri ont été fixées sur la platine d'un microscope Zeiss Examiner.D1 placé en position horizontale, de manière à ce que l'apex des racines soit visible. Les racines ont été observées à l'aide d'un objectif Plan-Neofluar x10. Le microscope a été piloté par le logiciel dédié Micromanager (Image J), qui a permis d'automatiser les prises de vue en lumière de transmission toutes les 10 minutes pendant 8 à 10 heures. La fluorescence et la platine du microscope n'étant pas pilotées par le logiciel, le passage de la lumière de transmission à la fluorescence a été réalisé de manière manuelle, de même que les déplacements de la platine en fonction de la croissance de la racine. Pour alléger la manœuvre, une prise de vue en fluorescence a été réalisée manuellement toutes les 30 minutes maximum. Pour les deux lignées DR5::GFP et DII-Venus, la longueur d'onde d'excitation utilisée a été de 488 nm et la fluorescence a été acquise en utilisant un filtre transmettant uniquement les longueurs d'ondes supérieures à 500 nm. La longueur d'onde d'émission optimale de la GFP se situe aux alentours de 510 nm et celle de VENUS se situe autour de 535 nm.

Les prises de vue en lumière de transmission et en fluorescence pour un même temps ont été fusionnées à l'aide de Fiji, pour faciliter la localisation de la fluorescence dans la racine. Pour analyser la localisation relative de l'auxine sur les prises de vue, une analyse de l'intensité des photons fluorescents de part et d'autre de la racine a été réalisée sur Fiji. Plus précisément, l'intensité des photons a été mesurée à partir de l'extrémité de la coiffe sur une distance de 500 μm et ce sur les deux côtés de la racine. Pour chaque prise de vue, le profil d'intensité de photons du côté supérieur de la racine a été soustrait au profil du côté inférieur de la racine et la soustraction des deux profils a été comparée entre les prises de vue séquentielles.

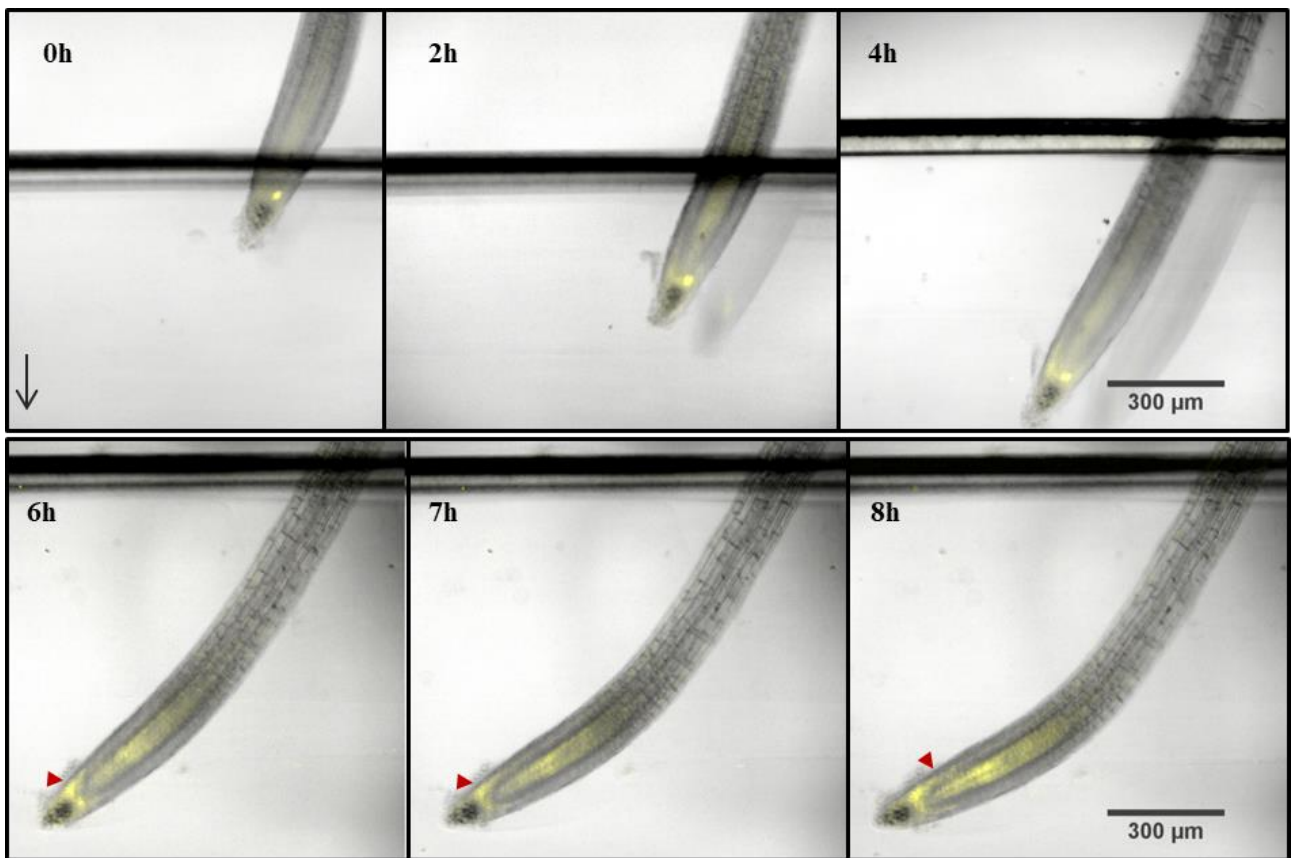


Figure 69 : Observation microscopique de la réponse à l'auxine au cours de la mise en place de la première zone de courbure dans le milieu 0,5-0,8 grâce à la construction DII-Venus

Les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues de la lignée DII-Venus progressant dans un milieu 0,5-0,8 ont été observées au microscope horizontal à fluorescence à l'objectif x10 pendant 8 heures à partir du contact de l'apex racinaire avec l'interface. La fluorescence indique indirectement l'absence d'auxine. Les triangles rouges pointent le côté de la racine où la fluorescence est plus présente. La flèche noire indique le sens de la gravité.

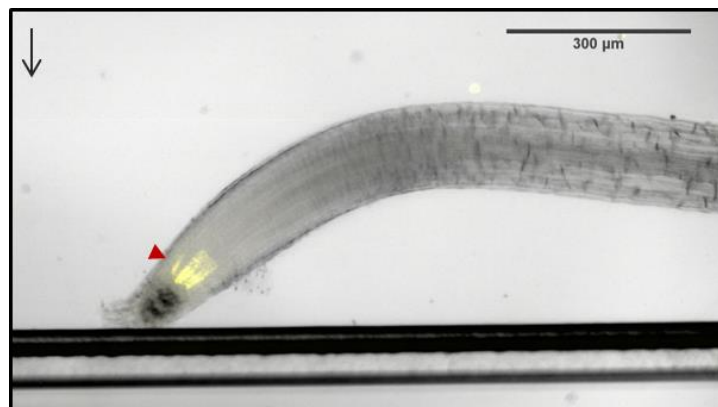


Figure 70 : Observation microscopique de la réponse à l'auxine au niveau de la deuxième zone de courbure dans le milieu 0,5-0,8

Apex d'une racine primaire issue de la lignée DII-Venus, 20 heures après contact avec l'interface dans le milieu 0,5-0,8. Les triangles rouges pointent le côté de la racine où la fluorescence est plus présente. La flèche noire indique le sens de la gravité.

II.2. La réorientation des racines dans le milieu deux-couches est accompagnée d'une réponse à l'auxine asymétrique

Au début de l'observation microscopique, les racines issues de la lignée DII-Venus progressant dans un milieu 0,5-0,8 présentent une fluorescence de faible intensité répartie dans la stèle, et dans l'ensemble des tissus juste au-dessus du centre quiescent (Figure 69, 0h). Comme attendu, aucun signal fluorescent n'est observé dans la coiffe des racines DII-Venus. Au contraire, les racines issues de la lignée DR5::GFP présentent une fluorescence de forte intensité au niveau du centre quiescent et de la coiffe au début de l'expérimentation (Figure 71, 0h). Les deux lignées indiquent donc la forte présence d'auxine dans la coiffe racinaire en absence de stimuli.

A partir de quatre heures après le contact entre l'apex racinaire et l'interface, les racines DII-Venus initient une première zone de courbure, de la même façon que les racines sauvages dans un milieu 0,2-0,5 (Figure 69). Conjointement à la mise en place de cette zone de courbure, et notamment de la réorientation de l'apex racinaire, il est possible d'observer un signal fluorescent plus intense sur la face supérieure de la racine (Figure 69; 4 h). L'asymétrie de fluorescence se renforce ensuite tout au long de la mise en place de la première zone de courbure, et est visible jusqu'à au moins 8 heures après le contact (Figure 69, 8 h). Ces observations suggèrent que l'auxine est présente en plus grande quantité dans la partie inférieure de la racine, et ce dès 4h après le contact avec l'interface (Figure 69).

Malheureusement, l'observation microscopique de la réorientation des racines n'a pu se prolonger au-delà de 8-10 h, du fait du dessèchement du milieu de culture. Cette limite de la durée de l'expérimentation nous a empêchés d'observer la fluorescence *in vivo* à partir du contact avec l'interface jusqu'à la mise en place de la seconde zone de courbure. Pour compléter cette étude et palier à ce problème, nous avons également réalisé des observations microscopiques de la fluorescence *ex vivo* sur des racines prélevées à des temps précis après contact avec l'interface. Pour observer si l'asymétrie de fluorescence est toujours présente lors de la mise en place de la seconde zone de courbure, les racines sont observées 15-20 h après le contact avec l'interface. Sur ces racines, nous avons observé un signal fluorescent légèrement plus important sur la face supérieure de la racine par rapport à la face inférieure de la racine, suggérant que la localisation asymétrique de l'auxine est présente de manière constante après réorientation (Figure 70).

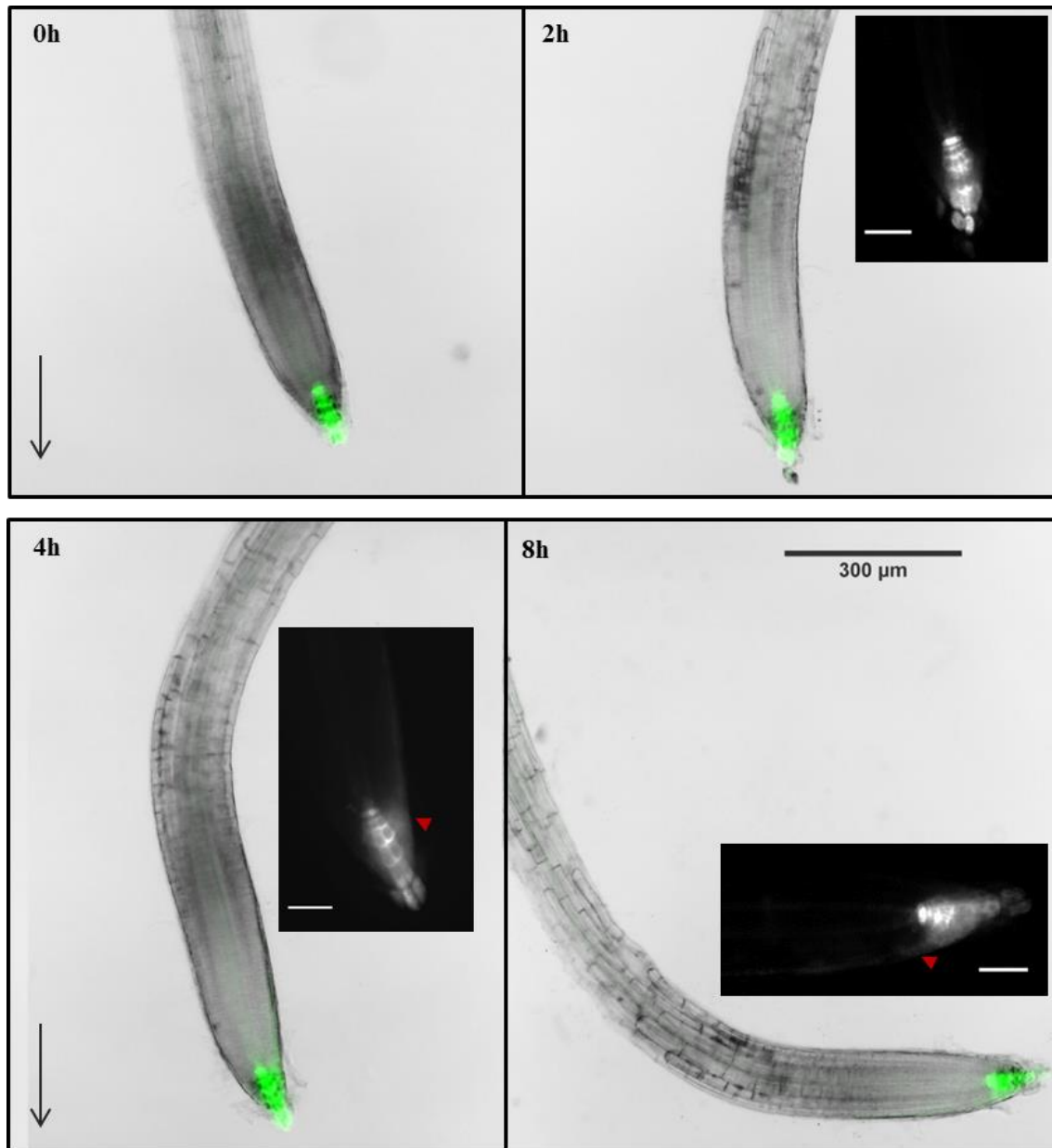


Figure 71 : Observation microscopique de la réponse à l'auxine lors de la mise en place de la première zone de courbure dans le milieu 0,5-0,8 grâce à la construction DR5::GFP

Apex d'une racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* issue de la lignée DR5::GFP progressant dans un milieu 0,5-0,8. La fluorescence indique indirectement la présence d'auxine. Les triangles rouges pointent le côté de la racine où la fluorescence est plus présente. Les flèches noires indiquent le sens de la gravité.

En complément des observations sur les racines issues des lignées DII-Venus, des observations microscopiques sur des racines DR5::GFP progressant dans le milieu 0,5-0,8 ont également été réalisées. Chez ces racines, une asymétrie du signal fluorescent est observée dans les 4 heures suivant le contact avec l'interface, avec un signal plus important sur la face supérieure de la racine par rapport à la face inférieure. Le signal sur la face supérieure de la racine s'étend jusqu'à une distance de 200 μm par rapport au centre quiescent (Figure 71, 4 h). Cette asymétrie du signal fluorescent indique une quantité d'auxine plus importante sur la face supérieure de la racine que sur la face inférieure. Ensuite lorsque la première zone de courbure est mise en place et l'apex est à l'horizontal, une nouvelle asymétrie du signal fluorescent est observée, suggérant cette fois une quantité d'auxine plus importante sur la face inférieure de la racine (Figure 71). Le signal DR5::GFP présentant un décalage de quelques heures par rapport à la présence de l'auxine dans les cellules, ces résultats suggèrent qu'une asymétrie de l'auxine est mise en place rapidement après le contact, avant la mise en place de la première zone de courbure et qu'une seconde asymétrie de l'auxine est établie entre la mise en place de la première zone de courbure et celle de la seconde zone de courbure (Figure 71).

Les résultats obtenus lors des observations microscopiques suggèrent donc qu'en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales, la réorientation de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* est accompagnée d'un transport et/ou d'une biosynthèse asymétrique de l'auxine.

III. Discussion

III.1. L'activité des canaux mécanosensibles de la famille des MCA et des MSL participe à la mise en place des réponses des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

Grâce à notre étude de la croissance et de l'orientation des racines *mca1-null* et *msl45* dans les milieux deux-couches, nous avons observé plusieurs altérations de réponses de ces racines par rapport aux racines sauvages. La différence la plus remarquable réside dans le taux de pénétration des racines *mca1-null* et *msl45*, beaucoup plus faible que chez les racines sauvages. La faible capacité des racines issue de la lignée *mca1-null* à pénétrer une couche d'Agar de forte résistance mécanique a été mise en évidence par le passé (Nakagawa *et al.*, 2007). En revanche, les études précédentes s'intéressant à la lignée *msl45* n'avait pu mettre en évidence aucune distinction de réponse au stress mécanique entre les plantules issues du quintuple mutant et les plantules sauvages (Haswell *et al.*, 2008; Peyronnet *et al.*, 2008). Par ailleurs, la faible capacité de pénétration des racines *mca1-null* et *msl45* coïncident avec celle observée chez les racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues des lignées mutantes *fer2* et *fer4*, n'exprimant pas le RLK FERONIA (Shih *et al.*, 2014). FER a été identifiée comme étant une intégrine-like possible, permettant de faire le lien entre le cytosquelette et la membrane plasmique des cellules. La déformation de la membrane plasmique d'une cellule à la suite d'un stimulus mécanique serait perçue à l'intérieur de la cellule en partie par le biais de protéines comme FER (Shih *et al.*, 2014). Il a été suggéré par diverses études que la mécanoperception impliquait une action complémentaire des canaux ioniques transmembranaires et des intégrines-like (Jaffe *et al.*, 2002; Monshausen and Haswell, 2013; Bellande *et al.*, 2017). Le fait que les pertes d'expression de *FER* et des gènes codant des canaux mécanosensibles entraînent le même phénotype soutient cette hypothèse.

Chez les racines mutantes *mca1-null* et *msl4*, il semblerait que le faible taux de pénétration ne soit pas lié à une altération de la force critique de flambement. Pour comprendre cette absence de lien, il est important de préciser que les racines comptabilisées dans le taux de pénétration n'ont pas toutes pénétrées directement la couche inférieure de milieu. Dans le milieu 0,2-0,3, il est fréquent d'observer des racines sauvages qui déforment l'interface jusqu'à subir un flambement puis finissent tout de même par induire la rupture de l'interface et pénétrer dans

la couche inférieure de milieu. En revanche, aucune zone de courbure n'est initiée chez les racines *mca1-null* et *msl15* qui pénètrent la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3. Chez les lignées mutantes, il semblerait que les racines qui ne pénètrent pas directement la couche inférieure ne la pénètrent jamais. Ces observations suggèrent d'une part qu'un flambement de la racine après le contact avec l'interface pourrait déclencher des mécanismes de régulation de la zone de croissance, permettant ensuite à la racine d'induire la rupture de l'interface et d'autre part, elles suggèrent que les canaux MCA et MSLs participeraient à ces mécanismes de régulation.

En plus des capacités de pénétration altérées, les racines *mca1-null* et *msl15* présentent des caractéristiques de réorientation de l'apex distinctes de celles des racines sauvages face à la plus forte augmentation des contraintes mécaniques axiales. Par ailleurs, leur vitesse de croissance n'est pas affectée par le contact avec l'interface, contrairement à celle des racines sauvages. Ces observations suggèrent que l'effet de l'augmentation des contraintes mécaniques axiales sur la zone de croissance, en termes de longueur ou d'EER, pourrait être altéré chez les racines *mca1-null* et *msl15*. Une analyse cinématique réalisée sur les racines *fer* a mis en évidence une altération spatiotemporelle de la distribution de l'expansion cellulaire chez ces racines par rapport aux racines sauvages (Shih *et al.*, 2014). Lors de leur croissance dans un milieu de forte concentration en Agar, il est ainsi apparu que les racines *fer* présentaient une zone d'élongation plus longue et un EERmax plus élevé que les racines sauvages (Shih *et al.*, 2014). Chez les racines *mca1-null* et *msl15*, des altérations similaires de la zone de croissance et de l'expansion des cellules pourraient expliquer à la fois les altérations de mise en place de la première zone de courbure et l'absence de modulations significatives de la vitesse de croissance après contact avec l'interface. Des analyses cinématiques *in vivo* réalisées sur les racines *mca1-null* et *msl15* progressant dans les milieux deux-couches permettraient de vérifier cette hypothèse.

En réponse à une flexion ou à un toucher de la racine, il a été mis en évidence que l'étirement des membranes plasmiques des cellules entraînait un influx de calcium cytosolique rapide et transitoire (Monshausen *et al.*, 2009). Cet influx de calcium serait alors à l'origine d'une cascade de signalisation aboutissant entre autres à la régulation de la croissance racinaire (Coutand and Moulia, 2000; Monshausen *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2009). Un rôle prépondérant des canaux calciques de la famille des MCAs dans l'influx de calcium cytosolique en réponse à un stimulus mécanique a été suggéré (Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010; Iida *et al.*, 2014).

Par ailleurs, la protéine FER, et les RLKs de façon plus générale, seraient également impliqués dans l'influx de calcium cytosolique après un stimulus mécanique, et déclencherait une cascade de signalisation parallèle ou complémentaire à celle déclenchée par les canaux mécanosensibles (Monshausen and Haswell, 2013). Chez les racines *mca1-null*, la perte d'expression de *MCA1* pourrait, comme celle de *FER*, altérer la signalisation mécanique, ce qui aurait une conséquence directe ou indirecte sur la mise en place des réponses de croissance racinaire à l'augmentation des contraintes mécaniques.

L'action des canaux MSLs en tant que canaux mécanosensibles a également été mise en évidence (Haswell *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2015). Jusqu'ici, il est apparu clair que les canaux MSL9 et MSL10 étaient activés par un étirement de la membrane plasmique et qu'ils avaient une meilleure affinité pour le transport des anions, et notamment des ions Cl⁻ (Hamilton *et al.*, 2015; Basu and Haswell, 2017). Ceci dit, le mode d'action des canaux MSLs et leur influence dans la mise en place des réponses aux stimuli mécaniques restent à définir. Toutefois, le fait que les racines du quintuple mutant *msl4 msl5 msl6 msl9 msl10* aient elles aussi une réponse aux contraintes mécaniques altérée suggère un rôle non négligeable des canaux MSLs dans la signalisation mécanique.

III.2. L'auxine serait impliquée dans la réorientation de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales

Dans notre système expérimental de milieux deux-couches, nous avons observé que des flux d'auxine asymétriques de part et d'autre de la racine étaient mis en place conjointement à la réorientation de l'apex racinaire. Dans un premier temps, il semblerait qu'une plus forte quantité d'auxine soit présente du côté concave de la racine lors de la mise en place de la première zone de courbure. Cette quantité d'auxine plus importante pourrait être le résultat d'un transport asymétrique de l'auxine ou bien d'une biosynthèse de l'auxine au niveau de la face concave de la racine. Or, l'auxine en grande quantité dans les cellules racinaires est connue pour inhiber leur expansion (Park and Cosgrove, 2012). En effet, il a été montré que l'auxine, en induisant une alcalinisation des parois cellulaires, entraînerait la rigidification de ces parois (Monshausen *et al.*, 2011; Park and Cosgrove, 2012). Lors d'une stimulation gravitropique des racines d'*Arabidopsis thaliana*, il a été mis en évidence que le transport asymétrique de l'auxine était responsable de la diminution de l'élongation des cellules sur la

face inférieure des racines par rapport à la face supérieure, entraînant la mise en place d'une courbure permettant à la racine de réorienter sa croissance en direction de la gravité (Cosgrove, 2000; Monshausen *et al.*, 2011). Nos expérimentations suggèrent qu'un tel mécanisme pourrait être mis en place après le contact entre l'apex racinaire et l'interface des milieux deux-couches. Le transport et/ou la biosynthèse asymétrique de l'auxine de part et d'autre de la racine pourrait ainsi participer à la réorientation de l'apex racinaire en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales.

Dans un second temps, nous avons observé une seconde asymétrie de la réponse à l'auxine dans les racines d'*Arabidopsis* au cours de la mise en place de la deuxième zone de courbure conduisant à la forme finale en marche. De façon intéressante, nos résultats suggèrent que l'auxine serait cette fois plus présente sur la face supérieure de la racine par rapport à la face inférieure, ce qui laisse à penser qu'un transport et/ou une biosynthèse asymétrique de l'auxine serait là encore responsable de la mise en place de la seconde zone de courbure. En réponse à une forte augmentation des contraintes mécaniques axiales dans les milieux deux-couches, alors que la première zone de courbure entraîne la déviation latérale de l'apex nécessaire au contournement de l'interface, la deuxième zone de courbure entraîne d'une part la réorientation de l'apex racinaire en direction du vecteur de gravité et permet d'autre par le maintien d'un contact permanent entre l'apex racinaire et l'interface. La mise en place de cette seconde zone de courbure a été interprétée comme étant le résultat de l'interaction entre les réponses gravitropiques et thigmotropiques (Massa and Gilroy, 2003). Cependant, les racines mutantes agravitropiques issues de la lignée *pgm1-1* (dépourvues d'amidon) ne présentent pas d'altération de leur réponse à un obstacle par rapport aux racines sauvages (Massa and Gilroy, 2003). Par ailleurs, nous avons mis en évidence dans le Chapitre 3 que la seconde zone de courbure mise en place chez les racines issues de la lignée *fez-2* était de faible intensité, alors que ces racines présentaient une réponse gravitropique normale. Ainsi, il serait tentant de spéculer que le contact entre la coiffe racinaire et l'interface induirait une régulation du transport et/ou de la biosynthèse d'auxine, permettant la mise en place de la seconde zone de courbure.

Le fait qu'une réponse à l'auxine asymétrique soit observée d'un côté de la racine puis de l'autre suggère que l'apex racinaire perçoit activement l'augmentation des contraintes mécaniques axiales et que des mécanismes de signalisation sont déclenchés dans la racine à la suite de cette mécanoperception.

La réorientation de l'apex racinaire en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques ne résulterait pas uniquement d'un flambement mais plutôt d'une action couplée des mécanismes mécanique et biologique.

Discussion générale et Perspectives

En conditions naturelles, les racines sont confrontées à une importante variabilité spatio-temporelle des propriétés physiques et mécaniques du sol (Jin *et al.*, 2013). Les variations de résistance mécanique du sol induisent de nombreuses altérations morphologiques et de croissance telles qu'une diminution de l'élongation racinaire, une augmentation du diamètre, une augmentation de la ramification du système racinaire, *etc.* (Bengough *et al.*, 2011; Potocka and Szymanowska-pułka, 2018). Or, la croissance et le développement des racines dans un sol influence l'absorption d'eau et de nutriments nécessaires au bon fonctionnement de la plante entière. Il a été montré que les traits racinaires affectés par une augmentation des contraintes mécaniques, *i.e.* le diamètre, la longueur, l'aire de surface de la racine, étaient corrélés au rendement des plants chez *Lupinus angustifolius* et *Triticum aestivum* (Chen *et al.*, 2014). Il a également été observé à plusieurs reprises que l'augmentation de la résistance mécanique du sol entraînait une diminution de la croissance de la tige, de l'élongation des feuilles et du rendement du grain chez les céréales (Masle and Passioura, 1987; Oussible *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1997; Whalley *et al.*, 2008).

En Europe, la compaction due aux pratiques culturales ou aux conditions climatiques concernerait une surface de 33 millions d'hectares (Gis sol). En France, la part des sols cultivables hautement sujets à la compaction est estimée entre 15 à 30 % (Lefebvre, 2011). Dans ce contexte, il semble primordial de mieux comprendre quelles réponses sont mises en place et comment sont-elles mises en place lorsque les racines sont confrontées à des variations spatio-temporelles des contraintes mécaniques. Cette meilleure compréhension permettrait entre autres d'optimiser le développement des plantes dont le système racinaire est soumis à d'importantes contraintes mécaniques ou de sélectionner des variétés dont la croissance et le développement sont moins affectés par les contraintes mécaniques.

En ce sens, nous avons développé un système expérimental modèle simplifié dont le but est de servir de base à une meilleure caractérisation des réponses des racines aux variations de contraintes mécaniques. Nous avons ensuite essayé de comprendre d'une part le rôle de la coiffe, en termes de géométrie et de fonctionnement, dans la mise en place de ces réponses.

Enfin nous avons tenté d'identifier le rôle d'acteurs moléculaires dans la mise en place de ces réponses. Le résultat de nos expérimentations, concomitamment aux connaissances déjà établies, permet de suggérer un modèle hypothétique de la perception et de la transduction du signal mécanique dans les racines, aboutissant à la mise en place des réponses de croissance aux variations des contraintes mécaniques.

I. Développement d'un système expérimental permettant un phénotypage précis des réponses de croissance des racinaire aux variations de contraintes mécaniques

I.1. Les milieux de culture de type hydrogel permettent de contrôler les variations de contraintes mécaniques imposées aux racines

Notre système expérimental est basé sur l'utilisation d'hydrogels dans lesquels progressent des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*. Les hydrogels, bien que très éloignés d'un sol réel en termes de propriétés mécaniques, offrent toutefois de nombreux avantages pour l'étude de la progression racinaire. Etant transparents, ils offrent une bonne visibilité des racines, ce qui est particulièrement favorable à l'étude des racines d'*Arabidopsis* qui sont de petites dimensions. De plus, dans un hydrogel, il est aisé de contrôler l'apport en eau, en nutriments, en vitamines,... et ainsi de faire varier uniquement les paramètres d'intérêts. Au cours de notre étude, nous avons mis en place deux types de milieux hydrogels : les milieux une-couche et les milieux deux-couches.

En caractérisant les propriétés mécaniques des milieux une-couche, nous avons mis en évidence que la rigidité et la résistance mécanique à la pénétration de ces milieux augmentaient avec la concentration en Phytigel. De plus, les milieux une-couche ont démontré une bonne homogénéité pour une concentration en Phytigel donnée. Ainsi, les milieux une-couche de concentration en Phytigel croissante permettent d'imposer différents niveaux de contraintes mécaniques réparties de façon homogène sur la circonférence des racines lors de leur progression verticale.

Dans les milieux deux-couches, nous avons mis en évidence que la superposition des deux couches de milieu impliquait la présence d'une interface de résistance mécanique à la pénétration plus élevée que celle des deux couches de milieu et ce, que les deux couches aient une concentration en Phytigel identique ou distincte. Nos expérimentations ont démontré que la résistance mécanique à la pénétration de cette interface augmentait avec la concentration en Phytigel de la couche inférieure de milieu. Ainsi, l'interface entraîne une augmentation rapide et importante des contraintes mécaniques axiales, et permet ainsi de mimer la présence d'un obstacle plus ou moins rigide opposé à la croissance racinaire. Cet obstacle présentant des caractéristiques élastiques, l'apex racinaire est capable de le déformer en générant une fore de croissance axiale. Si la force générée par la croissance axiale de la racine est suffisante par rapport à la force axiale de l'interface, elle peut induire la rupture de l'interface et permettre la pénétration de la racine dans la couche inférieure. Dans le cas contraire, l'interface se déforme sans rompre et l'apex racinaire est réorienté.

En conclusion, des variations diverses de contraintes mécaniques sont obtenues en jouant uniquement sur la concentration en Phytigel ajoutée dans le milieu de culture. Cet aspect permet, avec peu de mise en place, d'étudier un panel important de comportements racinaires. La méthodologie de fabrication des milieux une-couche et deux-couches peut être étendue à des combinaisons infinies de concentrations en Phytigel, de nombres de couches de milieu, permettant d'élargir encore l'étude de la réponse des racines aux variations de contraintes mécaniques.

I.2. L'étude des réponses de croissance par analyse d'image : une méthode complète de phénotypage

Le système de prises de vue séquentielles et d'analyse d'images que nous avons mis en place nous a permis d'étudier et de décrire précisément les réponses des racines à des augmentations de contraintes mécaniques, que ce soit dans les milieux une-couche ou deux-couches. Le programme d'analyse d'images RootStem Extractor a permis de tirer de nombreuses informations des prises de vue séquentielles, telles que la vitesse de croissance, les oscillations de croissance et la courbure le long des racines. De simples ajustements de la méthode de prise de vue permettraient de réaliser des analyses plus poussées telles que des analyses cinématiques *in vivo*. François Bizet, au cours de sa thèse (Bizet, 2014), a relaté une méthode de suivi de croissance sous infrarouge permettant une analyse cinématique *in vivo*

des racines adventives de peuplier à une résolution spatio-temporelle fine. Un défilage de l'appareil photo utilisé, ainsi que l'éclairement du dispositif sous infrarouge proche sont à la base de sa méthode. La lumière infrarouge proche, qui n'est pas perçue par la racine, génère de nombreuses marques le long de la racine, provenant d'irrégularités à sa surface (creux et bosses). L'éloignement relatif de ces marques au niveau de l'apex racinaire en fonction du temps est mesuré *via* des analyses d'images basées sur le principe de Particule Image Velocimetry (PIV). La PIV réalisée sur des prises de vue séquentielles permet d'obtenir des profils de Vitesse et d'EER de manière spatiotemporelle. Cette technique de cinématique appliquée à notre système expérimental nous permettrait ainsi d'étudier plus précisément la régulation des mécanismes de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une augmentation à long terme et à court terme des contraintes mécaniques.

En conclusion, notre étude détaillée du comportement racinaire a permis de phénotyper des racines transgéniques et de déceler des altérations de réponses aux augmentations des contraintes mécaniques chez ces lignées par rapport aux racines sauvages d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi, il est envisageable d'utiliser notre système expérimental pour un phénotypage à plus grande échelle. De plus, ce système expérimental serait facilement adaptable à des racines d'autres espèces végétales d'intérêt.

II. Réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* aux augmentations de contraintes mécaniques dans les hydrogels

II.1. La croissance racinaire est affectée dans les milieux une-couche et dans les milieux deux-couches

Dans les milieux une-couche, nous avons observé que la résistance mécanique du milieu de culture influençait divers paramètres de la croissance racinaire. La vitesse de croissance des racines et la longueur de leur zone de croissance sont affectées par une augmentation de la résistance mécanique. Il semblerait d'après nos résultats que l'augmentation des contraintes mécaniques dans les milieux une-couche affecte plus particulièrement la division des cellules que leur élongation. Cette hypothèse concorde avec l'étude de Youssef *et al.* (2018) qui a démontré que le taux de production cellulaire était le principal moteur de la croissance alors

que le taux d'élongation élémentaire était un acteur clé des ajustements de croissance à courts termes.

Dans les milieux deux-couches présentant des augmentations intermédiaires ou fortes des contraintes mécaniques axiales, nous avons observé une diminution rapide et significative de la vitesse de croissance dans l'heure suivant le contact de l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana* avec l'interface. Lorsque des racines de peupliers sont confrontées à un obstacle flexible, ont également été mises en évidence des diminutions de 30 % de la longueur de la zone de croissance et de 50 % du taux d'élongation élémentaire durant l'heure suivant le contact entre l'apex racinaire et l'obstacle (Bizet et al., 2016).

Dans un premier temps, nos résultats dans les deux types de milieux démontrent que la croissance racinaire est affectée d'une part par la compaction du milieu, impliquant une augmentation à long terme et concomitante des contraintes mécaniques axiales, radiales, et des frottements et d'autre part par la présence d'un obstacle, impliquant une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales. Au vue des précédentes études, nous pouvons émettre l'hypothèse que les ajustements de croissance résultent de mécanismes distincts dans les deux types de milieux. Il serait possible que l'augmentation à long termes des contraintes mécaniques dans les milieux une-couche impacte plus particulièrement la production des cellules alors que l'augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales dans les milieux deux-couches impacte l'élongation des cellules. Des analyses cinématiques *in vivo* sur les racines dans les milieux une-couche et dans les milieux deux-couches permettraient de confirmer cette hypothèse.

II.2. La résistance mécanique de l'interface conditionne la réorientation de l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*

Dans les milieux-deux couches, le contact entre l'apex racinaire et l'interface entraîne une accumulation des contraintes mécaniques axiales. D'après la littérature, l'apex racinaire doit générer une force de croissance axiale suffisante pour contrecarrer cette augmentation des contraintes axiales et déformer l'interface (Kolb et al., 2017). Si la force axiale nécessaire à la rupture de l'interface est plus importante que la force de croissance axiale critique de la racine, un flambement de cette dernière intervient (Box3).

En fonction de la résistance mécanique de l'interface, les racines ne parvenant pas à pénétrer la couche inférieure de milieu présentent principalement deux morphologies distinctes : une morphologie en boucles et une en marche. Nous avons interprété la forme finale des racines comme étant dépendante de la déviation latérale de l'apex à la suite de l'initiation de la première zone de courbure. Si l'apex n'est pas dévié, de nouvelles zones de courbure sont formées successivement, débouchant sur la formation de boucles, et si l'apex est dévié, alors la croissance racinaire est réorientée en marche, permettant à la racine de contourner l'interface. Or, la déviation de l'apex semble être conditionnée par la résistance mécanique de l'interface. En effet, le déplacement maximal de l'interface pour la résistance à la pénétration la plus élevée est en moyenne deux fois plus faible que celui observé pour la résistance à la pénétration intermédiaire. Ces résultats suggèrent que, face à une interface de résistance intermédiaire, l'apex racinaire est contraint axialement et latéralement, ce qui préviendrait sa déviation latérale. Dans ce cas, la racine est assimilable à une poutre encastree à une extrémité (par les poils absorbants) et articulée à l'autre extrémité (rotation possible mais pas déplacement latéral). En revanche, une interface de résistance mécanique plus élevée contraint peu l'apex racinaire latéralement, ce dernier étant alors libre de dévier après l'initiation de la première zone de courbure. Dans ce cas, la racine est assimilable à une poutre encastree à une extrémité et libre à l'autre extrémité (déplacement latéral possible). Une étude précédente a démontré que, en plus de la résistance mécanique de l'interface, le confinement latéral de la racine conditionnait également le mode de flambement et la forme finale de la racine (Silverberg *et al.*, 2012). Dans les milieux deux-couches, les racines sont confinées sur l'ensemble de leur circonférence par la couche supérieure de milieu, contenant 0,2% de Phytigel dans nos trois configurations. Pour aller plus loin dans l'étude de la réorientation racinaire, il serait intéressant de compléter notre étude en faisant varier la rigidité de la couche supérieure de milieu afin d'analyser l'impact de cette rigidité d'une part sur la force de croissance critique des racines et d'autre part sur la cinétique de la réorientation de l'apex.

III. Modèle hypothétique de mécanoperception et transduction permettant la mise en place des réponses des racines aux contraintes mécaniques

Dans les milieux deux-couches, si plusieurs arguments nous amènent à penser qu'un flambement serait le point de départ de la réorientation de la croissance des racines, il serait plausible que ce flambement soit suivi par le déclenchement de processus actifs dans la racine permettant l'accomplissement de la réorientation de la croissance.

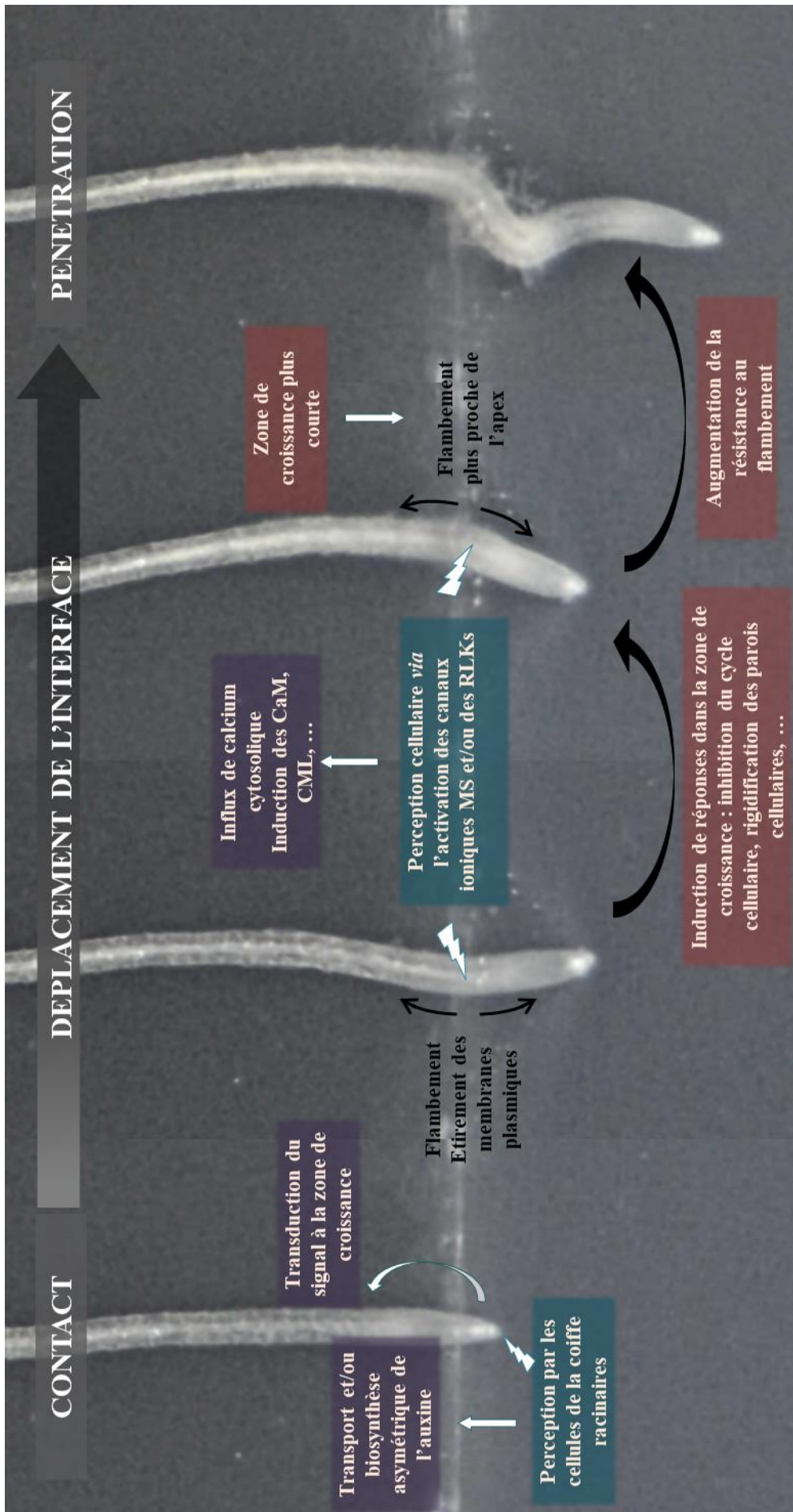


Figure 72 : Modèle hypothétique de la perception et de la transduction du signal mécanique permettant la mise en place des réponses des racines aux variations de contraintes mécaniques

L'illustration du modèle hypothétique est basée sur la réponse d'une racine primaire d'*Arabidopsis thaliana* sauvage confrontée à une augmentation des contraintes mécaniques axiales dans un milieu 0,2-0,3. Les encarts bleus, violets et rouges représentent des étapes putatives de la mécanopercption, de la mécanotransduction, et de la mise en place de la réponse, respectivement.

Le contact entre l'apex racinaire et l'interface (étape 1) serait perçu au niveau des cellules de la coiffe, déclenchant une voie de transduction qui impliquerait l'auxine. La force axiale générée par la croissance de l'apex racinaire entraîne un déplacement de l'interface, au cours duquel la racine subit de légers flambements (étapes 2 et 3). Ces flambements impliquent un étirement des membranes plasmiques de part et d'autre de la racine, qui est perçu au niveau cellulaire via l'activation de canaux ioniques. La mécanopercption déclenche une voie de transduction impliquant un influx de calcium cytosolique. Les deux voies de transduction déclenchent des mécanismes de réponse par le biais de modifications transcriptionnelles et traductionnelles. Les réponses au niveau cellulaire permettent une régulation de la croissance et de l'orientation de l'apex racinaire, aboutissant soit à la pénétration dans la couche inférieure de milieu (exemple, étape 4), soit à la réorientation de l'apex, en fonction de la résistance mécanique de l'interface.

Donnant du poids à cette hypothèse, nos études microscopiques préliminaires ont entre autres mis en évidence la mise en place de réponses à l'auxine asymétriques de part et d'autre de la racine, accompagnant la mise en place des deux zones de courbure lors de la réorientation en marche des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana*. Par ailleurs, nous avons observé que la mise en place des réponses racinaires à une augmentation des contraintes mécaniques axiales était altérée à la fois chez les racines affectées dans l'organisation et la géométrie de la coiffe racinaire et chez les racines *mca1-null* et *msl45* dépourvues des canaux ioniques mécanosensibles du même nom.

Nos résultats issus des expérimentations sur la lignée sauvage et sur les lignées mutantes nous amènent à proposer un modèle hypothétique de la perception et de la transduction du signal mécanique permettant la mise en place des réponses de croissance des racines face à une augmentation des contraintes mécaniques (Figure 72). Ce modèle hypothétique, basé sur nos résultats ainsi que sur de précédentes études, devra être vérifié par de nombreuses expérimentations complémentaires, dont nous proposons quelques exemples.

III.1. La coiffe racinaire : siège de la mécanoperception ?

Chez les racines *fez-2* et *smb-3*, dont la coiffe présente un nombre restreint ou accru de couche cellulaires COL et LRC, respectivement, l'altération des capacités de pénétration ainsi que des modes de réorientation nous amène à penser que le fonctionnement et/ou le nombre de couches cellulaires de la coiffe racinaire participeraient à la mise en place des réponses à une augmentation des contraintes mécaniques axiales. A la base de notre modèle hypothétique, nous proposons un rôle de la coiffe racinaire en tant que siège de la perception des variations de contraintes mécaniques axiales. Lors de la progression racinaire dans les milieux deux-couches, la coiffe racinaire est le premier tissu à entrer en contact avec l'interface, et dont les cellules sont déformées sous l'action des contraintes mécaniques axiales. Il serait envisageable que la déformation des membranes plasmiques des cellules de la coiffe à la suite du contact permette de déclencher des mécanismes de signalisation. Cette hypothèse est renforcée par une précédente étude qui a montré qu'une stimulation mécanique (de type toucher) effectuée sur les cellules périphériques de la coiffe inhibait la perception gravitropique en altérant la mobilité des amyloplastes de la columelle (Massa et Gilroy, 2003).

Les auteurs de cette étude avaient à l'époque spéculé que la coiffe racinaire participerait à la perception du signal mécanique et à la mise en place de la réponse thigmotropique, notamment en modulant le transport et la redistribution de l'auxine (Massa et Gilroy, 2003).

Notre observation d'une réponse à l'auxine plus importante du côté concave de la racine après le contact entre l'apex et l'interface dans les milieux deux-couches consolide cette hypothèse. Pour confirmer cela, plusieurs études devraient être réalisées :

- (I) Etude *in vivo* et en 3D de la déformation des cellules de l'apex racinaire en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques. Une telle étude a été initiée au laboratoire par le post-doctorant Hugo Chauvet, et est basé sur l'utilisation de la microscopie à feuillet de lumière (SPIM, Selective Plane Illumination Microscopy).
- (II) Etude des capacités de pénétration et de la réorientation de l'apex des racines d'*Arabidopsis thaliana* dans les milieux deux couches après ablation laser de tout ou partie des cellules de la coiffe racinaire. Une ablation de la coiffe latérale, de la columelle ou des deux tissus simultanément permettrait d'identifier précisément quel(s) type(s) cellulaire(s) est principalement responsable de la mécano-perception.
- (III) Poursuite de l'étude de la réponse à l'auxine après contact de l'apex racinaire avec l'interface. En outre, d'autres acteurs moléculaires pourraient être suivis au niveau de l'apex, comme le calcium ou l'acide jasmonique, qui sont connus pour participer à la réponse des racines aux contraintes mécaniques.

Si notre hypothèse se vérifie, la perte de couches cellulaires COL et LRC chez les racines *fez-2* affecterait alors leur mécanoperception, et ainsi la mise en place des réponses racinaires aux contraintes mécaniques. La présence d'une coiffe racinaire intacte avec un nombre précis de couches cellulaires pourrait être requise pour déclencher les processus de perception et transduction dans la racine et ainsi permettre la mise en place des réponses à l'augmentation des contraintes mécaniques.

III.2. Une mécanoperception parallèle et/ou complémentaire par le biais des canaux ioniques mécanosensibles ?

Au cours de nos expérimentations, nous avons observé que les racines *mca1-null* et *msl45*, qui n'expriment pas les gènes codant le canal calcique MCA1 et les canaux ioniques MSL4, MSL5, MSL6, MSL9 et MSL10, respectivement, présentaient des taux de pénétration moindre par rapport aux racines sauvages, sans toutefois que leur force de croissance axiale critique soit affectée significativement. Nous avons émis l'hypothèse que ces différents canaux ioniques transmembranaires, dont les gènes codants sont exprimés dans l'apex racinaire mais pas dans la coiffe, pourraient intervenir au cours du déplacement de l'interface par la croissance racinaire. Pour l'ensemble des lignées, nous avons observé un délai de 3 à 6 heures environ entre le contact de l'apex avec l'interface et la mise en place de la première zone de courbure. Ce laps de temps correspond au déplacement de l'interface par la croissance racinaire jusqu'à ce que la racine atteigne sa force de croissance critique. Sur les vidéos de la progression des racines dans les milieux deux-couches, nous avons observé que, durant ce laps de temps, les racines subissaient de légers flambements latéraux successifs d'un côté puis d'un autre. Le flambement, même léger, produit des contraintes mécaniques internes asymétriques de part et d'autre de la racine (Kolb *et al.*, 2017). Les cellules de la face concave de la racine sont soumises à une compression, générant une contraction des cellules, alors que les cellules de la face convexe sont soumises à une tension, générant un étirement des cellules. Or, il a été suggéré que l'étirement des membranes plasmiques sur la face convexe des racines activait les canaux ioniques transmembranaires, qualifiés de ce fait de mécanosensibles (Haswell *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2010). L'activation des canaux ioniques mécanosensibles déclencherait des voies de signalisation, entre autres, par le biais d'un influx rapide et transitoire de calcium cytosolique (Monshausen *et al.*, 2009). Cet influx de calcium cytosolique a par ailleurs été mis en évidence dans les minutes suivant le contact entre un obstacle rigide et l'apex des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* (Monshausen *et al.*, 2009). Le rôle des canaux ioniques de la famille des MCAs et des MSLs en tant qu'acteurs de la mécanoperception en réponse à la flexion de la racine a été suggéré (Monshausen *et al.*, 2009). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que lors de la phase de déplacement de l'interface par la croissance racinaire, les légers flambements subits par la racine activeraient l'ouverture des canaux MCA1 et de certains canaux MSLs dans l'apex racinaire, qui participeraient ainsi à la mécanoperception.

En conclusion, dans notre modèle hypothétique, nous suggérons une perception en deux temps des contraintes mécaniques résultant du contact de l'apex racinaire avec l'interface :

- (I) Une perception rapide du contact avec l'interface au niveau des cellules de la coiffe racinaire. Les acteurs moléculaires de cette perception seraient alors à identifier.
- (II) Une perception à plus long terme *via* l'activation des canaux ioniques transmembranaires au cours du déplacement de l'interface par la croissance racinaire

Ces deux événements de perception qui sont distincts dans le temps et dans l'espace pourraient ensuite activer deux voies de transduction du signal mécanique agissant en parallèle et/ou en interaction.

III.3. Une transduction du signal des zones de perception vers la zone de croissance impliquant l'auxine ?

La transduction du signal de la coiffe racinaire, ou des cellules soumises à une tension, vers la zone de croissance pour y déclencher des réponses de croissance des racines pourraient faire intervenir de multiples acteurs moléculaires. La réponse à l'auxine, déjà mentionnée précédemment, pourrait permettre la transduction du signal mécanique à partir des cellules de la coiffe vers les cellules de la zone de division ou d'élongation. L'auxine est une hormone prépondérante dans la régulation de multiples processus biologiques de la racine, telles que l'organogénèse, la division cellulaire, l'élongation cellulaire, la direction de la croissance (Friml *et al.*, 2002b; Ponce *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007; Dubrovsky *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2008; Nakayama *et al.*, 2012). Le rôle de l'auxine dans la transduction des signaux environnementaux et dans les régulations des tropismes a été mis en évidence à plusieurs reprises (Kaneyasu *et al.*, 2007; Monshausen *et al.*, 2011; Baldwin *et al.*, 2013). En revanche, son implication dans la mise en place des réponses racinaires à une augmentation des contraintes mécaniques n'a fait l'objet que de peu d'études. Dans notre modèle hypothétique, nous suggérons que le transport et/ou la biosynthèse d'auxine sont modulés à la suite de la perception de l'augmentation des contraintes mécaniques axiales et que cela aurait un impact sur la zone de croissance des racines. Par exemple, l'auxine pourrait entraîner une augmentation de la rigidité des parois cellulaires dans la zone d'élongation, inhibant alors l'expansion anisotrope des cellules.

Cette rigidification pourrait se faire par le biais de la régulation des enzymes de la paroi comme les EXPANSINS. En effet, les EXPANSINS sont des enzymes responsables du relâchement de la paroi qui agissent de manière pH-dépendante (Shcherban *et al.*, 1995; Park and Cosgrove, 2012, 2015). D'une part, un lien entre l'auxine et l'activité des EXPANSINS a déjà été suggéré (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994, 1995) et d'autre part, une étude transcriptomique a mis en évidence qu'une stimulation mécanique sur des racines d'*Arabidopsis thaliana* inhibait l'expression du gène EXP18 (Kimbrough *et al.*, 2004). L'auxine pourrait également être à l'origine de la régulation de la production cellulaire, et de l'induction de l'initiation de racines latérales observées en réponse à une augmentation des contraintes mécaniques axiales (Croser *et al.*, 1999, 2000; Richter *et al.*, 2009).

D'autres acteurs moléculaires pourraient également interagir ou agir en parallèle de l'auxine dans la transduction du signal mécanique jusqu'à la zone de croissance et permettre la mise en place des réponses racinaires à une augmentation des contraintes mécaniques axiales. Une étude en particulier a mis en évidence que des racines de tomates traitées avec un inhibiteur de réponse à l'éthylène étaient inhibées dans leur capacité de pénétration face à une augmentation de la résistance mécanique du sol (Santisree *et al.*, 2011). Cette étude a également montré qu'un apport exogène d'auxine sur ces racines rétablissait leur capacité de pénétration, à hauteur des racines non traitées avec l'inhibiteur de réponse à l'éthylène. Les auteurs ont suggéré que l'éthylène régulait le transport et/ou la biosynthèse de l'auxine en réponse à un stress mécanique, permettant ainsi d'impacter les capacités de pénétration des racines (Santisree *et al.*, 2011). Un rôle de l'acide jasmonique dans la réponse des racines aux contraintes mécaniques et dans la réorientation de la croissance en réponse à un obstacle a également été proposé (Santisree *et al.*, 2011; Lourenço *et al.*, 2015; De Zio *et al.*, 2018). L'identification d'acteurs de la mécanoperception et de la mécanotransduction ainsi que de leur mode d'action représente la prochaine grande étape de l'étude de la réponse des racines aux contraintes mécaniques, étape que nous avons initiée au cours des derniers mois de la thèse, par le biais de la miniaturisation de notre système expérimental et l'observation microscopique de marqueurs fluorescents.

Bibliographie

Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek TT, Wiřniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschign C. 2006. Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology* **8**, 249–256.

Abdalla AM, Hettiaratchi DRP, Reece AR. 1969. The mechanics of root growth in Granular media. *Journal of Agricultural Engineering Research* **14**, 236–248.

Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GTS, Genschik P. 2009. Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Current Biology* **19**, 1188–1193.

Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ, Then KY, Liu KK. 2005. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface* **2**, 455–463.

Aida M, Beis D, Heidstra R, *et al.* 2004. of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**, 109–120.

Anderson CT, Carroll A, Akhmetova L, Somerville C. 2010. Real-Time Imaging of Cellulose Reorientation during Cell Wall Expansion in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology* **152**, 787–796.

Arnaud C, Bonnot C, Desnos T, Nussaume L. 2010. The root cap at the forefront. *Comptes Rendus - Biologies* **333**, 335–343.

Atkinson JA, Rasmussen A, Traini R, Voss U, Sturrock C, Mooney SJ, Wells DM, Bennett MJ. 2014. Branching Out in Roots: Uncovering Form, Function, and Regulation. *Plant Physiology* **166**, 538–550.

Atwell BJ, Crops D, Russell S. 1988. Physiological responses of lupin roots to soil compaction. *Plant and Soil* **281**, 277–281.

Bailey PHJ, Currey JD, Fitter AH. 2002. The role of root system architecture and root hairs in promoting anchorage against uprooting forces in *Allium cepa* and root mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 333–340.

- Baldwin KL, Strohm AK, Masson PH.** 2013. Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *American Journal of Botany* **100**, 126–142.
- Baluška F, Hasenstein KH.** 1997. Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. *Planta* **203**, S69–S78.
- Balzan S, Johal GS, Carraro N.** 2014. The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1–12.
- Barlow PW.** 2003. The Root Cap : Cell Dynamics , Cell Differentiation and Cap Function. *Journal of Plant Growth Regulation*, 261–286.
- Barrada A, Montané M, Robaglia C.** 2015. Spatial Regulation of Root Growth : Placing the Plant TOR Pathway in a Developmental Perspective. *international Journal of Molecular Sciences* **16**, 19671–19697.
- Baskin TI.** 2005. Anisotropic Expansion of the Plant Cell Wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 203–222.
- Bastien R, Meroz Y.** 2016. The Kinematics of Plant Nutation Reveals a Simple Relation between Curvature and the Orientation of Differential Growth. *PLoS Computational Biology* **12**, 1–20.
- Basu D, Haswell ES.** 2017. Plant mechanosensitive ion channels: an ocean of possibilities. *Current Opinion in Plant Biology* **40**, 43–48.
- Batey T.** 2009. Soil compaction and soil management - A review. *Soil Use and Management* **25**, 335–345.
- Bellande K, Bono JJ, Savelli B, Jamet E, Canut H.** 2017. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? *International Journal of Molecular Sciences* **18**.
- Benfey PN, Scheres B.** 2000. Root development. *Current Biology* **10**, 813–815.
- Bengough AG, Bransby MF, Hans J, McKenna SJ, Roberts TJ, Valentine TA.** 2006. Root responses to soil physical conditions; growth dynamics from field to cell. *Journal of Experimental Botany* **57**, 437–447.
- Bengough AG, Croser C, Pritchard J.** 1997. A biophysical analysis of root growth under mechanical stress. *Plant and Soil* **189**, 155–164.

Bengough AG, Hans J, Bransby MF, Valentine TA. 2009. PIV as a method for quantifying root cell growth and particle displacement in confocal images. *Microscopy Research and Technique* **73**, N27-36.

Bengough AG, Loades K, Mckenzie BM. 2016. Root hairs aid soil penetration by anchoring the root surface to pore walls. **67**, 1071–1078.

Bengough AG, Mackenzie CJ. 1994. Simultaneous measurement of root force and elongation for seedling pea roots. *Journal of Experimental Botany* **45**, 95–102.

Bengough AG, Mckenzie BM. 1997. Sloughing of root cap cells decreases the frictional resistance to maize (*Zea mays* L .) root growth. **48**, 885–893.

Bengough AG, McKenzie BM, Hallett PD, Valentine TA. 2011. Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. *Journal of Experimental Botany* **62**, 59–68.

Bengough AG, Mullins CE. 1990. Mechanical impedance to root growth: a review of experimental techniques and root growth responses. *Journal of soil science* **41**, 341–358.

Bengough AG, Young IM. 1993. Root elongation of seedling peas through layered soil of different penetration resistances. *Plant and Soil* **149**, 129–139.

Benjamins R, Quint A, Weijers D, Hooykaas P, Offringa R. 2001. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Dev.Biologists.Org* **4067**, 4057–4067.

Bennett T, Sanchez-perez GF, Campilho A, Willemsen V, Snel B, Scheres B. 2010. SOMBRERO , BEARSKIN1 , and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**, 640–654.

Bennett T, van den Toorn A, Willemsen V, Scheres B. 2014. Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development* **141**, 4055–4064.

Bishopp A, Lehesranta S, Vatén A, Help H, El-Showk S, Scheres B, Helariutta K, Mähönen AP, Sakakibara H, Helariutta Y. 2011. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current Biology* **21**, 927–932.

Bizet F. 2014. Division et élongation cellulaire dans l'apex de la racine : diversité de réponses au déficit hydrique.

Bizet F, Bengough AG, Hummel I, Bogeat-Triboulot M-B, Dupuy LX. 2016. 3D deformation field in growing plant roots reveals both mechanical and biological responses to axial mechanical forces. *Journal of Experimental Botany* **67**, 5605–5614.

Blancaflor EB. 2015. *Plant Gravitropism*.

Blancaflor EB, Fasano JM, Gilroy S. 1998. Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol* **116**, 213–222.

Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Frimi J, Heldstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**, 39–44.

Boerjan W, Cervera M, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Onckelen H Van, Montagu M Van. 1995. superroot , a Recessive Mutation in Arabidopsis , Confers Auxin Overproduction. *The Plant cell* **7**, 1405–1419.

Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu DT, Tournaire-Roux C, Maurel C. 2008. Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant Journal* **56**, 207–218.

Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, Van Den Dries N, Maurel C, Dries N Van Den, Maurel C. 2005. Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots . Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression 1. *Plant Physiology* **139**, 790–805.

Brigham L a., Woo HH, Nicoll SM, Hawes MC. 1995. Differential Expression of Proteins and mRNAs from Border Cells and Root Tips of Pea. *Plant physiology* **109**, 457–463.

Brunoud G, Wells DM, Oliva M, et al. 2012. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**, 103–106.

Buer CS, Masle J, Wasteneys GO. 2000. Growth conditions modulate root-wave phenotypes in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **41**, 1164–1170.

del Campillo E, Abdel-Aziz A, Crawford D, Patterson SE. 2004. Root cap specific expression of an endo-beta-1,4-D-glucanase (cellulase): a new marker to study root

development in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **56**, 309–323.

Carminati A, Vetterlein D, Weller U, Vogel H-J, Oswald SE. 2009. When Roots Lose Contact. *Vadose Zone Journal* **8**, 805.

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, *et al.* 2001. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant cell* **13**, 843–852.

Chauvet H, Pouliquen O, Forterre Y, Legué V, Moulia B. 2016. Inclination not force is sensed by plants during shoot gravitropism. *Scientific Reports* **6**, 1–8.

Chen YL, Palta J, Clements J, Buirchell B, Siddique KHM, Rengel Z. 2014. Root architecture alteration of narrow-leaved lupin and wheat in response to soil compaction. *Field Crops Research* **165**, 61–70.

Chen HW, Shao KH, Wang SJ. 2016. Light-mediated modulation of helix angle and rate of seminal root tip movement determines root morphology of young rice seedlings. *Plant Signaling and Behavior* **11**, 1–3.

Chen Q, Suki B, An K. 2004. Dynamic Mechanical Properties of Agarose Gels Modeled by a Fractional Derivative Model. *Journal of Biomechanical Engineering* **126**.

Chimungu JG, Loades KW, Lynch JP. 2015. Root anatomical phenes predict root penetration ability and biomechanical properties in maize (*Zea Mays*). *Journal of Experimental Botany* **66**, 3151–3162.

Clark LJ, Whalley WR, Barraclough PB. 2001. Partial mechanical impedance can increase the turgor of seedling pea roots. *Journal of Experimental Botany* **52**, 167–171.

Clark LJ, Whalley WR, Dexter AR, Barraclough PB, Leigh RA. 1996. Complete mechanical impedance increases the turgor of cells in the apex of pea roots. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1099–1102.

Colombi T, Kirchgessner N, Walter A, Keller T. 2017. Root Tip Shape Governs Root Elongation Rate under increased soil strength. *Plant Physiology* **174**, 2289–2301.

Cosgrove DJ. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins - Prifysgol Bangor University. *Nature* **407**, 321–326.

Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**,

850–861.

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

Croser C, Bengough AG, Pritchard J. 1999. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (*Pisum sativum*). I. Rates of cell flux, mitosis, and strain during recovery. *Physiologia Plantarum* **107**, 277–286.

Croser C, Bengough AG, Pritchard J. 2000. The effect of mechanical impedance on root growth in pea (*Pisum sativum*). II. Cell expansion and wall rheology during recovery. *Physiologia Plantarum* **107**, 277–286.

Cui H, Levesque MP, Vernoux T, Jung JW, Paquette AJ, Gallagher KL, Wang JY, Blilou I, Scheres B, Benfey PN. 2007. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* **316**, 421–425.

Czarnes S, Hiller S, Dexter AR, Hallett PD, Bartoli F. 1999. Root:Soil adhesion in the maize rhizosphere: The rheological approach. *Plant and Soil* **211**, 69–86.

Datta S, Kim CM, Pernas M, Pires ND, Proust H, Tam T, Vijayakumar P, Dolan L. 2011. Root hairs : development , growth and evolution at the plant-soil interface. , 1–14.

Davies E, Huang Y, Harper JB, Hook JM, Thomas DS, Burgar IM, Lillford PJ. 2010. Dynamics of water in agar gels studied using low and high resolution ¹H NMR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology* **45**, 2502–2507.

Dechamps C, Noret N, Mozek R, Draye X, Meerts P. 2008. Root allocation in metal-rich patch by *Thlaspi caerulescens* from normal and metalliferous soil - New insights into the rhizobox approach. *Plant and Soil* **310**, 211–224.

Dexter AR, Hewitt JS. 1978. The deflection of plant roots. *Journal of Agricultural Engineering Research* **23**, 17–22.

Dietrich D. 2018. Hydrotropism: How roots search for water. *Journal of Experimental Botany* **69**, 2759–2771.

Dietrich D, John A, Darren M, Markus R, Leah R, Rosemary J, Oliver E, John R, Saoirse

R. 2017. Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. The University of Nottingham.

Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, et al. 2008. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **105**, 18818–18823.

Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Tombácz E. 2011. Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnology Reports* **5**, 345–352.

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71–84.

Dong S, Neilsen D, Neilsen GH, Weis M. 2003. A Scanner-based Root Image Acquisition Technique for Measuring Roots on a Rhizotron Window. *HortScience* **38**, 1385–1388.

Dorgan KM, Jumars PA, Johnson B, Boudreau BP, Landis E. 2005. Burrow extension by crack propagation. *Nature* **433**, 475.

Downie HF, Adu MO, Sschmidt S, Otten W, Dupuy LX, White PJ, Valentine TA. 2015. Challenges and opportunities for quantifying roots and rhizosphere interactions through imaging and image analysis. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1213–1232.

Downie H, Holden N, Otten W, Spiers AJ, Valentine T a, Dupuy LX. 2012. Transparent soil for imaging the rhizosphere. *PloS one* **7**, e44276.

Driouich A, Durand C, Vické-Gibouin M. 2007. Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* **12**, 14–19.

Dubrovsky JG, Rost TL, Colon-Carmona A, Doerner P. 2001. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **214**, 30–36.

Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-mendivil S, Ivanchenko MG, Shishkova S, Celenza J, Benkova E. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells.

Durand C, Vické-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A. 2009. The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan. *Plant Physiology* **150**, 1411–1421.

- Eklof JM, Brumer H.** 2010. The XTH Gene Family: An Update on Enzyme Structure, Function, and Phylogeny in Xyloglucan Remodeling. *Plant Physiology* **153**, 456–466.
- Feraru E, Friml J.** 2008. PIN Polar Targeting. *Plant Physiology* **147**, 1553–1559.
- Forouzesh E, Goel A, Mackenzie SA, Turner JA.** 2013. In vivo extraction of Arabidopsis cell turgor pressure using nanoindentation in conjunction with finite element modeling. *the plant journal* **73**, 509–520.
- Freundl E, Steudle E, Hartung W.** 1998. Water uptake by roots of maize and sunflower affects the radial transport of abscisic acid and its concentration in the xylem. *Planta* **207**, 8–19.
- Friml J, Benkova E, Wisniewska J, Mendgen K, Palme K.** 2002a. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *nature* **415**, 1–4.
- Friml J, Wiśniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K.** 2002b. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**, 806–809.
- Furuichi T, Iida H, Sokabe M, Tatsumi H.** 2012. Expression of Arabidopsis MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1022–1026.
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B.** 2007. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**, 1053–1057.
- Gouget A.** 2005. Lectin Receptor Kinases Participate in Protein-Protein Interactions to Mediate Plasma Membrane-Cell Wall Adhesions in Arabidopsis. *Plant Physiology* **140**, 81–90.
- Greacen EL, Oh JS.** 1972. Physics of Root Growth. *Nature New Biology* **235**, 24–25.
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B.** 2007. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008–1013.
- Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL.** 2006. The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Annals of Botany* **97**, 917–923.
- Hamant O, Traas J.** 2010. The mechanics behind plant development. *New Phytologist* **185**, 369–385.

- Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES.** 2015. United in Diversity: Mechanosensitive Ion Channels in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 113–137.
- Hanaor DAH, Gan Y, Einav I.** 2015. Contact mechanics of fractal surfaces by spline assisted discretisation. *International Journal of Solids and Structures* **59**, 121–131.
- Harmer SL, Brooks CJ.** 2018. Growth-mediated plant movements: hidden in plain sight. *Current Opinion in Plant Biology* **41**, 89–94.
- Harrison BR, Masson PH.** 2008. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant Journal* **53**, 380–392.
- Haswell ES.** 2007. CHAPTER 13 MscS - Like Proteins in Plants. **58**.
- Haswell ES, Meyerowitz EM, Frachisse J, Protoplasts R.** 2008. Two MscS Homologs Provide Mechanosensitive Channel Activities in the Arabidopsis Root. *Current Biology* **18**, 730–734.
- Hawes MC.** 1990. Living plant-cells released from the root cap: A regulator of microbial-populations in the rhizosphere. *Plant and Soil* **129**, 19–27.
- Hawes MC, Lin HJ.** 1990. Correlation of Pectolytic Enzyme Activity with the Programmed Release of Cells from Root Caps of Pea (*Pisum sativum*). *Plant physiology* **94**, 1855–9.
- Hou G, Mohamalawari DR, Blancaflor EB.** 2003. Enhanced Gravitropism of Roots with a Disrupted Cap Actin Cytoskeleton. *Plant Physiol.* **131**, 1360–1373.
- Hynes RO.** 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687.
- Iida H, Furuichi T, Nakano M, Toyota M, Sokabe M, Tatsumi H.** 2014. New candidates for mechano-sensitive channels potentially involved in gravity sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **16**, 39–42.
- Iijima M, Barlow PW, Bengough AG.** 2003*a*. Root cap structure and cell production rates of maize (*Zea mays*) roots in compacted sand. *New Phytologist* **160**, 127–134.
- Iijima M, Griffiths B, Bengough AG.** 2000. Sloughing of cap cells and carbon exudation from maize seedling roots in compacted sand. *New Phytologist* **145**, 477–482.
- Iijima M, Higuchi T, Barlow PW, Bengough AG.** 2003*b*. Root cap removal increases root

penetration resistance in maize (*Zea mays* L .). *Journal of Experimental Botany* **54**, 2105–2109.

Iijima M, Kono Y. 1991. Interspecific differences of the root systme structure of four cereal species as affected by soil compaction. *Japanese Journal of Crop Science* **60**, 130–138.

Iijima M, Kono Y. 1992. Development of Golgi Apparatus in the Root Cap Cells of Maize (*Zea mays* L .) as Affected by Compacted Soil. , 207–212.

Iijima M, Morita S, W. Barlow P. 2008. Structure and Function of the Root Cap. *Plant Production Science* **11**, 17–27.

Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. 2008. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380–1384.

Jaffe MJ, Leopold AC, Staples RC. 2002. Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany* **89**, 375–382.

Jalean J. Petricka, Cara M. Winter PNB. 2013. Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 563–590.

Jiang K, Feldman LJ. 2010. Positioning of the auxin maximum affects the character of cells occupying the root stem cell niche. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 202–204.

Jin K, Shen J, Ashton RW, Dodd IC, Parry MAJ, Whalley WR. 2013. How do roots elongate in a structured soil? *Journal of Experimental Botany* **64**, 4761–4777.

Johnsson a. 1997. Circumnutations: results from recent experiments on Earth and in space. *Planta* **203**, S147–S158.

Jungk A. 2001. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**, 121–129.

Juniper BE, Clowes FAL. 1965. Cytoplasmic organelles and cell growth in root caps. *Nature* **208**.

Kamiya M, Higashio S, Isomoto A, Kim J, Seki M. 2016. Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in Arabidopsis. *Development* **143**, 4063–4072.

- Kaneyasu T, Kobayashi A, Nakayama M, Fujii N, Takahashi H, Miyazawa Y.** 2007. Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1143–1150.
- Kepinski S, Leyser O.** 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446–451.
- Kim H jeong, Kobayashi A, Fujii N, Miyazawa Y, Takahashi H.** 2016. Gravitropic response and circumnutation in pea (*Pisum sativum*) seedling roots. *Physiologia Plantarum* **157**, 108–118.
- Kimbrough JM, Salinas-mondragon R, Boss WF, Brown CS.** 2004. The Fast and Transient Transcriptional Network of Gravity and Mechanical Stimulation in the Arabidopsis Root Apex 1 [w]. *Plant Physiology* **136**, 1–16.
- Kirby JM, Bengough AG.** 2002. Influence of soil strength on root growth: Experiments and analysis using a critical-state model. *European Journal of Soil Science* **53**, 119–127.
- Kiss JZ, Edelmann RE, Wood PC.** 1999. Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient Arabidopsis seedlings in spaceflight studies. *Planta* **209**, 96–103.
- Kiss JZ, Hertel R, Sack FD.** 1989. Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of Arabidopsis thaliana. *Planta* **177**, 198–206.
- Kleine-Vehn J, Ding Z, Jones AR, Tasaka M, Morita MT, Friml J.** 2010. Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 22344–22349.
- Kolb E, Hartmann C, Genet P.** 2012. Radial force development during root growth measured by photoelasticity. *Plant and Soil* **360**, 19–35.
- Kolb E, Legué V, Bogeat-Triboulot M-B.** 2017. Physical root – soil interactions. *Physical Biology* **14**.
- Konôpka B, Pagès L, Doussan C.** 2009. Soil compaction modifies morphological characteristics of seminal maize roots. *Plant, Soil and Environment* **55**, 1–10.
- Kramer PJ, Boyer JS.** 1995. *Water Relations of Plants and Soils*.
- Krieger G, Shkolnik D, Miller G, Fromm H.** 2016. Reactive Oxygen Species Tune Root

Tropic. Plant Physiology **172**, 1209–1220.

Kuchenbuch RO, Ingram KT. 2002. Image analysis for non-destructive and non-invasive quantification of root growth and soil water content in rhizotrons. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **165**, 573–581.

Kumpf RP, Nowack MK. 2015. The root cap: a short story of life and death. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5651–5662.

Kurusu T, Kuchitsu K, Nakano M, Nakayama Y, Iida H. 2013. Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport. *Trends in Plant Science* **18**, 227–233.

Kurusu T, Nishikawa D, Yamazaki Y. 2012*a*. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice. *BMC plant ...* **12**, 1–15.

Kurusu T, Yamanaka T, Nakano M, et al. 2012*b*. Involvement of the putative Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels, NtMCA1 and NtMCA2, in Ca²⁺uptake, Ca²⁺-dependent cell proliferation and mechanical stress-induced gene expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *Journal of Plant Research* **125**, 555–568.

Ledbetter MC, Porter KR. 1963. A ‘microtubule’ in plant cell fine structure. *Journal of Cell Biology* **19**, 239–250.

Lee Y, Lee WS, Kim S, Bruno Y. 2012. Hormonal regulation of stem cell induces maintenance in roots. *Journal of Experimental Botany* **63**.

Lefebvre M. 2011. Spatialisation de modèles de fonctionnement hydromécanique des sols appliquée à la prévision des risques de tassement à l’échelle de la France.

Leitz G, Kang B-H, Schoenwaelder MEA, Staehelin LA. 2009. Statolith Sedimentation Kinetics and Force Transduction to the Cortical Endoplasmic Reticulum in Gravity-Sensing Arabidopsis Columella Cells. *the Plant Cell Online* **21**, 843–860.

Levesque MP, Vernoux T, Busch W, et al. 2006. Whole-genome analysis of the short-root developmental pathway in Arabidopsis. *PLoS Biology* **4**, 739–752.

Liu Y, Lai N, Gao K, Chen F, Yuan L, Mi G. 2013. Ammonium Inhibits Primary Root Growth by Reducing the Length of Meristem and Elongation Zone and Decreasing Elemental

Expansion Rate in the Root Apex in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE **8**, 1–11.

Lloyd CW, Himmelspach R, Nick P, Wymer C. 2000. Cortical microtubules form a dynamic mechanism that helps regulate the direction of plant growth. Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology **13**, 59–65.

Loades KW, Bengough AG, Bransby MF, Hallett PD. 2013. Biomechanics of nodal, seminal and lateral roots of barley: Effects of diameter, waterlogging and mechanical impedance. Plant and Soil **370**, 407–418.

Lockhart JA. 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. Journal of Theoretical Biology **8**, 264–275.

Lodha P, Netravali AN. 2005. Characterization of phytigel modified soy protein isolate resin and unidirectional flax yarn reinforced ‘Green’ composites. Polymer Composites **26**, 647–659.

Lourenço TF, Serra TS, Cordeiro AM, Swanson SJ, Gilroy S, Saibo NJM, Oliveira MM. 2015. The Rice E3-Ubiquitin Ligase HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1 Modulates the Expression of ROOT MEANDER CURLING , a Gene Involved in Root Mechanosensing , through the Interaction with Two ETHYLENE-RESPONSE FACTOR Transcription Factors 1. plant physiolo **169**, 2275–2287.

Lucas M, Guédon Y, Jay-Allemand C, Godin C, Laplaze L. 2008. An Auxin Transport-Based Model of Root Branching in *Arabidopsis thaliana*. PloS one **3**.

Mancuso S, Barlow PW, Volkmann D, Baluška F. 2014. Actin Turnover-Mediated Gravity Response in Maize Root Apices. Plant Signaling & Behavior **1**, 52–58.

Masle J, Passioura J. 1987. The effect of soil strength on the growth of young wheat plants. Australian Journal of Plant Physiology, 643–656.

Massa GD, Gilroy S. 2003. Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal **33**, 435–445.

Materechera SA, Alston AM, Kirby JM, Dexter AR. 1992. Influence of root diameter on the penetration of seminal roots into a compacted subsoil. Plant and Soil **144**, 297–303.

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. Proceedings of the National Academy of

Sciences **91**, 6574–6578.

McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ. 1995. Expansin Mode of Action on Cell Walls. *Plant physiology* **107**, 87–100.

Mirabet V, Das P, Boudaoud A, Hamant O. 2011. The Role of Mechanical Forces in Plant Morphogenesis. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 365–385.

Misra RK, Dexter a. R, Alston a. M. 1986. Maximum axial and radial growth pressures of plant roots. *Plant and Soil* **95**, 315–326.

Miyazawa Y, Sakashita T, Funayama T, et al. 2008. Effects of Locally Targeted Heavy-ion and Laser Microbeam on Root Hydrotropism in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Radiation Research* **49**, 373–379.

Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S. 2009. Ca²⁺ Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in *Arabidopsis* Roots. *the Plant Cell Online* **21**, 2341–2356.

Monshausen GB, Gilroy S. 2009. Feeling green : mechanosensing in plants. *Trends in cell biology* **19**.

Monshausen GB, Haswell ES. 2013. A force of nature : molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *Journal of Experimental Botany* **64**, 4663–4680.

Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S, Lafayette W. 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *the plant journal* **65**, 309–318.

Morris ER, Nishinari K, Rinaudo M. 2012. Gelation of gellan - A review. *Food Hydrocolloids* **28**, 373–411.

Mravec J. 2017. Border cell release: Cell separation without cell wall degradation? *Plant Signaling and Behavior* **12**, 1–3.

Muratov A, Baulin VA. 2015. Biophysical Chemistry Mechanism of dynamic reorientation of cortical microtubules due to mechanical stress. *Biophysical Chemistry* **207**, 82–89.

Nagel KA, Putz A, Gilmer F, et al. 2012. GROWSCREEN-Rhizo is a novel phenotyping robot enabling simultaneous measurements of root and shoot growth for plants grown in soil-filled

rhizotrons. *Functional Plant Biology* **39**, 891–904.

Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T. 2007. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *PNAS* **104**, 3639–3644.

Nakayama N, Smith RS, Mandel T, Robinson S, Kimura S, Boudaoud A. 2012. Mechanical Regulation of Auxin-Mediated Growth. *Current Biology* **22**, 1468–1476.

Van Noordwijk M, Brouwer G, Harmanny K. 1993. Concepts and methods for studying interactions of roots and soil structure. *Geoderma* **56**, 351–375.

Normand V, Lootens DL, Amici E, Plucknett KP, Aymard P. 2000. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **1**, 730–738.

Oliva M, Dunand C. 2007. Waving and skewing : how gravity and the surface of growth media affect root development in Arabidopsis. *New phytologist*, 37–43.

Ortega-Martínez O, Pernas M, Carol RJ, Dolan L. 2007. Ethylene modulates stem cell division in the Arabidopsis thaliana root. *Science* **317**, 507–510.

Ottenschlager I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 2987–2991.

Oussible M, Crookston RK, Larson WE. 1992. Subsurface Compaction Reduces the Root and Shoot Growth and Grain Yield of Wheat. *Agron.J.* **84**, 34–38.

Pacifici E, Polverari L, Sabatini S. 2015. Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1113–1121.

Paez-Garcia A, Motes C, Scheible W-R, Chen R, Blancaflor E, Monteros M. 2015. Root Traits and Phenotyping Strategies for Plant Improvement. *Plants* **4**, 334–355.

Paredes AR, Somerville C, Ehrhardt D. 2006. Visualization of Cellulose Synthase with Microtubules. *Science* **312**, 1491–1495.

Park YB, Cosgrove DJ. 2012. Changes in Cell Wall Biomechanical Properties in the Xyloglucan-Deficient xxt1/xx2 Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology* **158**, 465–475.

- Park YB, Cosgrove DJ.** 2015. Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant and Cell Physiology* **56**, 180–194.
- Perbal G, Driss-Ecole D.** 2003. Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends in Plant Science* **8**, 498–504.
- Petersson S V., Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K.** 2009. An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *the Plant Cell Online* **21**, 1659–1668.
- Peyronnet R, Haswell ES, Barbier-Brygoo H, Frachisse J.** 2008. AtMSL9 and AtMSL10: Sensors of plasma membrane tension in Arabidopsis roots. *Current Biology* **3**, 726–729.
- Pivetti CD, Yen MR, Miller S, Busch W, Tseng YH, Booth IR, Saier Jr. MH, Saier H, Saier MH.** 2003. Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 66–85, table of contents.
- Ponce G, Barlow PW, Feldman LJ, Cassab GI.** 2005. Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant, Cell and Environment* **28**, 719–732.
- Ponce G, Rasgado F, Cassab GI.** 2008. How amyloplasts , water deficit and root tropisms interact ? *Plant Signaling & Behavior* **3**, 460–462.
- Popova L, Dusschoten D Van, Nagel KA, Fiorani F, Mazzolai B.** 2016. Plant root tortuosity : an indicator of root path formation in soil with different composition and density. *Annals of Botany* **118**, 685–698.
- Potocka I, Szymanowska-pulka J.** 2018. Morphological responses of plant roots to mechanical stress. *Annals of Botany* **0**, 1–13.
- Potocka I, Szymanowska-Pulka J, Karczewski J, Nakielski J.** 2011. Effect of mechanical stress on Zea root apex. I. Mechanical stress leads to the switch from closed to open meristem organization. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4583–4593.
- Pritchard J.** 1994. The control of cell expansion in roots. *New Phytologist* **127**, 3–26.
- Richefeu V, Youssoufi MS El, Radjaï F.** 2006. Shear strength properties of wet granular

materials.

Richter GL, Monshausen GB, Krol A, Gilroy S. 2009. Mechanical Stimuli Modulate Lateral Root Organogenesis. *Plant Physiology* **151**, 1855–1866.

Rivière M, Derr J, Douady S. 2017. Motions of leaves and stems, from growth to potential use. *Physical Biology* **14**, 051001.

Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1421–1435.

Ruiz S, Straub I, Schymanski SJ. 2016. Experimental Evaluation of Earthworm and Plant Root Soil Penetration – Cavity Expansion Models Using Cone Penetrometer Analogs. *Vadose Zone Journal*.

Ruzicka K, Simaskova M, Duclercq J, Petrasek J, Zazimalova E, Simon S, Friml J, Van Montagu MCE, Benkova E. 2009. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4284–4289.

Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, et al. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, 463–472.

Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Development*, 354–358.

Santisree P, Nongmaithem S, Vasuki H, Sreelakshmi Y, Ivanchenko M, Sharma R. 2011. Tomato Root Penetration in Soil Requires a Coaction. *Plant Physiology* **156**, 1424–1438.

Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T. 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811–814.

Sato EM, Hijazi H, Bennett MJ, Vissenberg K, Swarup R. 2015. New insights into root gravitropic signalling. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2155–2165.

Schiavi A, Cuccaro R, Troia A. 2016. Strain-rate and temperature dependent material properties of Agar and Gellan Gum used in biomedical applications. *Journal of the Mechanical*

Behavior of Biomedical Materials **53**, 119–130.

Schmidt S, Bengough AG, Gregory PJ, Grinev D V., Otten W. 2012. Estimating root-soil contact from 3D X-ray microtomographs. *European Journal of Soil Science* **63**, 776–786.

Schwechheimer C. 2008. Understanding gibberellic acid signaling-are we there yet? *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 9–15.

Shah AN, Tanveer M, Shahzad B, Yang G, Fahad S, Ali S, Bukhari MA, Tung SA, Hafeez A, Souliyanonh B. 2017. Soil compaction effects on soil health and crop productivity : an overview. , 10056–10067.

Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason SJ, Shieh M, Cosgrove DJ. 1995. Molecular cloning and sequence analysis of expansins--a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9245–9249.

Shih H, Miller ND, Dai C, Spalding EP, Monshausen GB. 2014. The Receptor-like Kinase FERONIA Is Required for Mechanical Signal Transduction in Arabidopsis Seedlings. *Current Biology* **24**, 1887–1892.

Shkolnik D, Krieger G, Nuriel R, Fromm H. 2016. Hydrotropism: Root Bending Does Not Require Auxin Redistribution. *Molecular Plant* **9**, 757–759.

Silk WK. 1992. Steady form from changing cells. *Int. J. Plant Sci.* **153**, 49–58.

Silk WK, Erickson RO. 1979. Kinematics of Plant Growth. *J.theor. Biol.* 481–501.

Silverberg JL, Noar RD, Packer MS, Harrison MJ, Henley CL, Cohen I, Gerbode SJ. 2012. 3D imaging and mechanical modeling of helical buckling in *Medicago truncatula* plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 16794–16799.

De Smet I, Tetsumura T, Rybel B De, et al. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* **690**, 681–690.

Souty N, Rode C. 1987. Aspect mécanique de la croissance des racines. I. - Mesure de la force de pénétration. *Agronomie* **7**, 623–630.

Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, et al. 2013. Moderation of arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Current Biology*

23, 362–371.

Stahl Y, Simon R. 2009. Is the arabidopsis root niche protected by sequestration of the CLE40 signal by its putative receptor ACR4? *Plant Signaling and Behavior* **4**, 634–635.

Stephenson MB, Hawes MC. 1994. Correlation of Pectin Methylesterase Activity in Root Caps of Pea with Root Border Cell Separation. *Plant physiology* **106**, 739–745.

Stolzy LH, Barley KP. 1968. Mechanical resistance encountered by roots entering compact soils. *Soil science* **105**.

Strohm AK, Baldwin KL, Masson PH. 2012. Molecular mechanisms of root gravity sensing and signal transduction. **1**.

Su S, Gibbs NM, Jancewicz AL, Masson PH. 2017. Review Molecular Mechanisms of Root Gravitropism. *Current Biology* **27**, R964–R972.

Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HMO, Haseloff J, Beemster GTS, Bhalerao R, Bennett MJ. 2005. Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology* **7**, 1057–1065.

Swarup R, Swarup R, Marchant A, et al. 2001. Root Apex. *Genes & Development*, 2648–2653.

Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A, Takahashi H. 2003. Hydrotropism Interacts with Gravitropism by Degrading Amyloplasts in Seedling Roots of Arabidopsis and Radish 1. *Plant Physiology* **132**, 805–810.

Takano M, Takahashi H, Hirasawa T, Suge H. 1995. Hydrotropism in roots: sensing of a gradient in water potential by the root cap. *Planta* **197**, 410–413.

Thévenaz P, Unser M. 2007. Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers. *Microscopy Research and Technique* **70**, 135–146.

Thompson M V, Holbrook NM. 2004. Root-Gel Interactions and the Root Waving Behavior. *Plant Physiology* **135**, 1822–1837.

Tracy SR, Black CR, Roberts JA, Sturrock C, Mairhofer S, Craigon J, Mooney SJ. 2012. Quantifying the impact of soil compaction on root system architecture in tomato (*Solanum lycopersicum*) by X-ray micro-computed tomography. *Annals of Botany* **110**, 511–519.

Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthelemy J, Palauqui J-C. 2008. High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in Arabidopsis. *the Plant Cell Online* **20**, 1494–1503.

Trupiano D, Rocco M, Renzone G, Scaloni A, Viscosi V, Chiatante D, Scippa GS. 2012. The proteome of *Populus nigra* woody root : response to bending. , 415–432.

Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ. 2009. Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Current Biology* **19**, 1194–1199.

Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ. 2008. Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology* **10**, 625–628.

Ugartechea-Chirino Y, Swarup R, Swarup K, Péret B, Whitworth M, Bennett M, Bougourd S. 2010. The AUX1 LAX family of auxin influx carriers is required for the establishment of embryonic root cell organization in Arabidopsis thaliana. *Annals of Botany* **105**, 277–289.

Verlag F, Kuzeja PS, Lintilhac PM, Wei C. 2001. Root elongation against a constant force : experiment with a computerized feedback-controlled device. *Journal of Plant Physiology* **158**, 673–676.

Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005. Root Border-Like Cells of Arabidopsis . Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiology* **138**, 998–1008.

Vollsnes a. V., Futsaether CM, Bengough a. G. 2010. Quantifying rhizosphere particle movement around mutant maize roots using time-lapse imaging and particle image velocimetry. *European Journal of Soil Science* **61**, 926–939.

Wang J-W. 2005. Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *the Plant Cell Online* **17**, 2204–2216.

Wang P, Chen X, Goldbeck C, Chung E, Kang BH. 2017. A distinct class of vesicles derived from the trans-Golgi mediates secretion of xylogalacturonan in the root border cell. *Plant*

Journal **92**, 596–610.

Wen F, Curlango-rivera G, Huskey DA, Xiong Z, Hawes MC. 2017. Visualization of extracellular DNA released during border cell separation from the root cap 1. *American Journal of Botany* **104**, 970–978.

Wen F, Zhu Y, Hawes MC. 1999. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *The Plant Cell Online* **11**, 1129–1140.

Whalley WR, Watts CW, Gregory AS, Mooney SJ, Clark LJ, Whitmore AP. 2008. The effect of soil strength on the yield of wheat. *Plant and Soil* **306**, 237–247.

Whiteley GM, Dexter AR. 1981. Elastic response of the roots of field crops. *Physiologia Plantarum* **51**, 407–417.

Whiteley GM, Dexter AR. 1984. Displacement of soil aggregates by elongating roots and emerging shoots of crop plants. *Plant and Soil* **77**, 131–140.

Willemsen V, Bauch M, Bennett T, Campilho A, Wolkenfelt H, Xu J, Haseloff J, Scheres B. 2008. The NAC Domain Transcription Factors FEZ and SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in Arabidopsis Root Stem Cells. *Developmental Cell* **15**, 913–922.

WILSON AJ, ROBARDS AW, GOSS MJ. 1977. Effects of Mechanical Impedance on Root Growth in Barley, *Hordeum vulgare* L. *Journal of Experimental Botany* **28**, 1216–1227.

Wolverton C, Mullen JL, Ishikawa H, Evans ML. 2002. Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. *Planta* **215**, 153–157.

Yamamoto C, Sakata Y, Taji T, Baba T, Tanaka S. 2008. Unique ethylene-regulated touch responses of Arabidopsis thaliana roots to physical hardness. *Journal of Plant Research* **121**, 509–519.

Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, et al. 2010. MCA1 and MCA2 That Mediate Ca²⁺ Uptake Have Distinct and Overlapping Roles in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**, 1284–1296.

Yan J, Wang B, Zhou Y. 2017. A root penetration model of Arabidopsis thaliana in phytagel medium with different strength. *Journal of Plant Research* **130**, 941–950.

- Yan J, Wang B, Zhou Y, Hao S.** 2018. Resistance from agar medium impacts the helical growth of *Arabidopsis* primary roots. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **85**, 43–50.
- Young IM, Montagu K, Conroy J, Bengough AG.** 1997. Mechanical impedance of root growth directly reduces leaf elongation rates of cereals. *New Phytologist* **135**, 613–619.
- Youssef C, Bizet F, Bastien R, Legland D, Bogeat-Triboulot M-B, Hummel I.** 2018. Quantitative dissection of variations in root growth rate: a matter of cell proliferation or of cell expansion? *Journal of Experimental Botany*.
- Yuan M, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW.** 1994. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6050–3.
- Zacarias L, Reid MS.** 1992. Inhibition of ethylene action prevents root penetration through compressed media in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **86**, 301–307.
- Zhang H, Han W, De Smet I, Talboys P, Loya R, Hassan A, Rong H, Jürgens G, Paul Knox J, Wang MH.** 2010. ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. *Plant Journal* **64**, 764–774.
- Zheng Z, Kang HY, Lee S, Kang SW, Goo B, Cho S Bin.** 2014. Up-regulation of fibroblast growth factor (FGF) 9 expression and FGF-WNT/ β -catenin signaling in laser-induced wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **22**, 660–665.
- De Zio E, Trupiano D, Karady M, Antoniadi I, Montagnoli A, Terzaghi M, Chiatante D, Ljung K, Scippa GS.** 2018. Tissue-specific hormone profiles from woody poplar roots under bending stress. *Physiologia Plantarum*.

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu MS ½

Composition des solutions mères (g/L)		Quantité pour 1L de milieu
Macroéléments (10X)	NH ₄ NO ₃	16.5
	KNO ₃	19
	CaCL ₂ , 2H ₂ O	4.4
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	3.7
	KH ₂ PO ₄	1.7
Oligo-éléments (1000X)	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ , H ₂ O	16.9
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6
	KI	0.83
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025
Vitamines B (100X)	Acide nicotiques	0.1
	Pyridoxine hydrochloride	0.1
	Thiamine hydrochloride	0.1
	Panthothénate de calcium	0.1
	L-cystéine chlorhydrate	0.1
	Biotine	
Fer (FeNaEDTA)		4
Myo-inositol (100X)		10
L-glutamine (100X)		20
Saccharose		20 g

Annexe 2 : Caractéristiques des deux zones de courbures mises en place lors de la réorientation des racines Col-0 dans les milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5

Distance Apex/Initiation (µm)		
Milieu	1^{ère} zone de courbure	2^{ème} zone de courbure
0,2-0,3	515 ± 98 ^a	280 ± 40 ^b
0,2-0,5	540 ± 50 ^a	276 ± 23 ^b

Longueur après formation (µm)		
Milieu	1^{ère} zone de courbure	2^{ème} zone de courbure
0,2-0,3	657 ± 121 ^a	399 ± 77 ^{ab}
0,2-0,5	602 ± 64 ^{ab}	350 ± 52 ^b

Intensité maximale (mm⁻¹)		
Milieu	1^{ère} zone de courbure	2^{ème} zone de courbure
0,2-0,3	5,0 ± 1,4	3,0 ± 0,5
0,2-0,5	4,7 ± 0,5	3,4 ± 0,4

Les caractéristiques des deux zones de courbure sont extraites de l'analyse spatiotemporelle des prises de vue séquentielles des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* n'ayant pas pénétré la couche inférieure dans les milieux deux-couches. Le premier tableau présente les valeurs de la distance (µm) entre l'apex racinaire et la formation de la première et de la seconde zone de courbure. Le deuxième tableau présente la longueur totale (µm) de la première ou de la seconde zone de courbure 3 h après leur formation. La longueur des zones de courbure varie au début de leur formation puis se stabilise. Le temps de 3h est choisi pour prendre en compte la longueur des zones de courbure une fois qu'elles se sont stabilisées. Le troisième tableau présente l'intensité maximale (mm⁻¹) de la première et de la deuxième zone de courbure. Les moyennes ± l'erreur standard sont présentées, 8<n<12. Pour l'ensemble des trois caractéristiques, les données obtenues ont fait l'objet d'une analyse statistique basée sur une ANOVA à II facteurs (un facteur milieu et un facteur zone de courbure) suivie d'un test post-hoc de Tukey. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes avec une Pvalue inférieure à 0,05.

Annexe 3 : Longueur de la zone de croissance et EER_{max} des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans les milieux une-couche contenant 0,2 % ou 1,2 % de Phytigel

Longueur de la zone de croissance (µm)				
Milieu	Col-0	<i>fez-2</i>	<i>smb-3</i>	<i>brn1-1 brn2-1</i>
0,2%	917 ± 49 ^{ab}	846 ± 84 ^{ab}	898 ± 72 ^{ab}	997 ± 67 ^a
1,2%	664 ± 56 ^c	921 ± 80 ^{abc}	736 ± 75 ^{bc}	725 ± 76 ^{bcd}

EER _{max} (h ⁻¹)				
Milieu	Col-0	<i>fez-2</i>	<i>smb-3</i>	<i>brn1-1 brn2-1</i>
0,2%	0,52 ± 0,05 ^a	0,42 ± 0,05 ^{ab}	0,24 ± 0,02 ^{cd}	0,31 ± 0,03 ^{bcd}
1,2%	0,38 ± 0,06 ^{abc}	0,16 ± 0,02 ^d	0,18 ± 0,03 ^d	0,33 ± 0,05 ^{bcd}

La longueur de la zone de croissance et la capacité maximale d'allongement des cellules (EER_{max}) ont été calculées à partir des profils de vitesse et d'EER réalisés sur l'apex des racines primaires issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui ont progressé dans les milieux-une couche contenant 0,2 % et 1,2 % de Phytigel. Les valeurs moyennes ± l'erreur standard sont présentées dans les deux tableaux, 8 ≤ n ≤ 10. Les données ont été analysées statistiquement, au travers d'une ANOVA à deux facteurs. Cette analyse a été réalisée après la vérification de la normalité et de l'homoscédasticité des variables. L'analyse statistique a permis de déterminer s'il y avait un effet significatif du facteur milieu de culture (0,2 % ou 1,2 % de Phytigel) et du facteur génotype sur la longueur de la zone de croissance et l'EER_{max}. L'ANOVA II a été suivie d'un test post-hoc basé sur le test de Tukey. Les lettres, obtenues à la suite du test de Tukey, indiquent des moyennes significativement différentes (P < 0,05).

Annexe 4 : Caractéristiques des deux zones de courbures mises en place lors de la réorientation des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans les milieux 0,2-0,3

Distance Apex/Initiation (µm)		
Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	515 ± 98 ^{ab}	280 ± 40 ^{bc}
<i>fez-2</i>	603 ± 33 ^a	280 ± 23 ^{bc}
<i>smb-3</i>	398 ± 53 ^{abc}	208 ± 37 ^c
<i>brn1-1 brn2-1</i>	512 ± 50 ^{ab}	263 ± 33 ^c

Longueur après formation (µm)		
Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	657 ± 121 ^{abc}	399 ± 77 ^{bc}
<i>fez-2</i>	977 ± 58 ^a	455 ± 45 ^{bc}
<i>smb-3</i>	414 ± 73 ^a	289 ± 14 ^c
<i>brn1-1 brn2-1</i>	690 ± 63 ^{ab}	404 ± 69 ^{bc}

Intensité maximale (mm ⁻¹)		
Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	5,0 ± 1,4 ^{ab}	3,0 ± 0,5 ^a
<i>fez-2</i>	3,4 ± 0,7 ^{ab}	3,2 ± 0,6 ^{ab}
<i>smb-3</i>	4,5 ± 0,8 ^{ab}	7,4 ± 1,8 ^b
<i>brn1-1 brn2-1</i>	3,8 ± 0,6 ^{ab}	4,4 ± 1,1 ^{ab}

Les caractéristiques des deux zones de courbure sont extraites de l'analyse spatiotemporelle des prises de vue séquentielles des racines primaires issues des lignées Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* n'ayant pas pénétré la

couche inférieure du milieu 0,2-0,3. Pour chaque variable (Distance par rapport à l'apex, Longueur et Intensité maximale), les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $6 \leq n \leq 10$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey). La couleur rouge est utilisée pour indiquer une moyenne significativement plus importante que la moyenne des racines sauvages.

Annexe 5 : Caractéristiques des deux zones de courbures mises en place lors de la réorientation des racines *Col-0*, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* dans le milieu 0,2-0,5

Distance Apex/Initiation (µm)		
Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	540 ± 50 ^b	276 ± 23 ^d
<i>fez-2</i>	664 ± 64 ^a	335 ± 25 ^{cd}
<i>smb-3</i>	407 ± 32 ^{cd}	245 ± 15 ^d
<i>brn1-1 brn2-1</i>	518 ± 48 ^{abc}	334 ± 32 ^{cd}

Longueur après formation (µm)		
Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	602 ± 64 ^{bc}	350 ± 52 ^c
<i>fez-2</i>	946 ± 140 ^a	503 ± 40 ^{bc}
<i>smb-3</i>	512 ± 56 ^{bc}	368 ± 44 ^c
<i>brn1-1 brn2-1</i>	698 ± 52 ^{ab}	471 ± 33 ^{bc}

Intensité maximale (mm ⁻¹)		
Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	4,7 ± 0,5 ^{ab}	3,4 ± 0,4 ^{abc}
<i>fez-2</i>	2,3 ± 0,5 ^{cd}	1,7 ± 0,2 ^d
<i>smb-3</i>	4,8 ± 0,6 ^{ab}	5,2 ± 0,5 ^a
<i>brn1-1 brn2-1</i>	3,4 ± 0,5 ^{abc}	3,0 ± 0,5 ^{bcd}

Les caractéristiques des deux zones de courbure sont extraites de l'analyse spatiotemporelle des prises de vue séquentielles des racines primaires issues des lignées *Col-0*, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* n'ayant pas pénétré la

couche inférieure du milieu 0,2-0,5. Pour chaque variable (Distance par rapport à l'apex, Longueur et Intensité maximale), les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $8 \leq n \leq 12$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey). La couleur rouge est utilisée pour indiquer une moyenne significativement plus importante que la moyenne obtenue pour les racines sauvages. La couleur verte est utilisée pour indiquer une moyenne significativement plus faible que celle obtenue pour les racines sauvages.

Annexe 6 : Vitesse de croissance moyenne des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui ont pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3

Vitesse de croissance ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)				
Milieu	Génotype	Avant contact	Après contact	Après pénétration
0,2-0,2	Col-0	$2,99 \pm 0,27^{ab}$	$2,21 \pm 0,18^{abcd}$	$2,71 \pm 0,37^{abc}$
	<i>fez-2</i>	$3,32 \pm 0,36^a$	$3,06 \pm 0,26^{ab}$	$2,99 \pm 0,29^{ab}$
	<i>smb-3</i>	$1,57 \pm 0,23^{cd}$	$1,45 \pm 0,15^d$	$1,44 \pm 0,19^d$
	<i>brn1-1</i>	$2,24 \pm 0,17^{abcd}$	$1,98 \pm 0,17^{bcd}$	$1,80 \pm 0,48^{bcd}$
	<i>brn2-1</i>			
0,2-0,3	Col-0	$2,54 \pm 0,23^{ab}$	$1,01 \pm 0,20^c$	$2,49 \pm 0,47^{ab}$
	<i>fez-2</i>	$3,22 \pm 0,16^a$	$2,57 \pm 0,16^{ab}$	$2,86 \pm 0,21^a$
	<i>smb-3</i>	$1,65 \pm 0,18^{bc}$	$0,99 \pm 0,06^c$	$0,95 \pm 0,18^c$
	<i>brn1-1</i>	$3,18 \pm 0,43^a$	$2,90 \pm 0,59^a$	$2,52 \pm 0,49^{ab}$
	<i>brn2-1</i>			

La vitesse de croissance moyenne des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui ont pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,2 et 0,2-0,3 a été calculée sur trois étapes caractéristiques :

- L'étape « Avant contact » concerne les 300 min précédant le contact entre l'apex racinaire et l'interface
- L'étape « Après contact » concerne la vitesse de croissance à partir du contact entre l'apex et l'interface jusqu'à la rupture de l'interface induite par la croissance racinaire
- L'étape « Après pénétration » concerne la vitesse de croissance à partir de la rupture de l'interface, permettant la pénétration dans la couche inférieure jusqu'à 600 min après le contact.

Les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $6 \leq n \leq 10$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

Annexe 7 : Vitesse de croissance des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5

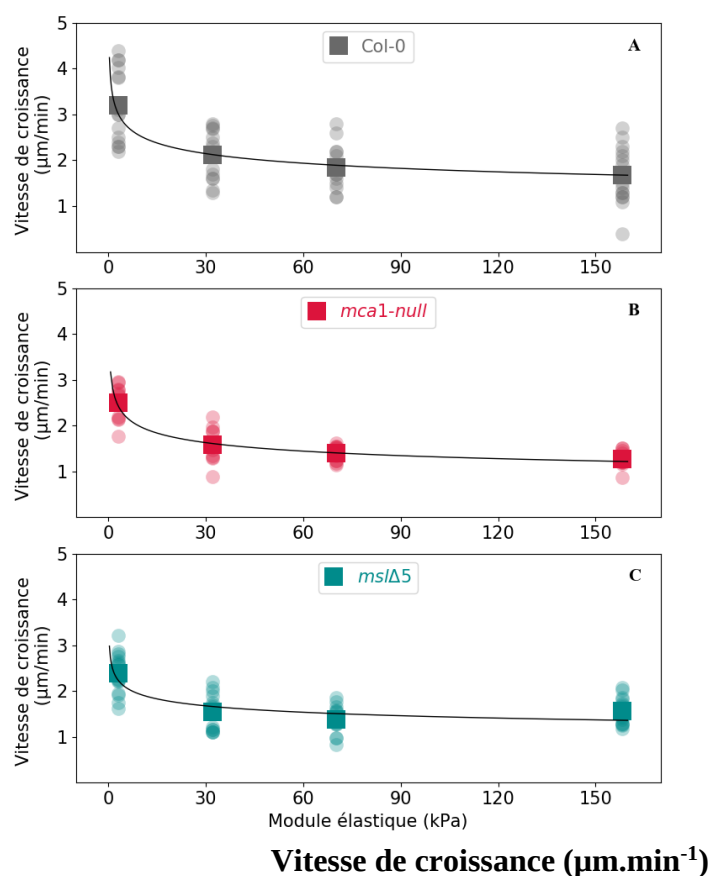
Vitesse de croissance ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)				
Milieu	Génotype	Avant contact	Pendant réorientation	Après réorientation
0,2-0,3	Col-0	$2,78 \pm 0,55^{ab}$	$1,18 \pm 0,20^{cd}$	_____
	<i>fez-2</i>	$2,91 \pm 0,26^a$	$2,34 \pm 0,23^{abc}$	$2,42 \pm 0,43^{abc}$
	<i>smb-3</i>	$1,36 \pm 0,33^{bc}$	$0,63 \pm 0,12^d$	=====
	<i>brn1-1 brn2-1</i>	$3,16 \pm 0,24^a$	$1,40 \pm 0,20^{bcd}$	_____
0,2-0,5	Col-0	$2,95 \pm 0,21^a$	$1,85 \pm 0,25^{bc}$	$1,78 \pm 0,20^{bc}$
	<i>fez-2</i>	$1,86 \pm 0,19^{bc}$	$1,33 \pm 0,15^c$	$1,57 \pm 0,12^c$
	<i>smb-3</i>	$1,60 \pm 0,12^{bc}$	$0,90 \pm 0,26^d$	$1,09 \pm 0,54^{cd}$
	<i>brn1-1 brn2-1</i>	$2,60 \pm 0,19^{ab}$	$1,50 \pm 0,18^c$	$1,31 \pm 0,19^c$

La vitesse de croissance moyenne des racines Col-0, *fez-2*, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5 a été calculée sur trois étapes caractéristiques :

- L'étape « Avant contact » concerne les 300 min précédant le contact entre l'apex racinaire et l'interface
- L'étape « Pendant réorientation » concerne la vitesse de croissance à partir du contact entre l'apex et l'interface jusqu'à la mise en place complète des zones de courbure
- L'étape « Après réorientation » concerne la vitesse de croissance à partir de la mise en place complète des zones de courbure jusqu'à 600 min après le contact avec l'interface. Dans le milieu 0,2-0,3, la réorientation en boucle des racines Col-0, *smb-3* et *brn1-1 brn2-1* n'a pu être suivie jusqu'à son terme du fait de l'acquisition des prises de vue séquentielles en 2D.

Les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $8 \leq n \leq 12$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

Annexe 8 : Vitesse de croissance moyenne des racines Col-0, *mca1-null* et *msl45* dans les milieux une-couche en fonction de la rigidité du milieu



Génotype	0,2%	0,5%	0,8%	1,2%
Col-0	$3,19 \pm 0,22$ ^a	$2,10 \pm 0,15$ ^{bcd}	$1,85 \pm 0,15$ ^{cde}	$1,75 \pm 0,19$ ^{de}
<i>mca1-null</i>	$2,51 \pm 0,12$ ^b	$1,58 \pm 0,09$ ^{de}	$1,40 \pm 0,04$ ^e	$1,27 \pm 0,04$ ^e
<i>msl45</i>	$2,39 \pm 0,11$ ^{bc}	$1,55 \pm 0,10$ ^e	$1,39 \pm 0,08$ ^e	$1,55 \pm 0,07$ ^e

La vitesse de croissance des racines Col-0 (A), *mca1-null* (B) et *msl45* (C) progressant dans des milieux une-couche contenant 0,2 % (E = 3kPa), 0,5 % (E= 32 kPa), 0,8 % (E = 70 kPa) et 1,2 % (E = 158 kPa) de Phytigel a été mesurée pendant 12 heures. Les ronds représentent la vitesse de croissance moyenne pour une racine et les carrés représentent la vitesse de croissance moyenne pour 15 racines. Les courbes noires représentent la régression non linéaire de la vitesse de croissance en fonction de la rigidité du milieu pour chaque lignée. Dans le tableau, les moyennes précises $\pm$ l'erreur standard sont présentées. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes en fonction du génotype et de la rigidité du milieu ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

Annexe 9 : Caractéristiques des deux zones de courbures mises en place lors de la réorientation des racines *mca1-null* dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5

Distance Apex/Initiation (µm)			
Génotype	Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	0,2-0,5	540 ± 50	276 ± 23
	0,2-0,2	679 ± 78 ^a	320 ± 29 ^b
	0,2-0,3	622 ± 35 ^a	311 ± 22 ^b
	0,2-0,5	745 ± 33 ^{a *}	399 ± 22 ^b

Longueur après formation (µm)			
Génotype	Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	0,2-0,5	602 ± 64	350 ± 52
	0,2-0,2	391 ± 62 ^{c *}	388 ± 79 ^c
	0,2-0,3	659 ± 60 ^{ab}	333 ± 35 ^c
	0,2-0,5	828 ± 45 ^{a *}	471 ± 44 ^{bc}

Intensité maximale (mm ⁻¹)			
Génotype	Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	0,2-0,5	4,7 ± 0,5	3,4 ± 0,4
	0,2-0,2	3,6 ± 0,6	4,0 ± 0,7
	0,2-0,3	3,3 ± 0,5	3,8 ± 0,7
	0,2-0,5	3,3 ± 0,4	2,0 ± 0,2

Les caractéristiques des deux zones de courbure sont extraites de l'analyse spatiotemporelle des prises de vue séquentielles des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues de la lignée *mca1-null* n'ayant pas pénétré la couche inférieure dans les milieux deux-couches. Dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5, les racines *mca1-null* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure de milieu ont réorienté leur croissance *via* la mise en place de deux zones de courbures et ont développé une forme finale de marche, similaire à celle développée par les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5. Les caractéristiques des zones de courbure formées chez les racines *mca1-null* dans les trois milieux deux-couches ont donc été comparées à celles chez les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5.

Pour chaque variable (Distance par rapport à l'apex, Longueur et Intensité maximale), les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $8 \leq n \leq 12$. Deux analyses statistiques distinctes ont été réalisées :

- Une ANOVA II suivie d'un test de Tukey a été réalisée pour comparer les moyennes obtenues pour les racines *mca1-null* dans le milieu 0,2-0,2, 0,2-0,3 ou 0,2-0,5 à celles obtenues pour les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (trois ANOVA II distinctes, un facteur génotype et un facteur courbure).

Les * indiquent les moyennes qui apparaissent significativement différentes de la moyenne obtenue pour les racines sauvages à la suite de cette analyse ($P < 0,05$). La couleur rouge et la couleur verte ont été utilisées pour indiquer des moyennes significativement plus élevées ou plus faibles, respectivement, de la moyenne obtenue pour les racines sauvages.

- Une ANOVA II suivie d'un test de Tukey a été réalisée pour comparer les moyennes obtenues pour les racines *mca1-null* en fonction du milieu et de la courbure (première ou seconde courbure)

Les lettres indiquent des moyennes qui apparaissent significativement différentes à la suite de cette analyse ($P < 0,05$).

Annexe 10 : Caractéristiques des deux zones de courbures mises en place lors de la réorientation des racines *msl15* dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5

Distance Apex/Initiation (µm)			
Génotype	Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	0,2-0,5	540 ± 50	276 ± 23
<i>msl15</i>	0,2-0,2	724 ± 64 ^a	385 ± 36 ^{bc}
	0,2-0,3	448 ± 57 ^{bc}	322 ± 75 ^c
	0,2-0,5	536 ± 33 ^b	296 ± 37 ^c

Longueur après formation (µm)			
Génotype	Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	0,2-0,5	602 ± 64	350 ± 52
<i>msl15</i>	0,2-0,2	787 ± 76 ^b	487 ± 42 ^{cd}
	0,2-0,3	714 ± 116 ^{bc}	364 ± 61 ^d
	0,2-0,5	1016 ± 79 ^{a ***}	508 ± 33 ^{cd}

Intensité maximale (mm ⁻¹)			
Génotype	Milieu	1 ^{ère} zone de courbure	2 ^{ème} zone de courbure
Col-0	0,2-0,5	4,7 ± 0,5	3,4 ± 0,4
<i>msl15</i>	0,2-0,2	6,0 ± 0,7 ^a	5,0 ± 1,1 ^{ab}
	0,2-0,3	4,8 ± 0,5 ^{ab}	3,3 ± 0,7 ^b
	0,2-0,5	3,5 ± 0,4 ^b	2,7 ± 0,3 ^b

Les caractéristiques des deux zones de courbure sont extraites de l'analyse spatiotemporelle des prises de vue séquentielles des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* issues de la lignée *msl15* n'ayant pas pénétré la couche

inférieure dans les milieux deux-couches. Dans les milieux 0,2-0,2, 0,2-0,3 et 0,2-0,5, les racines *mca1-null* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure de milieu ont réorienté leur croissance *via* la mise en place de deux zones de courbures et ont développé une forme finale de marche, similaire à celle développée par les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5. Les caractéristiques des zones de courbure formées chez les racines *msl15* dans les trois milieux deux-couches ont donc été comparées à celles chez les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5.

Pour chaque variable (Distance par rapport à l'apex, Longueur et Intensité maximale), les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $8 \leq n \leq 12$. Deux analyses statistiques distinctes ont été réalisées :

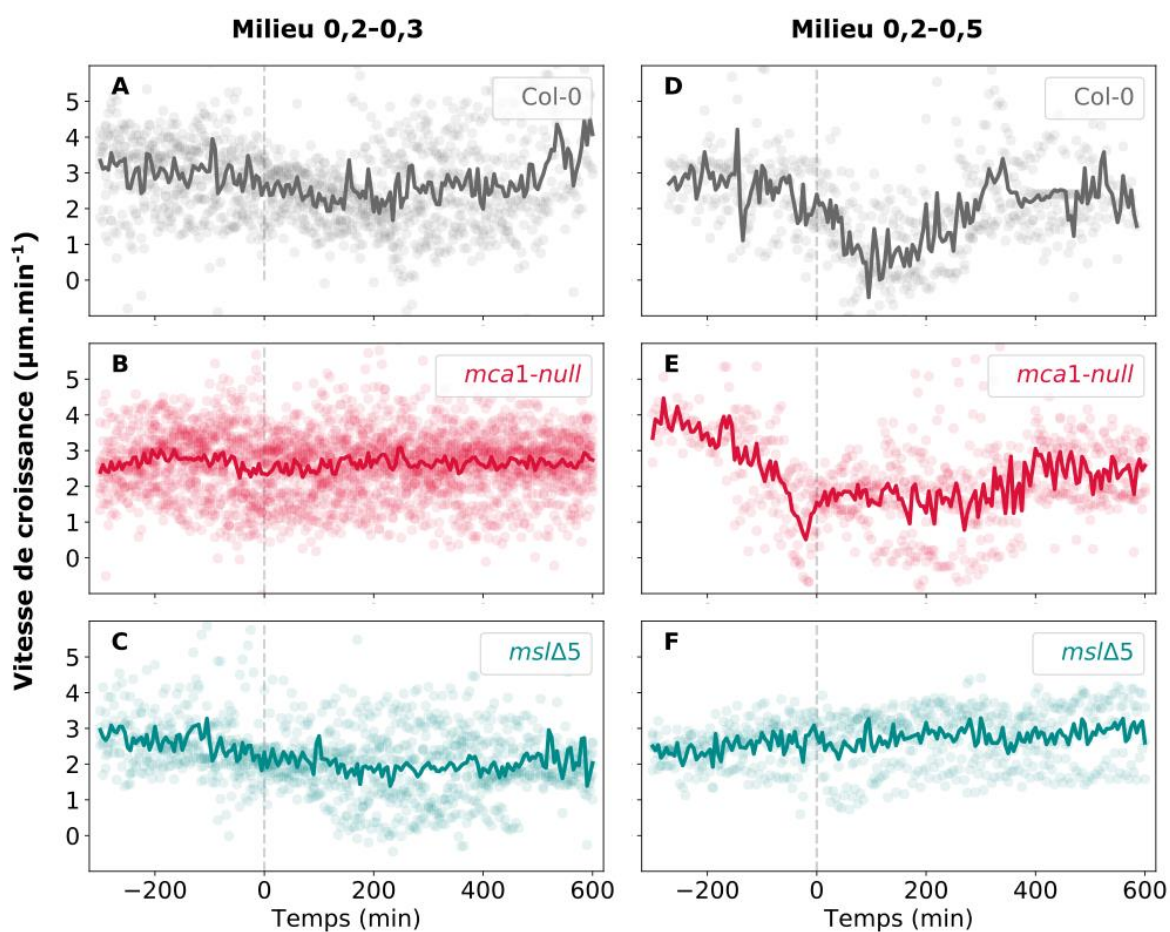
- Une ANOVA II suivie d'un test de Tukey a été réalisée pour comparer les moyennes obtenues pour les racines *msl15* dans le milieu 0,2-0,2, 0,2-0,3 ou 0,2-0,5 à celles obtenues pour les racines sauvages dans le milieu 0,2-0,5 (trois ANOVA II distinctes, un facteur génotype et un facteur courbure).

Les * indiquent les moyennes qui apparaissent significativement différentes de la moyenne obtenue pour les racines sauvages à la suite de cette analyse ($P < 0,05$). La couleur rouge a été utilisée pour indiquer des moyennes significativement plus élevées que la moyenne obtenue pour les racines sauvages.

- Une ANOVA II suivie d'un test de Tukey a été réalisée pour comparer les moyennes obtenues pour les racines *msl15* en fonction du milieu et de la courbure (première ou seconde courbure)

Les lettres indiquent des moyennes qui apparaissent significativement différentes à la suite de cette analyse ($P < 0,05$).

Annexe 11 : Vitesse de croissance des racines Col-0, *mca1*-null et *mslΔ5* pénétrant la couche inférieure des milieux deux-couches 0,2-0,2(A-C) et 0,2-0,3 (D-F)



Vitesse de croissance ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)

Milieu	Génotype	Avant contact	Après contact	Après pénétration
0,2-0,2	Col-0	$2,99 \pm 0,27$	$2,21 \pm 0,18$	$2,71 \pm 0,37$
	<i>mca1</i> -null	$2,69 \pm 0,17$	$2,47 \pm 0,17$	$2,65 \pm 0,17$
	<i>mslΔ5</i>	$2,54 \pm 0,19$	$1,87 \pm 0,25$	$1,97 \pm 0,31$

0,2-0,3	Col-0	2,54 ± 0,23 ^{ab}	1,01 ± 0,20 ^c	2,49 ± 0,47 ^{ab}
	<i>mca1-null</i>	2,40 ± 0,28 ^{ab}	1,47 ± 0,29 ^{bc}	2,44 ± 0,24 ^{ab}
	<i>msl15</i>	2,51 ± 0,31 ^{ab}	2,64 ± 0,43 ^{ab}	2,81 ± 0,39 ^a

La vitesse de croissance a été mesurée toutes les 5 min de -300 min à +600 min après contact entre l'apex racinaire et l'interface, pour les racines qui ont pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 (A-C) et 0,2-0,5 (D-F). Les lignes indiquent les valeurs moyennes et les points indiquent les valeurs individuelles, $8 \leq n \leq 10$. La ligne en pointillés indique le moment du contact entre l'apex racinaire et l'interface.

Dans le tableau, les vitesses de croissance moyennes calculées sur 8 à 10 racines $\pm$ l'erreur standard sont présentées pour trois étapes caractéristiques :

- L'étape « Avant contact » concerne les 300 min précédant le contact entre l'apex racinaire et l'interface
- L'étape « Après contact » concerne la vitesse de croissance à partir du contact entre l'apex et l'interface jusqu'à la rupture de l'interface induite par la croissance racinaire
- L'étape « Après pénétration » concerne la vitesse de croissance à partir de la rupture de l'interface, permettant la pénétration dans la couche inférieure jusqu'à 600 min après le contact.

Pour chaque milieu, les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

Annexe 12 : Vitesse de croissance des racines Col-0, *mca1-null* et *msl15* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5

Vitesse de croissance ($\mu\text{m}.\text{min}^{-1}$)				
Milieu	Génotype	Avant contact	Pendant réorientation	Après réorientation
0,2-0,3	Col-0	$2,78 \pm 0,55^a$	$1,18 \pm 0,20^b$	—
	<i>mca1-null</i>	$2,52 \pm 0,38^{ab}$	$1,83 \pm 0,36^{ab}$	$1,93 \pm 0,45^{ab}$
	<i>msl15</i>	$2,60 \pm 0,31^{ab}$	$1,64 \pm 0,22^{ab}$	$1,75 \pm 0,35^{ab}$
0,2-0,5	Col-0	$2,95 \pm 0,21^a$	$1,85 \pm 0,25^b$	$1,78 \pm 0,20^b$
	<i>mca1-null</i>	$2,55 \pm 0,30^{ab}$	$2,00 \pm 0,25^{ab}$	$2,20 \pm 0,21^{ab}$
	<i>msl15</i>	$2,66 \pm 0,12^{ab}$	$1,78 \pm 0,24^b$	$2,03 \pm 0,19^{ab}$

La vitesse de croissance moyenne des racines Col-0, *mca1-null*, et *msl15* qui n'ont pas pénétré la couche inférieure des milieux 0,2-0,3 et 0,2-0,5 a été calculée sur trois étapes caractéristiques :

- L'étape « Avant contact » concerne les 300 min précédant le contact entre l'apex racinaire et l'interface
- L'étape « Pendant réorientation » concerne la vitesse de croissance à partir du contact entre l'apex et l'interface jusqu'à la mise en place complète des zones de courbure
- L'étape « Après réorientation » concerne la vitesse de croissance à partir de la mise en place complète des zones de courbure jusqu'à 600 min après le contact avec l'interface. Dans le milieu 0,2-0,3, la réorientation en boucle des racines Col-0 n'a pu être suivie jusqu'à son terme du fait de l'acquisition des prises de vue séquentielles en 2D.

Les valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard sont présentées, $8 \leq n \leq 12$. Les lettres indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,05$, ANOVA II et test de Tukey).

Abstract

Root growth and development are highly modulated by soil mechanical properties such as texture, structure and bulk density. Increases in soil penetration resistance affect root system architecture, root cell production and elongation, root diameter, and root tip orientation. Although root responses to changes in mechanical stresses are well described in several plant species, their establishment and the signaling pathways underlying these responses remains misunderstood. The main objective of this thesis is to study the establishment of *Arabidopsis thaliana* primary root responses to changes in mechanical stresses. So far, studies reported two distinct putative mechanical signaling pathways involving either (i) the root cap as a main mechanosensing site or (ii) the activity of stretch-activated ion channels localized on the cell plasma membranes along the root apex. According to previous studies, we studied the implication of the root cap and of the stretch-activated channels of the MCA and MSL families in the root responses to increases in mechanical stresses. We developed an original experimental set-up based on the monitoring of growth and orientation of *Arabidopsis thaliana* primary roots in one-layer and two-layer Phytigel based growth media. The one-layer growth media mimicked a long-term increase in frictions and in radial and axial mechanical stresses whereas the two-layer growth media mimicked a short-term increase in axial mechanical stresses. We characterized penetration abilities, growth rate and tip orientation of *Arabidopsis thaliana* wild type roots (Col-0) and mutant roots showing defects in root cap organization (*fez-2*, *smb-3*, *brn1-1 brn2-1*) or in stretch-activated ion channels activity (*mca1-null*, *msl15*) in one-layer and two-layer media. Firstly, we observed that the establishment of root growth responses to increases in mechanical stresses involved both mechanical (buckling) and biological (growth zone modulations) mechanisms. Then, our experiments demonstrated that alterations in root cap organization led to altered root growth responses to increases in mechanical stresses. Our results suggest that the root cap acts as a mechanosensing site. Moreover, the results obtained with the *mca1-null* and *msl15* *Arabidopsis* lines suggest that the MCA1 and MSLs ion channels also participate in the establishment of root responses to increases in mechanical stresses.

Keywords: curvature, medium strength, Phytigel medium, root growth, biomechanics, root buckling, root cap

Résumé

Le comportement mécanique d'un sol constitue un des facteurs prépondérants affectant la croissance et le développement racinaire. L'augmentation de la résistance mécanique d'un sol affecte l'architecture du système racinaire, la croissance axiale et radiale des racines, et l'orientation de la croissance. Bien que ces réponses soient décrites sur diverses espèces végétales dans la littérature, leur mise en place et les mécanismes de signalisation sous-jacents restent à ce jour méconnus. L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la mise en place des réponses des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à des variations de contraintes mécaniques de son substrat. La littérature fait état jusqu'ici de deux voies de signalisation mécanique possibles, l'une impliquant une mécanoperception au niveau de la coiffe racinaire, et l'autre faisant intervenir entre autres l'activation de canaux mécano-sensibles au niveau de l'apex racinaire. Pour étudier leur implication respective, nous avons caractérisé les réponses à une augmentation des contraintes mécaniques de racines primaires issues de la lignée *Arabidopsis thaliana* sauvage et de lignées mutantes affectées au niveau de l'organisation de la coiffe (*fez-2*, *smb-3*, *brn1-1 brn2-1*) ou au niveau de canaux ioniques mécanosensibles (*mca1-null*, *msl45*). Nous avons développé un système expérimental original basé sur le suivi de croissance et d'orientation des racines dans des milieux de culture à base de Phytigel. Ces milieux de culture permettent de mimer d'une part une augmentation à long terme et simultanée des contraintes mécaniques axiales, radiales et des frottements et d'autre part une augmentation à court terme des contraintes mécaniques axiales. Tout d'abord, nous avons observé que la mise en place des réponses de croissance des racines primaires d'*Arabidopsis thaliana* à ces augmentations de contraintes mécaniques reposait sur une interaction entre des processus mécaniques (flambement) et biologiques (régulations de la zone de croissance). Ensuite, nous avons mis en évidence que la coiffe racinaire participait à la mise en place des réponses des racines d'*Arabidopsis thaliana* face à une augmentation des contraintes mécaniques. Nos résultats suggèrent que la coiffe pourrait constituer un siège de la mécanoperception. Par ailleurs, nos résultats sur les lignées *mca1-null* et *msl45* suggèrent que les canaux ioniques MCA1 et MSLs participeraient également à la mise en place des réponses racinaires à l'augmentation des contraintes mécaniques.

Mots-clés : courbure, résistance mécanique, Phytigel, croissance racinaire, biomécanique, flambement, coiffe racinaire