Modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le Noyer (Juglans regia) : approches écophysiologique et moléculaire

Khaoula Ben Baaziz

▶ **To cite this version:**

Khaoula Ben Baaziz. Modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le Noyer (Juglans regia) : approches écophysiologique et moléculaire. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22212 . tel-00735808

HAL Id: tel-00735808

https://theses.hal.science/tel-00735808

Submitted on 26 Sep 2012

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.

N° D.U. 2212

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,

SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre 571

Thèse en cotutelle

Présentée à l'Université Tunis El manar
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité: Physiologie et génétique moléculaire

Soutenue le 27 Décembre 2011

Mme Khaoula BEN BAAZIZ BEN MAAD

Modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le Noyer (Juglans regia): Approches écophysiologique et moléculaire

---

Président :	**Mr Omrane BELHADJ**, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Rapporteurs :	**Mr Mohamed Fouad BOUZIDI**, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand
	Mr Aly RAIES, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Examinateurs :	**Mr Soulaiman SAKR**, Professeur, Université d'Angers
	Mr Jean Stéphane VENISSE, Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand
	Mme Samira SMITI, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Invité :	**Mr Sadok BOUZID**, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

UMR 547 PIAF
Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier

Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix — Université Blaise Pascal

U.M.R. PIAF

N° D.U. 2212

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,

SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre 571

Thèse en cotutelle

Présentée à l'Université Tunis El manar
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité: Physiologie et génétique moléculaire

Soutenue le 27 Décembre 2011

Mme Khaoula BEN BAAZIZ BEN MAAD

Modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le Noyer (Juglans regia): Approches écophysiologique et moléculaire

---

Président :	**Mr Omrane BELHADJ**, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Rapporteurs :	**Mr Mohamed Fouad BOUZIDI**, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand
	Mr Aly RAIES, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Examinateurs :	**Mr Soulaiman SAKR**, Professeur, Université d'Angers
	Mr Jean Stéphane VENISSE, Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand
	Mme Samira SMITI, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Invité :	**Mr Sadok BOUZID**, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

UMR 547 PIAF
Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier

Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix — Université Blaise Pascal

U.M.R. PIAF

Remerciements

Cette thèse était une expérience enrichissante tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel et c'est avec un grand plaisir que je remercie toutes les personnes que j'ai connu lors de mon passage à l'*UMR 547 PIAF* et qui ont contribué dans ce travail.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Jean Louis JULIEN, Professeur à l'Université Blaise Pascal, de m'avoir acceuillie dans son laboratoire au sein de l'*UMR 547 PIAF « Physiologie Intégrée de l'arbre Fruitier et Forestier »* (INRA / Université Blaise Pascal) et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

Mes premiers remerciments s'adressent à mes directeurs de thèse : Monsieur Soulaiman SAKR, Professeur à l'*UMR SAGAH « Sciences Agronomiques Appliquées à l'Horticulture »* (INRA / Agrocampus Ouest INHP / Université d'Angers) et Monsieur Sadok BOUZID, Professseur à la Faculté des Sciences de Tunis. Je les remercie chaleureusement pour la confiance qu'ils ont toujours témoigné, leur encadrement enrichissant, leur soutien moral et leur disponiblité malgré leurs nombreuses obligations.

Je souhaite remercier Monsieur Jean Stéphane VENISSE, Maitre de conférences à l'*UMR 547 PIAF* qui a assuré le co-encadrement de cette thèse, de m'avoir aiguillé durant ces années.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Fouad BOUZIDI, Professeur à l'Université Blaise Pascal, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Je remercie également Monsieur Aly Raies, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans la fameuse machine de mesure de la conductivité hydraulique (XYL'EM) fournie pas Monsieur Hervé COCHARD, Professeur à l'INRA de Clermont Ferrand, je le remercie pour son investissement dans ce travail et ses conseils toujours précieux. J'adresse aussi mes remerciments à Messieurs Tété BARIGAH et Christian BODET de m'avoir initiée à effectuer les mesures sur XYL'EM.

Mes remerciements chaleureux s'adressent à tous les membres de l'*UMR 547 PIAF*. Je remercie Nicole BRUNEL, Patricia DREVET, Nathalie LEBLANC, Marie Thérèse GERLES, Brigitte MERINO, Christelle BOISSELET, Jerôme FRANCHEL, BORIS FUMANAL, Agnès

GUILLOT et Catherine LENNE pour leur bonne humeur quotidienne et les discussions animées à chaque pause café.

Je ne peux pas ne pas remercier Aurélie GOUSSET ma voisine de bureau et Stéphane HERBETTE, membres de l'équipe HYDRO dont je fais partie, je les remercie pour leurs conseils et disponibilté.

Un grand merci à sylvaine LABERNIA de m'avoir aidé à broyer les feuilles de noyer, à Laurent GUILLEMOT de m'avoir fournie l'azote liquide tant que je voulais, Dominique MARCON de m'avoir photographié avec minutie les gels AFLP et Norbert FRIZOT mon sauveur des pannes informatiques.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'*UMR 1095 GDEC* « Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales » en particulier Monsieur Said MOUZEYAR, Professeur à l'Université Blaise Pascal, de m'avoir fournie du matériel pour l'étude AFLP et de m'avoir permis de squatter les thermocycleurs du laboratoire. Je remercie également Monique, Florence, Jeanne, Giselle et Isabelle pour les bons moments partagés dans leur laboratoire.

Une grande pensée pour les thésards de l'*UMR 547 PIAF* actuels et de l'époque: Anais, Jing, Houssem, Ludovic, Dalila, Deplphine et David. Ainsi que les thésardes de l'*UMR 1095 GDEC* : Imen, Senda, Deplphine et Julie. Je les remercie tous pour les moments de joie et de détente.

Tous les séjours n'auraient pas été faciles sans le soutein de Madame Salwa BADAOUI, Maitre de conférences à l'*UMR 1095 GDEC* qui a su m'épauler et me réconforter dans les moments difficiles.

Un pensée très particulière pour toute ma famille, en particulier mes parents pour leur soutien et encouragement, mon mari Atef pour sa patience et compréhension et un grand merci à mon fils Yassine simplement d'être là.

Liste des abréviations

Unités :
°C : Degré Celsius
cm, nm : Centimètre, Nanomètre
g, mg, µg : Gramme, Milligramme, Microgramme
kDa : kilo Dalton
M, mM: Molaire, Millimolaire
s, min, h : Seconde, Minute, Heure
mL, µL : Millilitre, Microlitre
Pa : Pascal
pb, kb : Paire de bases, Kilo-base
rpm : Rotation par minute
U : Unité(s)
V : volt
W : Watt

Inhibiteurs :
CHX: Cycloheximide
DMSO : Diméthyl sulfoxide
$HgCl_2$: Chlorure de mercure
$LaCl_3$: lanthanum
W7 : N- 6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide

Divers :
A : Adénine
C : Cytosine
T : Thymine
G : Guanine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc db : ADN complémentaire double brin
ADNc : ADN complémentaire
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNtx : ARN totaux
ATP : Adénosine tri-phosphate
BET : Bromure d'éthidium
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Outil de recherche d'alignements locaux)
Ca^{2+} : Calcium
C_T : Treshold cycle (cycle-seuil)
CTAB : hexadecyltrimethylammonium bromide
DNAse : Acide désoxyribonucléase
dNTP : Désoxynucléotide 5'-triphosphate
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

ESTs : Expressed sequence tags (Etiquettes de séquences transcrites)
F : Flux (mmol s^{-1})
HPFM : High Pressure Flow Meter
HR: humidité relative de l'air
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K_F : Conductivité hydraulique foliaire
K_R: Conductivité hydraulique racinaire
LB : Milieu Luria-Bertani
LiCl : Chlorure de lithium
$MgCl_2$: Chlorure de magnésium
MIP: Major Intrinsic Protein
Na_2CO_3 : carbonate de sodium anhydre
NaCl : Chlorure de sodium
NIP: Nodulin 26-like intrinsic membrane protein
Oligo(dT) : Oligo-désoxythymidine
P : Pression (MPa)
PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PIP : Plasma membrane intrinsic protein (aquaporine)
PSA : persulfate d'ammonium
PVP : Polyvinylpyrrolidone K29-32
Q_R : Quantité relative des transcrits
qRT-PCR : RT-PCR quantitative en temps réel
qsp : Quantité suffisante pour
R_F : Résistance hydraulique foliaire
RNAse : Ribonucléase
RT : Reverse Transcription (Transcription inverse)
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SF : Surface foliaire
SIP: Small basic intrinsic proteins
TAE : Tampon Tris/Acétate/EDTA
Taq : Thermus aquaticus
TBE Tampon Tris/Borate/EDTA
TDF: Transcript-Derived Fragment (transcrits différentiels dérivés)
TIP : tonoplast intrinsic protein
Tris : 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
UV : Ultra violet
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactoside

Liste des figures

Figure 1 : Les voies de circulation de l'eau dans les cellules 10
Figure 2 : Chatons mâles (en bas) et fleurs femelles (en haut) d'une pousse de noyer 12
Figure 3 : Topologie d'une aquaporine à travers la membrane. 24
Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'un monomère d'aquaporine de tabac (*NtAQP1*)..... 24
Figure 5 : Structure des cryptochromes, des phytochromes et des phototropines 31
Figure 6 : (A) mécanismes d'action des phytochromes et des phototropines (B) mécanisme d'action des cryptochromes..... 33
Figure 7 : La structure "EF hand". 37
Figure 8 : Voies de circulation de l'eau à travers une feuille..... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 9 : Le mécanisme par lequel se fait la régulation des aquaporines à la lumière dans les feuilles de noyer (*Juglans regia*) reste encore inconnu..... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 10 : Matériel végétal utilisé : noyer (*Juglans regia* cv. Franquette)..... 43
Figure 11 : Dispositif expérimental utilisé pour la mesure de la résistance hydraulique foliaire. 45
Figure 12 : Etapes de la procédure cDNA AFLP. 50
Figure 13 : Carte de restriction du vecteur pGEM T easy 57
Figure 14 : (A) thermocycleur (Biorad), (B) la courbe de fusion (melt curve) indiquant la spécificité des amorces, (C) exemple d'amplification en Q PCR. 63
Figure 15 : Réponse de la K_F à la lumière et sa corrélation avec la stimulation des transcrits d'aquaporines chez le noyer (*Juglans regia*). 67
Figure 16 : (A) K_F (mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}) de *Fagus Sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba* et *Populus tremula* à l'obscurité et après 2h d'illumination (B) Abondance relative des transcrits PIP1s et PIP2s chez *Fagus Sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba* et *Populus tremula* à l'obscurité et après 1h d'illumination, déterminée par PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques dessinées dans les régions conservées pour toutes les espèces étudiées. 69
Figure 17 : Amplification PCR 40 cycles à 52°C utilisant les amorces dégénérées PIP1s (PIP1DF/PIP1DR) et PIP2s (PIP2DF/PIP2DR) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X pour *Fagus sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula*..... 71

Figure 18 : Amplification PCR 40 cycles à 54°C utilisant les amorces spécifiques PIP1s (PIP1SF/PIP1SR) et PIP2s (PIP2SF/ PIP2SR) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X pour *Fagus sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula.*..... 71
Figure 19 : Amplification PCR utilisant l'amorce PIP1DF ou PIP2DF et l'amorce race3' sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X. 71
Figure 20 : Analyse phylogénétique des aquaporines PIP1 et PIP2 chez *Juglans regia* (*Jr*), *Populus trichocarpa* (*Poptr*), *Vitis vinifera* (*Vv*), *Arabidopsis thaliana* (*At*) et *Quercus macrocarpa* (*Qm*). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 21 : Pourcentage des acides aminés identiques entre les sequences protéiques *JrPIP1s* et *JrPIP2s*. 75
Figure 22 : Evolution de la K_F (A) ainsi que l'abondance relative de 4 *JrPIP1s* (B) et 6 *JrPIP2s* (C) dans des feuilles de *Juglans regia* exposées à différentes durées d'éclairement (0, 15mn, 1h, 2h et obscurité). 77
Figure 23 : Effet de l'absence de la lumière bleue sur la K_F des feuilles de *Juglans regia* en comparaison avec les feuilles témoins. Les astérisques représentent les résultats significatifs (test t-student). (A) le filtre antibleu est appliqué pendant 1h après la phase obscure (-LB1). (B) le filtre antibleu est appliqué après 90min d'illumination (-LB2). (C) valeurs de K_F dans les feuilles témoins, les feuilles traitées –LB1 et –LB2. 79
Figure 24 : Effet de l'absence de la lumière bleue sur les transcrits d'aquaporines dans les feuilles de *Juglans regia*. 81
Figure 25 : Profil électrophorétique de 0.5µg d'ARNtx extraits de feuilles de noyer (*Juglans regia*) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X. 88
Figure 26 : Profil électrophorétique de 2µg d'ADNcdb purifié ssur gel d'agarose 1.5% dans du TAE 0.5X. 88
Figure 27 : Vérification d'une amplification non sélective utilisant les amorces Eco 0 et Msp 0 sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X. 89
Figure 28 : Exemple d'une amplification sélective utilisant les amorces EcoA et MspI CC sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X. 89
Figure 29 : Exemple de gel polyacrylamide montrant le polymorphisme de taille des fragments d'amplifications grâce à 8 combianaisons d'amorces à partir des feuilles de *Juglans regia* exposées à différentes durées de lumière. (A) marqueur constitutif, (B) marqueur induit par la lumière et (C) marqueur réprimé à la lumière. 91
Figure 30 : Vérification de l'amplification de plusieurs bandes récupérées du gel AFLP sur gel agarose 1.5% et dans du TAE 0.5X..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 31: Classification des TDFs ayant une fonction putative connue en 10 catégories fonctionnelles. 98
Figure 32 : Profils expressionnels des 30 TDFs sélectionnés de l'étude cDNA-AFLP comme marqueurs précocement régulés par la lumière. 102
Figure 33 : Test de réversibilité réalisé avec 30mM $LaCl_3$ sur des feuilles de noyer. 111
Figure 34 : Effet de 30M $LaCl_3$ ou 30mM W7 sur la K_F chez *Juglans regia* en comparaison avec les feuilles témoins (A) $LaCl_3$ ou W7 sont perfusés 1h avant l'illumination des feuilles (Lumière 1). (B) $LaCl_3$ ou W7 sont perfusés après 1h30 d'illumination (Lumière 2). (C) valeurs de K_F dans les feuilles témoins, les feuilles traits avec $LaCl_3$ ou W7. 113
Figure 35 : Profils d'expression des aquaporines *JrPIP1s* et *JrPIP2s* dans les feuilles de *Juglans regia* traitées avec un antagoniste de calmoduline (W7) ou un inhibiteur des canaux calciques ($LaCl_3$) après 1h d'illumination. 115
Figure 36 : Modèle intégratif hypothétique montrant les partenaires moléculaires (sur une sélection des TDFs identifiés) potentiellement modulés avec la stimulation de la conductivité hydraulique (K_F) et les aquaporines *JrPIPs* dans les feuilles de noyer exposées à la lumière. 126
Figure 37 : Modèle putatif de résistance de la conductivité hydraulique dans les feuilles de noyer impliquant une voie de signalisation calcique dans la modulation des transcrits *JrPIPs* par la lumière Ra: résistance hydraulique de l'apoplasme dans le mésophylle; Rs: résistance hydraulique du symplasme dans le mésophylle ; Rv: résistance hydraulique du système vasculaire ; flèches noires: régulations de l'abondance des transcrits; flèches rouges: réseau de signalisation ; flèches bleues: flux aqueux ; flèches roses: diminution de la résisatnce hydraulique Rs ($Rs = 1/K_F$). 129

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des amorces utilisées pour l'étude cDNA AFLP..... 52

Tableau II : Nombre de combinaison possibles d'amorces pour chaque couple d'enzyme... 52

Tableau III : Liste des amorces utilisées pour les PCR en temps réel.**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau IV : Classification fonctionnelle des TDFs précocement modulés par la lumière dans les feuilles de noyer. La recherche d'homologies de séquence est réalisée en utilisant la fonction Blast X et Blast N. 95

Tableau V : Informations relatives aux 30 TDFs sélectionnés pour l'étude PCR en temps réel. 100

Sommaire

Avant propos *1*

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE *5*

-I- INTRODUCTION GENERALE *6*

1-Importance de l'eau pour les plantes **6**

2- Fonctionnement hydraulique des plantes **6**

3- Bases physiques du transport d'eau chez les végétaux **7**

4- Le concept continuum sol-plante-atmosphère **8**

5- Voies de circulation de l'eau **9**

6- Description du modèle végétal : le noyer (*Juglans regia*) **11**

-II - ARCHITECTURE HYDRAULIQUE DE LA PLANTE *13*

1- La conductivité hydraulique racinaire **13**

2- La conductivité hydraulique xylémienne **15**

3- La conductivité hydraulique foliaire (K_F) : composante majeure du système hydraulique de la plante **16**

3.1- Méthodes de mesure de la K_F 17

3.2- Dynamique de la K_F 17

3.3- Bases moléculaires de la régulation de la K_F à la lumière 20

-III- LES AQUAPORINES *22*

1-Historique et phylogénie **22**

2- Structure moléculaire et mécanisme de transport **23**

3- Mécanismes de régulation **25**

3.1-Phosphorylation 25

3.2- Hétéromérisation 26

3.3-Glycosylation 26

3.4- Méthylation 27

3.5- pH et cations bivalents 27

4- Fonctions physiologiques **28**

-IV- LE SIGNAL LUMINEUX *29*

1-Perception du signal lumineux **29**

1.1- Les phytochromes 30

1.2-Les cryptochromes 30

1.3-Les phototropines 32

2-Transduction du signal lumineux **34**

2.1- Rôle du calcium dans la transduction du signal lumineux 34

-V- CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE *41*

MATERIEL ET METHODES *42*

-I- MATERIEL VEGETAL *44*

-II- PROCEDURES EXPERIMENTALES D'ECOPHYSIOLOGIE *44*

1- Méthode de mesure de la K_F : HPFM **44**

2- Conditions de mesure **44**

3- Mesure de la K_F en réponse aux inhibiteurs calciques **46**

4- Mesure de la K_F en réponse au filtre anti-bleu **46**

-III- Procédures expérimentales de biologie moléculaire *47*

1- Extraction des ARNtx **47**

2- Approche globale cDNA AFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction) **49**

2.1- Synthèse des ADNc double brin 49

2.2- Purification des ADNc double brin 49

2.3- Restriction des cADNdb et ligation des adaptateurs 51

2.4- Amplifications PCR 51

2.5- Analyse des fragments d'amplifications 54

3- Clonage **57**

4- RT-PCR en temps réel **59**

-IV- Méthodes bioinformatiques *64*

RESULTATS ET DISCUSSIONS *65*

Partie 1 : Etude de la modulation de la conductance hydraulique (K_F) par la lumière chez le noyer (*Juglans regia*) **66**

1-Introduction **68**

2- Comparaison de la réponse à la lumière chez *Juglans regia, Fagus sylvatica, Quercus robur, Salix alba* et *Populus tremula*..... 68

2.1- Effet de la lumière sur la K_F de *Juglans regia, Fagus sylvatica, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula*..... 68

2.2- Effet de la lumière sur les transcrits d'aquaporines de *Juglans regia, Fagus sylvatica, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula*..... 70

3- Identification de 8 nouvelles isoformes d'aquaporines chez *Juglans regia* et étude de leur réponse à la lumière..... 72

3.1- Conception des amorces..... 72

3.2-Analyse des séquences protéiques des JrPIPs identifiées et étude phylogénétique..... 74

3.3-Profils d'expressions des 10 *JrPIPs* en fonction d'une cinétique lumière..... 76

4- Rôle de la lumière bleue dans la modulation de la K_F par la lumière..... 78

4.1- Etude de l'effet de la lumière bleue sur la régulation de la K_F..... 78

4.2-Etude de l'effet de la lumière bleue sur la régulation des transcrits des *JrPIPs*..... 80

Partie 2 : Recherche des marqueurs moléculaires précoces accompagnant la modulation de la K_F par la lumière chez le noyer (*Juglans regia*)..... 86

1- Introduction..... 87

2- Etude sans apriori cDNA AFLP du profil transcriptionnel de la réponse à la lumière..... 87

2.1- Echantionnage et extraction des ARNtx..... 87

2.2- L'approche cDNA AFLP..... 87

3.1- Sélection de 30 gènes différentiellement exprimés à la lumière et conception des amorces..... 94

3.2- Profils expressionels des 30 gènes sélectionnés..... 99

4- Discussion..... 103

4.1- Transduction du signal..... 103

4.2- Régulation protéique..... 104

4.3- Maintenance protéique..... 106

4.4- Intégrité de la paroi cellulaire..... 107

4.5- Photosynthèse..... 107

4.6- Métabolisme des acides gras..... 108

Partie 3 : Rôle potentiel de la signalisation calcique dans la modulation de la K_F par la lumière chez le noyer..... 109

1-Introduction..... 110

2-Etude de l'effet des inhibiteurs de canaux calciques et de calmoduline sur la régulation de la K_F par la lumière..... 110

2-1 Choix de la concentration des inhibiteurs..... 110

2-2 Effets du $LaCl_3$ et du W7 sur la K_F..... 112

2-3 Effets du $LaCl_3$ et du W7 sur les transcrits *JrPIPs* 112

3-Discussion 116

DISCUSSION GENERALE 119

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 131

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 138

PUBLICATIONS 163

ANNEXES 164

Avant propos

Cette thèse en cotutelle a été réalisée entre le laboratoire de biologie végétale, Faculté des Sciences de Tunis, Campus universitaire et l'UMR 547 PIAF (Physiologie intégrée de l'arbre fruitier et forestier) *Université Blaise Pascal* F-63177 Aubière, Clermont-Ferrand. Elle a été encadrée par : Pr. Sadok BOUZID (*Faculté des Sciences de Tunis*) et Pr. Soulaiman SAKR (UMR PIAF, *Université Blaise Pascal, UMR SAGAH Agrocampus Ouest, Centre d'Angers, INHP*. Le co-encadrement a été assuré par Dr. Jean Stéphane VENISSE *(UMR PIAF).*

Cette thèse a bénéficié du soutien financier du ministère de l'enseignement supérieur et la recherche scientifique en Tunisie.

Contexte

Ce travail de thèse porte sur la régulation de la résistance hydraulique foliaire par le facteur lumineux chez le noyer (*Juglans regia*). Il s'inscrit dans la thématique de la réponse des plantes aux contraintes abiotiques.

La résistance hydraulique foliaire R_F est une composante majeure du transport d'eau dans toute la plante. Elle contribue jusqu'à 60 à 80% dans la résistance hydraulique aérienne et 30% dans la résistance hydraulique de toute la plante. Cette résistance hydraulique foliaire est dépendante des facteurs environnementaux tels que la lumière. La stimulation de la conductivité hydraulique à la lumière a été bien documentée à l'échelle physiologique. Toutefois, les bases moléculaires de cette réponse sont très peu étudiées.

Chez le noyer (*Juglans regia*), on a pu relier la stimulation de la K_F à la lumière à l'accroissement de la quantité de transcrits de deux isoformes d'aquaporines (*JrPIP2.1* et *JrPIP2.2)* (Cochard *et al*, 2007). Deux voies de circulation d'eau au sein de la feuille ont été proposées. A l'obscurité, la voie apoplasmique serait dominante et caractérisée par une faible valeur de la K_F et une faible abondance des transcrits *JrPIP2s*. La voie transcellulaire qui serait marquée par une valeur de K_F élevée, associée à une forte abondance des transcrits *JrPIP2s*. Cette dernière voie nécessite une biosynthèse *de novo* des aquaporines, ce qui pourrait suggérer que la lumière exerce une régulation précoce et complexe sur les aquaporines.

Le projet de la thèse s'inscrit dans la continuité des travaux mentionnés et vise à **identifier les mécanismes moléculaires précoces impliqués dans la modulation de la conductivité hydraulique foliaire chez le noyer.**

Structuration du manuscrit de la thèse

Le manuscrit de la thèse a été rédigé en quatre chapitres :

-**Le premier chapitre** correspond à une synthèse bibliographique sur les connaissances actuelles relatives à l'architecture hydraulique des plantes, les aquaporines et le signal lumineux.

-**Le deuxième chapitre** décrit les différentes approches écophysiologiques (mesure de la conductivité hydraulique foliaire) et moléculaires (cDNA-AFLP, RT-PCR et PCR en temps réel) utilisées.

-**Le troisième chapitre** a été consacré à la présentation des résultats obtenus et leurs discussions au regard des données bibliographiques. Ce chapitre comporte trois parties :

- La partie 1 est consacrée à l'étude de l'effet de la lumière sur la conductivité hydraulique foliaire et les transcrits d'aquaporines chez le noyer en comparaison avec d'autres arbres forestiers (le chêne, le hêtre, le saule et le peuplier). Les résultats montrent que le noyer (*Juglans regia*) est une espèce dont l'effet stimulateur de la lumière sur la conductivité hydraulique foliaire dépend d'une accumulation des transcrits d'aquaporines des sous familles PIP1 et PIP2. La participation d'autres isoformes d'aquaporines dans cette stimulation a été caractérisée chez le noyer. Puisque l'effet de la lumière dépend de sa quantité et de sa qualité, l'effet de la lumière bleue sur la régulation de la K_F a été étudié.
- La partie 2 s'intéresse à la recherche de marqueurs moléculaires précoces accompagnant la stimulation de la K_F par la lumière chez le noyer par le biais de l'analyse génomique globale (cDNA AFLP).
- La partie 3 étudie le rôle potentiel de la signalisation calcique dans la modulation de la K_F par la lumière chez le noyer, en développant une approche pharmacologique. Cette dernière consiste en l'étude de l'effet de deux inhibiteurs calciques : le lanthanum ($LaCl_3$) et le (W7) sur la K_F et sur les transcrits de 10 aquaporines de noyer.

-Le quatrième chapitre fait l'objet d'une discussion générale, à l'issue de laquelle un modèle hypothétique a été proposé, montrant les partenaires moléculaires potentiellement modulés avec la stimulation de la conductivité hydraulique (K_F) et les aquaporines *JrPIPs* dans les feuilles de noyer exposées à la lumière.

Le présent travail a fait l'objet de trois publications et sont présentées à la fin du manuscrit :

1. **Khaoula Ben Bâaziz, David Lopez, Sadok Bouzid, Hervé Cochard, Jean-Stéphane Venisse and Soulaiman Sakr (2011).** An insight into the early gene expression program occurring during light-induced leaf hydraulic (K_{leaf}) conductance in the walnut tree (*Juglans regia L.*) (article accepté à Biologia plantarum)
2. **Khaoula Ben Bâaziz, Didier Combes, Sadok Bouzid, Hervé Cochard, Jean-Stéphane Venisse and Soulaiman Sakr (201?).** Contribution of both the PIP1 and PIP2 aquaporins to light-mediated K_{leaf} induction in walnut tree (article soumis à tree Physiology)
3. **Khaoula Ben Bâaziz, Jean-Stéphane Venisse, Sadok Bouzid and Soulaiman Sakr (2010).** Molecular Characterization of light effect on leaf hydraulic conductance. Revue Soc.Sci. Nat de Tunisie 2009-2010. T : 36, 34-43.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

-I- INTRODUCTION GENERALE

1-Importance de l'eau pour les plantes

L'eau est considérée comme le constituant le plus important des végétaux, elle représente selon les espèces environ 80% de leur masse de matière fraîche. Du fait de ses propriétés physico-chimiques et son abondance dans la plante, l'eau assure de multiples fonctions dans le développement et la physiologie de ces organismes. A l'échelle de la plante, et grâce aux réseaux conducteurs, l'eau assure des corrélations fonctionnelles trophiques et hormonales entre les différents organes de la plante. Au niveau cellulaire, l'eau revêt d'une importance capitale dans le métabolisme cellulaire, soit en participant directement, en tant que substrat, à certaines réactions d'hydrolyse ou d'oxydation (photolyse de la photosynthèse), soit en rendant possible les réactions biochimiques. De plus, en coopération avec la paroi, l'eau participe à la rigidité et à la forme de la cellule. L'eau est également le moteur des mouvements cellulaires grâce au phénomène de turgescence qu'elle assure.
Dans les milieux émergés, la disponibilité en eau reste le facteur le plus limitant de la production (Lange *et al*, 1982) et la gestion des ressources d'eau devient alors un des principaux défit de l'humanité, notamment dans un contexte de changement climatique.

2- Fonctionnement hydraulique des plantes

La plante est un organisme sessile qui doit continuellement s'adapter et intégrer les contraintes environnementales dans son programme de développement et de croissance. Une des contraintes auxquelles les plantes sont de plus en plus confrontées est le déficit hydrique.
En milieu sec, les végétaux doivent faire face à des phénomènes d'évaporation intense, qui peuvent conduire, dans certains cas, à un déficit hydrique de la plante. Ce dysfonctionnement de l'équilibre hydrique de la plante peut affecter des processus clés de la physiologie de la plante tels que l'élongation cellulaire, la biosynthèse des protéines, la photosynthèse… En revanche, en conditions hydriques favorables, la quantité d'eau libérée dans l'atmosphère par le système aérien est facilement remplacée par l'eau prélevée du sol via le système racinaire. Ceci implique que le statut hydrique des plantes est un paramètre fondamental du fonctionnement de la plante. Pour accéder à sa stabilité, des stratégies anatomiques,

structurelles et physiologiques ont été élaborées, en rapport avec les conditions environnementales auxquelles les plantes sont exposées.

3- Bases physiques du transport d'eau chez les végétaux

La caractérisation du statut hydrique des plantes requiert la possibilité de quantifier l'état d'énergie de la molécule d'eau, qui est définit par son énergie libre. Il est communément utilisé la notion de potentiel hydrique qui correspond à l'énergie libre de l'eau rapportée au volume molaire de l'eau. Le potentiel hydrique est exprimé en MPa et est défini par rapport à une solution d'eau pure dans les mêmes conditions de température et de pression atmosphérique, dont le potentiel est par convention égale à zéro. Cela signifie que le potentiel hydrique est toujours inférieur ou égale à zéro. Dans une cellule végétale, la valeur du potentiel hydrique est déterminée par deux principales composantes opposées : le potentiel de turgescence qui représente la pression mécanique exercée par la paroi végétale sur les molécules d'eau et dont l'intensité dépend de l'état de turgescence de la cellule. Généralement, cette pression va contrer l'entrée d'eau dans la cellule. La seconde composante est le potentiel osmotique qui correspond à la force d'attraction exercée par les solutés osmotiquement actifs de la cellule (la vacuole) sur les molécules d'eau. Dans ce système d'étude (la cellule végétale),

$$\Delta\Psi = \Psi p + \Psi o$$

Les mouvements d'eau entre deux compartiments sont régis par la différence de leur potentiel hydrique et s'effectue toujours dans le sens du gradient décroissant de potentiels hydriques. De ce fait, $\Delta\Psi$ représente la force motrice du flux volumique d'eau (Jv). Ces deux paramètres sont reliés par la formule chimique suivante :

$$Jv = Lp.S.\ \Delta\Psi$$

Lp et S représentent la conductance hydraulique du système étudié. S correspond à la surface d'échange entre les deux compartiments et Lp à la conductivité hydraulique (la perméabilité) de la même surface. A partir de ces deux équations ci-dessus, le flux d'eau à travers une barrière (membrane ou autre) peut être défini comme suit :

$$Jv = Lp.S.\ (\Delta p - \sigma\Delta\pi)$$

Δp : correspond au gradient de pression hydrostatique de part et d'autre de la barrière

$\Delta\pi$: représente le gradient de pression osmotique de part et d'autre de la barrière

σ: désigne les caractéristiques de perméabilité de la barrière aux différentes molécules du milieu. Pour une molécule donnée, σ = 1 quand la membrane lui est imperméable alors σ = 0 quand la molécule traverse facilement la membrane.

Dans des systèmes plus complexes, le potentiel hydrique dépend d'autres composantes telles que le potentiel matriciel et le potentiel gravitationnel. Le potentiel matriciel est une composante importante de la graine, où la teneur en eau est faible. Le potentiel gravitationnel est négligeable chez les plantes herbacées mais importantes pour les plantes ligneuses dont l'hauteur dépasse 10 m. Ces données physiques indiquent que le transport d'eau au sein d'un système (cellule, tissu ou plante) est un processus complexe, intégrant plusieurs composantes dépendantes du système étudié.

4- Le concept continuum sol-plante-atmosphère

A l'opposée des animaux, les végétaux présentent un système de circulation d'eau ouvert, dont la force motrice dépend du gradient du potentiel hydrique entre la chambre sous stomatique et l'atmosphère.

$$E = C1wv - C\,atm$$

C1wv : concentration de la vapeur d'eau dans la chambre sous stomatique

Catm : concentration de la vapeur d'eau atmosphérique (à l'extérieur de la feuille)

Le potentiel hydrique de la feuille varie en général entre 0 et -5 MPa (le milieu sec), alors que celui de l'atmosphère est de l'ordre de -50 MPa à une humidité relative de l'air (HR) de 70 % et peut atteindre une valeur de -94 MPa à HR de 50%. Au contraire, le gradient de Ψ entre le sol et la partie aérienne est faible. Cela signifie que l'émission de la vapeur d'eau dans l'atmosphère détermine le flux d'eau au sein de la plante. Ce processus a lieu au niveau des stomates et est très finement régulé pour optimiser la diffusion de carbone dans la plante (la photosynthèse) tout en réduisant la perte en eau.

Chez les plantes vasculaires, l'eau absorbée par les racines ne fait que traverser le végétal au travers d'un système vasculaire très élaboré pour s'évaporer au niveau des stomates de feuilles. Plusieurs auteurs ont essayé d'expliquer le mécanisme de l'ascension de la sève dans les arbres, la seule explication qui s'est imposée est la *théorie de la tension-cohésion* qui a été proposée dès 1894 (Dixon et Joly, 1894). Selon cette théorie, il existe une continuité hydraulique à travers toute la plante depuis les particules du sol jusqu'aux cellules foliaires, la

force motrice qui est à l'origine du transfert d'eau à travers cette continuité, est générée par la courbure des ménisques air-eau qui se forment au niveau des surfaces d'évaporation dans la feuille. Cette courbure met l'eau sous des pressions inférieures à la pression atmosphérique. Des gradients de tensions s'établissent depuis la surface de ces ménisques jusqu'à l'eau du sol qui est par conséquent tirée par le haut (Cruiziat *et al*, 2001).

5- Voies de circulation de l'eau

Pour circuler dans les tissus vasculaires, l'eau doit passer à travers les cellules vivantes. Deux voies de circulation sont possibles : une voie apoplasmique qui se fait à travers la paroi cellulaire et une voie cellule- à cellule, qui se fait à travers les plasmodesmes (voie symplasmique) ou à travers la membrane plasmique (voie transcellulaire) (Chrispeels et Maurel, 1994 ; Maurel et Chrispeels, 2001) (Fig. 1). La voie préférentielle de la circulation de l'eau varie selon l'espèce, l'organe, l'état physiologique de la plante ainsi que la force exercée (hydrostatique ou osmotique) (Chrispeels et Maurel, 1994). Dans les racines de maïs et de coton, la voie apoplasmique serait dominante, par contre chez l'orge et l'haricot, l'eau circulerait selon la voie cellule-à-cellule (Steudle, 1992).

Durant les dernières décennies, plusieurs recherches ont étudié les principales voies de circulation de l'eau dans les feuilles (Boyer, 1985 ; Davies, 1986). Entrant par le pétiole, l'eau emprunte les faisceaux vasculaires de la nervure principale (Esau, 1965 ; Larson, 1984) ensuite passe soit vers les nervures secondaires soit vers les trachéides du mésophylle (Altus *et al*, 1985 ; Canny, 1990). En condition de transpiration, la nervure principale et les nervures secondaires agissent en série (Sack *et al*, 2003 ; Yang et Tyree, 1994). Il a été proposé que la nature de la voie de circulation d'eau dans la feuille dépende de flux de transpiration. Ainsi, en cas de forte transpiration, l'eau circule à travers la voie apoplasmique car c'est une voie à faible résistance hydraulique, par contre en absence de transpiration la grande proportion de l'eau suit la voie cellule-à cellule qui possède une plus grande résistance hydraulique et fait intervenir les canaux à eau : les aquaporines (Morillon et Chrispeels, 2001).

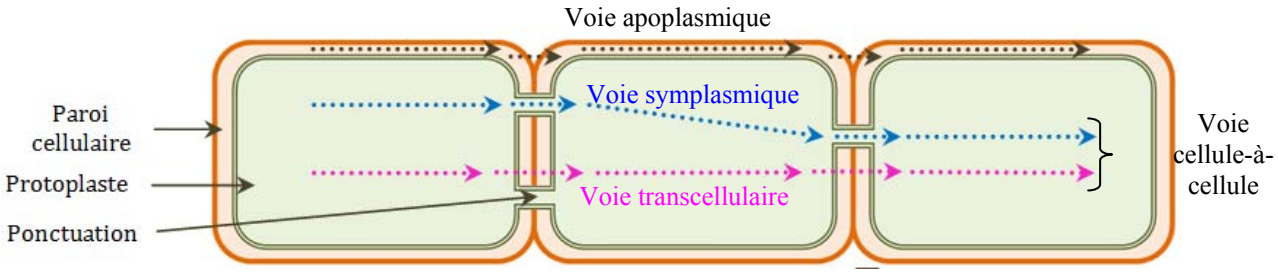


Figure 1 : Les voies de circulation de l'eau dans les cellules : la voie apoplasmique, la voie symplasmique et la voie transcellulaire.

6- Description du modèle végétal : le noyer (*Juglans regia*)

Règne : Plantae

Famille : Juglandaceae

Genre : Juglans

Le noyer commun, ou noyer royal *(Juglans regia)*, est un arbre originaire de le l'Europe orientale et de l'Asie tempérée, cultivé pour son bois et ses fruits riches en huile. Le tronc des noyers solitaires est souvent court, ne dépassant pas 3m, par contre, il peut atteindre 10m à l'intérieur d'un peuplement. L'écorce de l'arbre est de couleur gris clair qui noircit et se fissure au fil des années. Les feuilles sont caduques, alternes, pétiolées, composées de 5 à 9 folioles aromatiques. Le noyer est monoïque, les fleurs mâles en chatons sont de forme conique, allongés et pendants, ils éclosent entre avril et juin. Les fleurs femelles sont généralement disposées par paires à l'extrémité des rameaux et apparaissent environ quatre semaines après les fleurs mâles. Le fruit monosperme est une drupe contenant une coquille à l'intérieur de laquelle se trouve une amande réticulée (Fig. 2).

Du point de vue des besoins en lumière, le noyer est considéré comme essence de lumière. A une certaine tolérance à l'ombrage dans le jeune âge répond une forte exigence en lumière à l'âge adulte. L'éclairement latéral entraine la déformation des troncs en direction de la lumière (phototropisme prononcé). (Becquey, 1997 ; Hecker, 1985 ; Pretzsch, 1995, Zeitlinger, 1992).

Figure 2 : Chatons mâles (en bas) et fleurs femelles (en haut) d'une pousse de noyer (*Juglans regia*)

-II - ARCHITECTURE HYDRAULIQUE DE LA PLANTE

Le concept de l'architecture hydraulique chez les plantes a été énoncé pour la première fois par Zimmermann (1978) qui voulait souligner par ce terme l'importance physiologique du partage des conductances hydrauliques (K) dans une plante. La conductance hydraulique (k_h, mol s^{-1} MPa^{-1}) peut se définir comme étant la différence de pression (ΔP, MPa) entre les deux extrémités d'un segment divisé par le flux d'eau (Q, mol s^{-1}) que traverse le segment (Martre, 1999) :

$$k_h = Q / \Delta P$$

La conductivité hydraulique (K_h) est égale à k_h multipliée par la longueur du segment (Δx, m) (Martre, 1999) :

$$K_h = k_h . \Delta x = Q . \Delta x / \Delta P$$

La conductivité hydraulique peut se mesurer sur des segments de tiges, de racines ou de feuilles excisées. La mesure est réalisée en faisant circuler de l'eau dans un segment sous une différence de pression hydrostatique connue et en mesurant le flux qui sort et qui entre dans le segment (Sperry *et al*, 1988).

Le partage des conductances hydrauliques au niveau de la plante varie non seulement au cours du développement de la plante mais aussi au cours d'une même journée (Lo Gullo *et al*, 2004). Zimmermann (1983) a aussi émis le principe de la segmentation au niveau de la plante selon lequel des barrières hydrauliques peuvent exister entre les différentes parties de la plante comme l'insertion foliaire ou les régions nodales (Larson et Isebrands, 1978 ; Salleo *et al*, 2001 ; Lo Gullo *et al*, 1995).

1- La conductivité hydraulique racinaire

La racine est l'organe spécialisé dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux à partir de la solution du sol (Steudle, 2001) et joue donc un rôle essentiel dans le maintien de la balance hydrique et le continuum sol-plante-atmosphère. Elles contribuent jusqu'à 50% dans la résistance hydraulique de toute la plante (Martre *et al*, 2001). La racine possède une grande plasticité de régulation de ces propriétés hydrauliques, qui dépend de l'espèce et les facteurs externes (Brouwer, 1954; Weatherley, 1982; Kramer et Boyer, 1995). En réponse à ces facteurs environnementaux, la plante réagit en ajustant la conductivité hydraulique

racinaire (Javot et Maurel, 2002), voire en modifiant l'anatomie et la croissance de ses racines (Steudle et Peterson, 1998; Steudle, 2000a). Par exemple, la croissance racinaire est favorisée dans les zones du sol les plus riches en eau (Kobayashi, 2007) ou en éléments minéraux (Obara *et al*, 2010). Pour atteindre les faisceaux du xylème, l'eau peut emprunter trois voies de circulation : la voie apoplasmique, la voie symplasmique ou la voie transcellulaire ; (Steudle, 2000a ; 2000b). Les deux dernières formant la voie cellule-à-cellule sont difficiles à dissocier expérimentalement (Steudle, 2000b).

La contribution des aquaprines dans le contrôle du transport de l'eau via la voie cellule-à-cellule a été largement documentée. Les études pharmacologiques conduites sur la racine ont montré que la voie dépendante des aquaporines, marquée par sa sensibilité au chlorure de mercure, assure jusqu'à 85% du transport d'eau (Tazawa *et al*, 1997 ; Carvajal *et al*, 1999 ; Amodeo *et al*, 1999 ; Barrowclough *et al*, 2000). Ceci a été noté chez *Populus tremuloides* (Wan et Zwiazek, 1999), *Lotus japonicum* (Clarkson *et al*, 2000), *Capsicum annuum* (Martínez-Ballesta *et al*, 2003), *Pisum sativum* (Beaudette *et al*, 2007), *Triticum aestivum, Lupinus angustifolius et Lupinus luteus* (Bramley *et al*, 2009). L'implication des aquaporines du type PIPs dans le contrôle de la conductance hydraulique racinaire a été bien démontré (Javot et Maurel, 2002 ; Tyerman *et al*, 2002), au moyen de plantes transgéniques. Une sous-expression des aquaporines PIP1s chez *Arabidopsis thanliana* (Kaldenhoff *et al*, 1998) ainsi que chez le tabac (Siefritz *et al*, 2002) ou de PIP2 (Javot *et al*, 2003) provoque une baisse de la conductance hydraulique racinaire.

La conductivité hydraulique racinaire est une variable dynamique et sous le contrôle de plusieurs facteurs environnementaux. Elle est inhibée par les conditions d'anoxie, qui s'accompagnent d'une baisse du pH cytoplasmique provoquant ainsi une inhibition des aquaporines chez *Arabidopsis thaliana* (Tournaire-Roux *et al*, 2003) ainsi que *Beta vulgaris* (Alleva *et al*, 2006). Elle diminue également en réponse au stress hydrique (North et Nobel, 1991 ; 1996). Cette diminution est accompagnée par une réduction des aquaporines (North *et al*, 2004 ; Secchi *et al*, 2007 ; Vandeleur *et al*, 2009). Il a été reporté que la conductance hydraulique racinaire suit le cycle journalier et que cette régulation journalière serait corrélée avec l'expression des aquaporines chez un nombre d'espèces comme : *Lotus japonicus* (Henzler *et al*, 1999 ; Clarkson *et al*, 2000), *Quercus fusiformis* et *Bumelia lanuginosa.* (McElrone *et al*, 2007), *Pisum sativum* (Beaudette *et al*, 2007) et *Vitis vinifera* (Vandeleur *et al*, 2009). D'autres travaux étayent l'idée de la sensibilité de la conductance hydraulique racinaire au manque à certains minéraux comme le nitrate, le phosphate et le sulfate, fait

intervenir les aquaporines : l'information nutritionnelle serait traduite en une réponse hydraulique (Clarkson *et al*, 2000).

2- La conductivité hydraulique xylémienne

L'eau qui circule dans le xylème est appelée sève brute, c'est une solution d'éléments minéraux très diluée dont le transport s'effectue grâce à une structure particulière traversant toute la plante : l'appareil vasculaire ou conducteur qui est formé de cellules mortes rigides dont le diamètre varie entre 100 et 500 µm. Le passage d'un élément conducteur à un autre s'effectue à travers les ponctuations qui sont de l'ordre de quelques centaines de nanomètres (Cruiziat *et al*, 2001). La pression osmotique de la sève brute est généralement inférieure à 0,1 MPa et parfois négative (Jones, 1992). La sève brute est généralement sous tension, elle circule en réponse à la différence de potentiel hydrique entre les tissues de la feuille et l'atmosphère (Cruiziat *et al*, 2001).

Etant donné que le xylème est constitué de cellules mortes, sa conductance hydraulique est contrôlée essentiellement par des processus purement physiques tels que les dimensions des vaisseaux, la structure des parois (Sperry *et al*, 2005). La conductance hydraulique xylémienne peut être perturbée par la création de la cavitation (Salleo *et al*, 2001). Ce phénomène est accentué part le fait que la sève qui circule dans les vaisseaux du xylème soit sous tension. Cet état de tension est physiquement instable et peut conduire au passage à la phase gazeuse qui est plus stable. Des bulles d'air et de vapeur d'eau chassent la phase liquide et peuvent envahir tout le vaisseau où il n'y aura aucun flux. Le vaisseau est dit alors cavité ou embolisé. (Tyree et Sperry, 1989 ; Cruiziat *et al*, 2001). La cavitation se produit particulièrement en cas de sécheresse du sol (Vilagrosa *et al*, 2003, Ennajeh *et al*, 2008 ; Cochard *et al*, 2009). D'autres événements, comme le changement de la viscosité et la température de l'eau (Cochard *et al*, 2000), ou de la composition chimique de la sève (Zwieniecki *et al*, 2001) peuvent également affecter le transport d'eau dans les vaisseaux xylémiens.

Néanmoins, les aquaporines jouent un rôle important dans le transport latéral de l'eau entre les cellules de parenchymes et les vaisseaux de xylème. Chez le noyer, il a été démontré que les aquaporines du type PIP2 interviennent pour restaurer la conductivité hydraulique du xylème dans les vaisseaux embolisés suite au cycle gel dégel chez le noyer *(Juglans regia)* (Sakr *et al*, 2003). Chez l'hypocotyle de ricin, une accumulation des membres d'aquaporines du type TIP et PIP a été rapporté dans la zone d'élongation (Eisenbarth et Weig, 2005).

L'implication des aquaporines a été également démontrée dans la stimulation par l'éthylène de la production de latex dans les cellules laticifères chez *Hevea brasiliensis*. Cette stimulation serait liée à des flux d'eau entre les cellules laticifères et les cellules de phloème adjacentes via des aquaporines du type PIP2. Cette hypothèse est basée sur des observations corrélatives entre la production de latex, l'accumulation préférentielle des transcrits et de protéines des aquaporines PIP2 dans les cellules laticifères suite à un traitement par l'éthylène. De plus, la validation de leur capacité à transporter l'eau a été validée dans des ovocytes de Xénope (Tungngoen *et al*, 2009).

3- La conductivité hydraulique foliaire (K_F) : composante majeure du système hydraulique de la plante

La feuille est considérée comme « un bouchon » du système hydraulique de toute la plante (Nardini et Salleo, 2000 ; Brodribb *et al*, 2003 ; Sack *et al*, 2003 ; Sack et Tyree, 2005).

La conductance hydraulique foliaire K_F (K_F , kg s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}) (Tyree *et al*, 1999 ; Nardini, 2001) ou (K_F , mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}) (Sack et Holbrook, 2006), peut se définir comme étant le taux du flux d'eau traversant le feuille (depuis le pétiole et les nervures traversant les tissus vivants de la feuille jusqu'aux sites d'évaporation) par unité de surface foliaire divisé par la pression exercé par ce flux (Tyree *et al*, 2005 ; Sack et Holbrook, 2006).

La résistance hydraulique foliaire $R_F = 1/K_F$ (Cochard *et al*, 2007 ; Sack et Holbrook, 2006) représente 60-80% de la résistance hydraulique de la partie aérienne de la plante qui représente 50% de celle de toute la plante (Yang et Tyree, 1994 ; Nardini et Tyree, 1999 ; Nardini et Salleo, 2000 ; Tsuda et Tyree, 2000).

La K_F varie linéairement avec la conductance hydraulique de toute la plante K_P avec $K_p \approx 4 \times K_F$; la résistance hydraulique foliaire représente alors le ¼ de la résistance de toute la plante (Sack *et al*, 2003). Dans certains cas, tels la prévention de la cavitation (Nardini et Salleo, 2000) ou l'adaptation saisonnière (Brodribb *et al*, 2002), la feuille peut contribuer jusqu'à 80 à 98% à la résistance hydraulique de toute la plante.

Comme les résistances sont additives en série, la résistance hydraulique foliaire R_F est une composante majeure de la résistance hydraulique de toute la plante (Sack et Holbrook, 2006).

12% de la résistance hydraulique foliaire est localisée dans le pétiole, 25% dans les nervures principales, 25% dans les nervures secondaires et 39% dans les voies extra-xylèmiennes (à travers ou autour des cellules du mésophylle ou bien à travers les tissus vivants des faisceaux

vasculaires du xylème), de ce fait la résistance hydraulique foliaire est partagée entre ces différentes composantes (Sack *et al*, 2005).

3.1- Méthodes de mesure de la K_F

HPM (High pressure method), EFM (Evaporative flux method) et VPM (Vacuum pump method) sont des méthodes de mesure de la conductance hydraulique foliaire qui se réalisent respectivement en perfusant, évaporant ou aspirant l'eau en dehors de la feuille (Tyree *et al*, 2005).

La HPM (High pressure method) : C'est la technique la plus utilisée (Tyree *et al*, 2005). La conductance hydraulique foliaire est mesurée en perfusant des feuilles immergées avec de l'eau sous haute pression. Ceci sature les espaces intercellulaires des feuilles en eau y compris les chambres stomatiques (Cochard *et al*, 2007 ; Tyree *et al*, 2005).

La VPM (Vacuum pump method) : Cette mesure est réalisée en aspirant l'eau de la feuille à l'aide d'une pompe, le flux d'eau dans le pétiole est mesuré par une balance, la feuille étant maintenue à l'intérieur d'un flacon avec un papier humide (Tyree *et al*, 2005).

La EFM (Evaporative flux method) : Cette mesure est la plus rapide des trois, elle est réalisée en plaçant la feuille dans un environnement favorable à la transpiration, une source de lumière est suspendu au dessus de la feuille, le flux d'eau est mesuré grâce à une balance (Tyree *et al*, 2005).

La HPM (High pressure method) est sensible à la lumière, les valeurs de K_F sont plus faibles sous luminosité ambiante que lorsque les feuilles sont exposées à une forte luminosité, cette baisse de la K_F peut être expliquée par la fermeture des stomates. Par contre la VPM (Vacuum pump method) est insensible à la lumière (Tyree *et al*, 2005).

3.2- Dynamique de la K_F

A l'échelle temporelle, la conductance hydraulique foliaire est fortement dynamique. Elle varie selon les conditions environnementales et le stade de développement (Sack et Holbrook, 2006). La K_F maximale varie également selon les espèces entre 0.76 mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1} pour *Adiantum lunulatum* et 49 mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1} pour *Macaranga triloba*. Cette variation interspécifique serait due aux différences anatomiques du pétiole et des nervures aussi bien que les voies de circulation dans la feuille (Sack et Holbrook, 2006). Les caractéristiques structurales comme la densité, la taille, la géométrie des faisceaux vasculaires et leur arrangement dans les nervures sont très variables selon les espèces (Roth-Nebelsik *et al*, 2001) et semble jouer un rôle majeur dans la distribution de l'eau dans la feuille. Par

exemple, dans les feuilles de *Populus balsamifera*, Jeje (1985) a observé en utilisant des colorants fluorescents que la vitesse du flux d'eau varie selon l'insertion du pétiole. En général une plus grande vitesse du flux d'eau a été observée dans la partie basale de la nervure principale, cette vitesse diminue en s'éloignant de la base et en diminuant le nombre de nervures (Roth-Nebelsik *et al*, 2001)

Plusieurs auteurs ont essayé d'étudier les relations entre la K_F et l'architecture des nervures des feuilles (Aasamaa *et al*, 2005 ; Aasamaa *et al*, 2001 ; Nardini *et al*, 2005a ; Sack et Frole, 2006). Par exemple, une forte densité des nervures secondaires correspond à une conductivité hydraulique foliaire élevée (Cochard *et al*, 2004), par contre l'arrangement et la densité nervures principales ne changent pas la K_F (Sack et Frole, 2006).

Des variations temporelles ou spatiales de la résistance hydraulique foliaire affectent énormément les relations hydriques de toute la plante ainsi que sa croissance. Par exemple, au cours d'une même journée, les feuilles sont exposées à des différentes luminosités selon leur orientation et leur phyllotaxie : les feuilles exposées au soleil présentent une K_F supérieure à celle des feuilles à l'ombre (Sack *et al*, 2003). Aussi, chez certaines espèces de tournesol qui sont caractérisés par une dominance apicale, l'unique inflorescence est privilégiée en terme d'apport en eau et nutriment par rapport à la tige, la baisse progressive de la K_F provoque la fermeture progressive des stomates. La baisse de l'apport nutritionnel et la déshydratation des feuilles depuis la base, induisent la sénescence de ces dernières (Lo Gullo *et al*, 2004).

3.2.1- Dynamique de la K_F au cours du développement des feuilles

La K_F est dynamique aussi au cours de la vie des feuilles, elle augmente dans les feuilles en croissance (Aasamaa *et al*, 2005 ; Brodribb et Holbrook, 2005 ; Martre *et al*, 2000). Quelques semaines ou mois après avoir atteint son maximum, la K_F commence à diminuer jusqu'à 80-90% à l'abscission (Aasamaa *et al*, 2005 ; Brodribb et Holbrook, 2003 ; 2004a, Lo Gullo *et al*, 2005, Sack et Frole, 2006 ; Salleo *et al*, 2002). L'un des facteurs contribuant à cette baisse de K_F est l'embolie du xylème (Salleo *et al*, 2002 ; Tyree et Zimmermann, 2002). Une baisse de la K_F peut être liée également au vieillissement, lié à une chute de la concentration d'azote dans les feuilles, une diminution du potentiel osmotique foliaire et une réduction des échanges gazeux au niveau de la feuille (Kitajima *et al*, 2002 ; Reich, 1984). Certains auteurs suggèrent qu'une baisse saisonnière de la K_F signale l'installation de la sénescence foliaire (Brodribb et Holbrook, 2003 ; Salleo *et al*, 2002). Chez le tournesol, la K_F sera sous l'effet combiné de la lumière et l'âge des feuilles (Lo Gullo *et al*, 2004).

3.2.2- Dynamique journalière de la K_F

La K_F varie aussi à l'échelle de la journée (Goldstein *et al*, 1998), elle répond à la lumière incidente à l'échelle des minutes et des heures (Lo Gullo *et al*, 2005 ; Sack *et al*, 2002 ; Tyree *et al*, 2005). De plus K_F augmente à la température, par contre elle diminue quand les feuilles sont déshydratées sous de fortes températures (Sack et Holbrook, 2006). Des modèles contrastés de variation journalière de la K_F ont été observés : chez certaines espèces parmi lesquels le tournesol, la K_F augmente d'un facteur 2 à 3 fois durant la matinée, conjointement avec la luminosité et la température alors qu'elle diminue durant l'après midi (Lo Gullo *et al*, 2005 ; Tsuda et Tyree, 2000). Chez d'autres espèces, une diminution de 30 à 50% de la K_F à midi a été observée (Brodribb et Holbrook, 2004a ; Nardini *et al*, 2003) probablement en réponse à une déshydratation des feuilles (Sack et Holbrook, 2006). D'autres espèces comme *Acer rubrum*, *Liriodendron tulipifera* et *Vitis labrusca* ne présentent pas de variation journalière de la K_F (Zwieniecki *et al*, 2000).

3.2.3- Dynamique selon les habitats écologiques

La K_F varie aussi selon les différents habitats écologiques des espèces (Sack *et al*, 2005). Pour certaines espèces, les plantes développées sous faible luminosité ont une K_F plus faible que celles développées sous forte luminosité (Engelbrecht *et al*, 2000). De même, les espèces développées dans des sites ouverts présentent une K_F qui est plus élevée que celles des espèces développées dans des sites ombragés (Brodribb et Holbrook, 2004b). Pour ces différentes composantes, seule la résistance du pétiole ne varie pas significativement entre les deux types d'éclairement (ombre et plein soleil), les résistances des nervures principales, secondaires, du xylème et des voies extra-xylémiennes varient linéairement avec R_f (Sack *et al*, 2005).

Au sein du même arbre, la K_F varie aussi selon l'orientation et la phyllotaxie : Chez certaines espèces, les feuilles ensoleillées présentent une conductance hydraulique plus élevée que celle des feuilles développées à l'ombre (Sack *et al*, 2003 ; Lo Gullo *et al*, 2004 ; Schultz et Matthews, 1993). Puisque les feuilles ensoleillées sont plus petites et plus épaisses que celles développées à l'ombre, K_F serait plutôt dépendante de son épaisseur (Sack *et al*, 2003).

La valeur de K_F exhibe une plasticité au cours du développement, elle est plus faible chez les plantes développées plusieurs mois sous faible luminosité (Engelbrecht *et al*, 2000), ou en déficit hydrique ou déficit nutritionnel (Aasamaa *et al*, 2005 ; Aasamaa et Sober, 2001 ; Aasamaa *et al*, 2001 ; Engelbrecht *et al*, 2000). Cette plasticité de la K_F se produit en parallèle à des phénomènes adaptatifs : les espèces adaptées à la lumière tendent à augmenter leur K_F

par rapport à celle des espèces adaptées à l'ombre (Sack *et al*, 2005 ; Nardini *et al*, 2005a). Ainsi la K_F joue un rôle important dans la détermination des préférences écologiques des espèces.

3.3- Bases moléculaires de la régulation de la K_F à la lumière

L'intensité de la conductance hydraulique foliaire comme celle de la racine varie non seulement en fonction de l'espèce (Tyree *et al*, 1998 ; Cosmstock, 2000 ; Brodribb *et al*, 2002) mais répond également à divers stimuli externes comme le stress hydrique (Nardini *et al*, 2003 ; Nardini et Salleo, 2005), la température (Cochard *et al*, 2007 ; Fredeen et Sage, 1999 ; Sack *et al*, 2004 ; Cochard *et al*, 2000) ainsi que les rythmes circadiens (Brodribb et Holbrook, 2004a ; Lo Gullo *et al*, 2005).

Bien que la résistance hydraulique foliaire soit contrôlée par le mouvement des stomates (Sack *et al*, 2004), un ensemble d'arguments corrélatifs soutiennent l'idée selon laquelle les aquaporines pourraient intervenir dans le contrôle de la K_F : i) la localisation des aquaporines dans les cellules du mésophylle, de l'épiderme et des faisceaux conducteurs (Robinson *et al,* 1996, Hachez *et al,*2008, Sakurai *et al,* 2008), ii) la corrélation entre l'accumulation des transcrits de deux aquaporines PIP2 et la stimulation de la K_F par la lumière dans les feuilles de noyer (Cochard *et al.* 2007); (iii) l'inhibition par $HgCl_2$ (inhibiteur des aquaporines) de la K_F (Aasamaa and Sõber 2005, Nardini *et al*, 2005b, Lovisolo et Schubert, 2006, Sellin *et al*, 2008, Voicu *et al*, 2008).

Concernant la réponse à la lumière, plusieurs études ont suggéré que l'effet de la lumière sur la K_F fait intervenir les aquaporines (Henzler *et al*, 1999 ; Tyree *et al*, 2005, Moshelion *et al*, 2002 ; Lopez *et al*, 2003, Voicu *et al*, 2008). Ces canaux paraissent suivre le rythme circadien. En effet chez le tournesol, la K_F augmente de 60% entre la nuit et le jour (Nardini *et al*, 2005b), par contre elle diminue de 20 à 75% quand les plantes sont maintenus à l'obscurité (Aasamaa et sober, 2001 ; Sober, 1997). Cette réponse au rythme circadien est inhibée par un traitement au chlorure de mercure $HgCl_2$ et rétablie par un traitement au β mercapto-éthanol, excluant un effet toxique de $HgCl_2$ (Nardini *et al*, 2005b). Parmi les aquaporines régulées par le rythme circadien on cite : γ-TIP (aquaporine du tonoplaste) chez *Arabidopsis Thaliana* (Hamer *et al*, 2000) et *SsAPQ2* chez *Samanea saman* qui contrôle les changements rythmiques du volume cellulaire (Moshelion *et al*, 2002).

Chez le noyer (*Jugalns regia*), il a été démontré que l'utilisation de fortes concentrations d'acide abscissique (un inhibiteur des stomates) n'affecte pas la stimulation de la K_F à la lumière excluant le rôle des stomates dans ce processus (Tyree *et al*, 2005). Plus récemment,

on a pu relier la stimulation de la K_F à la lumière à l'accroissement du taux d'aquaporine chez le noyer (Cochard *et al*, 2007). Cette étude a porté sur 2 isoformes d'aquaporines *JrPIP2.1* et *JrPIP2.2* qui sont préalablement isolés du parenchyme xylémien du rameau d'un an de noyer (Sakr *et al*, 2003). A l'obscurité, la valeur de K_F est faible et constante par contre elle augmente fortement à la lumière, parallèlement à la stimulation des transcrits de 2 aquaporines *JrPIP2*.

Selon la même étude, la stimulation de la transcription des 2 *JrPIP2* est inhibée par un traitement à la cycloheximide (CHX : un inhibiteur de la traduction) dans les feuilles ce qui prouve que cette stimulation par la lumière se fait par une biosynthèse *de novo* des aquaporines (Cochard *et al*, 2007). Le même effet inhibiteur de la cycloheximide a été rapporté chez les cellules de *Samanea saman* (Moshelion *et al*, 2002) et dans les racines de *Populus tremula* (Voicu et Zwiazek, 2004). Le rôle exact de la cyclohéximide n'est pas bien établi et plusieurs hypothèses restent ouvertes. La cycloheximide agirait au niveau transcriptionnel en provoquant une instabilité des transcrits d'aquaporines mais aussi au niveau protéique en inhibant la traduction des aquaporines, en altérant l'assemblage des composants essentiels des aquaporines et/ou de leur activité (Bogre *et al*, 1997 ; Mitsui *et al*, 1999 ; Seiberer *et al*, 2000).

-III- LES AQUAPORINES

1-Historique et phylogénie

Le passage de l'eau à travers les membranes biologiques a été longtemps considéré comme étant le résultat d'une simple diffusion des molécules d'eau à travers la bicouche lipidique. Plus tard, une évidence s'est imposée, selon laquelle le mouvement d'eau à travers les cellules vivantes se fasse par un flux à travers des pores dans la membrane (Sidel et Solomon, 1957). Plusieurs études menées sur les animaux et les végétaux ont supporté cette idée (Preston *et al*, 1992 ; Fushimi *et al*, 1993 ; Maurel *et al*, 1993). Ces pores ont été appelés les « aquaporines » (Agre *et al*, 1993).

Les aquaporines sont des canaux protéiques qui facilitent la diffusion de l'eau à travers les membranes cellulaires. Elles appartiennent à une large famille de canaux protéiques membranaires appelée MIP (Major Intrinsic Protein) (Reizer *et al*, 1993 ; Chrispeels et Maurel, 1994 ; Agre *et al*, 1998). Les aquaporines ont été identifiées chez presque tous les organismes vivants (Maurel et Chrispeels, 2001). Dans les cellules animales, les aquaporines ont été découvertes dans les membranes plasmiques de cellules spécifiques où le passage de l'eau joue un rôle important comme celles des tubules du rein (Fushimi *et al*, 1993) et des globules rouges (Preston *et al*, 1992). Chez les végétaux, les aquaporines ont été identifiées dans le tonoplaste (Höfte *et al*, 1992), dans la membrane plasmique (Kammerloher et Schäffner, 1993), mais également dans les nodules fixateurs d'azote (Johansson *et al*, 2000 ; Schäffner, 1998) et le réticulum endoplasmique (Johanson et Gustavsson, 2002 ; Ishikawa *et al*, 2005).

Jusqu'à présent, 35 gènes d'aquaporines ont été identifiés chez l'arabette des dames *(Arabidopsis thaliana)* (Johanson *et al*, 2001 ; Quigley *et al*, 2002), 36 chez le mais *(Zea mais)* (Chaumont *et al*, 2001) et 28 chez la vigne *(Vitis vinifera)* (Fouquet *et al*, 2008).

En se basant sur leur homologie de séquence, les aquaporines peuvent être classées en 4 sous-familles (Maurel, 2007 ; Maurel *et al*, 2008):

Sous-familles		Localisation	Homologues chez *Arabidopsis*	Littérature
TIPs	tonoplast intrinsic proteins	tonoplaste.	10	Höfte *et al*, 1992
PIPs	plasma membrane intrinsic proteins	membrane plasmique	13	Kammerloher et Schäffner, 1993
NIPs	Nodulin 26-like intrinsic membrane proteins	membrane péribactérienne des nodules fixateurs d'N_2 mais aussi chez des espèces non légumineuses	9	Johansson *et al*, 2000 ; Schäffner, 1998 ; Wallace *et al*, 2006
SIPs	Small basic intrinsic proteins	réticulum endoplasmique	3	Johanson et Gustavsson, 2002 ; Ishikawa *et al*, 2005

2- Structure moléculaire et mécanisme de transport

Les aquaporines sont des protéines hydrophobes de poids moléculaire compris entre 23 et 31 kDa (Maurel *et al*, 2008). La caractérisation de leur structure moléculaire a permis de montrer qu'elles sont organisées en tétramère. Chaque monomère délimite un canal central individuel. (Daniels *et al*, 1999 ; Fotiadis *et al*, 2001 ; Kukulski *et al*, 2005 ; Tornroth-Horsefield *et al*, 2006). La chaîne polypeptidique de chaque monomère traverse la membrane six fois et présente les extrémités aminique (NH_2) et carboxylique (COOH) du côté de cytoplasme (Chrispeels et Maurel, 1994). On a ainsi une structure typique avec six domaines transmembranaires en hélice α formant 5 boucles (boucle A à boucle E) exposées à la face interne de la membrane (boucle B et D) ou à la face externe de la membrane (boucle A, C et E) (Maurel, 2007 ; Maurel *et al*, 2008).

Les aquaporines présentent une structure typique en sablier avec une symétrie centrale. Selon ce modèle, les boucles B et E, qui présentent un motif hautement conservé Asn-Pro-Ala (NPA), se replient dans la membrane formant ainsi un $7^{ème}$ domaine transmembranaire constituant l'étranglement du sablier dans lequel les motifs NPA interagissent pour former avec les autres domaines transmembranaires le pore de l'aquaporine (Maurel, 2007) (Figs. 3 et 4).

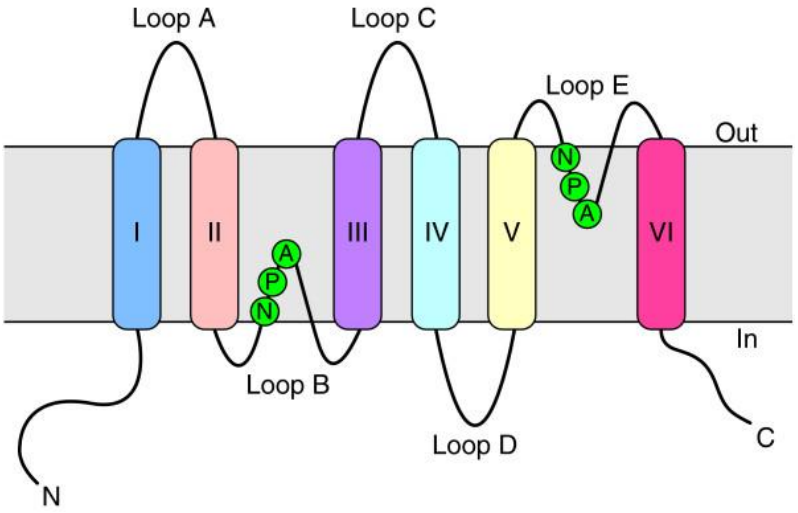


Figure 3 : Topologie d'une aquaporine à travers la membrane. Les 6 domaines transmembranaires (I-VI) sont reliés par 5 boucles (A-E), les boucles B et E contiennent des motifs conserves NPA (Kruse *et al*, 2006)

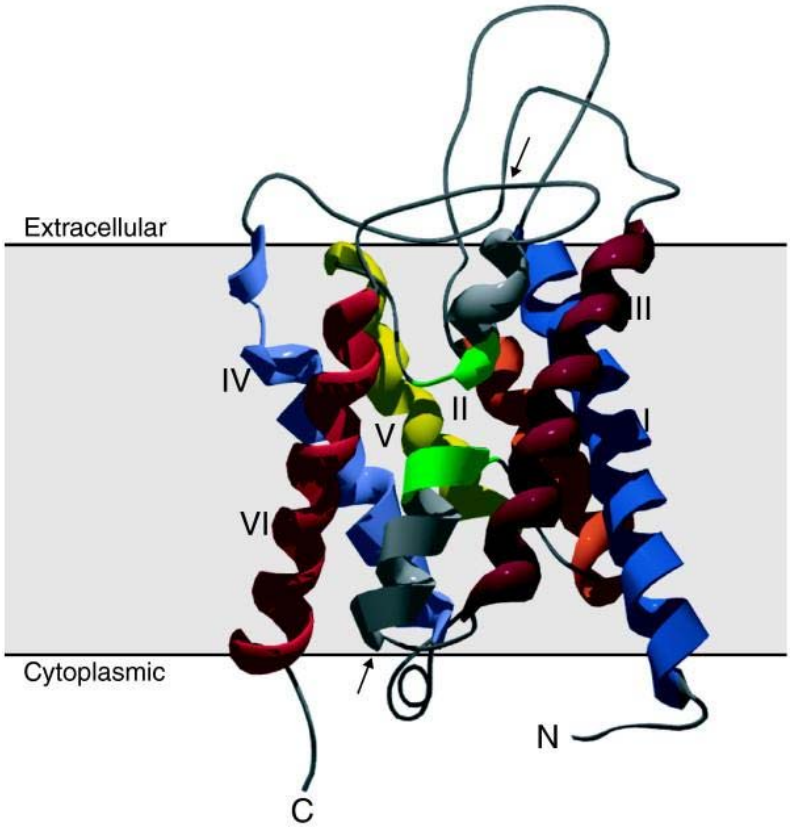


Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'un monomère d'aquaporine de tabac (*NtAQP1*) montrant les 6 domaines transmembranaires (I-VI), les deux domaines formant le pore (flèches) et les motifs NPA (en vert). La figure a été obtenue grâce au programme MODELLER7v7 et Swiss-Pdb Viewer. (Kruse *et al*, 2006).

Le transport des molécules d'eau se fait en file unique à travers le centre du pore, toute molécule plus grosse est exclue. La sélectivité du pore vis-à-vis de l'eau se fait au niveau de deux zones de constriction du pore : les résidus aromatiques/ Arg (R/Ar) et le motif NPA (Fig. 4). Au niveau d'une de ces constrictions, la file des molécules d'eau traversant le pore est rompue empêchant ainsi le passage des protons (Maurel *et al*, 2008).

3- Mécanismes de régulation

La régulation des aquaporines est complexe et peut s'exercer à des niveaux multiples selon le type d'organe, le tissu (Sakurai *et al*, 2005), le stade de développement ainsi que les stimuli externes que peut subir la plante (Luu et Maurel, 2005 ; Hachez *et al*, 2006).

Contrairement à d'autres protéines membranaires, les aquaporines font l'objet de plusieurs types de régulation post-traductionnelles. Les mécanismes les plus étudiés sont :

3.1-Phosphorylation

C'est le premier mécanisme connu pour réguler directement l'activité des aquaporines (Weaver et Roberts, 1991, 1992; Johnson et Chrispeels, 1992; Miao *et al*, 1992). Plusieurs études ont démontré la phosphorylation *in vivo* et *in vitro* des résidus sérine au niveau des terminaisons aminique (N-terminal) et carboxylique (C-terminal) de plusieurs aquaporines : *Pv* TIP3;1 (Ser 7), *Gm* NOD 26 (Ser 262), *So* PIP2 ;1 (Ser 274 et Ser 277) (Maurel *et al*, 1995 ; Guenther *et al*, 2003 ; Johansson *et al*, 1998). Une séquence consensus de phosphorylation a été identifiée dans la boucle B de plusieurs PIPs (Tornroth-Horsefield *et al*, 2006 ; Johansson *et al*, 1998). Cette séquence (Arg/Xaa-Lys-Xaa-Ser-Xaa-Xaa-Arg) est reconnue par plusieurs protéines kinases y compris les protéines kinases ca^{2+}-dépendante (CDPK) (Chaumont *et al*, 2005). Récemment, la résolution de la structure tridimentionelle de l'état phosphorylé et déphosphorylé a permis de mieux comprendre le mécanisme de phosphorylation de *SoPIP2;1* de l'épinard. (Törnroth-Horsefield *et al*, 2006). Dans la structure déphosphorylée (pore fermé), la boucle D obstrue le pore depuis le cytoplasme, alors que dans la structure phosphorylée (pore ouvert), la boucle D est déplacée de façon à permettre l'entrée de l'eau. Par ailleurs, plusieurs études ont établit la caractérisation de protéines kinases et phosphatases impliquées dans la phosphorylation de différentes PIP (Azad *et al*, 2004 ; Sjövall-Larsen *et al*, 2006).

De plus, la phosphorylation des aquaporines est dépendante du stade de développement et des stimuli externes. Ce processus a été rapporté lors de l'imbibition de la

graine d'haricot (Johnson et Chrispeels, 1992), du développement symbiotique et du stress osmotique des graines de soja (*Glycine max* L.) (Guenther *et al*, 2003), de la floraison chez la tulipe (*Tulipa gesneriana* L.) (Azad *et al*, 2004 ; Katsuhara *et al*, 2008), le stress oxydatif chez le mais (Aroca *et al*, 2005). Ceci prouve l'importance de la phosphorylation des aquaporines dans le développement et l'adaptation au stress.

3.2- Hétéromérisation

Les aquaporines sont organisées en tétramères, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Chaumont *et al*, 2005). Des études ont montré que certaines aquaporines forment des homotétramères stables (Fu *et al*, 2000; Murata *et al*, 2000; Fotiadis *et al*, 2001). Néanmoins, d'autres isoformes d'aquaporines peuvent former des hétérotétramères, comme c'est le cas de deux isoformes TIP de la graine de lentille *(Lens culinaris)* (Harvengt *et al*, 2000). De même chez *Mimosa pudica* où une interaction directe entre isoformes PIP1 et PIP2 a été observée (Temmei *et al*, 2005). Des observations similaires ont été faites chez le mais où une interaction entre PIP1 et PIP2 a été étudiée *in vivo* (Zelazny *et al*, 2007). La co-expression de *Zm*PIP1;2 et les différentes *Zm*PIP2 dans les ovocytes de Xénope montre une activité importante comparée à celle de PIP1 ou PIP2 seules (Fetter *et al*, 2004). Il a été suggéré que la boucle E jouerait un rôle important dans la formation des hétérotétramères chez les aquaporines PIP (Chaumont *et al*, 2005 ; Fetter *et al*, 2004). Cette hétéromérisation serait à l'origine d'un accroissement de flux d'eau à travers la membrane, sans pour autant que la quantité d'aquaporines soit augmentée.

3.3-Glycosylation

La glycosylation est importante pour l'adressage des protéines depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Elle a été observée chez AQP1 et AQP2 (aquaporines 1 et 2 du canal collecteur chez mammifères) (Smith *et al*, 1994 ; Hendricks *et al*, 2004). La glycosylation d'AQP2 serait responsable de la tétramérisation d'AQP2 ainsi que sa sortie de l'appareil de Golgi et sa distribution membranaire (Hendricks *et al*, 2004). Chez les végétaux, ce type de régulation a été observée chez GmNOD 26 (Glycine max.) et chez certaines TIP de Mesembryanthemum crystallinum (Miao *et al*, 1992 ; Vera-Estrella *et al*, 2004).

3.4- Méthylation

La méthylation peut réguler différents processus comme les interactions protéines-protéines et protéines–acides nucléiques, remodelage de la chromatine et signalisation cellulaire (Aletta *et al*, 1998 ; McBride et Silver, 2001). Les aquaporines sont les premières protéines végétales connues pour être régulées par méthylation. Ce mécanisme de régulation a été observé chez *Arabidopsis thaliana* (Santoni *et al*, 2006). Selon cette étude, l'isoforme *AtPIP2;1* montre une mono ou di-méthylation des résidus Glu6 et Lys3 respectivement. La méthylation du résidu lysine a été observée dans la régulation de plusieurs protéines comme l'ATP synthase mitochondriale bovine (Chen R *et al*, 2004), le cytochrome C (Kluck *et al*, 2000) et un canal Na^+ de l'épithélium des cellules du canal collecteur de la souris (Edinger *et al*, 2006). Toutefois, ce type de régulation est très peu documenté et son rôle reste ambigu chez les eucaryotes (Chen R *et al*, 2004).

3.5- pH et cations bivalents

L'effet inhibiteur d'un pH cytosolique acide sur l'activité des aquaporines a été observé dans les racines d'*Arabidopsis* en réponse à une anoxie causée par une inondation du sol ou par irrigation (Tournaire-Roux *et al*, 2003). Ce type de stress induit une acidification du cytosol qui a pour conséquence une inhibition de l'activité des aquaporines. Dans un milieu acide, le résidu His^{197} localisé au niveau de la boucle cytosolique D fixe un proton et entraîne la fermeture de l'aquaporine *AtPIP2;2*. La substitution de His^{197} par un résidu alanine réduit l'effet de l'acidification (Tournaire-Roux *et al*, 2003).

De même, les cations bivalents ont un effet inhibiteur sur l'activité des aquaporines (Alleva *et al*, 2006 ; Gerbeau *et al*, 2002). Le mécanisme moléculaire a été élucidé grâce à la résolution de la structure atomique de *SoPIP2;1* dans l'état ouvert et fermé du pore (Tornroth-Horsefield *et al*, 2006). La fixation d'un cation bivalent fait interagir le résidu Asp^{28} avec le résidu Glu^{31} ce qui stabilise la boucle D à la conformation fermée du pore. La phosphorylation du résidu Ser^{115} de la boucle B perturbe ces interactions et ramène la boucle D à la conformation ouverte du pore (Maurel *et al*, 2008). D'autre part, la phosphorylation des aquaporines est préférentiellement assurée par des protéines kinases ca^{2+}-dépendante (CDPK) (Johansson *et al*, 1996 ; Johnson *et al*, 1992 ; Sjövall-Larsen *et al*, 2006).

4- Fonctions physiologiques

En plus du transport de l'eau qui est leur fonction principale, les aquaporines peuvent également assurer le passage de petits solutés neutres tels que : le glycérol (Agre *et al*, 1998 ; Biela *et al*, 1999), l'urée (Gerbeau *et al*, 1999), le formamide, l'acétamide (Rivers *et al*, 1997), le bore (Takano *et al*, 2006), le silicium (Ma *et al*, 2006) et l'acide lactique (Choi et Roberts, 2007). Chez les plantes, elles peuvent aussi assurer le transport de substances gazeuses telles que le CO_2 (Uehlein *et al*, 2003) ou l'ammoniaque (Holm *et al*, 2005).

Chez les plantes, les aquaporines sont localisées dans la majorité des organes de la plante et interviennent dans plusieurs processus physiologiques. Plus généralement, les aquaporines jouent un rôle très important dans les mécanismes de croissance et de développement. A titre d'exemple, il a été démontré chez *Arabidopsis thaliana* que l'aquaporine γ-TIP est hautement exprimée durant l'élongation cellulaire (Ludevid *et al*, 1992). Plus intéressant, les aquaporines interviennent dans la réponse au divers stress biotiques ou abiotiques que peut subir la plante (Maurel et Chrispeels, 2001). Dans ce contexte physiologique, l'expression des ARNm des PIP peut être affectée (Yamaguchi-Shinozaki *et al*, 1992 ; Ruiter *et al*, 1997 ; Mariaux *et al*, 1998) aussi bien que l'abondance des protéines PIP (Kirch *et al*, 2000).

Les plantes sont donc capables de moduler l'expression de leurs gènes d'aquaporines en réponse à divers stimuli externes tels que la salinité (Yamada *et al*, 1995 ; Martínez-Ballesta *et al*, 2003 ; Boursiac *et al*, 2005), la sécheresse (Kawasaki *et al*, 2001 ; Smart *et al*, 2001), le rythme circadian (Henzler *et al*, 1999, Moshelion *et al*, 2002), la lumière (Siefritz *et al*, 2004), le stress nutritionnel (Clarkson *et al*, 2000) et le froid (Wei *et al*, 2006).

-IV- LE SIGNAL LUMINEUX

La lumière constitue la base du processus le plus important pour la nature qui est la photosynthèse. Les feuilles des plantes utilisent l'énergie lumineuse pour transformer le gaz carbonique CO_2 atmosphérique en énergie chimique (glucose) et en oxygène O_2. Par sa qualité, son intensité ou sa direction, la lumière contrôle également plusieurs aspects de la morphogenèse végétale.

La lumière naturelle, fournie par le soleil, peut être décomposée en plusieurs longueurs d'ondes correspondant à des couleurs, soit dans l'ordre: ultraviolet, violet, bleu, cyan, vert jaune, orangé, rouge et infra-rouge. Les plantes n'utilisent pas tout le spectre du rayonnement solaire, les pigments photosynthétiques localisés dans les chloroplastes (chlorophylles a et b) absorbent certaines longueurs d'ondes plus efficacement que d'autres soient : la lumière bleue (400 à 500nm), la lumière rouge (655 à 665nm) et le rouge lointain (725 à 735nm). (Fankhauser et Lorrain, 2006).

1-Perception du signal lumineux

Dans leur milieu naturel, les plantes sont constamment soumises à des variations d'éclairement (intensité, direction, durée, qualité). Afin de détecter ces différentes variations et d'y répondre de façon appropriée, les plantes ont développé des mécanismes de perception qui peuvent détecter la présence, l'absence, la qualité, l'intensité, la direction et la durée du signal lumineux (Chen M *et al*, 2004 ; Schäfer et Nagy, 2006, Whitelam et Halliday, 2007). La perception du signal lumineux est assurée principalement par 3 familles de photorécepteurs suivant la longueur d'onde perçue:

- les phytochromes qui détectent le rouge et le rouge lointain sont les premiers à être identifiées (Smith, 2000 ; Quail, 2002 ; Wang et Deng, 2004),
- les phototropines et les cryptochromes captent le bleu et les UV-A (Briggs *et al*, 2001 ; Lin et Shalitin, 2003).

Ces photorécepteurs sont des protéines qui absorbent la lumière grâce à un groupement chimique appelé chromophore. Selon la longueur d'onde absorbée, la capture d'un photon provoque un changement conformationnel du photorécepteur approprié qui fait

activer sa partie protéique. Ceci déclenche une cascade de signalisation (Fankhauser et Lorrain, 2006).

1.1- Les phytochromes

Les phytochromes ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Sharrock et Quail, 1989), le mais (Christensen et Quail, 1989), la tomate (Hauser *et al*, 1995) et le riz (Mathews et Sharrock, 1996)

1.1.1- Structure

Les phytochromes sont des chromoprotéines solubles dimériques, chaque monomère de 125kDa est lié de façon covalente à un chromophore (Fig. 5). Chez *Arabidopsis thaliana,* les phytochromes sont codés par une famille de 5 gènes : *PHYA* à *PHYE* (Sharoock et Quail, 1989). Des études réalisées sur des mutants de l'un ou plusieurs de ces phytochromes ont montré qu'ils interviennent dans diverses réponses telles que la germination, le dé-étiolement, l'évitement de l'ombre et la floraison (Quail, 1998, Schäfer et Nagy, 2006, Whitelam et Halliday, 2007).

1.1.2-Mécanisme d'action

Les phytochromes sont synthétisés dans le cytosol sous leur forme inactive Pr, l'absorption de la lumière rouge les activent et les convertissent sous leur forme active Pfr qui absorbe le rouge lointain (Nagatani, 2004 ; Rockwell *et al*, 2006). La transformation réversible entre les deux formes agit comme un interrupteur pour réguler les réponses induites par les phytochromes (Kendrick et Kronenberg, 1994). Cette forme active Pfr migre du cytoplasme vers le noyau où, avec d'autres protéines, commande l'expression ou l'inactivation de certains gènes. Parmi ces protéines des facteurs de transcriptions nommés PIF (Phytochrome Interacting factors) qui s'associent directement avec le phytochrome et participent à l'évitement de l'ombre (Fig. 6A) (Fankhauser et Lorrain, 2006).

1.2-Les cryptochromes

Les cryptochromes ont été identifiés en premier chez *Arabidopsis thaliana* et *Sinapsis alba* (Ahmad et Cashmore, 1993 ; Batschauer, 1993), puis chez de nombreuses autres espèces végétales, des bactéries, des champignons, des animaux ainsi que chez l'homme.

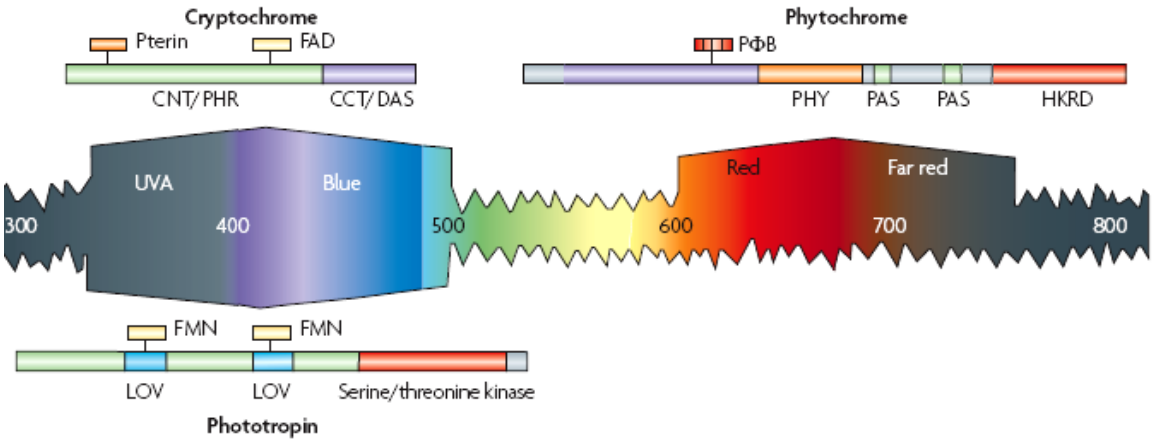


Figure 5 : Structure des cryptochromes, des phytochromes et des phototropines (Jiao *et al*, 2007).

1.2.1- Structure

Les cryptochromes sont des protéines d'environ 75kDa composées de deux domaines (Sancar, 2003) :

(1) la région N terminale (domaine PHR) permettant la liaison de deux chromophores une FAD (flavine adénine dinucléotide) et une ptérine (5,10-methenyltetrahydrofolate ou MTHF)

(2) la région C terminale dont la taille peut varier (Fig. 5)

La plupart des plantes possèdent plus d'un cryptochrome, chez *Arabidopsis thaliana* on connaît AtCRY1 et AtCRY2 de taille 75kDa et AtCRY3 de taille 60.7kDa (Ahmad et Cashmore, 1993 ; Hoffman *et al*, 1996 ; Lin *et al*, 1996, Kleine *et al*, 2003 ; Brudler *et al*, 2003). Aussi chez la tomate et le riz, on connaît trois cryptochromes (Perrotta *et al*, 2000 ; Matsumoto *et al*, 2003).

1.2.2- Mécanisme d'action

A l'obscurité les protéines CRY1 et CRY2 sont localisées dans le noyau. La lumière bleue entraine leur phosphorylation (Shalitin *et al*, 2002 ; 2003). Bien que le mécanisme d'action des cryptochromes n'a pas été totalement élucidé, il semble que le déclenchement de la voie de signalisation serait dû à un changement de conformation de la protéine : l'extrémité C-terminale du cryptochrome pourrait alors interagir avec d'autres protéines telles que COP1, un représseur de la photomorphogenèse (Lin et Shalitin, 2003). COP1 agit comme une ubiquitine ligase et participe à la dégradation de plusieurs facteurs favorisant la photmorphogenèse comme HY5, HYH, LAF1 et HFR1 (Ang *et al*, 1998 ; Osterlund *et al*, 2000, Holm *et al*, 2002 ; Yang *et al*, 2005). (Fig. 6B)

1.3-Les phototropines

Les phototropines ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Liscum et Briggs, 1995 ; Huala *et al*, 1997)

1.3.1- Structure

Les phototropines sont des proteines associées à la membrane, de 120kDa et constituées de deux domaines LOV (Light Oxygen Voltage) en position N-terminale et d'un domaine serine /threonine kinase à l'extrémité C-terminale (Fig. 5). On connaît deux phototropines chez *Arabidopsis thaliana* PHOT1 et PHOT2.

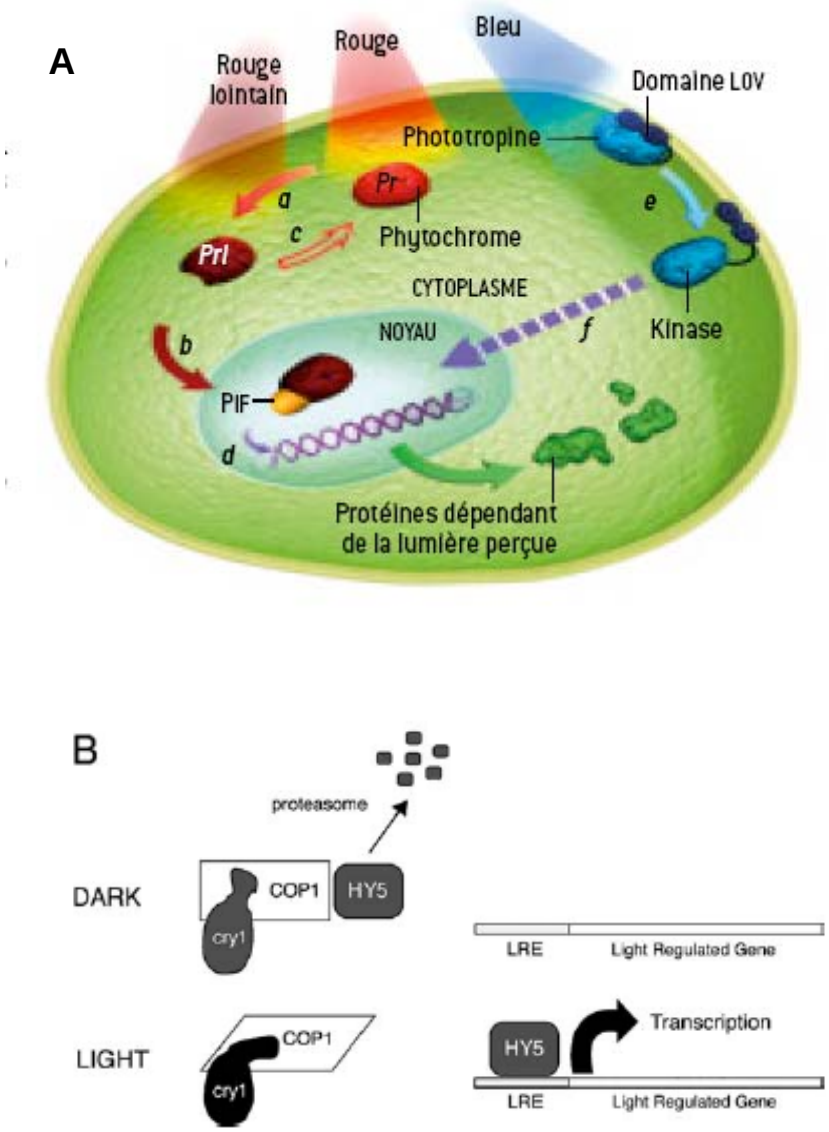


Figure 6 : (A) mécanismes d'action des phytochromes et des phototropines (Fankhauser et Lorrain, 2006), (B) mécanisme d'action des cryptochromes (Chen M *et al*, 2004).

Les phototropines interviennent dans divers processus tels que le phototropisme (Briggs et Christie, 2002). Les mouvements chloroplastiques (Kagawa *et al*, 2001), l'ouverture des stomates (Kinoshita *et al*, 2001) et l'expansion foliaire (Sakamoto et Briggs, 2002).

1.3.2- Mécanisme d'action

A l'obscurité chaque domaine LOV lie de façon non covalente un chromophore FMN (Flavin MonoNucleotide). La lumière bleue provoque un changement de conformation, la libération dans le cytoplasme et l'autophosphorylation de la phototropine et déclenche ainsi la cascade de signalisation (Fig. 6A) (Briggs et Christie, 2002, Salomon *et al*, 2003).

2-Transduction du signal lumineux

L'activation des différents photorécepteurs déclenche une cascade de signalisation qui relaie le message au noyau conduisant à une reprogrammation transcriptionnelle spécifique (Jiao *et al*, 2007). La transduction du signal depuis le cytosol vers le noyau est assurée par des messagers secondaires tels que le calcium, la calmoduline, le cGMP (Guanosine monophosphate cyclique) et la protéine G hétérotrimérique (Bowler *et al*, 1994 ; Mustilli et Bowler, 1997).

2.1- Rôle du calcium dans la transduction du signal lumineux

2.1.1- Importance du calcium pour la plante

Le calcium constitue un élément essentiel pour la physiologie de la plante, il assure un rôle important pour la croissance, la structure, le maintien de la paroi cellulaire et la signalisation en tant que messager intracellulaire dans le cytosol (Marschner, 1995). Des perturbations de la $[Ca^{2+}]$ cyt se produisent par afflux rapide du Ca^{2+} vers le cytosol depuis l'apoplasme ou les organites cellulaires (vacuole, réticulum endoplasmique) et un retour rapide au niveau basal par efflux, en réponse à divers processus développementaux et stimuli externes (White et Broadley, 2003 ; Hetherington et Brownlee, 2004 ; Kim *et al*, 2009). Parmi lequels, on trouve le gravitropisme (Plieth et Trewavas, 2002), le froid (Moore *et al*, 2002), la salinité (Halperin *et al*, 2003) la sécheresse (Mahajan *et al*, 2005), les pathogènes (Rudd et Franklin-Tong, 2001; Lecourieux *et al*, 2002), la nodulation (Lhuissier *et al*, 2001; Shaw et Long, 2003), la stimulation mécanique (Plieth, 2001; Fasano *et al*, 2002), le phytohormones

(Felle**,** 1988), le stress oxydatif (Knight, 2000; Klüsener *et al*, 2002) la lumière (Shacklock *et al*, 1992; Malhó *et al*, 1998 ; Baum *et al*, 1999), le rythme circadien (Johnson *et al*, 1995; Wood *et al*, 2001), le développement du tube pollinique (Messerli *et al*, 2000; Rudd et Franklin-Tong, 2001), la germination (Bush, 1995; Anil et Sankara Rao, 2001), l'élongation racinaire (White, 1998; Bibikova *et al*, 1999)

2.1.2- La signature calcique

En utilisant des techniques de visualisation du calcium et des mesures de la dynamique de $[Ca^{2+}]$ dans des cellules végétales *in vivo*, des études ont montré que chaque stimulus provoque un signal calcique distinct et unique appelé « signature calcique » (McAinsh et Hetherington, 1998 ; Allen *et al*, 2000, 2001 ; Sanders *et al*, 2002). Cette unicité se manifeste par la localisation sub-cellulaire, et/ou la cinétique et l'amplitude des perturbations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Rudd et Franklin-Tong, 2001). Les perturbations de $[Ca^{2+}]$ cyt peuvent être de faible amplitude ou transitoire. L'augmentation transitoire de $[Ca^{2+}]$ cyt peut être simple (pic), double (diphasique) ou multiple (oscillations). Les perturbations générées diffèrent aussi selon leur localisation cellulaire et l'amplitude de leur propagation (Tuteja et Mahajan, 2007). La signature calcique peut être tissue-spécifique. Ainsi, les perturbations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induites par une stimulation mécanique, la salinité, un stress osmotique ou le froid diffèrent remarquablement selon les types cellulaires (Moore *et al*, 2002). Aussi, en réponse à une anoxie, les cellules de la tige montrent des perturbations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ diphasiques alors que les cellules de la racine montrent une augmentation lente de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Sedbrook *et al*, 1996 ; Plieth, 2001).

2.1.3- Les acteurs de la signalisation calcique

Afin de répondre de façon appropriée aux perturbations de la $[Ca^{2+}]$ cyt, la cellule possède des protéines fixatrices de calcium. Ces protéines changent de conformation ou d'activité catalytique dès qu'elles fixent le calcium. Les plus importantes sont : les calmodulines (CaM ou CaM-like proteins), les calcineurin B-like proteins (CBLs) et les Ca^{2+}-dependant protein kinases (CDPKs) (White et Broadley, 2003 ; Tuteja et Mahajan, 2007). Ces protéines fixent le Ca^{2+} grâce à un motif appelé « EF hand » constitué de 29 acides aminés hautement conservés formant une structure une hélice-boucle-hélice qui fixe une molécule Ca^{2+} avec haute affinité (Strynadka et James, 1989 ; Tuteja et Mahajan, 2007) (Fig. 7).

Néanmoins il existe d'autres protéines fixatrices de calcium, ne comprenant pas des motifs « EF hand » comme la phospholipase D (PLD), les annexines, la calreticuline et la PCP (Pistil-expressed Ca^{2+} binding protein) (White et Broadley, 2003 ; Tuteja et Mahajan, 2007).

2.1.3.1- Les CaMs et CaM-like (CMLs)

Les calmodulines ont été identifiées chez les plantes et les animaux et sont nommées ainsi pour CALcium MODULating ProteIN (Means et Dedman, 1980). La calmoduline est une petite protéine (17 kDa) hautement conservée qui présente deux domaines globulaires comprenant chacun une paire de motif « EF hand » (Fig. 7) reliés par une hélice α flexible, (Zielinski, 1998; Reddy, 2001; Snedden et Fromm, 2001; Luan *et al*, 2002). La fixation du calcium induit un changement de conformation de la calmoduline qui expose la surface hydrophobe de chaque domaine globulaire de façon à entourer sa protéine cible à travers des liaisons van der Waals non spécifiques (White et Broadley, 2003). Les calmodulines fixent plusieurs protéines impliquées dans divers processus physiologiques tels que le transport cationique, la résistance aux maladies, la tolérance au stress, la division cellulaire, la signalisation par les phospholipides (Zielinski, 1998; Reddy, 2001; Snedden et Fromm, 2001; Luan *et al*, 2002; Reddy *et al*, 2002). Les Calmodulines peuvent réguler également l'expression de certains gènes en fixant les facteurs de transcription spécifiques (Szymanski *et al*, 1996; Reddy *et al*, 2000; Yang et Poovaiah, 2000; Bouché *et al*, 2002).

Chez les plantes, on connaît également les protéines CaM-like qui possèdent entre 1 et 6 motifs EF hand et présentent une faible homologie avec les calmodulines (<75% avec les isoformes CaM). Ces protéines sont impliquées également dans diverses réponses cellulaires (stimuli externes, réaction aux pathogènes, développement..) (Reddy, 2001; Snedden et Fromm, 2001; Luan *et al*, 2002; Zielinski, 2002 ; Tuteja et Mahajan, 2007).

2.1.3.2- Les calcineurin B-like proteins *(CBLs)*

Les protéines calcineurin B-like (CBLs) possèdent 3 motifs EF hand (Luan *et al*, 2002). Certaines CBLs transmettent des signaux environnementaux ou développementaux spécifiques : l'expression de *At*CBL1 est induite par la sécheresse, la salinité, le froid et les blessures (Kudla *et al*, 1999; Piao *et al*, 2001). Aussi, une accumulation des transcrits de *At*CBL1et *At*CBL2 a été observée dans les feuilles exposées à la lumière (Nozawa *et al*, 2001).

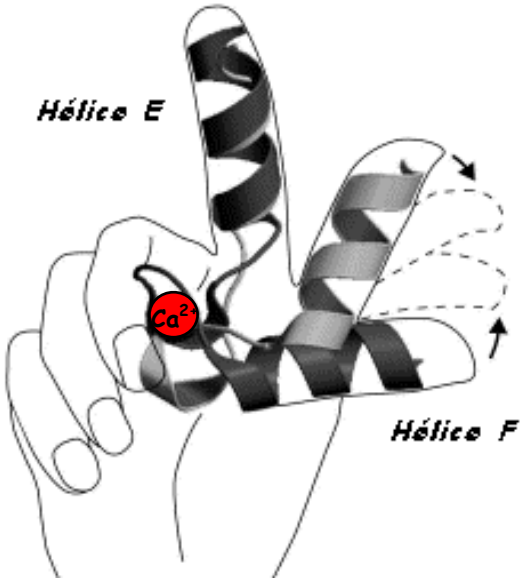


Figure 7 : La structure “EF hand” (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

Les CIPKs (**C**BL **I**nteracting **P**rotein **K**inase) ont été identifiées comme les cibles Ca^{2+} -dépendantes des CBLs (Shi *et al*, 1999; Halfter *et al*, 2000; Albrecht *et al*, 2001; Y .Guo *et al*, 2001; Luan *et al*, 2002). L'interaction CIPK –CBL se fait grâce à un motif à 24 acides aminés nommé « motif NAF » (Albrecht *et al*, 2001) et nécessite des cations bivalents comme cofacteurs pour leur activité (Luan *et al*, 2002). Chaque CBL peut interagir avec plusieurs CIPKs , *At*CBL1 interagit avec différentes *At*CIPK (Shi *et al*, 1999). Inversement certaines *At*CIPKs interagissent avec plusieurs *At*CBLs (Shi *et al*, 1999 ; Albrecht *et al*, 2001; Y. Guo *et al*, 2001).

2.1.3.3- Les calcium-dependent protein kinase *(CDPKs)*

Les CDPKs possèdent généralement 4 motifs EF hand au niveau de leur terminaison carboxylique qui fixe le Ca^{2+} afin d'activer son activité sérine/thréonine kinase (White et Broadley, 2003). On connaît au moins 34 gènes codant des CDPKs chez *Arabidopsis thaliana* (Harmon *et al*, 2001; Cheng *et al*, 2002). Plusieurs CDPKs se trouvent associées au cytosquelette, noyau, membrane plasmique et réticulum endoplasmique (Reddy, 2001; Sanders *et al*, 2002).

Les CDPKs sont capables de convertir les signaux calciques du cytoplasme en des réponses biochimiques et génétiques à travers la phosphorylation de diverses protéines cibles tels que les transporteurs membranaires, les canaux ioniques, les aquaporines, les protéases, les protéines du cytosquelette (Reddy, 2001; Rudd et Franklin-Tong, 2001; Cheng *et al*, 2002; Sanders *et al*, 2002). Elles sont par conséquent impliquées dans plusieurs processus : développement pollinique, contrôle du cycle cellulaire, transduction du signal par le phytochrome, l'expression de gènes régulés par la lumière, le gravitropisme, le thigmotropisme, la nodulation, l'acclimatation au froid, la tolérance à la salinité, la tolérance à la sécheresse, les réponses aux pathogènes (Sheen, 1996; Saijo *et al*, 2000; Anil et Sankara Rao, 2001; Reddy, 2001; Romeis *et al*, 2001;Cheng *et al*, 2002; Xiong *et al*, 2002; Lee *et al*, 2003).

2.1.4- La signalisation calcique est impliquée dans la transduction du signal lumineux

L'implication de la signalisation calcique dans la transduction du signal lumineux a été étudiée chez plusieurs espèces. Des études ont reporté une augmentation de la concentration cytosolique de ca^{2+} par un approvisionnement en ca^{2+} à partir de l'apoplaste ou des organites intracellulaires suite à une exposition des feuilles à la lumière bleue (Babourina *et al*, 2002;

Baum *et al*, 1999 ; Harada *et al*, 2003; Stoelzle *et al*, 2003). Ces changements en [ca^{2+}] modulent la voie de signalisation par les phototropines (Chen M *et al*, 2004). D'autres études utilisant des mutants de phototropines ont démontré l'implication du calcium cytosolique dans la réponse des plantes à la lumière bleue (Harada et Shimazaki, 2007).

La participation du calcium dans la voie de signalisation par les cryptochromes ainsi que par les phytochromes a été également démontrée chez *Arabidopsis thaliana*. Ces deux voies seraient modulées par une protéine cytoplasmique fixatrice de Ca^{2+} (SUB1 : Short Under Blue light) (H. Guo *et al*, 2001).

Aussi, des oscillations circadiennes de [Ca^{2+}] cyt ont été observées chez les animaux et les végétaux (Colwell, 2000; Dodd *et al*, 2005). Chez les plantes, ces oscillations ont lieu dans tous les tissus (Johnson *et al*, 1995), contrairement à ce qui a été observé chez les animaux ou elles semblent spécifiques des neurones (Colwell, 2000 ; Ikeda *et al*, 2003) et régulées par la photopériode et l'intensité lumineuse (Love *et al*, 2004).

De même, une mobilisation nucléaire de calmoduline a été observée lors d'un changement du régime lumineux **;** la CaM 53 du pétunia et la CaM 61 du riz présentent un motif de prénylation à leur extrémité carboxylique qui leur permettrait de s'ancrer au plasmalemme lorsque ces plantes sont exposées à la lumière (Rodriguez-Concepcion *et al,* 1999).

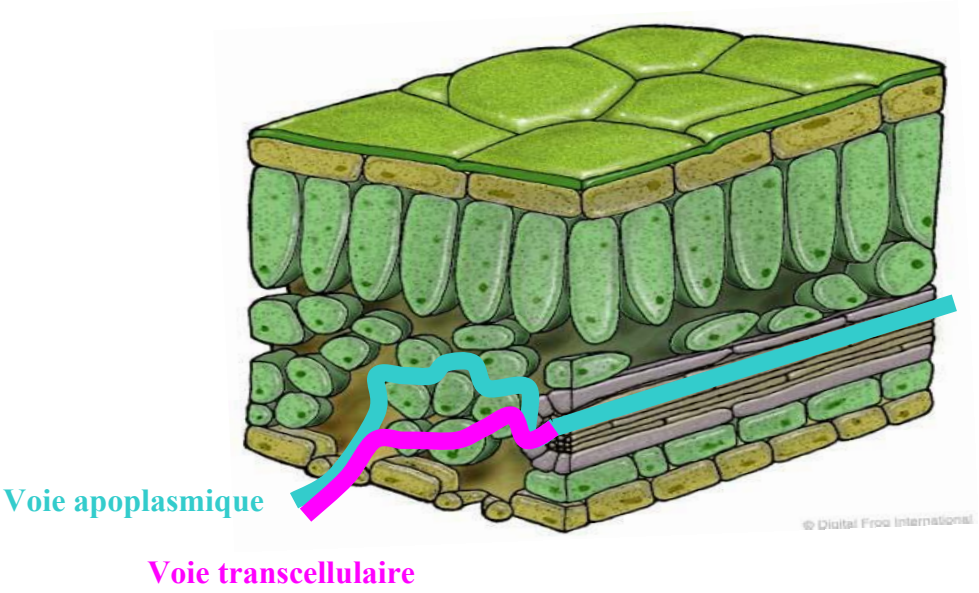


Figure 8 : Voies de circulation de l'eau à travers une feuille, après avoir emprunté les tissus vasculaires, l'eau peut circuler en parallèle selon la voie apoplasmique et transcellulaire (voies extravasculaires).

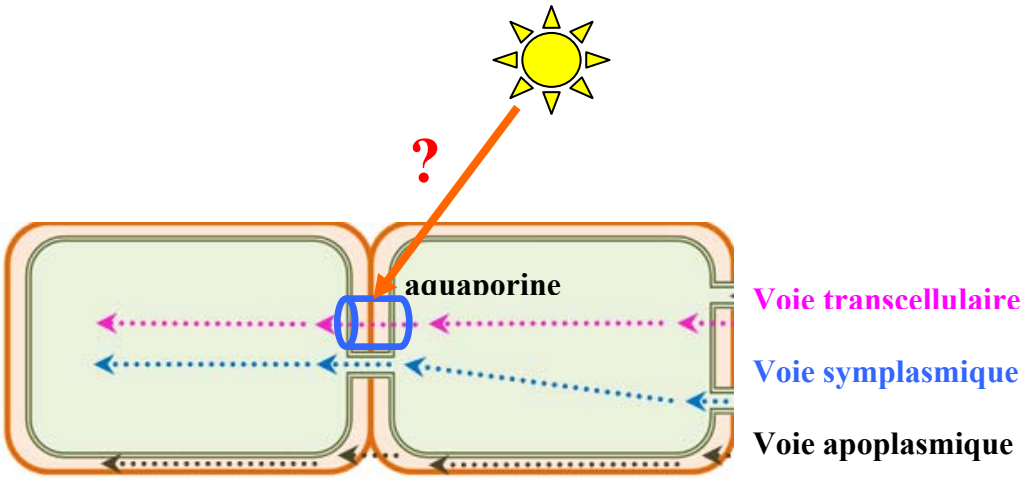


Figure 9 : Le mécanisme par lequel se fait la régulation des aquaporines à la lumière dans les feuilles de noyer (*Juglans regia*) reste encore inconnu.

-V- CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

La résistance hydraulique foliaire R_F est une composante majeure du transport d'eau dans toute la plante. Elle contribue jusqu'à 60 à 80% dans la résistance hydraulique aérienne et 30% dans la résistance hydraulique de toute la plante. Cette résistance hydraulique foliaire est dépendante des facteurs environnementaux tels que la lumière. La stimulation de la conductivité hydraulique ($K_F = 1/R_F$) à la lumière a été bien documentée (Moshelion *et al*, 2002, Tyree *et al*, 2005, Cochard *et al*, 2007, Voicu *et al*, 2008) à l'échelle physiologique. Toutefois, les bases moléculaires de cette réponse sont très peu étudiées.

Chez le noyer (*Juglans regia*), on a pu relier la stimulation de la K_F à la lumière à l'accroissement du taux de deux isoformes d'aquaporines *JrPIP2.1* et *JrPIP2.2*. Selon la même étude, deux voies de circulation de la sève sont possibles. A l'obscurité, la voie apoplasmique serait dominante et caractérisée par une faible valeur de K_F et une faible abondance des transcrits *JrPIP2*. La voie transcellulaire qui serait marquée par une valeur de K_F élevée, associée à une forte abondance des transcrits *JrPIP2*. De plus, elle nécessite une biosynthèse *de novo* des aquaporines (Fig. 8 et 9), ce qui pourrait suggérer que la lumière exerce une régulation précoce et complexe sur les *JrPIP2*.

Le projet de la thèse s'inscrit dans la continuité des travaux obtenus aux laboratoires et vise à **identifier les mécanismes moléculaires précoces impliqués dans la modulation de la conductivité hydraulique foliaire chez le noyer.**

En combinant des approches écophysiologiques et moléculaires les objectifs de la thèse sont les suivants :

- Appréhender le rôle des différentes isoformes d'aquaporines, notamment PIP1s et PIP2s dans l'effet stimulateur de la K_F par la lumière.
- Investiguer le rôle de la qualité de la lumière dans ce processus physiologqiue, en étudiant l'effet de la lumière bleue sur la stimulation de la K_F
- Rechercher, en engageant une approche sans apriori la cDNA AFLP, les acteurs moléculaires associées à la perception et la transduction du signal lumineux conduisant à la stimulation de la K_F et au taux des transcrits d'aquaporines.
- Vérifier l'hypothèse de l'implication de la voie de signalisation de calcium dans la transduction du signal lumineux responsable de la régulation des aquaporines.

MATERIEL ET METHODES

.

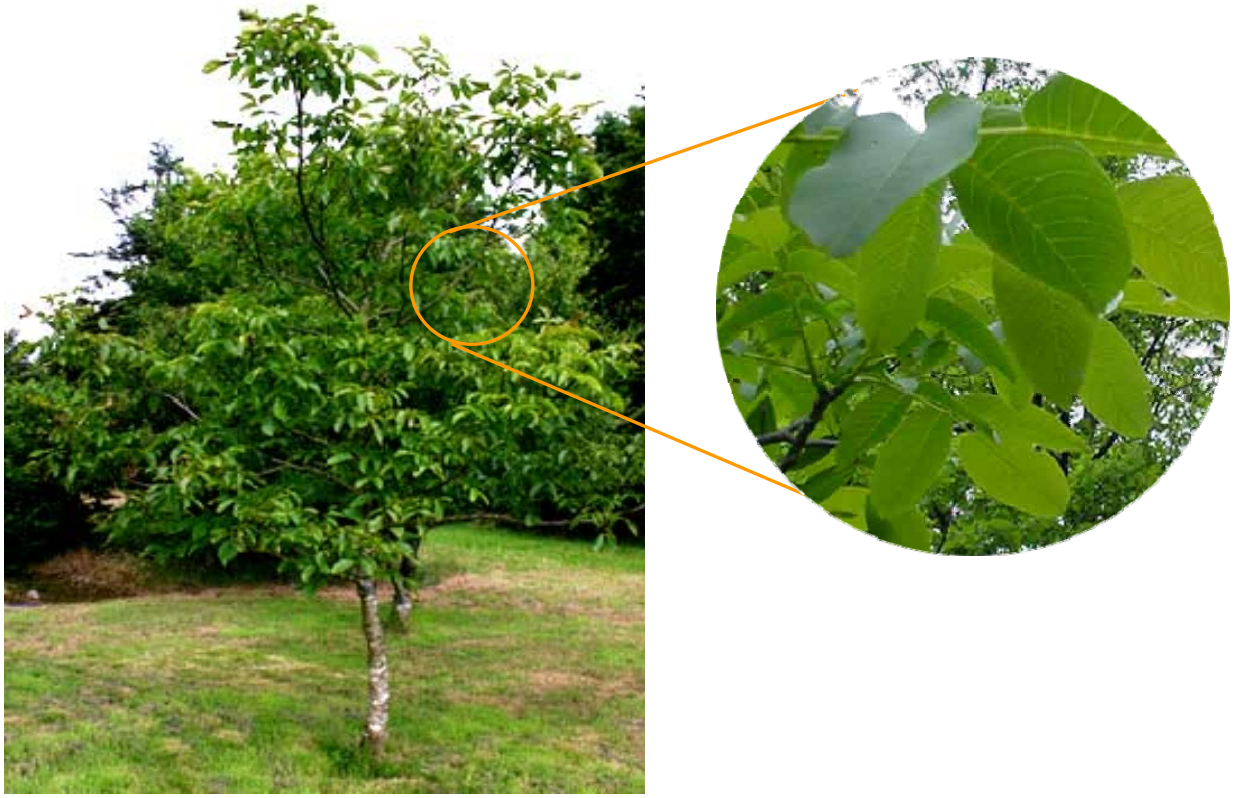


Figure 10 : Matériel végétal utilisé : noyer (*Juglans regia* cv. Franquette), les feuilles sont composées de 5 folioles.

-I- MATERIEL VEGETAL

Les expériences on été menées durant les étés 2006 à 2009 sur des pousses feuillées de noyer (*Juglans regia* cv. Franquette) (Fig. 10) recueillies du côté ensoleillé sur des arbres de 15ans, cultivés à l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) site de Crouël (Clermont- Ferrand). Les branches ont été prélevées la veille des expérimentations et leurs bases ont étés recoupées sous l'eau et maintenues au noir dans un sac en plastique pendant une nuit au moins avant leur utilisation.

-II- PROCEDURES EXPERIMENTALES D'ECOPHYSIOLOGIE

1- Méthode de mesure de la K_F : HPFM

Les mesures de la résistance hydraulique foliaire ont été réalisées en utilisant la méthode HPFM (high pressure flow meter) utilisée précédemment par Sack *et al*, 2002; Tyree *et al*, 2005 et Cochard *et al*, 2007. La technique consiste à perfuser de l'eau dégazée et sous pression positive +P (MPa) dans le pétiole d'une feuille fraichement coupée de la branche et de mesurer le flux à l'entrée du pétiole (Fig. 11). Les valeurs de flux mesurées (F, mmol s^{-1}) sont enregistrées automatiquement toutes les 30 secondes dans un ordinateur relié à l'appareil HPFM.

la conductivité hydraulique (K_F , mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}) est calculée comme suit où SF est la surface foliaire en m^2:

$$K_F = F / (P*SF)$$

2- Conditions de mesure

Pour l'étude sans apriori cDNA-AFLP, la dynamique de la K_F des feuilles de noyer a été mesurée en fonction de différentes conditions et durées d'éclairement (obscurité, 5, 10, 15, 30, 60 et 120min). La lumière blanche est fournie par deux lampes iodine de 400W délivrant une intensité d'environ 600 µmol. m^{-2}. s^{-1} au niveau de la feuille. Afin de prévenir le sur-réchauffement des feuilles, ces dernières sont placées dans un bac rempli d'eau continuellement aérée et dont la température est maintenue à 25 °C (Cochard *et al*, 2007). Pour les études moléculaires, les feuilles préalablement utilisées pour la mesure de la conductivité foliaire sont déconnectées du circuit HPFM et directement plongées dans l'azote liquide et maintenues à -80 °C jusqu'à utilisation.

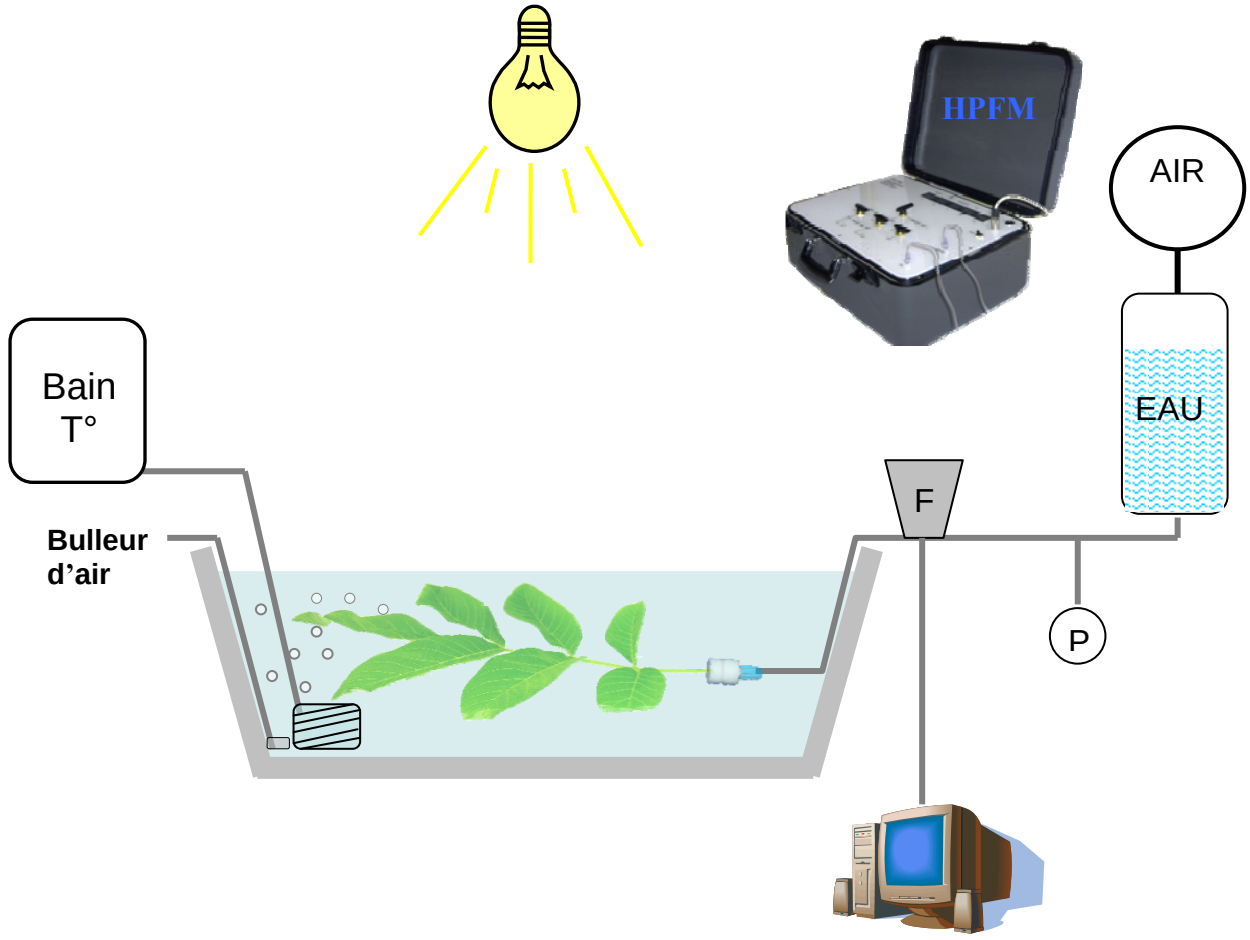


Figure 11 : Dispositif expérimental utilisé pour la mesure de la résistance hydraulique foliaire.

3- Mesure de la K_F en réponse aux inhibiteurs calciques

Afin d'estimer le rôle de la signalisation calcique dans la stimulation de la K_F par la lumière, deux inhibiteurs calciques ont été perfusés aux feuilles exposées à la lumière : un inhibiteur des canaux calciques : le lanthanum ($LaCl_3$, Sigma) et un antagonist de calmoduline N- 6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7, Sigma), les deux utilisés à une concentration de 30mM et dissous dans l'eau pour $LaCl_3$ et dans 0.5% de méthanol pourW7. Toutefois, le choix de cette concentration a été établi après avoir testé une gamme de concentration (100µM, 300µM, 500 µM, 800µM, 10mM, 20mM, 30mM, 50mM et 100mM) pour les deux inhibiteurs.

Deux stratégies ont été adoptées : pour la première, les feuilles ont été perfusées d'eau ultra pure à l'obscurité jusqu'à ce que la valeur de K_F soit constante, ensuite l'inhibiteur approprié est perfusé pendant une heure toujours à l'obscurité, enfin la lumière est allumée et les feuilles sont de nouveau perfusées d'eau.

Pour la deuxième, les inhibiteurs sont perfusés à la lumière quand la K_F atteint sa valeur maximale environ après 90min d'exposition à la lumière

4- Mesure de la K_F en réponse au filtre anti-bleu

Afin de vérifier si la K_F est sensible à la qualité de la lumière, nous avons utilisé un filtre anti-bleu pour discriminer l'effet de la lumière bleue de celui de la lumière rouge sur la conductivité hydraulique. Dans ces conditions, la K_F et le taux de transcrits d'aquaporines ont été comparés pour des feuilles témoins (éclairées avec de la lumière blanche) et des feuilles traitées (éclairées en présence du filtre anti-bleu, Geste scénique, France). Deux procédures complémentaires ont été adoptées : la première consiste à exposer les feuilles immédiatement après la phase d'obscurité à la lumière en présence du filtre anti bleu et à l'enlever après une heure. La deuxième consiste à rajouter le filtre quand la K_F atteint sa valeur maximale environ après 90min d'exposition à la lumière.

Les lampes sont placées à 28cm de la surface des feuilles et à 24cm en présence du filtre anti-bleu. Cette distance est calculée grâce à un filtre neutre.

-III- Procédures expérimentales de biologie moléculaire

1- Extraction des ARNtx

Une procédure adaptée de Chang *et al* (1993) a été adoptée pour extraire les ARN_{tx} à partir des feuilles traitées à la lumière, aux inhibiteurs calciques et au filtre anti bleu. Les feuilles sont broyées dans l'azote liquide et réduites en une poudre fine. Le broyat est repris dans 1 ml de tampon d'extraction. Après homogénéisation vigoureuse au vortex, le mélange est incubé 5min à 65 °C puis 1min à température ambiante. Les acides nucléiques sont extraits avec 1ml de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et centrifugés pendant 20min à 4 °C à 14000 rpm.

L'extraction des acides nucléiques est renouvelée avec 1ml de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) suivie d'une centrifugation de 10min à 4 °C à 14000 rpm. Le surnageant récupéré est calibré à 1ml avec de l'eau RNase free. Les ARN_{tx} sont ensuite précipités avec 250 µl de LiCl (10 M) et incubés pendant une nuit à 4 °C après un vortex vigoureux.

Après une centrifugation de 45min à 4 °C à 14000 rpm, le précipité est lavé 2 fois à l'éthanol 80% et centrifugé à chaque fois pendant 5min à 4 °C à 14000 rpm. Le culot obtenu est séché 10min dans la glace ou quelques minutes à température ambiante, puis dissous dans 25 µl d'eau RNase free. Les traces génomiques sont éliminées par addition d'un mélange contenant : 3 µl de tampon DNase 10X, 1µl de RNasine (40 unités) et 1 µl de DNase. Le mélange est ensuite incubé pendant 15 min à température ambiante. Les acides nucléiques sont purifiés avec 470 µl de tampon SSTE qui précipite les sucres et les phénols. L'extraction de ces acides nucléiques est réalisée par addition d'un volume (530 µl) de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Après une centrifugation de 10min à 4 °C à 14000 rpm, les ARN_{tx} sont précipités de nouveau dans 1 ml d'éthanol absolu à -20 °C pendant 2h ou pendant 20min à -80 °C. Après une centrifugation de 45min à 4 °C à 14000 rpm, le précipité est lavé 3 fois à l'éthanol 80 °C, séché puis repris dans volume apprécié selon la quantité du culot (entre 20 à 40 µl) d'eau RNase free.

La qualité des ARN_{tx} est contrôlée sur un gel d'agarose 2% et visualisé sous UV.

La quantité des ARN_{tx} extraits est appréciée grâce au spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000), la pureté et la contamination par les protéines peuvent être estimées.

Tampon d'extraction *(50 ml)*

2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)		1 g
2% PVP (Polyvinylpyrrolidone K29-32)		1 g
100 mM Tris HCl (pH 8)	(solution mère 1 M)	5 ml
25 mM EDTA (pH 8)	(solution mère 0,5 M)	2,5 ml
2 M NaCl	(solution mère 5 M)	20 ml
H_2O (qsp 50 mL)		21 ml
3% *ß*-mercaptoéthanol (*à ajouter extemporanément*)		1,5 ml

Tampon SSTE *(50 ml)*

10 mM Tris HCl (pH 8)	(solution mère 1 M)	500 µl
1 mM EDTA (pH 8)	(solution mère 0,5 M)	100 µl
1 M NaCl	(solution mère 5 M)	10 ml
0.5% SDS	(solution mère 10%)	2,5 ml
H_2O (qsp 50 mL)		36,9 ml

Chlorure de lithium *(50 ml)*

10 M LiCl
Eau (qsp 50 mL)

Tampon DNAse *(5 ml)*

10 M LiCl
Eau (qsp 5 mL)

2- Approche globale cDNA AFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction)

La procédure adoptée est celle de Vos *et al*, 1995 et Bachem *et al*, 1996 avec quelques modifications (Fig. 12).

2.1- Synthèse des ADNc double brin

2µg d'ARN_{tx} sont retro-transcrits en utilisant 1µg d'amorce oligo $(dT)_{30}$-AFLP (tableau I) contenant un site de restriction EcoR1. Après une dénaturation à 65 °C pendant 5min et une incubation de 2 à 5min dans la glace, un mélange réactionnel contenant : 5µl de tampon 5X (AMV RT Buffer) (Promega, Madisson, WI, USA) préchauffé à 42 °C, 2,5µl d'oligonucléotides, 1µl (40 U) de RNasine (Promega), 1,25µl de pyrophosphate de sodium et 3µl (30U) d'AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madisson, WI, USA) est ajouté pour finir dans un volume final de 25µl. Ce mélange est incubé à 42 °C pendant 2h.

Le premier brin étant synthétisé, le brin complémentaire est synthétisé par l'ajout d'un mélange réactionnel de 75µl contenant : 10µl de tampon 10X (DNA poly buffer), 2µl d'oligonucléotides, 0,2µl (1U) de RNase H et 2,75µl (25U) de DNA polymérase I (Promega). Ce mélange réactionnel est rajouté aux 25µl d'ADNc simple brin, l'ensemble est incubé à 12 °C pendant 2h ensuite arrêté pendant 10min à 70 °C puis traité avec 0,75µl (6U) de T4 DNA polymérase (Promega) pendant 15min à 37 °C. La réaction est arrêtée à 75 °C pendant 10min. Ces opérations sont réalisées dans un volume final de 100µl dans un thermocycleur et des thermo-tubes Eppendorf 200µl.

2.2- Purification des ADNc double brin

Les 100µl de $cADN_{db}$ sont purifiés par deux précipitations : la première dans 1 volume de phénol chloroforme isoamylique (25:24:1), la deuxième dans 1 volume de chloroforme isoamylique (24:1). Les culots sont récupérés par une centrifugation pendant 10min à température ambiante à 10000 rpm. Une troisième précipitation est réalisée dans 3 volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume d'acétate d'ammonium (3M). Après une incubation pendant 10min dans la glace et une centrifugation pendant 45min à 4 °C à 14000 rpm, les culots sont lavés 2 fois avec l'éthanol 80%. Les culots obtenus sont solubilisés dans 40µl d'eau nucléase free.

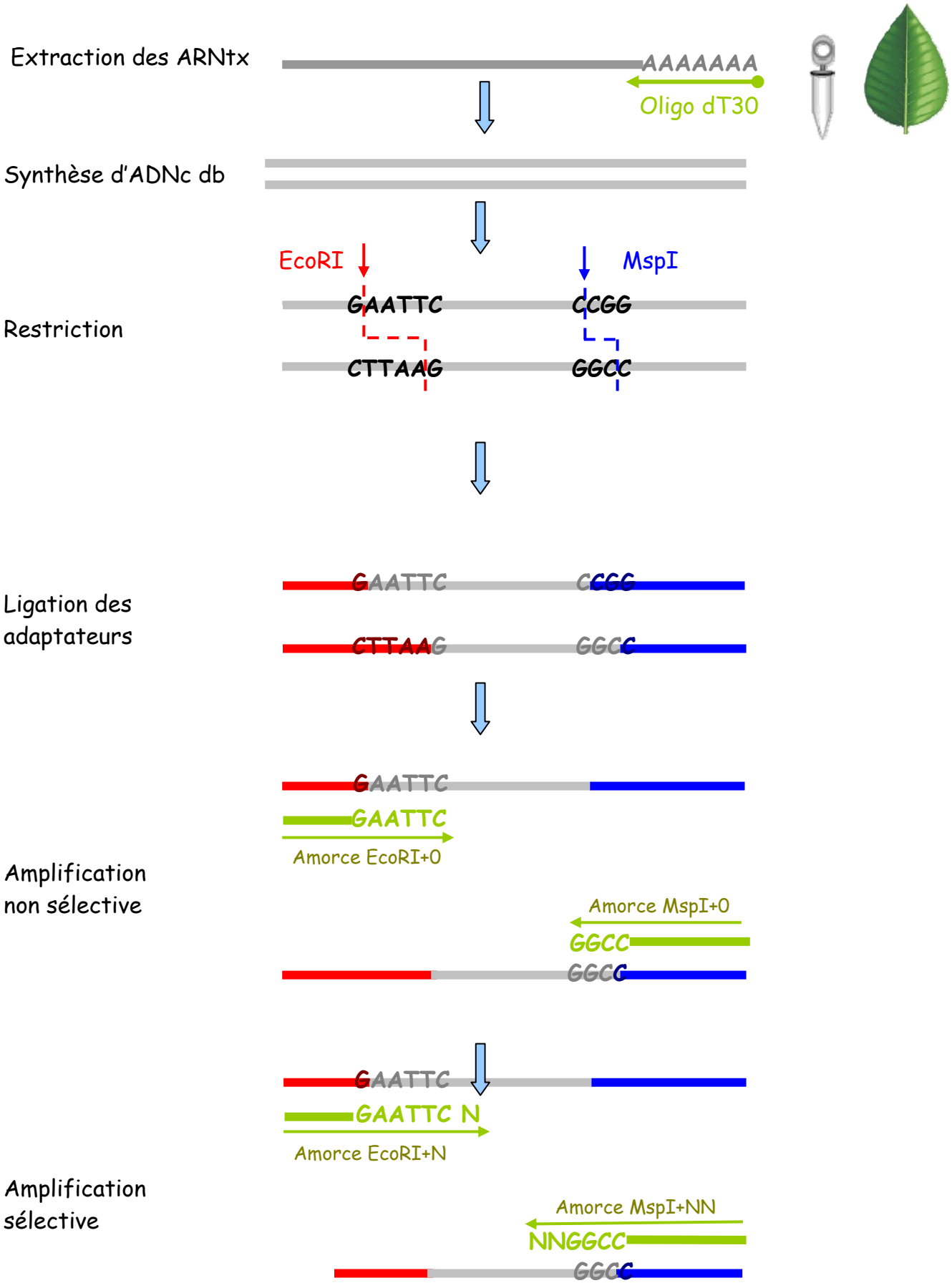


Figure 12 : Etapes de la procédure cDNA AFLP.

Ces $cADN_{db}$ purifiés sont dosés au spectrophotomètre Nanodrop et leur qualité est contrôlée par dépôt sur un gel d'agarose 1.5% et visualisé sous UV. Normalement un smear d'ADN homogène entre les échantillons doit apparaitre.

2.3- Restriction des cADNdb et ligation des adaptateurs

L'ADN_{db} est digéré simultanément par deux endonucléases de restriction. Dans notre étude nous avons utilisé deux couples d'enzymes : EcoRI –MseI et EcoRI –MspI. Ensuite des adaptateurs spécifiques aux sites de restriction, sont fixés aux extrémités cohésives des fragments d'ADN obtenus.

1µg de $cADN_{db}$ est digéré avec 10U EcoRI (0,5µl), 10U MspI (0,5µl) ou MseI (2µl) (Biolabs), en présence de 2µl de tampon 10X (tampon MseI ou tampon MspI). Le mélange de la digestion est réalisé dans 20µl final et incubé à 37 °C pendant 3 heures en agitant les échantillons délicatement de temps en temps.

Les fragments de restriction obtenus et présentant des bouts cohésifs sont collés à des adaptateurs spécifiques double brin dans le mélange de ligation suivant :

- 1µl d'adaptateur EcoRI (10µM)
- 1µl d'adaptateur MseI ou MspI (50µM)
- 1µl de T4 DNA ligase (400U final)
- 2,5µl d'ATP (1mM final)
- 1µl de tampon 10X (tampon MseI ou tampon MspI)
- 0,7 µl d'eau DNAse-Free

Les échantillons sont ensuite incubés à 16 °C pendant 6h en les agitant délicatement de temps en temps.

2.4- Amplifications PCR

Les amplifications sont réalisées à l'aide d'amorces définies d'après la séquence des adaptateurs utilisés. Ces amorces portent sur leur extrémité 3'-OH des extensions aléatoires de 1 à 2 bases. Une préamplification non sélective est réalisée en premier à l'aide d'amorces sans extension. Le produit de cette préamplification sert de matrice pour l'amplification sélective qui est réalisée à l'aide d'amorces « débordantes » (amorces +2).

Pour un seul couple d'enzyme, l'utilisation d'amorce+N pour EcoRI et d'amorces+NN pour MseI ou MspI porte à 64 combinaisons possibles (16 × 4) (tableau II). La liste des amorces utilisées figure dans le tableau I.

Tableau I : Liste des amorces utilisées pour l'étude cDNA AFLP.

Oligo-dT30-AFLP	5'-TTTTTTGCAAGCTTGAATTCGCT_{30}N-3'
AdaptEco-A	5'-AGGACTCGTAGACTGCGTACC-3'
AdaptEco-B	5'-GAGCATCTGACGCATGGTTAA-3'
AdaptMsp-A/Mse-A	5'-AGGAGACGATGAGTCCTGAA-3'
AdaptMse-B	3'-CTGCTACTCAGGACTTAT-5'
AdaptMsp-B	3'-CTGCTACTCAGGACTTGC-5'
Pré-Amplif-Eco+0	5'-CTCGTAGACTGCGTACCAATTC-3'
Amplif-Eco+N	5'-CTCGTAGACTGCGTACCAATTCN-3'
Pré-Amplif-Msp+0	5'-GACGATGAGTCCTGAACGG-3'
Amplif-Msp+NN	5'-GACGATGAGTCCTGAACGGNN-3'
Pré-Amplif-Mse+0	5'-GACGATGAGTCCTGAATAA-3'
Amplif-Mse+NN	5'-GACGATGAGTCCTGAATAANN-3'

Tableau II : Nombre de combinaison possibles d'amorces pour chaque couple d'enzyme.

64 combinaisons possibles

	Msp AA	**Msp AC**	**Msp AG**	**Msp AT**	**Msp CA**	**Msp CC**	**Msp CG**	**Msp CT**	**Msp GA**	**Msp GC**	**Msp GG**	**Msp GT**	**Msp TA**	**Msp TC**	**Msp TG**	**Msp TT**
Eco A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Eco C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Eco G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Eco T	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

2.4.1- Préamplification non sélective

Cette étape de préamplification est réalisée dans un mélange réactionnel de 40 µl contenant :

- 4 µl de produits de restriction-ligation dilués au 1/10ème
- 25.2 µl d'eau DNAse-free [qsp 40µL]
- 4 µl de tampon (sans $MgCl_2$) (10X) (Goldstar) (Eurogentec) [1 X final]
- 1.6 µl de $MgCl_2$ (50 mM) [2 mM final]
- 1 µl de dNTP [250 µM total final]
- 2 µl d'amorces Eco0 (20 µM) [1 µM final]
- 2 µl d'amorces Msp0 (20 µM) [1 µM final]
- 0.2 µl de Red Goldstar Taq Polymerase (Eurogentec) [1unité total]

Cette préamplification consiste en une première étape à 94 °C pendant 4min suivie de 25 cycles (94 °C pendant 30s, 55 °C pendant 1min et 72 °C pendant 1min30). La réussite de la réaction PCR est testée sur un gel d'agarose 1.5%.

2.4.2- Amplification sélective

Cette amplification PCR est réalisée dans un mélange réactionnel de 30 µl contenant:

- 4 µl de produits de pré-amplification PCR dilués au 1/20ème
- 19.35 µl d'eau DNAse-free [qsp 30µL]
- 3 µl de tampon (sans MgCl2) (10X) (Goldstar) [1 X final]
- 1.2 µL $MgCl_2$ (50 mM) [2 mM final]
- 0.75 µl de dNTP (2.5 mM chaque/10mM total) [250 µM total final]
- 0.75 µl d'amorces Eco+1 (20µM) [0.5 µM final]
- 0.75 µl d'amorces Mse+2 ou Msp+2 (20µM) [0.5 µM final]
- 0.2 µl de Taq (Goldstar) (5u/µL) [1 unité total]

Le programme d'amplification PCR est le suivant :

4min à 94 °C

30s à 94 °C
30s à 65 °C
1min30 à 72 °C
} 1 cycle

30s à 94 °C

30s touch down phase [-0.7 °C/cycle] durant 14 cycles

1min30 à 72 °C

30s à 94 °C
30s à 56 °C
1min30 à 72 °C
} 23 cycles

10min à 72 °C

2.5- Analyse des fragments d'amplifications

2.5.1- Préparation du système d'électrophorèse

a) Préparation des plaques

Le système d'électrophorèse est constitué de deux plaques : une plaque « réservoir » portant la cuve d'électrophorèse et une plaque « gel » portant le gel d'acrylamide. Les deux plaques doivent être préalablement nettoyées à l'eau ultra pure et à l'éthanol 95% avant leur traitement qui diffère selon la plaque :

- **la plaque gel** est traitée avec une solution collante composée de 3ml d'une solution d'acide acétique glacial 0.5% et d'éthanol 95% additionnée de 5µl de silane (sigma, France). La plaque est ensuite légèrement essuyée à l'éthanol 95° pour éliminer l'excès du produit.
- **La plaque réservoir** est traitée avec 1ml d'un produit glissant le sigmacote (sigma, France) qui sera légèrement essuyé à l'éthanol 95° une fois la plaque séchée.

Les deux plaques ainsi traitées, le système de coulage est monté selon la notice du fournisseur (Biorad). Les plaques sont assemblées en plaçant un spacer de chaque coté et fixées à l'aide de pinces.

b) Préparation du gel de polyacrylamide 5%

Le gel utilisé pour la migration électrophorétique est un gel de polyacylamide 5% contenant 100ml de mélange urée/ TBE/acrylamide auquel on rajoute 75µl de TEMED et 500µl de persulfate d'ammonium (PSA) à 10%, précurseurs de polymérisation. Le gel est ensuite homogénéisé et rapidement coulé entre les deux plaques en faisant attention à la formation des bulles d'air qui empêcheraient la migration. Le gel est laissé polymériser pendant 2 heures minimum en couvrant les extrémités afin d'éviter le desséchement du gel et la cristallisation de l'urée.

2.5.2- Migration des amplifiats

Une fois tout le système d'électrophorèse est assemblé, le peigne est introduit dans un 1mm de gel tout en faisant attention qu'il n'y ait pas de contamination entre les puits lors du dépôt. Du tampon TBE 1X est versé dans la cuve supérieure da la plaque réservoir ainsi dans le bac inférieur (environ 2cm), le peigne doit être totalement immergé. Le gel est ensuite chauffé à 40 °C (pré-run) pendant 30min à 1500V.

Solutions nécessaires pour la procédure cDNA AFLP

Tris borate EDTA (TBE) 10X : 900 mM Tris-HCl (108.9 g/L)
900 mM acide borique (55.6 g/L)
20mM EDTA (40 mL 0.5 M EDTA pH8, ou 7.4 g/L)
pH=8.3

Urée/TBE/ acrylamide : 420 g Urée [7 M final]
(Pour 1L) 100 mL TBE (10X) [1 X final]
125 mL Acrylamide/bis (29/1) (40%) [5% final]
Compléter à 1L avec de l'eau DNAse-free
Filtrer la solution

Persulfate d'ammonium PSA (10%) 1g pour 10 mL

Mélange Ethanol/Acétate: 15 mL éthanol (95% final)
25 µL acide acétique glacial (0.05% final)

Bleu formamide: 20 mg Xylène cyanol FF
20 mg Bleu de bromophénol
400 µL EDTA 0.5M pH=8
20 mL Formamide

Solution de fixation : 3L acide acétique glacial 10%

Solution de coloration : 3 L 3g de nitrate d'argent [0.1 % final]
4.5 mL formaldéhyde à 35%

Thiosulfate de sodium (1% ou 10 mg.mL^{-1}) : 200 mg dans 20 mL

Solution de révélation : 3 L 90g de Na_2CO_3 [3 % final]
600 µL de Na-Thiosulfate (1%)
4.5 mL formaldéhyde (35%)
1 L de glace pillée

D'autre part, les dépôts contenant 3µl de produit d'amplification et 3µl de bleu de formamide, sont dénaturés par chauffage à 95 °C pendant 4min puis maintenus dans la glace jusqu'au dépôt.

Avant le dépôt des amplifiats, les 2 puits des extrémités du gel sont chargés de tampon de charge, ensuite les amplifiats dénaturés sont déposés dans l'ordre tout en respectant les quantités entre chaque puits. La migration est lancée à 2000V.

La migration peut être arrêtée lors de la sortie du premier trait bleu du front de migration (bleu de bromophénol) après environ 3 heures.

2.5.3- Révélation des bandes à l'argent

La révélation des fragments amplifiés et séparés sur gel de polyacrylamide se fait au nitrate d'argent 0.1% (Chalhoub *et al*, 1997).

Une fois refroidi et décollée de la plaque réservoir, la plaque gel est placée dans une solution de fixation à l'acide acétique 10% pendant 20min sous légère agitation qui sera réservée à 4° pour stopper la réaction de révélation. Après 3 à 4 lavages de 3min chacun à l'eau distillée froide, le gel est placé dans une solution de coloration au nitrate d'argent 0.1% pendant 30min sous légère agitation et à l'obscurité. Après un bref lavage de 5 secondes dans l'eau distillée, le gel est placé dans une solution de révélation au carbonate de sodium anhydre Na_2CO_3 toujours à l'obscurité. La coloration est arrêtée à l'intensité désirée des bandes d'ADNc apparues, en versant la coloration de fixation déjà préparée. Le gel est enfin lavé pendant 15min à l'eau distillée et séché pendant 2 heures minimum.

2.5.4- Prélèvements des bandes

Les bandes qui présentent un intérêt sont réhydratées avec de l'eau DNAse free sur le gel puis excisées avec précision et récupérées dans 20 à 30µl de tampon 1X (Qiagen), ensuite elles sont dénaturées à 94 °C pendant 4min et laissés diffuser à 4 °C pendant une nuit.

Les amplifications sont réalisées dans un volume final de 40µl pendant 30cycles en utilisant 10µl d'ADNc provenant des bandes, 20µM d'amorces non selectives Eco+0 et Mse+0 ou Msp+0, 4µl de tampon (Qiagen), 1.6µl de $MgCl_2$, 1µl dNTP, et 0.1µl de taq polymérase (Qiagen).

Le programme d'amplification consiste en une première étape à 94°C pendant 4min suivie de 30 cycles (94 °C pendant 30s, 55 °C pendant 1min et 72 °C pendant 1min30). Les produits d'amplifications sont vérifiés sur gel d'agarose 2%.

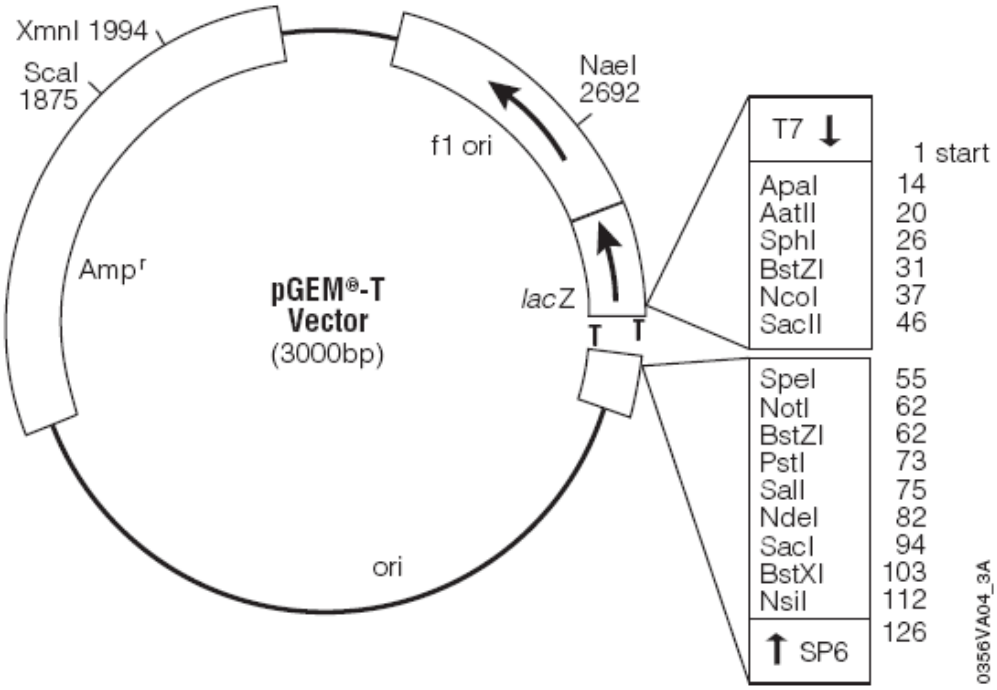


Figure 13 : Carte de restriction du vecteur pGEM T easy

3- Clonage

Les produits d'amplification précédemment vérifiés sur gel d'agarose sont clonés dans le vecteur pGEM T-easy (promega) (Fig. 13) suivant les instructions du fournisseur. Le clonage se fait en deux étapes :

- **la ligation :** est réalisée dans un volume final de 10µl, en incubant pour une nuit à 4 °C un mélange constitué de : 5µl de tampon 2X (promega), 0.5µl du vecteur pGEM T, 0.5µl de T4 ligase (promega) et 4µl de produit d'amplification.
- **La transformation :** les 10µl de produit de ligation sont transformés dans 100µl de bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α (promega). Le mélange est incubé pendant 30min dans la glace ensuite pendant 90 secondes à 42 °C et finalement remis dans la glace pendant 5min. Dans des tubes de 2ml, ce mélange est mis en culture dans 800µl de milieu SOC (1% $Mgcl_2$, 1%$MgSO_4$ et 1% de glucose), à 37 °C pendant 1h 30 sous une agitation de 200rpm. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 5min à 4 °C. Après récupération des 800µl de SOC, le culot de bactéries est repris dans les 100µl restants qui sont étalés à l'aide d'un râteau flambé au préalable à l'alcool sur des boites de pétri renfermant du milieu LB et préalablement traitées avec de l'ampicilline, X-Gal et IPTG. Les boites sont incubées dans l'étuve à 37 °C entre 16 et 20h.

Les colonies blanches apparues correspondent aux bactéries transformées. Deux colonies blanches de chaque boite sont piquées à l'aide d'un cure dent propre et resuspendues dans 2ml de milieu LB. La taille des fragments clonés est vérifiée par amplification en utilisant les amorces non selectives Eco+0 et Mse+0 ou Msp+0. Chaque clone est enfin envoyé à séquencer (Cogenics, GENOME express, France).

4- RT-PCR en temps réel

Afin de vérifier le profil d'expression des différents gènes issus de l'AFLP et de caractériser le profil d'expression des différentes aquaporines dans des feuilles préalablement traitées avec les inhibiteurs calciques ainsi que le filtre anti bleu, des analyses de PCR en temps réel ont été menées. Pour la validation de l'AFLP, seulement 30 TDFs ont été ciblés, leurs amorces correspondantes ont été dessinées (tableau III) et enfin étudiés selon la cinétique lumière suivante: 0, 5min, 10min, 15 min, 30min, 1h, 2h et 2h après le retour à l'obscurité.

D'autre part, le profil d'expression de 4 aquaporines PIP1 (*JrPIP1.1*, FJ971053 ; *JrPIP1.2*, FJ971054 ; *JrPIP1.3*, FJ971055 ; *JrPIP1.4*, FJ970489) et 6 aquaporines PIP2 (*JrPIP2.1*, AY189973 ; *JrPIP2.2*, AY189974 ; *JrPIP2.3*, FJ971056 ; *JrPIP2.4*, FJ971057 ; *JrPIP2.5*, FJ971058 ; *JrPIP2.6*, FJ971059) a été étudié au cours d'une cinétique lumière, aussi dans des feuilles traitées aux inhibiteurs calciques, au filtre anti bleu et des feuilles témoins correspondant à 1h d'exposition à la lumière (K_F maximale). Les amorces des différentes *JrPIP* figurent dans le tableau III.

Le gène de référence utilisé pour la normalisation de la quantité de transcrits des gènes cibles est le gène 18S de *Juglans regia* (AF399876).

La synthèse d'ADNc simple brin est réalisée sur 2µg d'ARN_{tx} en utilisant le kit superscript III (invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Un premier mélange réactionnel constitué de 4µl d'ARNtx à 0.5µg/µl additionnés de 1µl d'oligodT, 1µl de dNTP et de 4µl d'eau DEPC, est incubé pendant 5min à 65 °C puis 2min dans la glace. Un deuxième mélange constitué de 2µl de tampon 10X, 1µl RNase OUT (40U/µl), 4µl de $MgCl_2$ (25mM), 2µl de DTT (0.1M) et 1µl SuperScipt III RT (200U/µl), est rajouté au premier mélange ensuite incubé à 50 °C pendant 1h30 puis à 75 °C pendant 10min. Finalement, le restant d'ARNtx est traité avec 1µl RNase H (2U/µl) à 37 °C pendant 20min.

Tableau III : Liste des amorces utilisées pour les PCR en temps réel.

gène	*amorce sens*	*amorce anti sens*	*Tm (°C)*
PIP1DF/PIP1DR	CTCMGGWGGRCACATCAACCC	GMAGDGCAGCDCCAA TGAA	52
PIP2DF/PIP2DR	CCTCMGGWGGRCATAAACCC	GMAGDGCAGCDCCGATCAA	52
PIP1SF/PIP1SR	TACACYAARGGTGATGGCCTTGG	GTTATGGGGATGGTAGCCA	54
PIP2SF/ PIP2SR	GGRTTTGCTGTGTTYATGGT	AATGGNCCAACCCAGAAYATCCA	54
FsPIP2SF	GAATTTGCGGTGTTCATTGT		54
Race 3'	GCAAGCTTGAATTCGCTTT		52
JrPIP1.1	GGCACAGCTGCTCAGACAG	CCCACACTTTTACACTTACTG	60
JrPIP1.2	GGGAGCCGCCAGTACGGA	CCCAACCGAGGTCCTTGTC	52
JrPIP1.3	GGCGCCAATACTATAAGCAAG	ATCATTTAGACTTGAATGGACG	52
JrPIP1.4	TCGACCCAGGTAAAAATAAGTG	CTTACGTACTCGCCCTTCAA	52
JrPIP2.1	GCACTTTGATGTGGTTTGGG	CATGCACGAATGGACTGAGG	58.5
JrPIP2.2	CCCCTCTGCTCACCGATTTA	TAGGCAAATGGACATCCTCG	58.5
JrPIP2.3	GTCCAGAGTTCTGCCCCC	ACTTCTGAAGGAACCTAGAGCCTTA	60
JrPIP2.4	GGTACAAGAAGTCCGGACC	CAGAGTTGGTTCCACCACCAAGTGT	56
JrPIP2.5	CTACAAGAAGTCCGCGGATCC	CTGAGTTGGCTCCGCCACCCTGCGC	52
JrPIP2.6	CATACCAAGACTTCCAACCCC	AAGGACTACCTGCACCCACC	52
Jr 18S	GGTGGGGGTGTAATGCCCCC	CGCGGGATTCTGCAATTCAC	52/60
JrCAM	CGGTTGCATCACTACCAAGG	CTCAGGGAAGTCAATGGTTCC	53
JrCaBP	GAGAGTTGCTTTTCAATGACCG	CTTGCCGGATGTCATTGTTCC	53
JrCDPK	TAAGAGGCTCCATTGATCCG	TATCGGCCGGGGGGGCTACT	58
JrCIPK	GAATTCGCTAAAGCCAACGAG	TTAGCCTCCACCACTACCAG	53
JrWAK	CAGTTTATAAAGGTGTTTTATCC	CTGAGAAAGTACAAGCACCTCG	52
JrBtbTaz	TCCGAGCGAGTCATTCCAATAC	AGAGGTCCGGTGCGTCGCAC	60
JrPK	CATTAACGACAATCCAAAATC	AAGATGAGGATCAAAGTCGCG	50

JrWRKY	AGTGCACTTATCCCAATTGCC	GAATCCACGTGTCCGTTACC	57.5
JrHSFA4	GGTTGATTCCTTTCTCCGGC	AACGAATGTAGTTCGTAAATGAAG	54
JrHSP70a	ACTGGAAAATTACGCGTACAAC	CGGCCTTCTCCATCTTCTG	53
JrHSP70b	GGCATGGAGCTGAAAAGGAG	GTTTGGTCGTCCTCGACGG	53
JrCDase	TACACTGAGAATGGCGAGC	CAGATGGACCTGGAGCTTTTG	61
JrXTR	AGTCTATCTCATCCCACAACG	CAACTCCCAGAACGAGTATTT	53
JrAUXFT	CGTTCACAACATGCAAACTCC	AGACTGCGTACCAATTCAGC	55 .5
JrRAV1	CCAAAGCTGAGATTGTGGAC	GAAGGAATTACCGAGAAATCC	54
JrMAPK	TTCACCGATGTTTACATTGCC	ATCTTAAGGTCACAATTTGCATTC	61
JrTransd	AGCAGAGATTCTGAGATGC	GCTGTGCTGTCAAATGATGC	58
JrFAR7	CGGATTGGTCAATTGTTTCGTT	GCTCCACAACCTACTCTTGAAG	52
JrAOC	AAAGCACAAACGCCAGTGCC	CTTCTACACGTTTTACCTCAAG	54
JrPlastoQ	CGAATATGATATTTTCTGGGCA	AATTCTAAATTGTAGCCAAGCATC	53
JrUSP	GAATTCAGTGATGGCAAGAGCTG	GTAGTCGCTCACACTCCCAAGC	60
JrAmilase	CTGCTTCCATGGCTCCTGG	GGGGAGATCATCGGAATGC	54
JrRUB	CTATTGGGATGTACTATTAAACC	CTCATCATCTTTGGTAAAATC	47
JrATPase	GGGTCGAGATACTACCGGTC	CAGGCGCAGATCTATGAATAG	52
JrPSII-d1	GTGCTTGGGAGTCCCTAATG	CAGAAGTTGCGGTCAATAAGG	53.5
JrARF1	CACTCACTCCGTCAACGCC	CTACAGGTAGTAACGATGATGTC	58
JrSYP121	GATGAGTCCTGAACGGCGG	GTATAGTGTCCATAACTCTTCC	57.5
JrRING1	CAGGGTTCCTCTTCCCCC	CACACTTCGAGATCTTCTCC	60
JrRING2	CAGCACAGCTCCATCATCAAG	CACACTTCGAGATCTTCTCC	60
JrARM	CGGATTATCGACGACACCGA	CGAGCTGGGCGGACATTTTG	54

L'amplification PCR en temps réel est réalisée en utilisant un thermocycleur iCycler iQ (Bio-rad, Hercules, CA, USA) (Fig. 14), dans un volume final de 30µl en additionnant :

- 3µl d'ADNc dilué 20 fois
- Tampon 10X 3 µL [1 X final]
- DNTPs (10 mM) 0.6 µL [0.2 mM final]
- Amorce sens (10 µM) 0.6 µL [0.2 µM final]
- Amorce anti sens (10 µM) 0.6 µL [0.2 µM final]
- $MgCl_2$ (50 mM) 1,2 µL [1.5 mM final]
- Taq polymerase platinum (invitrogen) 0.1 µL [0.5unité final]
- SYBR Green I * 0.3 µL [dilution 10^{-5} final]
- Eau stérile qsp30 µL

Le SYBR Green I (Sigma) est dilué au 1/1000ème dans 20% DMSO.

Le programme thermocycleur est le suivant: une dénaturation de 3min à 94 °C, suivi de 35cycles d'amplification (94 °C pour 20s, T°m pour 20s et 72 °C pour 20s).

La quantité relative de transcrits (Qr) est calculée selon la méthode $2^{-\Delta\ \Delta CT}$ (Livak et Schmittgen, 2001) qui est calculée comme suit :

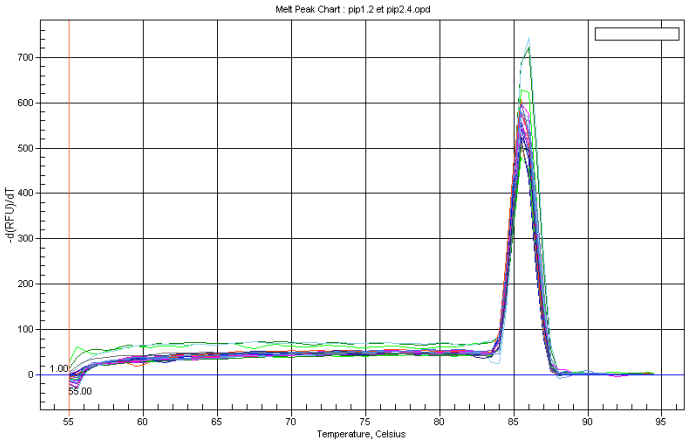
$$\Delta\Delta C_T = (C_{T.cible} - C_{T.18S})_{Temps\ x} - (C_{T.cible} - C_{T.18S})_{Temps\ 0}$$

C_T représente le nombre de cycle de la réaction PCR, le temps x représente chaque point de la cinétique et le temps 0 correspond à 1fois d'expression du gène cible par rapport au gène de référence18S.

Pour chaque gène étudié 3 répétitions techniques de la réaction PCR ont été élaborés ainsi que 2 répétitions biologiques.

A

B



C

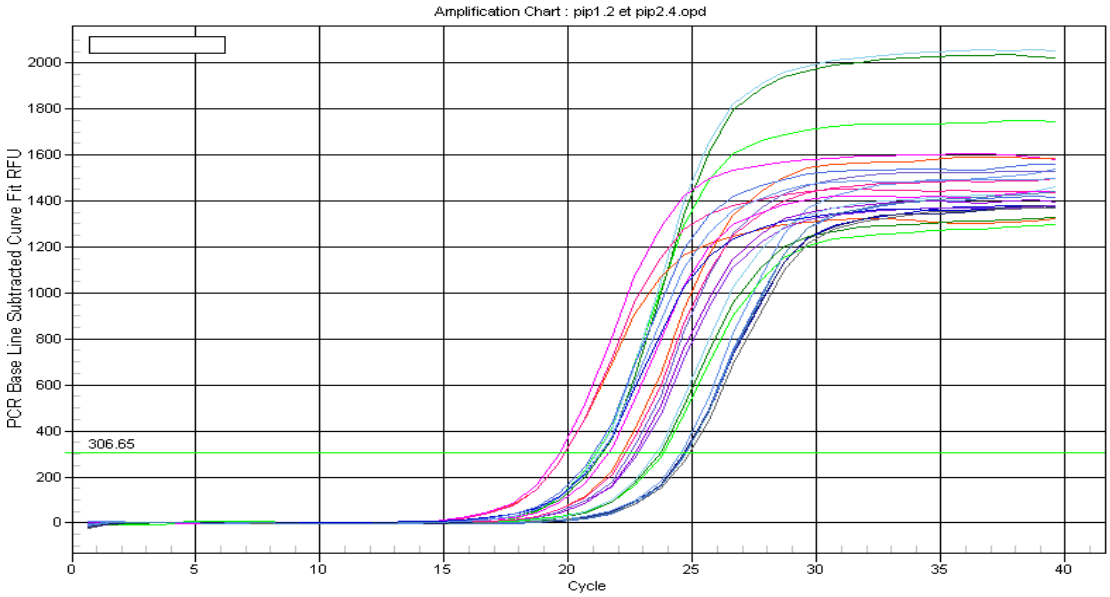


Figure 14 : (A) thermocycleur (Biorad), (B) la courbe de fusion (melt curve) indiquant la spécificité des amorces, (C) exemple d'amplification en Q PCR.

-IV- Méthodes bioinformatiques

L'analyse des séquences nucléotidiques est réalisée en utilisant les fonctions BLASTN et BLASTX de la base de données en ligne http:/www.ncbi.nlm.gov/BLAST. D'autre part, afin d'avoir un maximum d'information, les séquences obtenues par l'AFLP sont comparées aux séquences des EST (expressed sequence tag) de *juglans* valables dans la base de données.

Pour l'étude phylogénétique, chaque séquence d'aquaporine clonée a été traduite en séquence protéique en utilisant l'outil ExPASy proteomics (http://www.expasy.org/tools/dna.html). Les séquences obtenues ont été alignées les unes avec les autres, mais aussi avec les séquences protéiques complètes PIP1 et PIP2 chez *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, et *Vitis vinifera.* Les séquences partielles identifiées récemment chez *Quercus macrocarpa* (Voicu *et al*, 2009) ont été également utilisées dans cette étude.

L'alignement des séquences protéiques est réalisé grâce à l'outil ClustalW (Thompson *et al*, 1994; http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). L'arbre phylogénétique est obtenu en utlisant l'application Tree View (Page, 1996).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 1 :

Etude de la modulation de la conductance hydraulique (K_F) par la lumière chez le noyer (Juglans regia)

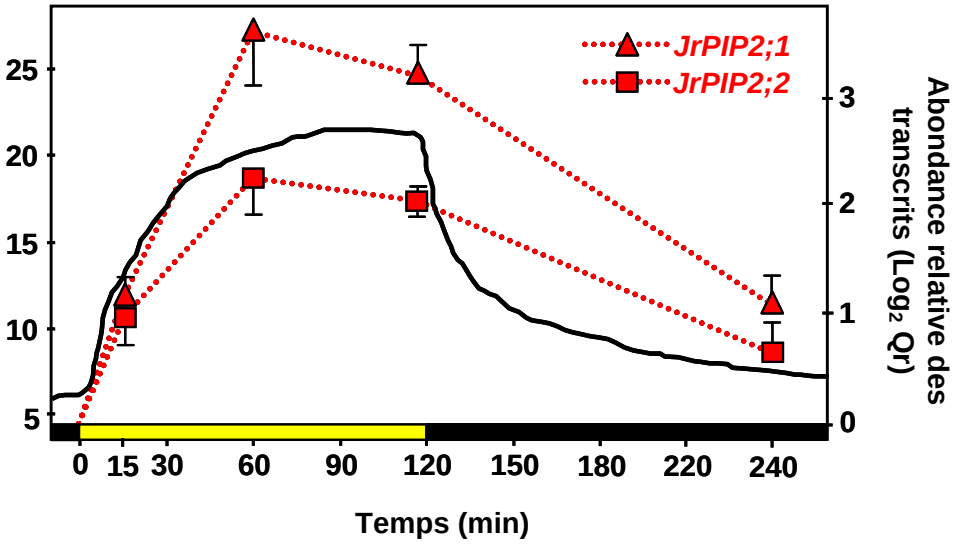


Figure 15 : Réponse de la K_F à la lumière et sa corrélation avec la stimulation des transcrits d'aquaporines chez le noyer (*Juglans regia*).

1-Introduction

Chez le noyer, la conductivité hydraulique de ses feuilles (K_F) est augmentée par la lumière (Cochard *et al*, 2007). Cette stimulation de K_F est accompagnée de l'accumulation des transcrits de deux aquaporines *JrPIP2.1* et *JrPIP2.2* et est indépendante des mouvements des stomates (Cochard *et al*, 2007). Afin de préciser le rôle des aquaporines dans ce processus, nous avons d'abord confirmé la robustesse de cette réponse chez le noyer (Fig. 15). En effet, et en accord avec les résultats précédents (Cochard *et al*, 2007), les transcrits des 2 *JrPIP2s* sont fortement stimulés durant les 15 premières minutes parallèlement à celle de la K_F. Le maximum de stimulation est atteint après 1h d'exposition à la lumière. Le retour à l'obscurité conduit à une diminution des taux de transcrits des *JrPIP2s* ainsi que la K_F.

L'effet de la lumière sur la K_F a été caractérisé chez plusieurs espèces. Cette réponse semble dépendre de l'espèce étudiée et n'implique pas toujours une étroite corrélation entre la stimulation de K_F et la quantité des transcrits d'aquaporines (Martre *et al*, 2002 ; Lee *et al*, 2009 ; Voicu *et al*, 2009 ; Voicu et Zwiazek, 2010). Ces données bibliographiques nous ont conduits à comparer dans les mêmes conditions expérimentales, la réponse de K_F à la lumière d'un certain nombre d'espèces à celle du noyer. Ensuite, nous avons tenté de relier cette réponse à l'accumulation du taux des transcrits d'aquaporines.

2- Comparaison de la réponse à la lumière chez *Juglans regia*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, *Salix alba* et *Populus tremula*

2.1- Effet de la lumière sur la K_F de *Juglans regia, Fagus sylvatica, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula*

Les branches feuillées de noyer (*Juglans regia),* hêtre *(Fagus sylvatica),* saule blanc *(Salix alba),* chêne *(Quecus robur)* et peuplier *(Populus tremula*) ont été prélevées des arbres la veille de l'expérimentation, recoupées à leur base sous l'eau puis maintenues à l'obscurité jusqu'à leur utilisation. Les mesures des K_F respectives ont été réalisées en utilisant la méthode HPFM (Fig. 11, MM, p. 38). Pour toutes les espèces étudiées, les K_F ont été mesurées à l'obscurité et après 2h d'illumination. A l'obscurité, la K_F chez *Juglans regia, Fagus sylvatica et Quercus robur* est faible environ 6, 3 et 2 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} respectivement mais atteint son maximum de 26, 7 et 14 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} au bout d'2h d'illumination (Fig. 16A).

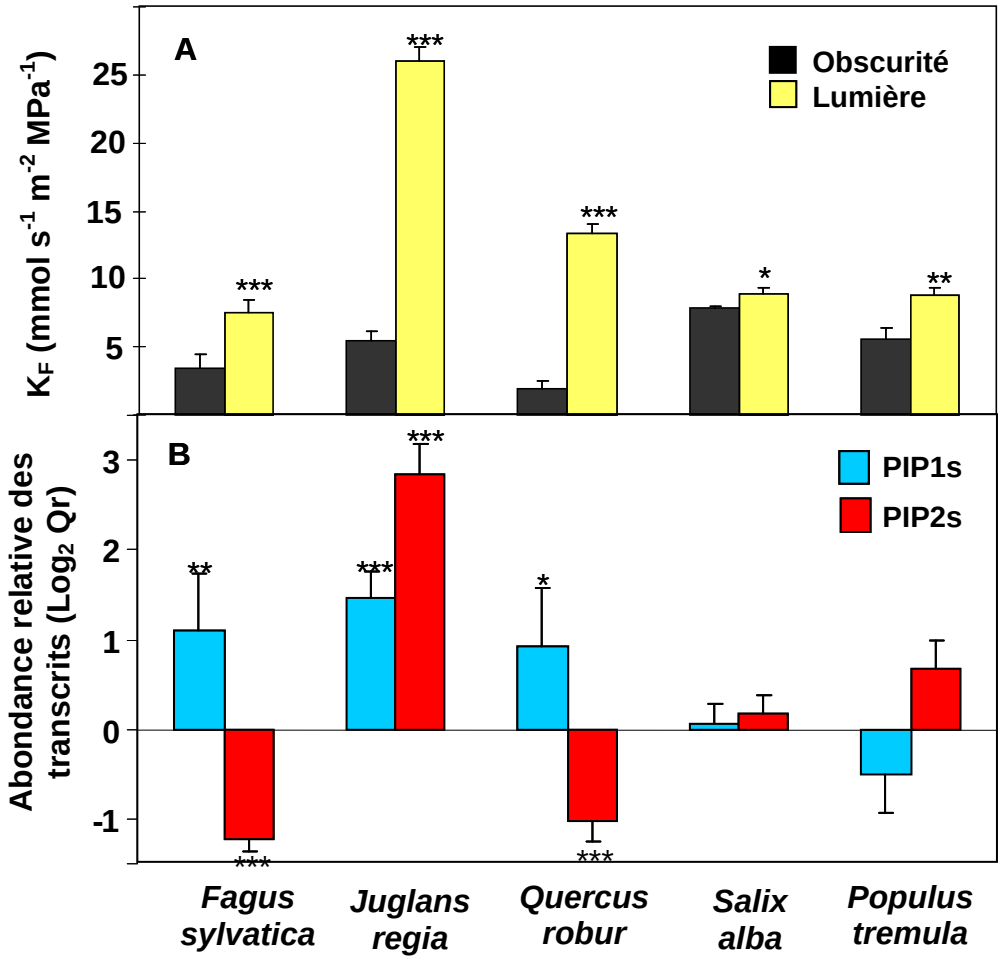


Figure 16 : (A) K_F (mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}) de *Fagus Sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba* et *Populus tremula* à l'obscurité et après 2h d'illumination (B) Abondance relative des transcrits PIP1s et PIP2s chez *Fagus Sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba* et *Populus tremula* à l'obscurité et après 1h d'illumination, déterminée par PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques dessinées dans les régions conservées pour toutes les espèces étudiées. Les astérisques représentent les résultats significatifs (test t-student) (* : 0,01<P<0,05 ; ** : 0,001<P<0,01 ; *** : P<0,001).

Une légère stimulation a été observée pour *Populus tremula* (6 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} à l'obscurité et 9 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} à la lumière). Par contre aucune différence significative n'a été observée pour la K_F de *Salix alba* (Fig. 16A).

2.2- Effet de la lumière sur les transcrits d'aquaporines de *Juglans regia, Fagus sylvatica, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula*

Afin d'établir une relation entre K_F et le taux de transcrits, nous avons comparé les profils d'expression des sous-familles PIP1 et PIP2 chez *Juglans regia*, *Fagus sylvatica, Quercus robur, salix alba et Populus tremula* sous deux conditions contrastées à l'obscurité et à la lumière. Des amorces dites « globales » ont été dessinées, en ciblant des régions conservées et communes pour la plupart des isoformes des espèces étudiées. Ces amorces devraient encadrer des régions spécifiques des sous-familles PIP1 et PIP2, ce qui nous permet de raisonner en terme de populations d'aquaporines et non en terme d'isoformes.

2.2.1- Conception des amorces et amplifications PCR

Les feuilles des différentes espèces ayant servi pour les mesures de K_F ont été débranchées du dispositif HPFM et plongées dans l'azote liquide. Les feuilles sont ensuite broyées, leurs ARNtx ont été extraits et une transcription reverse a été réalisée.

Des amorces dégénérées ciblant la famille PIP1s (PIP1DF/PIP1DR) et la famille PIP2s (PIP2DF/PIP2DR) (MM, tableau III) ont été utilisées pour amplifier des fragments d'ADNc à partir des feuilles des différentes espèces. L'amplification par PCR est réalisée en 40 cycles à partir de 3µl de d'ADNc diluée au $1/40^{ème}$ dans un volume final de 50µl final à une température de 52 °C. Les fragments obtenus ont une taille comprise entre 200 et 300 pb (Fig. 17). Ces fragments ont été ensuite clonés dans le vecteur pGEM T-easy (promega) et séquencés.

Un alignement de séquences a été réalisée pour les séquences nucléotidiques obtenues pour (*JrPIP1, FsPIP1, QrPIP1, SaPIP1, et PopPIP1)* d'une part et (*JrPIP2, FsPIP2, QrPIP2, SaPIP2, et PopPIP2)* d'autre part afin de dessiner les amorces spécifiques globales : PIP1s (PIP1SF/PIP1SR) et PIP2s (PIP2SF/ PIP2SR) (annexes 1 et 2). Pour *Fagus sylvatica* nous avons utilisé l'amorce sens FsPIP2SF (MM, tableau III). La vérification du fonctionnement de ces amorces est réalisée par PCR 40 cycles à 54 °C (Fig. 18).

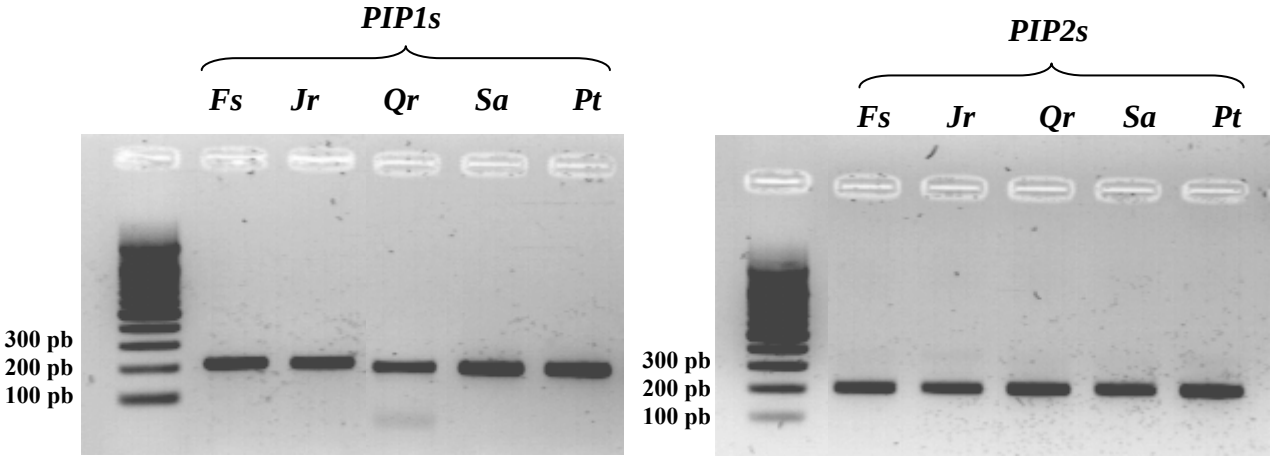


Figure 17 : Amplification PCR 40 cycles à 52°C utilisant les amorces dégénérées PIP1s (PIP1DF/PIP1DR) et PIP2s (PIP2DF/PIP2DR) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X pour *Fagus sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula*.

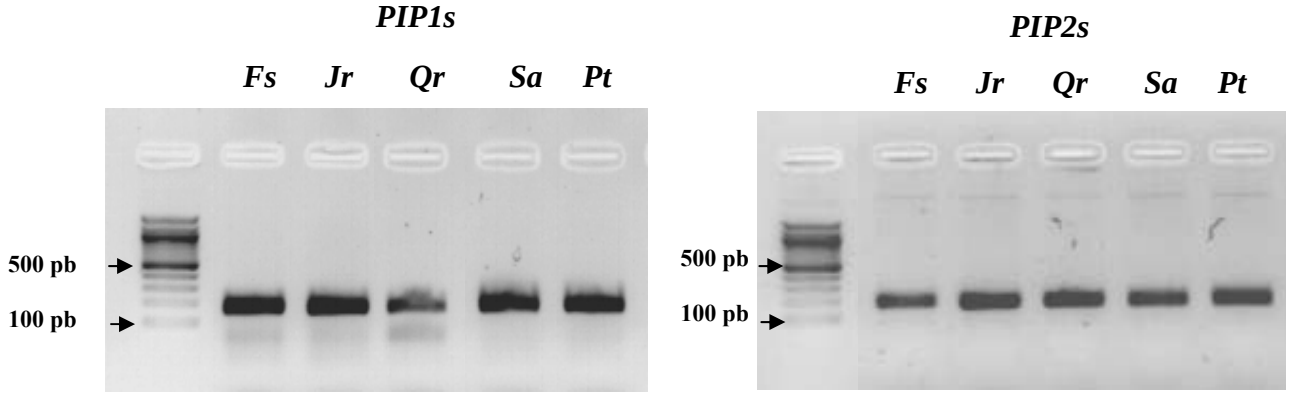


Figure 18 : Amplification PCR 40 cycles à 54°C utilisant les amorces spécifiques PIP1s (PIP1SF/PIP1SR) et PIP2s (PIP2SF/ PIP2SR) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X pour *Fagus sylvatica, Juglans regia, Quercus robur, Salix alba et Populus tremula.*

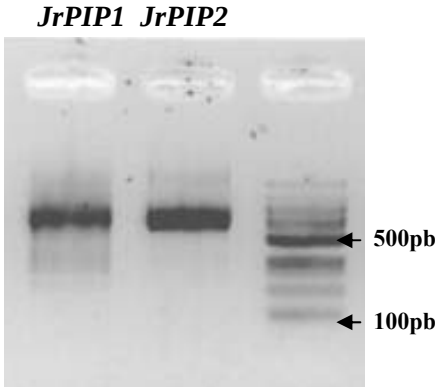


Figure 19 : Amplification PCR utilisant l'amorce PIP1DF ou PIP2DF et l'amorce race3' sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X.

2.2.2- Profils d'expression des différentes *PIP1s* et *PIP2s* identifiées

Afin d'identifier le lien entre les profils de la K_F et l'abondance des transcrits d'aquaporines, une étude comparative par PCR en temps réel des familles PIP1 et PIP2 a été menée à l'obscurité et à 1h de lumière chez *Juglans regia Fagus sylvatica, Quercus robur, Salix alba* et *Populus tremula.* L'étude PCR en temps réel a été réalisée à partir de 3µl d'ADNc dans un volume final de 30µl, à 54 °C et en utilisant les amorces spécifiques PIP1s (PIP1SF/PIP1SR) et PIP2s (PIP2SF/ PIP2SR). Le gène ARNr 18S de *Juglans regia* (AF399876) a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation des transcrits des gènes cibles.

A l'obscurité, pour les différentes espèces étudiées, la faible K_F est associée à une faible accumulation des transcrits *PIP1s* et *PIP2s*. A la lumière, la stimulation de la K_F chez *Juglans regia* est associée à une accumulation à la fois des transcrits *JrPIP1s* (3 fois) et *JrPIP2s* (7fois) (Fig. 16B). Pour *Fagus sylvatica* et *Quercus robur*, seuls les transcrits PIP1s sont augmentés d'un facteur 2 à la lumière. Les PIP2s sont plutôt réprimés à la lumière. Par contre, pour *Salix alba* et *Populus tremula*, à l'exception de *PopPIP2s*, aucune différence n'a été observée pour les transcrits PIP1s et PIP2s entre les conditions obscurité et lumière (Fig. 16 B). Ce résultat indique que contrairement aux autres espèces étudiées, l'effet de la lumière sur la K_F de noyer est significativement corrélé à l'accroissement des transcrits des *JrPIP1s* et *JrPIP2s*. Par conséquent, les feuilles de noyer offre un cadre physiologique robuste pour comprendre le déterminisme moléculaire de l'effet de la lumière sur leur conductance hydraulique.

3- Identification de 8 nouvelles isoformes d'aquaporines chez *Juglans regia* et étude de leur réponse à la lumière

3.1- Conception des amorces

Jusqu'à présent, tous les travaux menés sur la relation entre K_F et les aquaporines chez le noyer ont porté sur deux isoformes d'aquaporines (*JrPIP2,1* et *JrPIP2,2*), initialement isolées de parenchyme de xylème d'un rameau d'un an (Sakr *et al*, 2003). Pour acquérir d'autres informations sur le rôle des aquaporines dans ce processus physiologique, nous avons entrepris l'isolement d'autres isoformes dans les feuilles de noyer exposées à la lumière. Des amorces dégénérées PIP1 sens (PIP1DF) ou PIP2 sens (PIP2DF) et l'amorce race 3' (MM, tableau III) ont été utilisées.

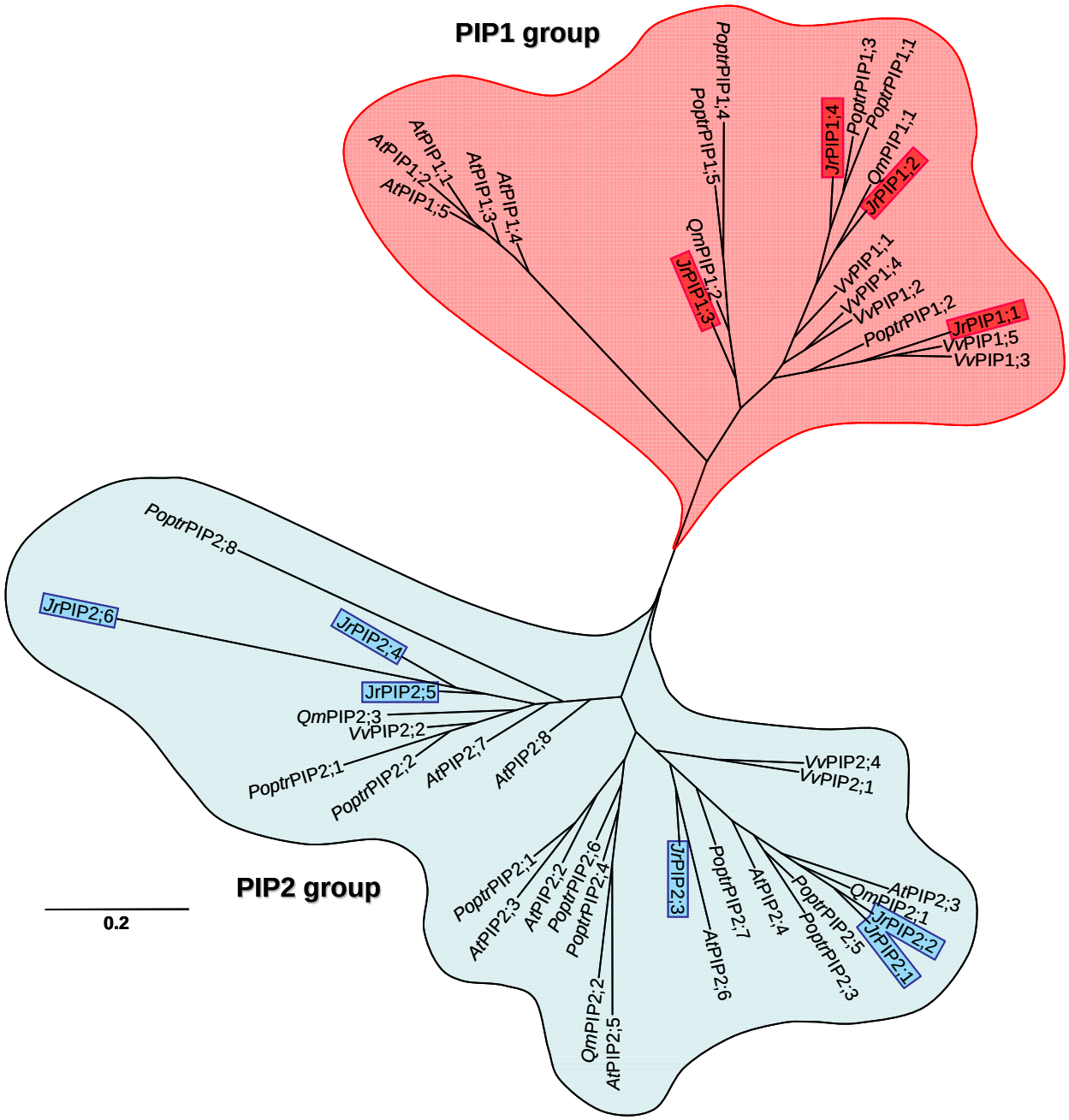


Figure 20 : Analyse phylogénétique des aquaporines PIP1 et PIP2 chez *Juglans regia* (*Jr*), *Populus trichocarpa* (*Poptr*), *Vitis vinifera* (*Vv*), *Arabidopsis thaliana* (*At*) et *Quercus macrocarpa* (*Qm*).

Cette stratégie nous permet de différencier les isoformes d'aquaporines par la séquence nucléotidique de leur région 3'UTR, qui est généralement spécifique de chaque isoforme. Les fragments obtenus qui ont une taille d'environ 800pb (Fig. 19) ont été clonés dans le vecteur pGEM T-easy (promega) en vue du séquençage.

Les séquences nucléotidiques ainsi obtenues ont été alignées avec les deux isoformes déjà identifiées *JrPIP2.1* et *JrPIP2.2* ainsi que des séquences d'aquaporines PIP1 et PIP2 d'*Arabidopsis* (*AtPIP1* et *AtPIP2*) et servit de matrice pour dessiner les amorces spécifiques de chaque isoforme. La spécificité de ces amorces a été testée ainsi que leur température optimale d'hybridation (MM, tableau III). Le gène ARNr 18S de *Juglans regia* (AF399876) a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation des transcrits des gènes cibles.

3.2-Analyse des séquences protéiques des JrPIPs identifiées et étude phylogénétique

8 nouvelles isoformes ont été identifiées, leurs séquences protéiques *Jr*PIPs identifiées présentent les caractéristiques des MIPs (annexe 3). L'analyse phylogénétique de ces séquences montrent que 4 d'entre elles appartiennent à la sous-famille PIP1 des aquaporines et les 4 autres à la sous-famille PIP2 (Fig. 20). Les *4 Jr*PIP1 contiennent 287, 290, 285 et 292 acides amines et présentent une similarité d'environ 87% (Fig. 21). Les 4 nouvelles *Jr*PIP2 contiennent 284, 280, 281 et 239 acides amines et présentent une similarité d'environ 80% avec les séquences protéiques de *Jr*PIP2;1 et *Jr*PIP2;2 (Sakr *et al*, 2003). La similarité entre les *Jr*PIP1 et *Jr*PIP2 est moins de 70% ce qui est en accord avec la nomenclature des PIPs (Johanson *et al*, 2001).

Tous les *Jr*PIP1 présentent une plus longue extrémité aminique (NH_2) et une plus courte extrémité carboxylique (COOH) comparé aux *Jr*PIP2. Toutes les séquences identifiées sont disponibles sous les numéros d'accession suivants : *Jr*PIP1;1 (FJ971053), *Jr*PIP1;2 (FJ971054), *Jr*PIP1;3 (FJ971055) *Jr*PIP1;4 (FJ970489), et *Jr*PIP2;3 (FJ971056), *Jr*PIP2;4 (FJ971057), *Jr*PIP2;5 (FJ971058) *Jr*PIP2;6 (FJ971059).

	***Jr*PIP1;1**	***Jr*PIP1;2**	***Jr*PIP1;3**	***Jr*PIP1;4**	***Jr*PIP2;1**	***Jr*PIP2;2**	***Jr*PIP2;3**	***Jr*PIP2;4**	***Jr*PIP2;5**	***Jr*PIP2;6**
***Jr*PIP1;1**	100	85	87	87	64	65	67	67	66	59
***Jr*PIP1;2**	-	100	85	91	67	67	70	68	67	60
JrPIP1;3	-		100	85	67	66	65	64	64	64
***Jr*PIP1;4**	-	-	-	100	66	67	70	67	67	59
***Jr*PIP2;1**	-	-	-	-	100	98	84	78	78	71
***Jr*PIP2;2**	-	-	-	-	-	100	84	78	79	70
***Jr*PIP2;3**	-	-	-	-	-	-	100	80	80	75
***Jr*PIP2;4**	-	-	-	-	-	-	-	100	94	83
***Jr*PIP2;5**	-	-	-	-	-	-	-	-	100	78
***Jr*PIP2;6**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

Figure 21 : Pourcentage des acides aminés identiques entre les sequences protéiques *JrPIP1s* et *JrPIP2s*. Les pourcentages sont calculés en utilisant l'application NCBI bl2seq algorithm.

3.3-Profils d'expressions des 10 *JrPIPs* en fonction d'une cinétique lumière

Afin de mieux comprendre le lien entre la stimulation de la K_F et l'accumulation des transcrits d'aquaporines à la lumière, les profils d'expression des 10 *JrPIPs* ont été étudiés sur la cinétique lumière suivante: [0-obscurité; 15min-lum; 1H-lum; 2H-lum et obs (1H après le retour à l'obscurité)]. La figure 22 A, montre à nouveau que les feuilles exposées à la lumière, présentent une K_F élevée avec un maximum au bout de 2h d'exposition à la lumière.
Pour toutes les isoformes *JrPIP1s* et *JrPIP2s* identifiées, l'accumulation de leurs transcrits augmentent entre 1h (*JrPIP1,1*; *JrPIP1,2*; *JrPIP1,3*; *JrPIP2,1* et *JrPIP2,4*) ou 2h (*JrPIP1,4*; *JrPIP2,2* et *JrPIP2,6*) d'exposition à la lumière, sauf pour *JrPIP2.3* qui atteint son maximum d'accumulation à 15min de lumière (Fig 22 B, C). La plus forte accumulation a été observée pour *JrPIP2.1* (8 fois). En particulier, la stimulation des transcrits d'aquaporines à la lumière a été plus prononcée pour les isoformes *JrPIP2s* comparé à ceux des *JrPIP1s*.
Quand les feuilles sont remises à l'obscurité, la K_F diminue progressivement jusqu'à atteindre sa valeur initiale. Parallèlement, le taux des transcrits de la plupart des isoformes *JrPIPs* chutent à l'obscurité.

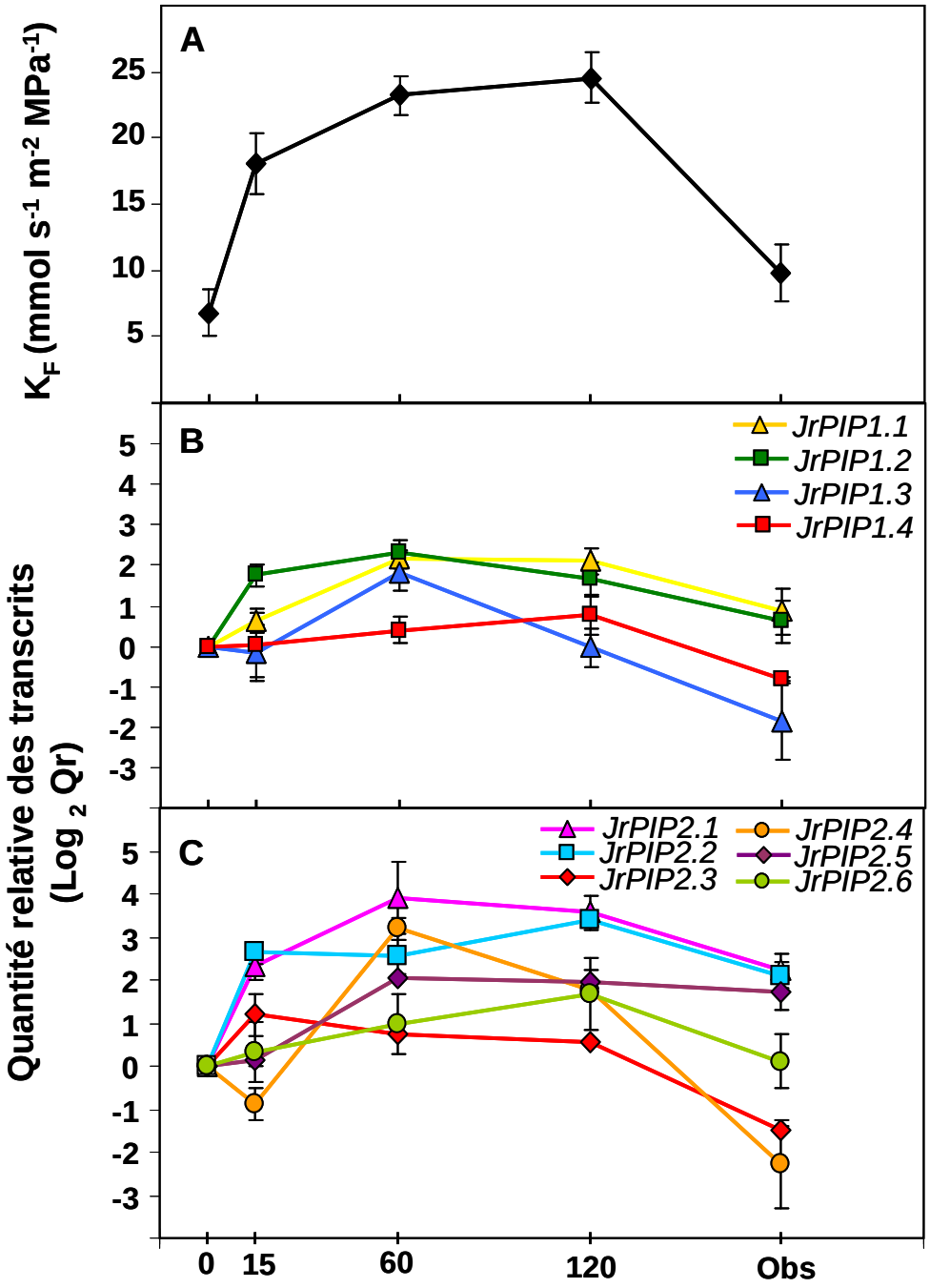


Figure 22 : Evolution de la K_F (A) ainsi que l'abondance relative de 4 *JrPIP1s* (B) et 6 *JrPIP2s* (C) dans des feuilles de *Juglans regia* exposées à différentes durées d'éclairement (0, 15mn, 1h, 2h et obscurité).

4- Rôle de la lumière bleue dans la modulation de la K_F par la lumière

En tant que facteur environnemental, la lumière peut agir sur un processus physiologique soit quantitativement soit qualitativement. Des études précédentes ont montré que la K_F de chêne est régulée par la lumière bleue et rouge (Voicu *et al*, 2008). Cependant, aucune information n'est disponible sur le rôle des aquaporines dans cette réponse. Ici, nous avons caractérisé l'effet de la lumière bleue sur la K_F et la quantité de transcrits d'aquaporines chez le noyer. Le profil de la K_F des feuilles privées de lumière bleue (exposées à la lumière blanche en présence d'un filtre anti-bleu) a été comparé à celui des feuilles exposées à la lumière blanche. Ces mêmes feuilles ont servi pour l'étude des profils d'expression des 10 *JrPIPs*.

4.1- Etude de l'effet de la lumière bleue sur la régulation de la K_F

Deux stratégies ont été adoptées : la première consiste à exposer les feuilles immédiatement après la phase d'obscurité à la lumière en présence du filtre anti bleu et à l'enlever après une heure (Fig. 23A). La deuxième consiste à installer le filtre anti-bleu quand la K_F atteint sa valeur maximale environ après 90min d'exposition à la lumière (Fig. 23B).

A l'obscurité, la K_F est faible et constante dans les feuilles témoins (7 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}), tandis qu'elle augmente immédiatement pour atteindre un maximum de 23 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} quand les feuilles sont exposées à la lumière. L'utilisation d'un filtre anti-bleu pendant une heure réduit significativement la K_F à 8 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}. Cette dernière retrouve sa valeur maximale quand le filtre est enlevé (-LB (1), Fig. 23 A).

Par ailleurs, quand le filtre anti-bleu est utilisé une fois la K_F ait atteint sa valeur maximale à la lumière, cette dernière diminue légèrement et très lentement comparé au retour à l'obscurité des feuilles témoins pour atteindre 18 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} (-LB (2), Fig. 23 B).

La figure 23 C montre que l'utilisation du filtre anti-bleu directement après la phase obscure (- LB(1)), réduit la K_F de 65 % par rapport au feuilles témoins. L'utilisation de ce filtre au plateau pendant la phase lumineuse (-LB (2)) réduit la K_F uniquement de (22 %) par rapport aux feuilles témoins.

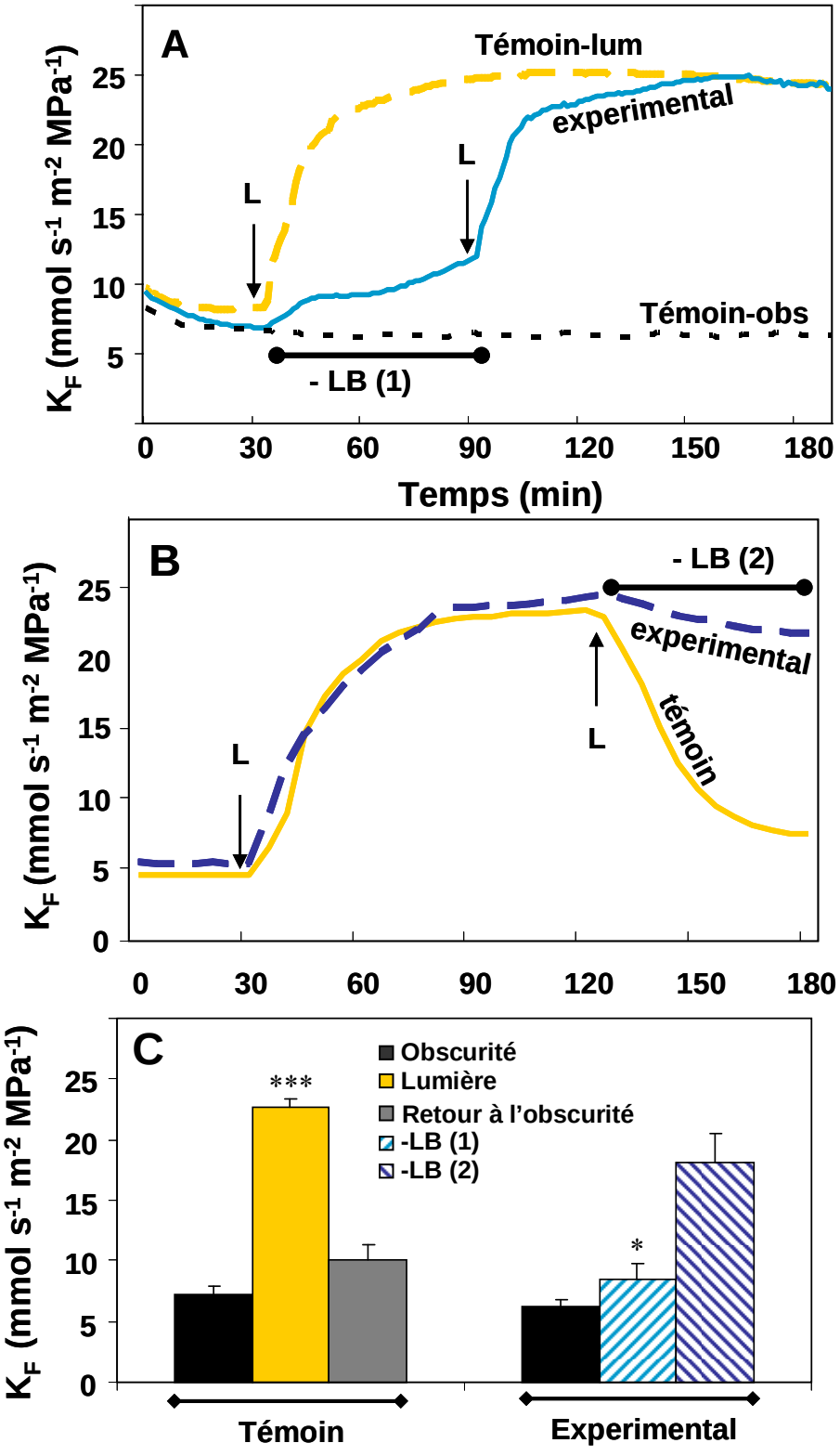


Figure 23 : Effet de l'absence de la lumière bleue sur la K_F des feuilles de *Juglans regia* en comparaison avec les feuilles témoins. Les astérisques représentent les résultats significatifs (test t-student). (A) le filtre antibleu est appliqué pendant 1h après la phase obscure (-LB1). (B) le filtre antibleu est appliqué après 90min d'illumination (-LB2). (C) valeurs de K_F dans les feuilles témoins, les feuilles traitées –LB1 et –LB2.

4.2-Etude de l'effet de la lumière bleue sur la régulation des transcrits des *JrPIPs*

Les feuilles placées sous le filtre anti-bleu (donc privée de lumière bleue) ont été récoltées du dispositif HPFM et ont servi pour l'étude moléculaire. L'accumulation des transcrits des 10 *JrPIPs* a été étudiée dans les feuilles traitées 1h avec le filtre anti-bleu (-LB 1) en comparaison avec l'accumulation maximale des transcrits correspondant à 1h d'exposition à la lumière blanche.

La figure 24 montre, sauf pour *JrPIP1.4*, que les transcrits de la majorité des isoformes *JrPIPs* étudiées sont significativement accumulées à la lumière. Quand les feuilles sont privées de la lumière bleue, les transcrits *JrPIPs* sont fortement réprimés sauf pour *JrPIP2.1* et *JrPIP2.6* qui semblent être faiblement affectés par l'absence de cette qualité de lumière.

Le taux d'accumulation des transcrits *JrPIPs* dans les feuilles privées de lumière bleue est plus faible que le taux basal d'expression à l'obscurité sauf pour *JrPIP1.2*. La plus forte inhibition a été observée pour *JrPIP2.3* and *JrPIP2.5* avec une diminution de 6 et 8 fois respectivement comparé avec le niveau basal d'expression à l'obscurité.

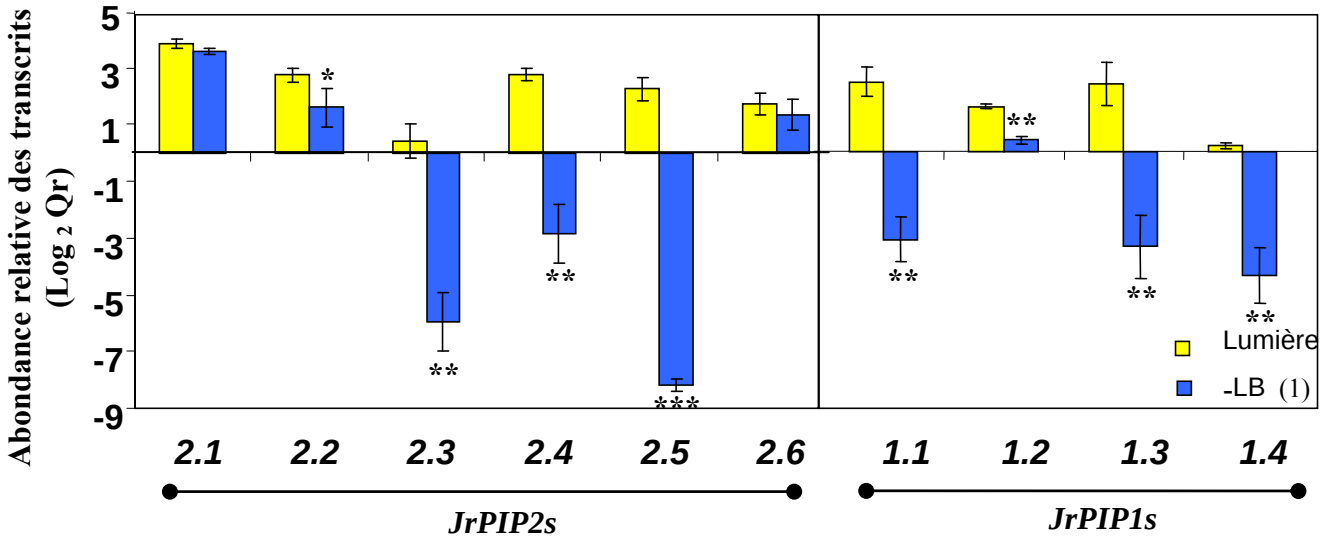


Figure 24 : Effet de l'absence de la lumière bleue sur les transcrits d'aquaporines dans les feuilles de *Juglans regia*. Les astérisques représentent les résultats significatifs (test t-student) (* : 0,01<P<0,05 ; ** : 0,001<P<0,01 ; *** : P<0,001).

5- Discussion

La réponse de la KF à la lumière dépend de l'espèce étudiée

La stimulation de la K_F à la lumière varie selon les espèces (Sack et Tyree, 2005, Sack et Holbroock, 2006) ; elle peut être faible (stimulation de < 1.5 fois) ou forte (de 2 à 7 fois) selon l'espèce étudiée (Cochard *et al,* 2007 ; Sack *et al,* 2003 ; Tyree *et al,* 2005 ; Voicu *et al,* 2008). Ici, nous reportons une forte stimulation à la lumière de la K_F chez *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* et *Juglans regia* (facteur de 7, 3 et 4, respectivement). Par ailleurs, nous observons une plus faible stimulation chez *Populus tremula* (facteur de 1.5) (Fig. 16A).

Aussi, le maximum de stimulation de la K_F varie selon les espèces étudiées, de 7 mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1} chez *Fagus sylvatica* à 26 mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1} chez *Juglans regia*. Selon une étude qui a porté sur 107 espèces a montré, le maximum de stimulation de la K_F à la lumière varie de 0.76 à 49 mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1} (Sack et Tyree, 2005). Ces différences interspécifiques restent encore inexplicables. Des études suggèrent que les différences dans l'intensité de la K_F dépendent de la contribution de la voie xylémienne et extraxylémienne dans la feuille (Sack et Holbrook, 2006). Par exelmple, si la résistance du xylème (R_{xylem}) est une composante majeure comme dans les feuilles de *Quercus rubra* et *Acer saccharum* (Zwieniecki *et al*, 2002, Sack *et al*, 2004), les variations interspécifiques de l'architecture des nervures peuvent expliquer les différences de R_F entre ces espèces. Par ailleurs, si la R_{xyleme} est négligeable comparée à la $R_{extraxylemienne}$, dans ce cas les différences de R_{xyleme} entre les espèces auraient un faible impact sur la R_F totale (Sack et Holbrook 2006). D'autres études ont montré que la R_{xyleme} est du même ordre que la $R_{extraxylemienne}$ (Cochard *et al*, 2004 ; Gascó *et al*, 2004 ; Nardini *et al*, 2005a ; Sack *et al*, 2004 ; Sack *et al*, 2005) et que les espèces diffèrent par leur partage.

Ainsi, les caractéristiques structurales comme la densité, la taille, la géométrie des faisceaux vasculaires et leur arrangement dans les nervures qui sont très variables selon les espèces (Roth-Nebelsik *et al*, 2001), semblent jouer un rôle majeur dans la distribution de l'eau dans la feuille. Par exemple, une forte densité des nervures secondaires correspond à une conductivité hydraulique foliaire élevée, en raison d'une plus grande surface d'échange entre l'eau du xylème avec le mésophylle (Cochard *et al*, 2004), et du transport d'eau à travers de courtes distances en dehors du xylème. (Roth-Nebelsick *et al*, 2001; Sack et Frole, 2006).

La corrélation entre K_F et transcrits d'aquaporines n'est pas générale

La contribution des aquaporines dans le transport d'eau a été reportée dans les feuilles de noyer. Pour cette espèce, le rôle de deux aquaporines du type PIP2 (*JrPIP2.1* et *JrPIP2.2*) dans la stimulation de la K_F à la lumière a déjà été démontré (Cochard *et al*, 2007). Ici, les résultats de la figure 22B et C concordent avec ces derniers travaux et prouvent la participation des deux sous-familles d'aquaporines identifiées chez le noyer dans la stimulation de la K_F à la lumière. Nous avons identifié 8 nouvelles isoformes : 4 isoformes de la sous famille PIP1 (*JrPIP1,1 ; JrPIP1,2 ; JrPIP1,3* et *JrPIP1,4*) et 4 de la sous-famille PIP2 (*JrPIP2,1*; *JrPIP2,2*; *JrPIP2,3*; *JrPIP2,4*; *JrPIP2,5*; *JrPIP2,6*). Pour les 10 *JrPIPs* étudiées l'accumulation de ces transcrits a été observée après 1 à 2h d'exposition à la lumière pour les transcrits des deux familles PIP1 et PIP2 sauf pour *JrPIP2.*3 qui semble être une isoforme précoce (Fig. 22C).

Néanmoins, la stimulation des transcrits d'aquaporines de noyer à la lumière a été plus prononcée pour les isoformes *JrPIP2s* comparé à ceux des *JrPIP1s* (Figs. 22B et C). Il semble que les aquaporines du type PIP1 seraient moins impliquées que les PIP2 dans la stimulation de la K_F à la lumière. Des observations similaires ont été reportées chez d'autres espèces ; la co-présence des PIP1 et PIP2 a été reportée dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Jang *et al*, 2004 ; Postaire *et al*, 2010), de riz (Sakurai *et al,* 2005; 2008), de mais (Hachez *et al*, 2008) et de chêne (*Quercus macrocarpa*) (Voicu *et al*, 2009). Ces aquaporines ont des fonctions différentes et complémentaires dans la feuille. Par exemple, *NtAQP1* assure le transport de glycérol (Biela *et al*, 1999) et la diffusion du CO_2 (Sade *et al*, 2010). Tandis que les PIP2 assurent principalement le transport de l'eau à travers les membranes. Voicu *et al* (2009) a également reporté une faible activité des PIP1 comparés aux PIP2 chez *Quercus macrocarpa*. Le transport de l'eau dans la feuille est aussi augmenté par l'hétérotétramérisation entre PIP1 et PIP2 (Fetter *et al,* 2004 ; Zelazny *et al,* 2007).

Cependant, la corrélation positive entre la stimulation de la K_F à la lumière et celle des transcrits d'aquaporines n'est pas valable pour toutes les espèces étudiées. Chez *Arabidopsis thaliana*, aucune différence n'a été notée quant à la K_F des plantes sauvages et des plantes double antisens dont l'expression des PIP1 et PIP2 a été réduite (Martre *et al*, 2002). Aussi, chez le tabac, aucune différence n'a été notée entre la K_F des plantes sauvages et celle des plantes transgéniques ayant une surexpression de PIP2.5 et PIP1.4 sous deux régimes lumineux (Lee *et al*, 2009). De plus, des études ont montré que la conductivité hydraulique cellulaire diminue dans les feuilles en réponse à une forte intensité lumineuse, probablement par inhibition des aquaporines (Kim et Steudle, 2007, 2009 ; Lee *et al*, 2008, 2009).

Récemment, une étude a montré que l'obscurité stimule les transcrits de certaines PIP dans les feuilles d'Arabidopsis, en particulier *AtPIP1;2* (initialement nommée *AthH2* ou PIP1b (Kaldenhoff *et al*, 1995)), qui assure la majeure proportion du transport de l'eau via les aquaporines dans les plantes cultivées à l'obscurité pour de longues périodes (Postaire *et al,* 2010).

Dans cette étude, la plus grande stimulation de K_F a été observée pour *Quercus robur* et *Juglans regia* avec 14 et 26 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}, respectivement après 2h d'exposition à la lumière. Seulement aucune corrélation n'a été trouvée entre le taux de stimulation de K_F et celle des transcrits d'aquaporines sauf pour le noyer (*Juglans regia*) (Fig. 16B). Chez *Quercus robur* la stimulation de la K_F à la lumière est accompagnée par une inhibition des transcrits de PIP2 alors que les transcrits PIP1 restent constants comparés avec les feuilles témoins (obscurité) (Fig. 16B). Le même profil d'expression a été observé chez *Fagus sylvatica*. L'absence de corrélation entre la réponse de K_F et celle des transcrits d'aquaporines à la lumière a été aussi reporté chez *Quercus macrocarpa* (Voicu *et al*, 2009). Les auteurs suggèrent que les aquaporines ne jouent pas un rôle dans la réponse de la K_F à la lumière, par contre elles contribueraient au maintien de l'homéostasie foliaire sous différentes conditions d'éclairement. De même, la faible stimulation de K_F chez *Populus tremula* semble être indépendante de l'expression d'aquaporines (Fig. 16A et B). Elle serait plutôt liée au métabolisme foliaire et non à la participation des aquaporines (Voicu et Zwiazek, 2010).

Contribution majeure de la lumière bleue dans la stimulation de la K_F et des transcrits JrPIPs

La lumière module l'expression des gènes soit quantitativement soit qualitativement (Girault *et al*, 2008 ; Voicu *et al,* 2008). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à apprécier le rôle de la lumière bleue dans la modulation de la K_F ainsi que les transcrits d'aquaporines chez le noyer par la lumière. L'utilisation du filtre anti-bleu réduit la K_F d'environ 65 % dans les feuilles privées de lumière bleue par rapport aux feuilles témoins exposées à la lumière blanche (8 mmol $s^{-1}MPa^{-1}$ au lieu de 23 mmol $s^{-1}MPa^{-1}$) (Fig. 23C). Ce résultat concorde avec la seule et la première étude qui porte sur l'effet de la qualité de lumière sur la K_F de *Quercus macrocarpa* (Voicu *et al,* 2008). Selon cette dernière étude, la stimulation de la K_F est plus importante en présence de lumière bleue ou verte que les autres longueurs d'onde. Aussi, la réponse de la K_F à la lumière blanche est plus importante que celle de l'une des longueurs d'onde appliquée individuellement (Voicu *et al,* 2008).

Quant à l'accumulation des transcrits *JrPIPs* à la lumière, globalement toutes les isoformes *JrPIP1* et *JrPIP2s* (sauf *JrPIP1.4*) se trouvent stimulées après 1h d'éclairement par la lumière blanche. Dans les feuilles privées de lumière bleue, les taux des transcrits d'aquaporines baissent remarquablement sauf pour *JrPIP2.1* et *JrPIP2.6* dont les taux sont similaires à ceux des feuilles témoins (Fig. 24). L'expression de ces aquaporines serait indépendante de la lumière bleue, elles seraient potentiellement responsables des 35% de stimulation de la K_F en absence de cette qualité de lumière par rapport à l'obscurité.

Aussi, en absence de lumière bleue, la majorité des transcrits d'aquaporines (*JrPIP2,3, JrPIP2,4; JrPIP2,5; JrPIP1,1; JrPIP1,3* et *JrPIP1,4)* se trouvent fortement réprimés ; ceci suggère la contribution majeure de la lumière bleue dans la stimulation des aquaporines à la lumière. Chez *Arabidopsis thaliana* l'expression de l'aquaporine *AthH2* est induite par la lumière bleue. L'activation de son promoteur a été observée dans les tissus subissant une élongation cellulaire tels que la zone l'élongation racinaire, les cellules stomatiques et les cellules des faisceaux vasculaires suite à l'irradiation des plantes avec la lumière bleue (Kaldenhoff *et al*, 1995). Contrairement à la lumière rouge qui ne semble pas avoir un effet sur l'activité de son promoteur (Kaldenhoff *et al*, 1996). Chez le tabac, plusieurs sites de fixation de la flavine (un chromophore qui absorbe la lumière dans les photorécepteurs) ont été identifiés chez *NtAQP1*. La fixation de la flavine à la protéine peut être induite photochimiquement par la lumière bleue, ce qui évoque le rôle potentiel de l'aquaporine *NtAQP1*comme photorécepteur (Lorenz *et al*, 2003).

Des études utilisant des filtres à d'autres longueurs d'ondes en particulier la lumière rouge seraient d'un grand intérêt pour étudier la contribution de chaque longueur d'onde dans la stimulation de la K_F et les transcrits d'aquaporines de noyer à la lumière.

Partie 2 :

Recherche des marqueurs moléculaires précoces accompagnant la modulation de la K_F par la lumière chez le noyer (Juglans regia)

1- Introduction

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à caractériser les mécanismes moléculaires accompagnant la modulation de la K_F ainsi que la régulation des transcrits *JrPIPs* par la lumière chez le noyer. Pour cela, une approche globale cDNA AFLP a été développée sur une cinétique de 2h de lumière avec un retour à l'obscurité, visant à identifier des acteurs moléculaires précoces qui potentiellement pourraient être impliqués dans ce processus.

La technique cDNA AFLP consiste à amplifier des fragments d'ADNc digérés par des enzymes de restriction et à les séparer sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante. L'analyse de l'intensité des bandes générées fournit des données sur le polymorphisme d'expression au cours du temps.

2- Etude sans apriori cDNA AFLP du profil transcriptionnel de la réponse à la lumière

2.1- Echantionnage et extraction des ARNtx

Les feuilles de noyer ayant servi aux mesures de la K_F sont débranchées du système HPFM après exposition à différentes durées d'éclairement (0, 15mn, 30mn, 1h, 2h et obscurité), puis directement plongées dans l'azote liquide pour être stockées à -80°C. Ces feuilles constituent le matériel de départ pour l'extraction des ARNtx.

Etant donné que la qualité des ARNtx de départ constitue un facteur déterminant pour la réussite de l'AFLP, ces derniers sont d'abord dosés au spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000), puis leur qualité a été validée sur gel d'agarose 2% (Fig. 25).

2.2- L'approche cDNA AFLP

Les différentes étapes de la technique cDNA-AFLP sont détaillées dans le chapitre matériel et méthodes. Une mise au point de la technique ainsi que des tests de répétitivité ont toutefois été réalisés. Les ARNtx extraits sont retro-transcrits par double transcription reverse en utilisant une amorce contenant un site de restriction EcoRI (oligodT $_{30}$- EcoRI). Les ADNcdb ainsi obtenus, sont purifiés puis leur qualité est contrôlée par dépôt sur gel d'agarose 1.5%. L'obtention d'un smear d'ADN clairement appréciable entre 0.5 et 4Kb et homogène entre les échantillons témoigne de la bonne qualité de nos échantillons (Fig. 26).

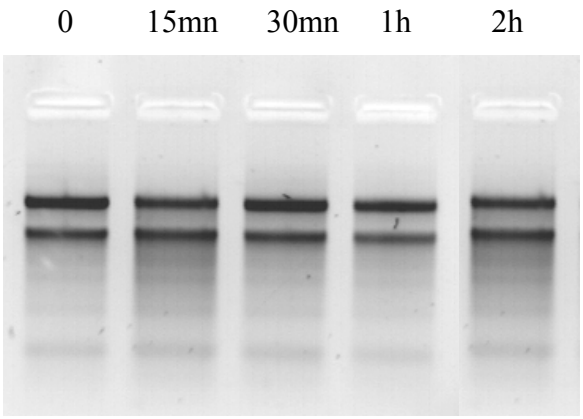


Figure 25 : Profil électrophorétique de 0.5µg d'ARNtx extraits de feuilles de noyer (*Juglans regia*) sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X.

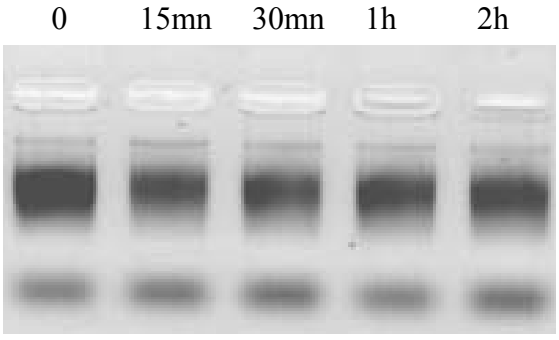


Figure 26 : Profil électrophorétique de 2µg d'ADNcdb purifié ssur gel d'agarose 1.5% dans du TAE 0.5X.

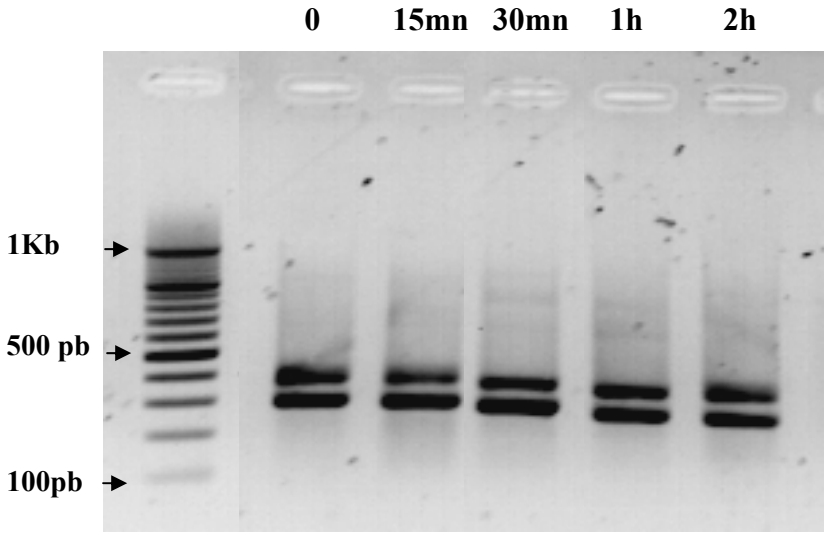


Figure 27 : Vérification d'une amplification non sélective utilisant les amorces Eco 0 et Msp 0 sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X.

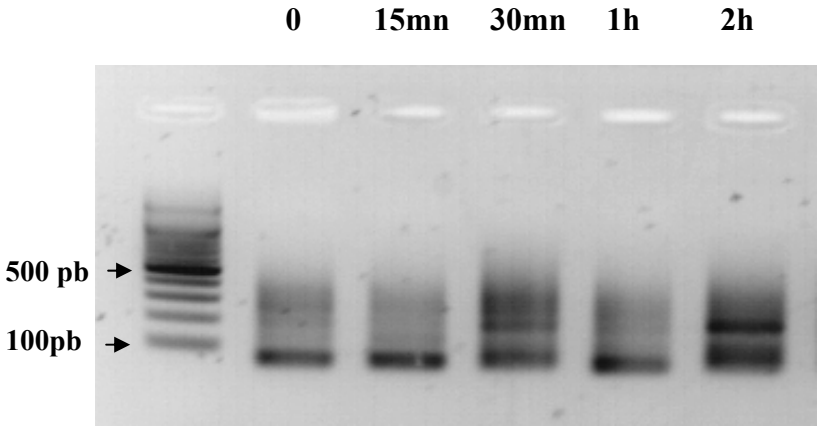


Figure 28 : Exemple d'une amplification sélective utilisant les amorces EcoA et MspI CC sur gel d'agarose 2% dans du TAE 0.5X.

Les ANDc db sont ensuite digérés simultanément par une combinaison de deux enzymes de restriction. Dans notre étude nous avons utilisé deux combinaisons d'enzymes : EcoRI –MseI et EcoRI –MspI. EcoRI est une endonucléase à coupure rare, MseI et MspI sont des endonucléases à coupure fréquente. Cette combinaison d'enzymes de restrictions peut générer trois types de fragments :

- Des fragments MseI-MseI ou MspI-MspI
- Des fragments MseI- EcoRI ou MspI- EcoRI
- Des fragments EcoRI - EcoRI

Afin de s'assurer que la digestion enzymatique a été complètement réalisée, le dépôt des produits de restriction ne doit montrer aucune bande de haut poids moléculaire sur gel d'agarose mais une légère trainée traduisant l'existence d'une multitude de fragments de taille voisine.

La ligation des adaptateurs double brin aux extrémités cohésives générées par la restriction, sert à créer des sites d'hybridation d'amorces pour une éventuelle amplification. Ainsi on peut amplifier un fragment d'ADN sans connaître sa séquence nucléotidique.

Une préamplification non sélective est réalisée en utilisant des amorces correspondant à la séquence des adaptateurs. Celle-ci est suivie par une amplification sélective en utilisant des amorces débordantes correspondant à la séquence des adaptateurs portant des extensions aléatoires de 1 à 2 bases (1base pour EcoRI et 2 bases pour MseI et MspI). Pour chaque couple d'enzyme, 64 combinaisons d'amorces sont possibles. En tout, 128 combinaisons d'amorces ont été utilisées pour notre étude et la qualité des amplifications a été testée sur gel d'agarose 2% (Fig. 27).

Le profil d'un exemple d'une amplification sélective (Fig. 28), montre une trainée foncée et continue correspondant à une multitude de bandes amplifiées et tassées indiquant le grand nombre d'amplifiats qui diffèrent par leur taille et témoignant d'un polymorphisme entre les différents points de la cinétique lumière utilisée.

Les produits d'amplification sélective sont séparés sur gel de polyacrylamide 5% en condition dénaturante puis colorés au nitrate d'argent 0.1%. Les différentes bandes visualisées sont appelés TDFs (transcrits différentiels dérivés). Au total, sur les 16 gels AFLP réalisés, environ 12000 TDFs ont étés générés en utilisant les 128 combinaisons d'amorces, leur taille varie entre 50 et 1300 pb. La figure 29 illustre un exemple type d'un gel AFLP avec 8 combinaisons d'amorce et la cinétique lumière utilisée.

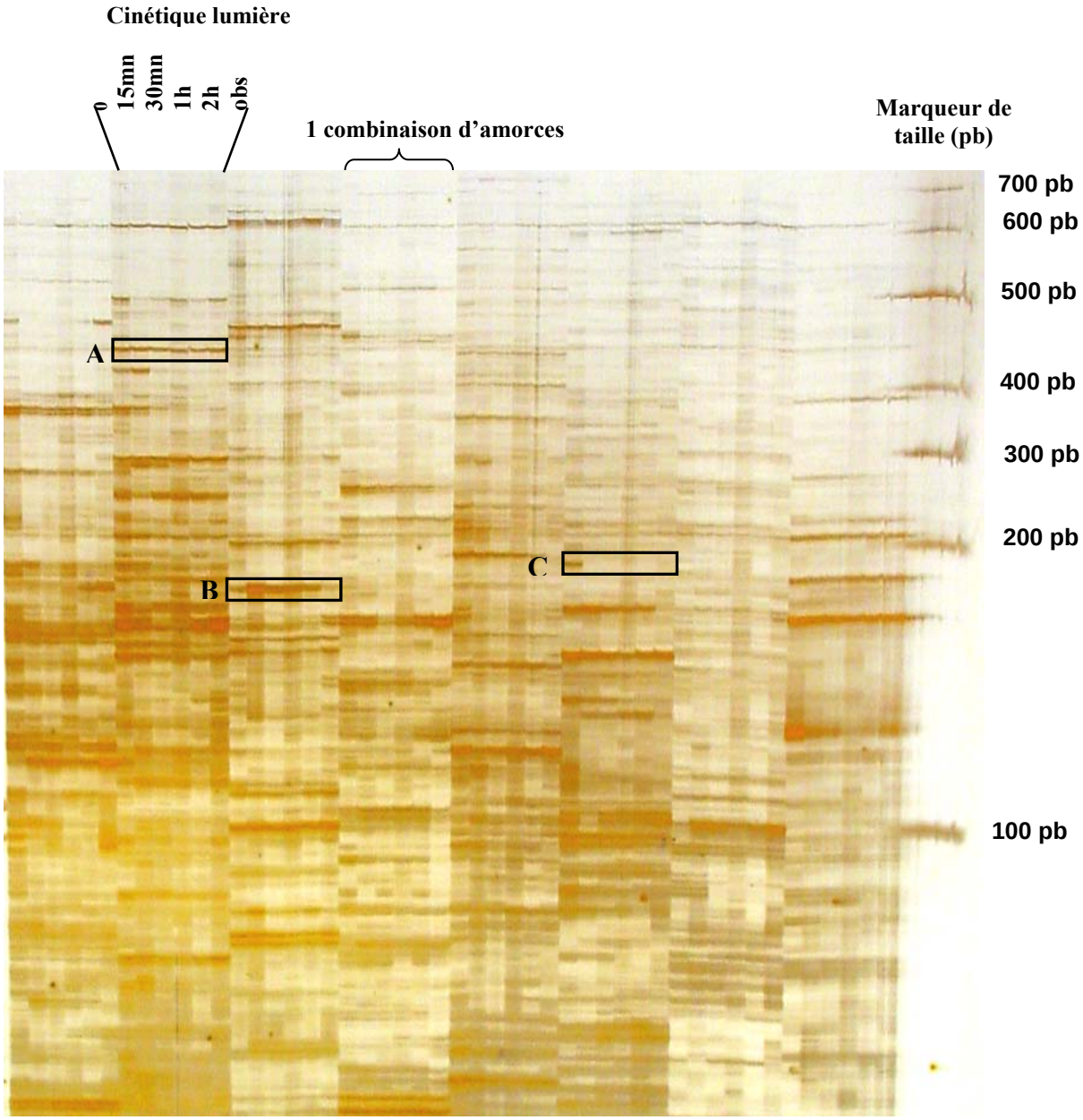


Figure 29 : Exemple de gel polyacrylamide montrant le polymorphisme de taille des fragments d'amplifications grâce à 8 combianaisons d'amorces à partir des feuilles de *Juglans regia* exposées à différentes durées de lumière. (A) marqueur constitutif, (B) marqueur induit par la lumière et (C) marqueur réprimé à la lumière.

L'analyse des gels a montré 592 TDFs différentiellement exprimés selon la durée d'éclairement. 225 TDFs ont été classés comme marqueurs « précoces » dans leur réponse à la lumière (15 et/ou 30min). Parmi les 225 TDFs précoces, nous avons compté 126 marqueurs stimulés et 99 marqueurs réprimés par lumière. Selon cette classification, les bandes AFLP ont été excisés des gels, réhydratés dans l'eau DNase free puis ré-amplifiés par PCR en vue de leur séquençage. La figure 30 montre un exemple de ré-amplification issue d'une suspension de différentes bandes AFLP.

La recherche d'homologies de séquences a été réalisée grâce aux applications Blastn et Blastx. Le Blastn permet de comparer une séquence nucléotidique aux banques de données nucléotidiques ; le Blastx traduit une séquence nucléotidique et la compare aux banques de données protéiques. Au final, l'analyse des séquences nucléotidiques a montré 38 TDFs ayant des séquences redondantes, les 187 TDFs restantes ont servi dans la recherche d'homologies de séquences. La E-value (expectation value) maximale a été fixée à 10^{-4} sauf pour TDF046 qui présente une E-value de 1.1 mais 87% d'homologies avec ATERF5 (ethylene responsive element binding factor type 5) d'*Arabidopsis thaliana* (BAA97157). Toutes les valeurs E-value sont issues de la recherche Blastx sauf pour TDF107 et TDF073 dont les E-value proviennent de la recherche Blastn.

Les séquences des TDFs retenus dans notre étude, sont disponibles dans la base de données nucléotidique GenBank/EMBL. La taille, le profil AFLP, le n° d'accession, la fonction putative ainsi que la E- value sont résumés dans le tableau IV.

Parmi les 187 séquences obtenues, aucune annotation fonctionnelle n'a pu être trouvée pour 47.6 % d'entre elles soit 89 séquences. Parmi ces dernières, 21 séquences avaient des annotations du type « protéines hypothétiques ». Par ailleurs aucune similarité n'a été trouvée pour les 68 séquences restantes (annexe 4) dont 31 gènes stimulés et 37 réprimés par la lumière. Cette absence d'identité peut s'expliquer soit par des nouveaux gènes non encore identifiés soit par l'obtention des séquences très courtes, soit par des séquences localisées dans la partie hautement variable du gène.

De plus, 5 TDFs montrent des homologies de séquences avec des gènes de procaryotes, probablement due à une contamination lors de l'une des étapes de la cDNA AFLP. Les 93 séquences restantes pour lesquelles une fonction putative a été trouvée, ont été classées en 10 catégories fonctionnelles comme suit : métabolisme carboné, métabolisme d'acides gras, métabolisme des dérivés, métabolisme cellulaire, transport, maintenance protéique, transduction du signal, stress et défense, protéines de régulation et maintenance ARN/ADN (Fig. 31).

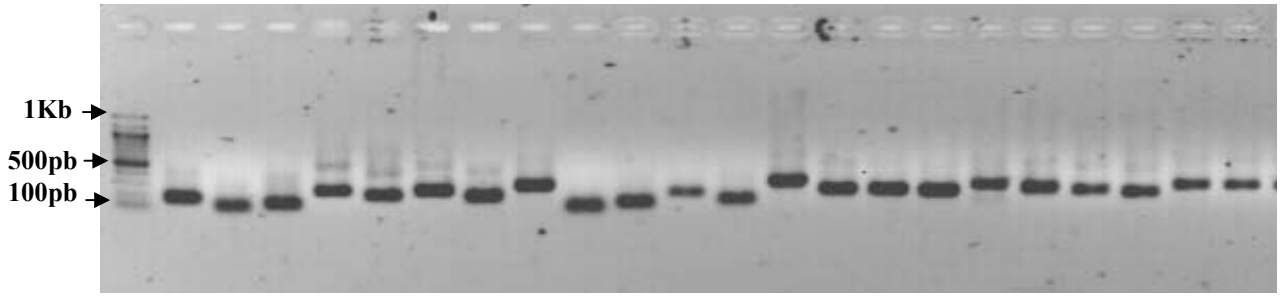


Figure 30 : Vérification de l'amplification de plusieurs bandes récupérées du gel AFLP sur gel agarose 1.5% et dans du TAE 0.5X.

Une grande proportion des gènes différentiellement exprimés selon la durée d'éclairement (20.5%) interviennent dans la transduction du signal. Cette catégorie est suivie d'une importante proportion des gènes intervenant dans la maintenance protéique (15%), la maintenance des ARN/ADN (12.9%) et la régulation protéique (9.7%). Les plus faibles proportions sont représentés par les gènes de stress et de défense (6.4%), le transport (5.4%) ainsi que le métabolisme de dérivés (3.2%).

3-Validation de l'approche cDNA-AFLP

3.1- Sélection de 30 gènes différentiellement exprimés à la lumière et conception des amorces

Afin de valider les profils d'expression à l'issue de l'analyse cDNA-AFLP, 30 gènes ont été sélectionnés selon leur réponse précoce à la lumière, dont 21 gènes stimulés et 9 gènes réprimés par la lumière. Le tableau V résume toutes les informations concernant ces gènes. Les amorces correspondantes (MM, tableau III) ont été dessinées de façon à encadrer la séquence de chaque gène après avoir enlevé la séquence des amorces AFLP et celle des adaptateurs. Quand la séquence obtenue d'un gène est très courte ou ne montre aucune homologie avec des séquences connues, nous procédons à une recherche d'homologie de séquence dans les bases de données EST *juglans*, afin de rallonger la séquence de départ. Cette étape permet à la fois de valider la fonction putative du gène isolé et de disposer d'une séquence assez longue pour dessiner des amorces plus spécifiques. Ceci a été réalisé pour les ADNc suivants :

TDF	Fonction putative	EST juglans
TDF171	RAV/ AP2 domain transcription factor	EL896913
TDF005	Ribulose bisphosphate carboxylase	EL896246
TDF148	ATP synthase beta subunit	EL895584
TDF087	BTB and TAZ domain binding protein	EL895772
TDF121	Heat shock transcription factor protein	EL892172 ; EL899692
TDF104	NADH-plastoquinone reductase	EL893246

Tableau IV : Classification fonctionnelle des TDFs précocement modulés par la lumière dans les feuilles de noyer. La recherche d'homologies de séquence est réalisée en utilisant la fonction Blast X et Blast N.

TDF	*N° d'accession*	*Profil AFLP*	*Taille pb*	*Similarité putative*	*E value*
Métabolisme carboné					
TDF005	GR410238	+	093	Ribulose bisphosphate carboxylase [*Juglans nigra*-AF206785]	6e-10
TDF094	GR410322	+	217	Photosystem II protein J [*Nicotiana tabacum*-NP054513]	7e-08
TDF125	GR410345	+	257	Formate dehydrogenase [*Quercus robur*-CAE12168]	9e-35
TDF150	GR410364	+	220	Photosystem II protein D1 [*Phaseolus vulgaris*-ABH88068]	1e-28
TDF168	GR410375	-	203	Amilase *β*-type [*Cicer arietinum*-CAA07229]	2e-23
TDF169	GR410376	-	134	Xyloglucan endotransglycosylase [*Cucumis sativus*-CAD87536]	3e-11
TDF181	GR410388	-	194	Formate dehydrogenase [*Quercus robur*-CAE12168]	4e-24
Métabolisme d'acide gras					
TDF006	GR410239	+	182	Allene oxide cyclase *[Medicago truncatula*-CAC83767]	1e-12
TDF021	GR410253	+	082	Fatty acid hydroxylase/desaturase [*Ricinus communis*-EEF39915]	3e-05
TDF146	GR410361	+	171	Fatty acid hydroxylase/desaturase [*Ricinus communi*-EEF39915*s*]	4e-05
TDF129	GR410348	+	110	Fatty acid hydroxylase/desaturase [*Ricinus communis*-EEF39915]	3e-13
TDF110	GR410337	+	238	Ceramidase [*Vitis vinifera*-CAO21530]	6e-36
TDF111	GR410338	+	263	Ceramidase [*Vitis vinifera*-CAO21530]	1e-29
TDF114	GR410340	+	203	Sérine C-palmitoyltransferase [*Vitis vinifera*-CAO67084]	8e-26
TDF053	GR410284	-	213	Patatin-like phospholipase [*Vitis vinifera*-XP002282546]	1e-27
TDF215	GR410415	-	302	Triacylglycerol lipase [Arabidopsis thaliana-EEE84272]	1e-06
Métabolisme des dérivés					
TDF034	GR410265	-	058	Maturase chloroplast gene [*Juglans regia*-AF118038]	5e-08
TDF104	GR410331	+	060	NADH-plastoquinone reductase[*Illicium oligandrum*-YP001294275]	4e-05
TDF163	GR410372	-	060	NADH-plastoquinone reductase[*Illicium oligandrum*-YP001294275]	4e-05
Métabolisme cellulaire					
TDF015	GR410247	+	150	NADH dehydrogenase ND1 sub. [*Guizotia abyssinic*-ACB86576]	1e-07
TDF019	GR410251	+	158	Hexose-phosphate guanyltransferase [*Prunus persica*-BAH03300]	5e-20
TDF024	GR410256	+	239	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase [*P. trichocarpa*-AAQ57202]	2e-34
TDF025	GR410257	+	139	Threonine dehydratase/deaminase [*Ricinus communis*-EEF33728]	1e-12
TDF093	GR410321	+	111	Cytochrome P450 monooxygenase [*Pyrus communis*-AAR25996]	4e-06
TDF116	GR410342	+	122	Reticuline oxidase precursor [*Ricinus communis*-EEF32495]	2e-04
TDF148	GR410363	+	158	Chloroplastic ATP synthase [*Juglans mandshu*-AAP88222]	2e-21
TDF178	GR410385	-	383	Alcohol dehydrogenase [*Alnus glutinosa*-CAJ21172]	3e-64
TDF204	GR410407	-	156	Alanine aminotransferase [*Hordeum vulgare*-CAA81231]	2e-10
Transport					
TDF089	GR410318	+	162	Proton-dependent oligopeptide transport [*Vitis vinifera*-CAO63418]	3e-15
TDF119	GR410343	+	176	ABC transporter homolog [*Populus nigra*-EEF10682]	1e-24
TDF130	GR410349	+	259	ABC transporter homolog [*Vitis vinifera*-CAO39997]	7e-20
TDF081	GR410311	+	189	ACT domain-containing protein [*Arabidopsis thaliana*-AAK74028]	3e-24
TDF068	GR410298	-	261	Plasma membrane H^+-ATPase [*Prunus persica*-CAB69823]	1e-26

Maintenance protéique

TDF011	GR410243	+	142	E3 ubiquitin ligase [*Ricinus communis*-EEF35056]	6e-10
TDF147	GR410362	+	249	E3 ubiquitin ligase [*Ricinus communis*-EEF35056]	4e-20
TDF090	GR410319	+	238	E3 ubiquitin ligase [*Ricinus communis*-EEF35056]	7e-27
TDF070	GR410300	+	345	E2-ubiquitin-protein ligase [*Arabidopsis thaliana*-NP174228]	4e-23
TDF143	GR410358	+	325	Ubiquitin-protein ligase [*Ricinus communis*-EEF40124]	7e-27
TDF071	GR410301	+	370	RING-finger copine like protein [*Ricinus communis*-EEF47612]	6e-31
TDF156	GR410368	+	352	RING-finger copine like protein [*Ricinus communis*-EEF47612]	4e-31
TDF077	GR410307	+	247	RING-finger copine like protein [*Ricinus communis*-EEF47612]	7e-32
TDF079	GR410309	+	156	Syntaxin121 (SYP121) [*Arabidopsis thaliana*-NP974288]	7e-11
TDF026	GR410258	+	152	Alpha-1,3-mannosyltransferase [*Mus musculus*-NP064382]	2e-10
TDF225	GR410424	+	206	ADP-ribosylation factor 1 [*Populus trichocarpa*-XM002320238]	2e-35
TDF030	GR410262	+	085	F-box family protein [*Arabidopsis thaliana*-NP568408]	1e-04
TDF191	GR410397	+	138	Armadillo/catenin repeat family protein [*A. thaliana*-NP201421]	3e-08
TDF216	GR410416	-	300	Polyubiquitin [*Populus trichocarpa*-EEE72016]	3e-05

Transduction du signal

TDF012	GR410244	+	107	Homeotic transcription factor protein [*Ricinus communis*-EEF38266]	1e-05
TDF017	GR410249	+	140	Wall-associated kinase [*Ricinus communis*-EEF52934]	4e-11
TDF031	GR410263	+	105	CBL-interacting protein kinase [*Populus trichocarpa*-ABJ91223]	6e-10
TDF075	GR410305	+	254	Calmodulin [*Zea mays*-ACG25844]	1e-25
TDF108	GR410335	+	288	Calmodulin [*Quercus petraea*-CAH57708]	5e-38
TDF083	GR410313	+	223	FERONIA receptor-like[*Vitis vinifera*-CAO49183]	3e-07
TDF084	GR410314	+	080	Beta family G-protein [*Musa acuminate*-AY463016]	8e-10
TDF121	GR410344	+	083	Heat shock transcription factor A4 [*Ricinus communis*-EEF40128]	3e-40
TDF138	GR410354	+	166	Serine/threonine kinase [*Arabidopsis thaliana*-CAB87849]	5e-23
TDF152	GR410366	+	617	Calcium-dependent protein kinase [*Populus trichocarpa*-EEE75232]	3e-15
TDF159	GR410369	+	454	Auxin response factor-like protein [*Mangifera indica*-AAP06759]	6e-10
TDF224	GR410423	+	206	Mitogen-activated protein kinase3 [Solanum lycopersicum-U086227]	7e-48
TDF046	GR410277	-	078	Ethylene responsive binding factor 5 [*A. thaliana*-BAA97157]	2e-02
TDF051	GR410282	-	225	WRKY-type transcription factor [*Glycine max*-ABY84656]	6e-32
TDF222	GR410421	-	449	WRKY-type transcription factor [*Populus trichocarpa*-EEE95882]	6e-25
TDF041	GR410272	-	181	WRKY-type transcription factor [*Vitis thunbergii*-CAP08303]	1e-06
TDF060	GR410291	-	073	Heat shock transcription factor A2-type [*Pisum sativum*-CAA09301]	6e-07
TDF061	GR410292	-	107	Calcium-binding EF-hand protein [*Ricinus communis*-EEF41088]	8e-07
TDF171	GR410378	-	143	AP2 domain transcription factor (RAV1) [*Vitis vinifera*-CAN68564]	3e-11

Régulation protéique

TDF008	GR410240	+	119	FRS7 (FAR1-Related Sequence 7) [*Arabidopsis thaliana*-NP566278]	2e-14
TDF023	GR410255	+	288	ATP-dependent RNA helicase [*Oryza sativa Japonica*-BAD54014]	4e-36
TDF087	GR410316	+	131	BTB and TAZ domain protein [*Ricinus communis*-EEF51878]	5e-08
TDF029	GR410261	+	098	Heat shock protein 70 [*Populus trichocarpa*-EEE70412]	7e-08
TDF064	GR410294	-	223	Heat shock protein 40 / DnaJ homolog [*Salix gilgiana*-BAA35121]	3e-32
TDF170	GR410377	-	334	Heat shock protein 70 [*Oryza sativa* cv.*j aponica*-AAT39165]	1e-16
TDF186	GR410393	-	160	Heat shock protein HSP101 [*Nicotiana tabacum*-AAC83688]	2e-20
TDF201	GR410404	-	067	Heat shock protein HSP17.8 [*Populus trichocarpa*-EEE76050]	2e-04
TDF197	GR410401	-	195	Transducin WD-40 repeat protein [*Vitis vinifera*-CAO64276]	6e-28

Maintenance ADN/ARN

TDF022	GR410254	+	093	RNA-binding protein, putative [*Ricinus communis*-XP002279792]	5e-09
TDF074	GR410304	+	109	CCR4 associated factor 1-related protein [*C. annuum*-ABG66307]	2e-05
TDF134	GR410351	+	089	CCR4 associated factor 1-related protein [*C. annuum*-ABG66307]	3e-05
TDF135	GR410352	+	089	CCR4 associated factor 1-related protein [*C. annuum*-ABG66307]	1e-07
TDF086	GR410315	+	276	DNA-directed RNA polymerase [*Vitis vinifera*-XP002285900]	4e-38
TDF073	GR410303	+	299	Plastid 16S rRNA gene [*Vitis vinifera*-AJ639615]	5e-14
TDF078	GR410308	+	923	Retrotransposon gag protein [*Vitis vinifera*-XP002271436]	6e-33

TDF107	GR410334	+	315	Ribosomal 26S RNA gene [*Juglans nigra*-AF479105]	4e-16
TDF039	GR410270	-	224	Retrotransposon Gag-Pol protein [*Solanum demissum*-AAT38724]	4e-22
TDF047	GR410278	-	226	Retrotransposon protein [*Oryza sativa*-ABF97084]	5e-18
TDF182	GR410389	-	218	Transposase family tnp2 [*Oryza sativa*-AAX95566]	1e-14
TDF196	GR410400	-	212	Reverse transcriptase [*Vitis vinifera*-CAN79321]	2e-24

Stress et défense

TDF010	GR410242	+	186	Cinnamate 4-hydroxylase [*Vitis vinifera*-CAO66538]	2e-30
TDF080	GR410310	+	150	Drought-responsive protein [*Arabidopsis thaliana*-NP849286]	9e-06
TDF097	GR410324	+	087	Cinnamoyl-CoA reductase [*Betula luminifera*-ACJ38670]	2e-04
TDF050	GR410281	-	161	Universal Stress Protein (USP) [*Populus trichocarpa*-EEE82033]	9e-13
TDF045	GR410276	-	160	Senescence-associated protein [*Pisum sativum*-BAB33421]	2e-23
TDF211	GR410412	-	319	Nonsymbiotic hemoglobin [*Alnus firma*-BAE75956]	2e-48

Contamination bactérienne

TDF002	GR410236	+	211	Phosphoenolpyruvate synthase [*P.syringae. Oryzae*-ZP04591238]	2e-32
TDF160	GR410370	+	176	N-acetylglucosaminyltransferase [*Bradyrhizobium* sp-CAD90583.]	2e-04
TDF082	GR410312	+	183	Transposase component [*Pseudomonas putida*-YP709289]	8e-12
TDF098	GR410325	+	178	Hypothetical protein [*Pseudomonas fluorescens*-YP350507]	3e-20
TDF217	GR410417	-	177	Cell wall-associated hydrolase [*Escherichia coli*-ABJ03470]	2e-05

Protéines Hypothétiques

TDF018	GR410250	+	159	Hypothetical chloroplastic protein *[Nandina domestica*-ABI49909]	2e-14
TDF109	GR410336	+	185	Chloroplast membrane protein [*Fagus sylvatica*-AF525759]	8e-23
TDF142	GR410357	+	199	Hypothetical protein [*Ricinus communis*-EEF30461]	1e-20
TDF101	GR410328	+	063	Hypothetical protein [*Vitis vinifera*-CAN82657]	8e-04
TDF202	GR410405	-	105	Hypothetical protein [*Arabidopsis thaliana*-AAL49847]	5e-09
TDF038	GR410269	-	191	Hypothetical protein [*Vitis vinifera*-XP002275129]	1e-09
TDF165	GR410374	-	138	Hypothetical protein [*Ricinus communis*-EEF51999]	2e-06
TDF176	GR410383	-	263	Hypothetical protein [*Vitis vinifera*-CAO64333]	9e-27
TDF172	GR410379	-	182	Hypothetical protein [*Populus trichocarpa*-EEE87280]	1e-11
TDF162	GR410371	-	243	Hypothetical protein [*Populus trichocarpa*-EEE87280]	4e-08
TDF044	GR410275	-	100	hypothetical protein [*Vitis vinifera*-CAN75225]	4e-09
TDF036	GR410267	-	197	Hypothetical Zing-finger protein [*Ricinus communis*-EEF31539]	4e-19
TDF207	GR410408	-	315	Hypothetical protein [*Arabidopsis thaliana*-BAF01964]	2e-53
TDF173	GR410380	-	315	Hypothetical protein [*Arabidopsis thaliana*-BAF01964]	2e-53
TDF185	GR410392	-	167	Hypothetical protein [*Populus trichocarpa*-EEF09401]	7e-16
TDF190	GR410396	-	192	Hypothetical protein [*Vitis vinifera*-CAO14912]	1e-16
TDF194	GR410399	-	352	Hypothetical protein [*Medicago truncatula*-ABO81861]	1e-16
TDF203	GR410406	-	302	Hypothetical chloroplast protein [*Morus indica*-YP762304]	1e-35
TDF209	GR410410	-	252	Hypothetical protein [*Populus trichocarpa*-EEE78734]	2e-24
TDF210	GR410411	-	309	Hypothetical protein [*Ricinus communis*-EEF41177]	1e-07
TDF214	GR410414	-	244	Hypothetical protein [*Populus trichocarpa*-EEE87280]	9e-21

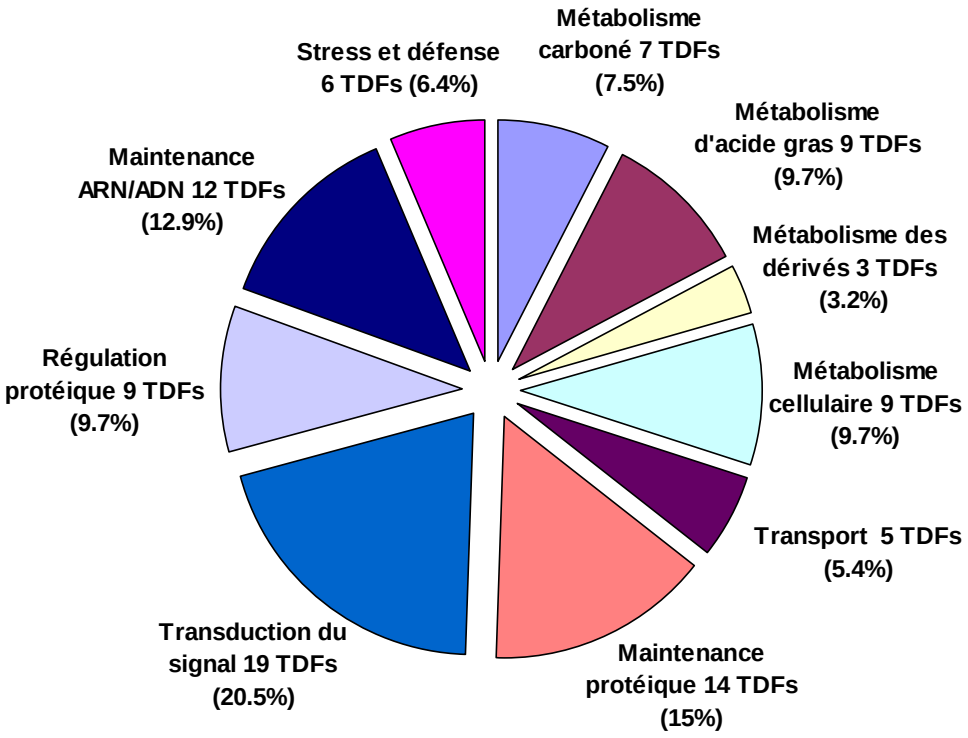


Figure 31: Classification des TDFs ayant une fonction putative connue en 10 catégories fonctionnelles.

Ainsi une validation des profils expressionnels de ces 30 gènes a été réalisée par analyse RT-PCR en temps réel en utilisant la cinétique lumière suivante (0, 5, 10, 15, 30min, 1h, 2h, et 2h après le retour à l'obscurité). Pour tous les gènes étudiés, les profils de PCR en temps réel confirment globalement les résultats de l'analyse AFLP.

3.2- Profils expressionels des 30 gènes sélectionnés

3.2.1- Transduction du signal

Parmi les gènes intervenant dans la transduction du signal, nous avons identifiés 4 acteurs de la signalisation calcique : *JrCAM* (calmoduline), *JrCDPK* (Ca^{2+} dependant protein kinase), *JrCIPK* (CBL-interacting protein kinase) et *JrCaBP* (calcium binding protein). L'accumulation des transcrits de *JrCIPK*, *JrCDPK* et *JrCAM*, est précoce et transitoire ; ces gènes atteignent leur maximum d'accumulation après 15min (6 fois), 30min (3 fois) et 1h (5 fois) d'exposition à la lumière, respectivement (Fig. 32A et B). Leurs taux de transcrits diminuent progressivement pour retourner au niveau basal d'expression après 2h d'exposition à la lumière et restent constants même quand les feuilles sont remises à l'obscurité. En revanche, les transcrits de *JrCaBP* sont fortement réprimés à la lumière (dès 5min de lumière) mais retrouvent leur niveau basal quand les feuilles sont remises à l'obscurité (Fig. 32B).
Parmi les gènes intervenant dans la transduction du signal, nous avons identifiés également les gènes suivants: *JrAUXTF* (Auxin response transcription factor-like protein), *JrPK* (receptor serine/threonine kinase) qui sont fortement stimulés dès 15min de lumière ; tandis que *JrWRKY* (WRKY-type transcription factor), *JrRAV* (Ap2 domain transcription factor RAV1-Type) et *JrMAPK* (mitogen activated protein kinase) sont réprimés à la lumière (Fig. 32A et B)

Aussi, *JrWAK* (wall associated kinase) atteint son maximum d'accumulation à 15min d'exposition à la lumière mais qui est précédée par une légère diminution lors des 10 premières minutes du traitement (Fig. 32B).

3.2.2- Régulation protéique

Pour les gènes intervenant dans la régulation protéique, les transcrits de *JrHSFA4* (heat shock transcription factor), *JrHsp70a* (heat shock protein 70) et *JrFAR7* (FAR1-Related Sequence 7) sont précocement stimulés. *JrFAR7* atteint son maximum d'accumulation à 10min, alors que *JrHSFA4* et *JrHsp70a* le font après 30min d'exposition à la lumière (Fig. 32C).

Tableau V : Informations relatives aux 30 TDFs sélectionnés pour l'étude PCR en temps réel.

Désignation	TDF	Profile AFLP	Fonction putative	N° accession
Jr CAM	TDF108	+	Calmoduline	GR410335
JrCDPK	TDF152	+	Calcium-dependent protein kinase	GR410366
Jr CIPK	TDF031	+	CBL-interacting protein kinase	GR410263
Jr RUB	TDF005	+	Ribulose bisphosphate carboxylase	GR410238
JrATPase	TDF148	+	ATP synthase beta subunit	GR410363
JrAOC	TDF006	+	Allene oxide cyclase	GR410239
Jr HSFA4	TDF121	+	Heat shock transcription factor protein	GR410344
Jr HSP70a	TDF029	+	Heat shock protein 70	GR410261
Jr HSP70b	TDF170	-	Heat shock protein 70	GR410377
Jr WAK	TDF017	+	Wall-associated kinase	GR410249
Jr PK	TDF138	+	Receptor serine/threonine kinase	GR410354
JrARM	TDF191	+	Armadillo/beta-catenin repeat family protein	GR410397
Jr Ring1	TDF071	+	RING-finger copine like protein	GR410301
Jr Ring2	TDF077	+	RING-finger copine like protein	GR410307
Jr FAR	TDF008	+	FAR1-RELATED SEQUENCE	GR410240
Jr CaBP	TDF061	-	calmodulin like	GR410292
Jr Btb-Taz	TDF087	-	BTB and TAZ domain binding protein	GR410316
Jr WRKY	TDF222	-	WRKY-type transcription factor	GR410421
Jr CDase	TDF110	-	Ceramidase	GR410337
Jr XTR	TDF169	-	Xyloglucan endotransglycosylase	GR410376
Jr Transd	TDF197	-	Transducin WD-40 repeat family protein	GR410401
JrRAV1	TDF171	-	RAV/ AP2 domain transcription factor	GR410378
JrPlastQ	TDF163	+	NADH-plastoquinone reductase	GR410372
JrAUXTF	TDF159	+	Auxin response factor-like protein	GR410369
JrMAPK	TDF224	+	Mitogen-activated protein kinase3	GR410423
JrUSP	TDF050	-	Universal Stress Protein (USP)	GR410281
JrAmilase	TDF168	-	Amilase β-type	GR410375
JrPSII-d1	TDF150	+	Photosystem II protein D1	GR410364
JrARF1	TDF22	+	ADP-ribosylation factor 1	GR410424
JrSYP121	TDF079	+	Syntaxin121 (SYP121)	GR410309

D'autre part, les transcrits de *JrTransd* (transducine-like), *JrHsp70b* (heat shock protein 70) et *JrBtbTaz* [a protein with an N terminal BTB/POZ (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac/Poxvirus and Zinc finger) domain, a central TAZ (Transcriptional Adaptor Zinc finger) domain and a C terminal calmodulin-binding domain (CaMBD)] sont réprimés à la lumière (Fig. 32C).

3.2.3- Intégrité de la paroi cellulaire, stress et défense

Les transcrits de *JrCdase* (ceramidase), *JrXTR* (xyloglucan endotransglycosylase) et *JrUSP* (Universal stress protein) sont fortement inhibés par la lumière (Fig. 32D). Le maximum d'inhibition a été observé pour *JrXTR* et *JrUSP* après 2h d'exposition à la lumière, qui retournent à leurs niveaux basaux quand les feuilles sont remises à l'obscurité.

Les transcrits *JrPlastQ* (NADH-plastoquinone reductase) et *JrAOC* (allene oxide cyclase) sont légèrement stimulés à la lumière (Fig. 32C).

3.2.4- Photosynthèse

Les gènes intervenant dans cette catégorie sont précocement stimulés à la lumière et retournent à leurs niveaux basaux après 2h à l'obscurité. *JrRUB* (Ribulose biphosphate carboxylase), *JrATPase* (ATP synthase) et *JrPSII-d1* (protein D1 of photo system II) atteignent leur maximum d'accumulation après 15min d'exposition à la lumière (Fig. 32E).
D'autre part, *JrAmilase* (Amilase β-type) est réprimé à la lumière, le minimum d'accumulation a été observé à 30min de la cinétique lumière (Fig. 32E).

3.2.5- Ubiquitination et Trafic vésiculaire

Les transcrits de *JrARF1* (ADP-ribosylation factor 1), *JrARM* (Armadillo/catenin repeat family protein) et *JrSYP121* (syntaxin 121) sont stimulés à la lumière. Le maximum d'accumulation a été observé pour *JrSYP121* après 1h d'exposition à la lumière (Fig. 32F).
JrRING1 (RING-finger copine like protein) est fortement réprimé à la lumière, alors que *JrRING2* est légèrement stimulé durant les 30 premières minutes puis chute jusqu'à 2h d'exposition à la lumière. Tous les gènes cités dans cette catégorie, retrouvent le niveau basal d'expression à l'obscurité (Fig. 32F).

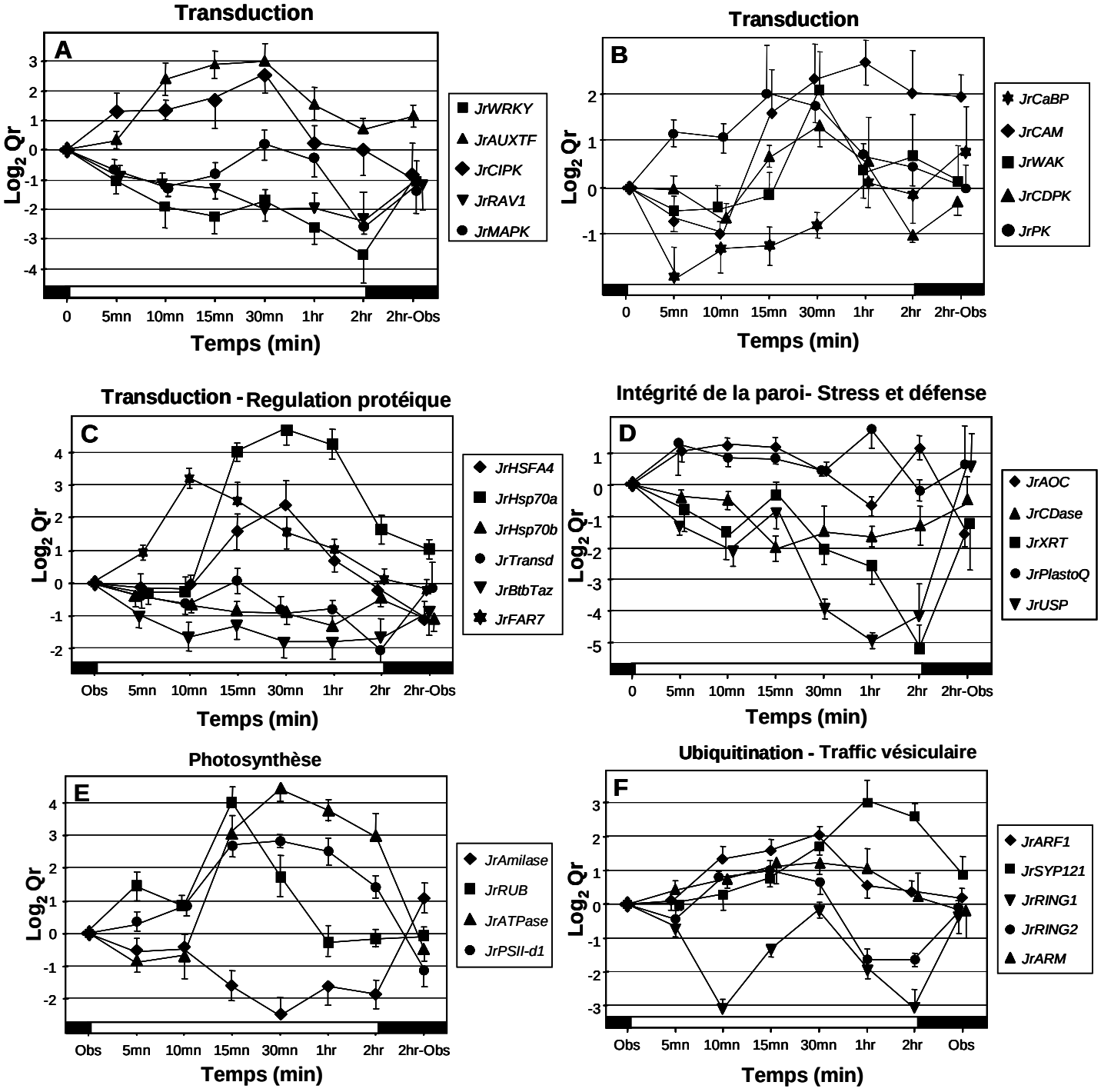


Figure 32 : Profils expressionnels des 30 TDFs sélectionnés de l'étude cDNA-AFLP comme marqueurs précocement régulés par la lumière.

4- Discussion

Dans notre étude, l'approche cDNA-AFLP pourrait offrir une vue large et exhaustive de la modulation du transcriptome dans les feuilles de noyer exposées à la lumière avec haute reproductibilité. Ainsi 93 TDFs ont été sélectionnés pour leur sensibilité à la lumière et leur similarité avec des protéines connues (tableau IV). 10 catégories fonctionnelles ont été identifiées (Fig. 31), démontrant la grande diversité des gènes intervenant dans la modulation précoce par la lumière. Ici nous étudions les liens potentiels entre ces catégories fonctionnelles et la stimulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines chez le noyer.

4.1- Transduction du signal

4.1.1- Kinases et protéines calcium- dépendantes

Un résultat très significatif dans cette étude était l'indentification de TDFs impliqués dans la première étape de transduction du signal notamment les kinases : Wall associated kinase (*JrWAK*); serine/threonine Kinase (*JrPK)*, CBL-interacting protein kinase (*JrCIPK*), Calcium-dependant protein Kinase (*JrCDPK*) et Mitogen activated protein kinase (*JrMAPK*). Ces TDFs constituent la catégorie la plus fortement régulée par la lumière, ce qui pourrait suggérer leur rôle essentiel dans la stimulation de la conductivité hydraulique dans les feuilles en réponse à la lumière.

Plusieurs d'entre eux partagent la propriété d'être associés au calcium, l'un des principaux messagers dans les organismes vivants. Chez les végétaux, l'évidence de l'implication du Ca^{2+} dans la transduction du signal de divers stimuli environnementaux tels que le froid, la sécheresse, le stress mécanique ainsi que la lumière, a été bien documentée (Sanders *et al*, 1999, Harada et Shimazaki 2009). La lumière induit des changements de la concentration de Ca^{2+} dans le mésophylle (Shabala et Newman, 1999) et dans les stomates (Roelfsema et Hedrich, 2010). Ici 4 TDFs impliqués dans la signalisation calcique et codant pour les 4 principaux groupes des protéines fixatrices de calcium chez les plantes [CaM, CaBP, CIPKs et CDPKs (Snedden et Fromm 2001, Luan *et al*, 2002, Sanders *et al*, 2002), ont été identifiés comme régulés par la lumière (Figs. 32A et B). Ces TDFs ne montrent pas les mêmes profils d'expression, suggérant qu'à la lumière des rôles contrastés peuvent être joués. Une régulation transcriptionelle similaire par la lumière a été observée pour les CDPKs (Breviario *et al*, 1995, Saijo *et al*, 1997, Ellard-Ivey *et al*, 1999, Kumar *et al*, 2004), les CBLs (Nozawa *et al*, 2001), les CIPKs (Kim *et al*, 2003) et les CaBP (Delk *et al*, 2005). D'autres

résultats ont montré que la régulation des aquaporines se fait par des mécanismes dépendants de calcium. Ainsi, des fluctuations des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} peuvent affecter l'expression (Maathuis *et al*, 2003) ou l'activité des aquaporines (Johnson et Chrispeels 1992, Johansson *et al*, 1996, Alleva *et al*, 2006, Van Wilder *et al*, 2008).

4.1.2- Facteurs de transcription

On a pu identifier 9 facteurs de transcription précocement modulés par la lumière: un facteur de la sous famille RAV1-AP2domain, un facteur de réponse à l'éthylène de type 5, un facteur de réponse à l'auxine, un facteur de transcription homéotique, 2 facteurs de transcription du type Heat shock (HsfA2 et HsfA4) (voir ci dessous), et 3 facteurs de transcription WRKY (tableau IV, transduction du signal). Parmi ces derniers, les facteurs de transcription WRKY forment une large famille de protéines régulatrices (Eulgem *et al*, 1999, Wei *et al*, 2008), définis comme des régulateurs majeurs de la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Du et Chen. 2000, Pandey et Somossich 2009). Cependant, quelques études ont décrit l'implication de ces facteurs de transcription dans la signalisation de la lumière. La seule étude valable a indiqué qu'une surexpression du facteur WRKY89 améliorerait la tolérance à l'UVB (ultraviolet B) et la résistance aux maladies dans les plantes de riz (Wang *et al*, 2007). Ici nous montrons pour la première fois la répression de 3 TDFs WRKY (tableau IV, transduction du signal), en réponse à l'exposition précoce à la lumière.
Ces nouveaux résultats soulignent l'importance des facteurs WRKY dans la reprogrammation transcriptionelle de la réponse des plantes à la lumière, probablement en agissant comme des répresseurs. Une étude a montré récemment le même profil d'expression des aquaporines et des WRKY sous stress salin (Diédhou *et al*, 2009), ce qui appuierait l'hypothèse de la régulation potentielle des aquaporines via les facteurs WRKY.

4.2- Régulation protéique

4.2.1- Les protéines Hsps (Heat Shock Proteins)

L'effet de la lumière peut s'étendre aux composés impliqués dans la régulation protéique tels que les Hsps (heat shock proteins). Ces partenaires moléculaires jouent un rôle essentiel dans la maintenance et/ou la réparation de l'homéostasie protéique (Baniwal *et al*, 2004) en conditions normales ou de stress chez les plantes (Lee et Vierling, 2000). La modulation de leurs gènes relatifs est sous le contrôle des facteurs de transcription Hsfs (Heat shock factor transcription factors). Dans nos conditions expérimentales, une accumulation

transitoire des gènes codant 5 Hsps (types : 18; 40; 70; 101 KD) et 2 Hsfs (types HsfA2 et HsfA4) a été observée (tableau IV, régulation protéique). Ces résultats sont inattendus vu que les Hsps ont été habituellement étudiés dans le contexte de stress aux hautes températures. Nous avons prêté une attention particulière à 3 d'entre eux: 2 isoformes de protéines chaperones *JrHsp70* qui montrent une modulation contrastée: *JrHsp70a* est stimulé, alors que *JrHSP70b* est réprimé à la lumière, et un facteur de transcription du type *JrHsfA4* qui montre une accumulation différentielle précoce (Fig 32C). La protéine *Hsp70* est impliquée dans les mouvements et la stabilisation des protéines nouvellement synthétisées (Baniwal *et al*, 2004), y compris les canaux protéiques comme les canaux K^+ (Negulyaev *et al*, 1996). Une telle régulation des *JrHsp70* concorde avec l'hypothèse d'auto-répression dans cette classe de protéines chaperones (Kim et Schöffl, 2002). Lu *et al* (2007) ont démontré chez la grenouille, que *Hsp70* coopère d'une manière ATP dépendante avec l'aquaporine *AQP2* en régulant ses mouvements au sein de la cellule.

La stimulation de la conductivité hydraulique à la lumière serait essentielle non seulement pour l'apport en eau et en CO_2 pour les cellules exposées à ce facteur, mais aussi pour le refroidissement des feuilles. Par conséquent, *Hsp70* contribuerait au renforcement de la structure des aquaporines et la sauvegarde de leur transport quand la température des feuilles augmente. Un rôle similaire de *JrHsfA* dans la stimulation de la K_F serait possible vu l'implication de biosynthèse de novo des protéines dans ce processus (Cochard *et al*, 2007).

4.2.2- Autres protéines régulatrices

L'identification de 2 gènes codant pour des protéines régulatrices était d'un grand intérêt notamment : une protéine FRS7 (pour FAR1-related Sequence 7), et une protéine BTB à domaine TAZ. Le premier est stimulé alors que le deuxième est réprimé par la lumière dans les feuilles illuminées (Fig. 32C). La protéine FRS7 est membre d'une famille de protéines nucléaires FRS qui semblent être liées à la voie de signalisation par le phytochrome (Lin et Wang, 2004). Ces derniers interagissent également avec divers partenaires pour contrôler une multitude de processus de signalisation (Wang et Deng, 2002). Ainsi, les protéines FRS sont décrites comme des transducteurs positifs essentiels pour les réponses médiées par le phytochrome A (HIRs) (phyA-mediated FR-High-Irradiance Responses) en réponse à la lumière blanche. L'implication donc de phytochrome dans ce processus physiologique serait possible.

Quant à *JrBtbTaz*, c'est un membre de la sous famille des protéines BTB (Ren *et al*, 2007, Robert *et al*, 2008, Mandadi *et al*, 2009). Le rôle de ces protéines dans les voies de

signalisation de plusieurs stress tels que la lumière, l'état nutritionnel et les hormones a été documenté récemment (Mandadi *et al*, 2009). A cet égard, le gène BT2 chez *Arabidopsis thaliana* est accumulé à l'obscurité et se trouve sous le contrôle du cycle circadien (Mandadi *et al*, 2009). En accord avec ce dernier résultat, nous avons montré que le gène *JrBtbTaz* est réprimé à la lumière et retourne à son niveau basal d'expression quand les feuilles sont remises à l'obscurité. Il serait intéressant de déterminer si ces 2 modulateurs de transduction pourraient interagir, directement ou indirectement avec les facteurs de transcriptions régulant les gènes d'aquaporines.

4.3- Maintenance protéique

4.3.1- Trafic vésiculaire

Une large variété de molécules participant au maintien de l'intégrité cellulaire est transportée depuis le site de leur synthèse (réticulum endoplasmique, RE) jusqu'à la surface cellulaire à travers la voie de sécrétion, un processus majeur des organismes eucaryotes (Hwang et Robinson, 2009). La modification du trafic vésiculaire à la lumière explique la stimulation des gènes tels que *ADP-ribosylation-factor 1(ARF1*) et *SYP121* (syntaxin 121) (Fig 32F). Les protéines ARF1 sont connues pour coordonner le trafic vésiculaire asymétrique et sont d'abord localisées dans l'appareil de golgi et la sous population des vésicules golgiennes (Matheson *et al*, 2008).

De façon intéressante, l'état de stabilité de certaines aquaporines PIPs chez *Arabidopsis* subit un cycle constitutif régulé par les vésicules de clathrine et une intériorisation possible dans la cellule à travers les endosomes Nexin 1 (SNX1) (Paciorek *et al*, 2005, Dhonukshe *et al*, 2007, Jaillais *et al*, 2008). L'utilisation d'inhibiteurs du chargement des protéines transportées des endosomes vers la membrane plasmique serait d'un grand intérêt pour pouvoir appuyer l'implication de cette voie de transport dans la stimulation des *JrPIPs* à la lumière.

4.3.2- la voie ubiquitine- protéasome

La régulation post-transcriptionelle impliquant la voie protéolytique est un processus prédominant utilisé par les plantes pour coordonner les réponses aux signaux internes et externes, en altérant les taux de protéines et leurs activités (Somers et Fujiwara, 2009). Dans cette étude, 11 gènes reliés potentiellement au processus de protéolyse, subissent une stimulation précoce et significative à la lumière. Les plus signifiants d'entre eux sont : un gène codant pour une protéine E2 ubiquitine ligase, un codant pour plusieurs isoformes de E3

ubiquitine ligases, un codant pour une protéine RING-finger copine-like et un autre codant pour une protéine F-box, tous sont stimulés à la lumière (tableau IV, maintenance protéique).

Un gène codant pour une protéine de la famille Armadillo/Catenin repeat family protein (*JrARM)*, est parmi les TDFs modulés par la lumière (Fig. 32F). Ces résultats concordent avec les nouvelles études relatives au rôle du complexe ubiquitine-/ protéasome 26S dans la voie de signalisation de la lumière (Hoecker, 2005).

De plus le rôle de l'ubiquitination dans le fonctionnement des aquaporines a été démontré par Lee *et al* (2009). Ces auteurs ont établit le lien entre l'ubiquitination et le trafic des aquaporines et leurs dégradation, par l'implication d'une interaction physique entre une RING ubiquitine ligase E3 et l'aquaporine (*AtPIP2;1*). Une telle régulation des aquaporines par ubiquitination rappelle la dégradation de l'AQP1 chez les mammifères AQP1 (Leitch *et al*, 2001). Afin de confirmer cette hypothèse dans nos conditions expérimentales, des études pharmacologiques utilisant un inhibiteur du protéasome 26S (MG132) peuvent être envisagées dans le futur.

4.4- Intégrité de la paroi cellulaire

Parmi les TDFs identifiés, l'un montre une forte homologie avec une enzyme jouant un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire : la xyloglucane endotransglycosylase (*JrXTR*) (Fig 32D). L'effet inhibiteur de la lumière sur le taux des transcrits de *JrXTR* jouerait en faveur d'une grande extensibilité de la paroi cellulaire nécessaire pour la turgescence cellulaire. La xyloglucane endotransglycosylase (XTR) est capable de couper et de coller les molécules de xyloglucanes les unes aux autres (Thompson *et al*, 1997, Ito et Nishitani 1999) et ainsi contribuer à la rigidité des parois cellulaires (Hayashi 1989, Fry 1989, McCann *et al*, 1990).

4.5- Photosynthèse

Les feuilles constituent le site de la photosynthèse, qui est contrôlée par les facteurs environnementaux en particulier la lumière. 4 TDFs reliés à la photosynthèse (tableau IV, métabolisme carboné): la ribulose biphosphate carboxylase (*JrRUB*), la protéine J du photosystème II, la protéine D1 du photosystème II (*JrPSII-d1*) et la sous unité beta d'une ATP synthase chloroplastique (*JrATPase*), se trouvent stimulés à la lumière (Fig. 32E). Ces résultats suggèrent qu'il y'aurait un lien entre les mécanismes de régulation de la photosynthèse et ceux de la modulation de la K_F comme précédemment démontré par Brodribb *et al* (2007). Cette hypothèse concorde avec les nouveaux résultats qui démontrent

le rôle d'une PIP chez le tabac *NtAQP1* dans le transport de CO_2 dans les feuilles à travers sa double localisation dans la membrane plasmique et la membrane chloroplastique, *NtAQP1*assure~90 % du transport de CO_2 via la membrane chloroplastique (Flexas *et al*, 2007 ; 2008; Uehlein *et al*, 2008). Il serait intéressant dans le futur d'étudier la corrélation entre la stimulation de la K_F à la lumière avec la stimulation de la photosynthèse et la conductance du mésophylle (g_m) au CO_2 (Evans *et al*, 2009), et si ces événements physiologiques sont couplés à une modulation d'aquaporines chez le noyer.

4.6- Métabolisme des acides gras

Dans le même cadre, nous avons identifié un TDF codant pour une céramidase (*JrCDase*) (Fig. 32D) une enzyme clé dans le métabolisme des sphingolipides et la signalisation (Worrall *et al*, 2008). En coupant les acides gras des céramides, cela produit la sphingosine qui est phosphorylée par une sphingosine kinase pour former la sphingosine-1-phosphate (S1P). La sphingosine et la S1P constituent des messagers secondaires connus chez les plantes. En plus S1P constitue un messager calcique actif dans les cellules stomatiques en réponse à la sécheresse et la signalisation par l'acide abscissique (Ng *et al*, 2001).
La répression de la céramidase à la lumière signifierait que la perception du signal lumineux provoquerait des fluctuations des concentrations cytosoliques du Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) *via* la production de S1P dans les feuilles. Ceci serait en accord avec la régulation de l'accumulation de transcrits de plusieurs protéines impliqués dans la signalisation calcique (Fig. 32B).

Partie 3 :

Rôle potentiel de la signalisation calcique dans la modulation de la K_F par la lumière chez le noyer

1-Introduction

Dans la partie précédente nous nous sommes intéressés à dégager les acteurs moléculaires susceptibles d'être impliqués dans la modulation de la K_F par la lumière. Il en ressort que la plus grande proportion des gènes différentiellement exprimés au cours de la cinétique lumière, seraient des gènes impliqués dans la transduction du signal (20.5%). Une majeure partie de ces gènes sont des acteurs de la signalisation calcique (*JrCAM, JrCaBP, JrCIPK, JrCDPK*). Ces gènes seraient d'une grande importance dans le mécanisme de régulation du taux des transcrits d'aquaporines par la lumière chez le noyer et donc celle de la K_F.

Afin d'estimer le rôle de la signalisation calcique dans cette régulation, nous étudions dans cette partie l'effet d'un inhibiteur des canaux calciques : le Lanthanum ($LaCl_3$) et d'un antagoniste de calmoduline : N- 6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) sur la K_F et sur les transcrits de 10 aquaporines de noyer.

2-Etude de l'effet des inhibiteurs de canaux calciques et de calmoduline sur la régulation de la K_F par la lumière

2-1 Choix de la concentration des inhibiteurs

Ces deux inhibiteurs ont été utilisés à une concentration de 30mM, cette concentration a été choisie, après avoir testée une gamme de concentration (100µM, 300µM, 500 µM, 800µM, 10mM, 20mM, 30mM, 50mM et 100mM). Les concentrations inférieures à 30mM étaient sans effet ou de très faible effet sur la K_F. Les concentrations 50mM et 100mM pourraient être létales pour les cellules, en effet la K_F ne varie pratiquement pas même à la lumière. Pour la concentration de 30mM, un test de réversibilité a été réalisé pour vérifier l'état des cellules et s'assurer de la non-toxicité de la concentration sélectionnée. Ce test consiste à perfuser l'inhibiteur, le laisser agir environ 1h ensuite perfuser de l'eau ultra pure, les valeurs de K_F devraient augmenter et se rapprocher de celles de la feuille témoin (Fig. 33). Une telle concentration élevée peut être expliquée par la taille des feuilles de noyer. Ces dernières sont composées de 5 à 7 folioles et ayant une surface totale d'environ 250 cm^2.

Pour W7 qui est soluble dans 0.5% de méthanol, un test a été réalisé en perfusant des feuilles avec 0.5% de méthanol uniquement. Aucune différence n'a été observée entre la feuille traitée et la feuille témoin. Ceci confirme que l'effet observé sur les feuilles traitées revient uniquement à l'inhibiteur W7 et non au méthanol.

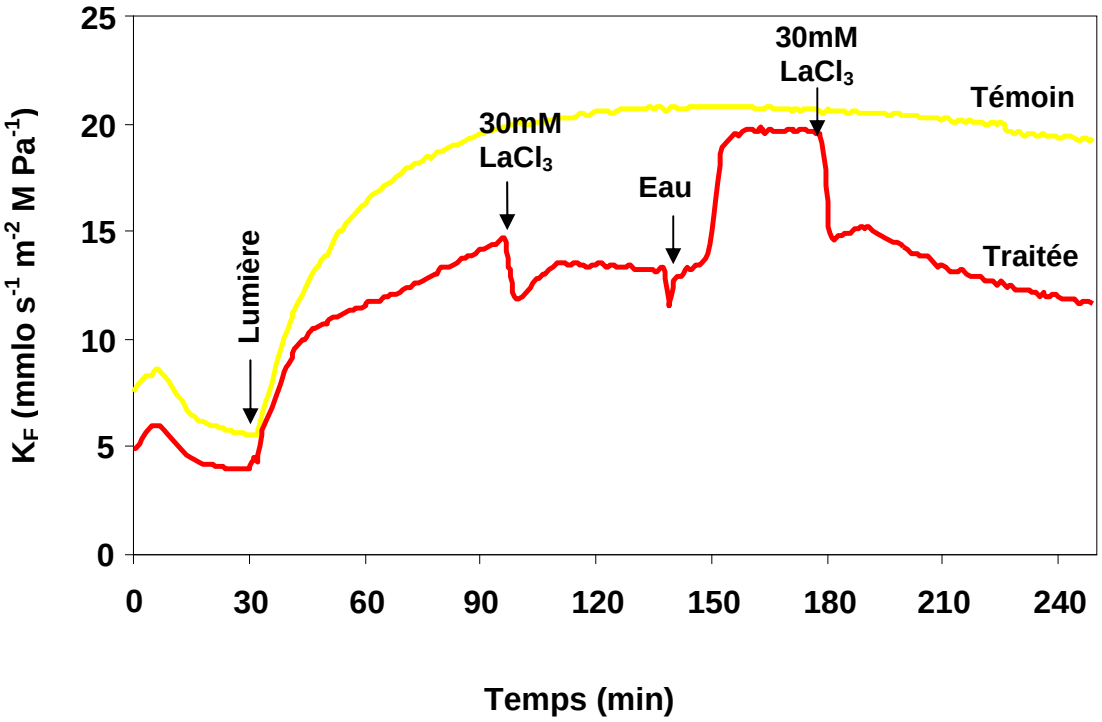


Figure 33 : Test de réversibilité réalisé avec 30mM $LaCl_3$ sur des feuilles de noyer.

2-2 Effets du $LaCl_3$ et du W7 sur la K_F

Deux types d'expérience ont été réalisés : pour la première, les feuilles sont perfusées avec l'inhibiteur ($LaCl_3$ ou W7) pendant une heure à l'obscurité, ensuite les feuilles sont exposées à la lumière tout en les perfusant avec de l'eau ultra pure (Fig. 34 A).

Pour la deuxième, l'inhibiteur est perfusé à la lumière quant la K_F atteint sa valeur maximale environ après 90min d'exposition à la lumière (Fig. 34 B).

Dans les deux types d'expériences, le témoin lumière nous indique que pendant la phase obscure, la K_F est très faible (7mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}) comparée avec celle de la phase lumineuse (23mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1}). Pour les feuilles traitées avec les inhibiteurs calciques, pendant la phase obscure, aucune différence n'a été observée quant à la K_F qui reste constante. Par contre, pendant la phase lumineuse, les feuilles traitées avec ces inhibiteurs montrent une K_F réduite par rapport au témoin : 10 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} pour le traitement $LaCl_3$ et 12mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} pour le traitement W7 (Fig. 34 A).

Aussi, une diminution importante de la K_F a été observée sur les feuilles traitées avec les inhibiteurs calciques pendant la phase lumineuse. La perfusion de chacun des inhibiteurs après 90min d'exposition à la lumière provoque une réduction brusque et rapide d'environ 50% de la K_F durant les 15 premières minutes, suivie d'une légère et lente diminution durant les 40minutes restantes (Fig. 34B).

La figure 34C confirme que la K_F est insensible aux inhibiteurs calciques $LaCl_3$ et W7 pendant la phase obscure. Néanmoins, pendant la phase lumineuse, la K_F se trouve fortement réduite par rapport au témoin : de 48% pour $LaCl_3$ –lumière 1 et 46% pour W7-lumière 1. Quand ces inhibiteurs sont perfusés après 90 min d'exposition à la lumière ($LaCl_3$-lumière 2 et W7-lumière 2), la K_F se trouve semblable à celle du témoin retour à l'obscurité.

2-3 Effets du $LaCl_3$ et du W7 sur les transcrits *JrPIPs*

Il a déjà été montré que la stimulation de la K_F à la lumière est positivement corrélée avec l'accumulation des transcrits de plusieurs aquaporines chez le noyer (Fig. 22). Selon la dernière étude réalisée chez le noyer (Cochard *et al*, 2007), cette corrélation positive a été dévoilée pour deux membres d'aquporines *JrPIP2.1 et JrPIP2 .2*. Dans la présente étude, nous avions voulu savoir si cet effet inhibiteur de $LaCl_3$ ou W7 est bien relié à une régulation de la quantité des transcrits d'aquaporines.

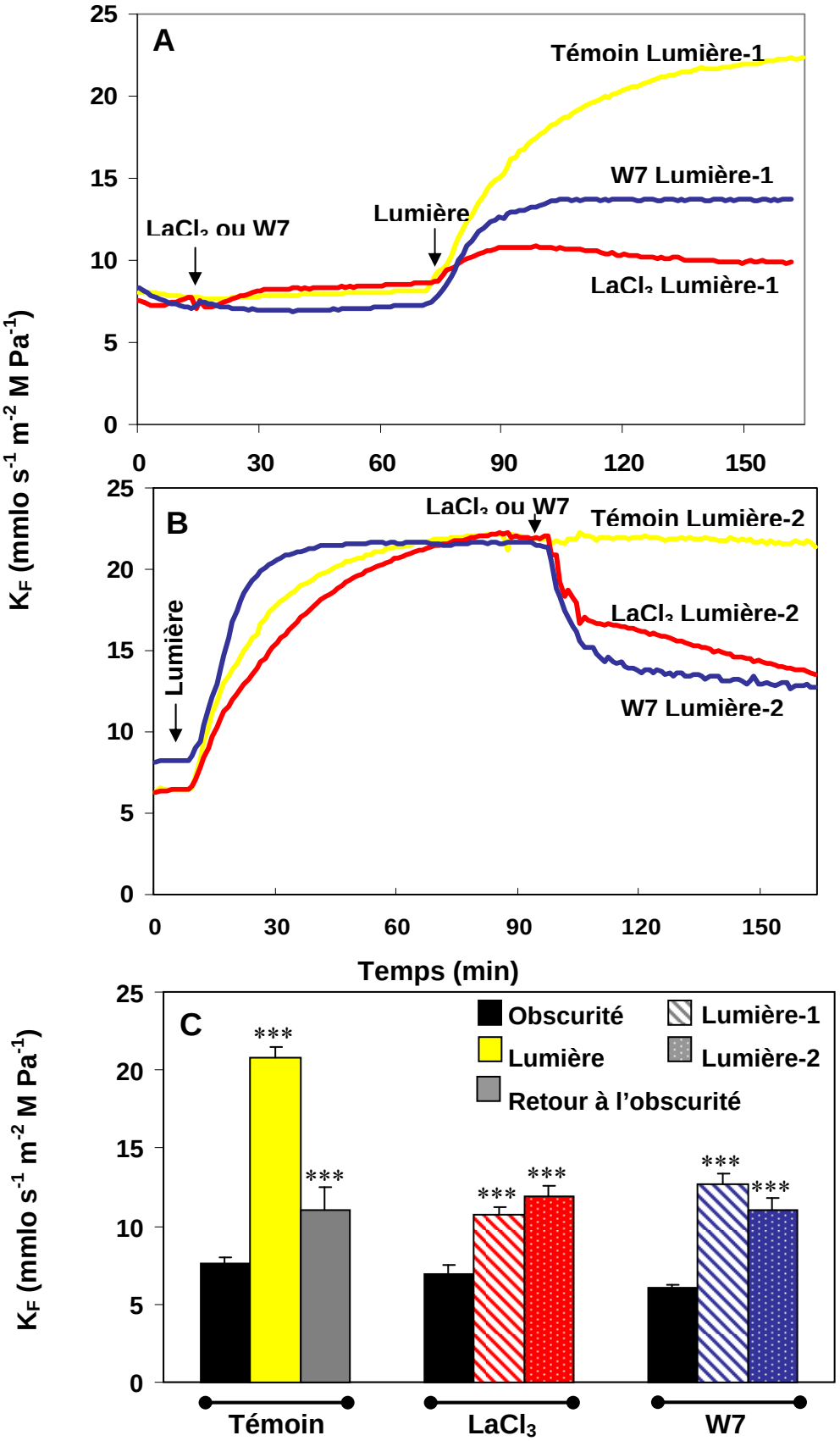


Figure 34 : Effet de 30M $LaCl_3$ ou 30mM W7 sur la K_F chez *Juglans regia* en comparaison avec les feuilles témoins (A) $LaCl_3$ ou W7 sont perfusés 1h avant l'illumination des feuilles (Lumière 1). (B) $LaCl_3$ ou W7 sont perfusés après 1h30 d'illumination (Lumière 2). (C) valeurs de K_F dans les feuilles témoins, les feuilles traits avec $LaCl_3$ ou W7. Les astérisques représentent les résultats significatifs (test t-student) (* : 0,01<P<0,05 ; ** : 0,001<P<0,01 ; *** : P<0,001).

Pour cela, la quantité de transcrit de 10 isoformes d'aquaporines (4 *JrPIP1* et 6 *JrPIP2*) a été étudiée en présence et en abscence d'inhibiteurs calciques. Les feuilles traitées avec l'inhibiteur approprié pendant une heure à l'obscurité, ont été récoltées après une heure d'exposition à la lumière ($LaCl_3$-lumière 1 et W7-lumière 1). Les feuilles témoins perfusées à l'eau ont été récoltées après une heure d'exposition à la lumière. Le point 1h de la cinétique lumière a été choisi pour l'étude PCR en temps réel car il correspond au point où la valeur de la K_F et la quantité des transcrits de la majorité des *JrPIPs* est maximale.

La quantité des transcrits de toutes les isoformes d'aquaporines étudiées (sauf pour *JrPIP1.4*), est significativement accrue à la lumière. Le degré de stimulation des isoformes *JrPIP1.1 JrPIP1.2 et JrPIP1.3* était de 4 fois en comparaison avec le niveau basal à l'obscurité (Fig. 35A). Concernant les isoformes *JrPIP2* : *JrPIP2.1 et JrPIP2.4* étaient les isoformes les plus stimulées à la lumière (10 fois). Le degré de stimulation de *JrPIP2.2*, *JrPIP2.3, JrPIP2.5 et JrPIP2.6* varie entre 3 et 6 fois (Fig. 35B).

Ces données nous ont permis de comparer les taux de transcrits d'auaporines dans les feuilles témoins et les feuilles traitées avec les inhibiteurs calciques. Les résultats de la figure 35 montrent que la quantité de transcrits de la majorité des isoformes d'aquaporines, est réduite dans les feuilles traitées avec 30mM $LaCl_3$ ou 30mM W7 comparée avec celle des feuilles témoins. L'inhibition la plus importante a été observée pour les isoformes *JrPIP1.1*, *JrPIP1.4*, *JrPIP2.2*, *JrPIP2.3*, *JrPIP2.4* pour lesquelles les taux de transcrits sont même inférieurs au niveau basal d'expression à l'obscurité. Les taux des transcrits de *JrPIP1.3* et *JrPIP2.1* sont relativement faiblement réprimés par le traitement $LaCl_3$ mais fortement réprimés par le traitement W7. Un profil contraire a été observé pour *JrPIP2.6*. Finalement, *JrPIP1.2* serait la seule isoforme d'aquaprine insensible au traitement $LaCl_3$ mais faiblement réprimé par l'inhibiteur W7.

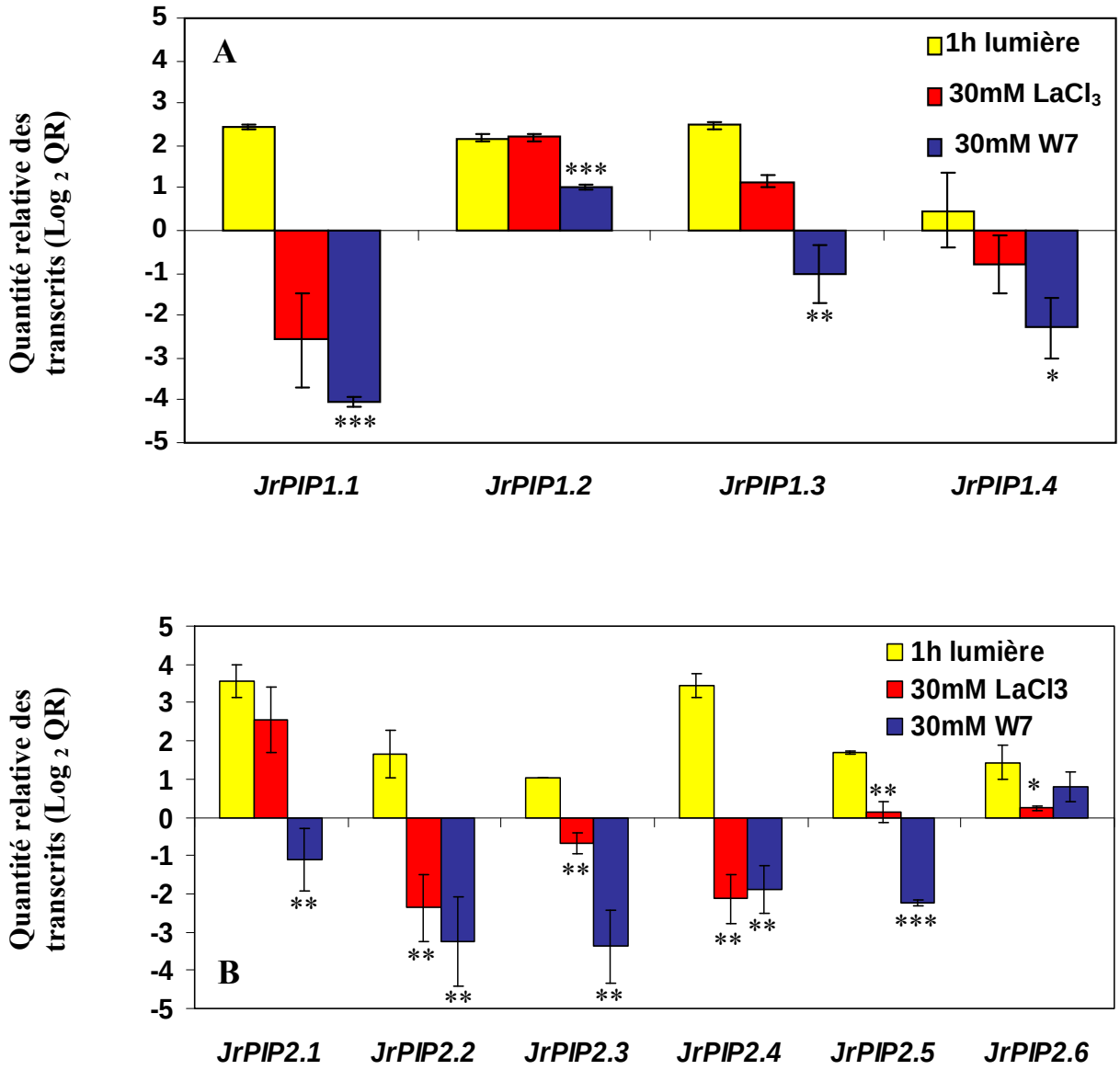


Figure 35 : Profils d'expression des aquaporines *JrPIP1s* et *JrPIP2s* dans les feuilles de *Juglans regia* traitées avec un antagoniste de calmoduline (W7) ou un inhibiteur des canaux calciques ($LaCl_3$) après 1h d'illumination. Les astérisques représentent les résultats significatifs (test t-student) (* : 0,01<P<0,05 ; ** : 0,001<P<0,01 ; *** : P<0,001).

3-Discussion

Dans cette étude, nous reportons pour la première fois le rôle potentiel de la signalisation calcique dans la stimulation de la K_F à la lumière potentiellement via les aquaporines chez le noyer.

Plusieurs études ont démontré l'implication du Ca^{2+} dans la transduction du signal dans diverses réponses adaptatives (White et Broadley, 2003, Mazars *et al*, 2008, McAinsh et Pittman, 2009) comme le froid, la sécheresse, le stress mécanique et la lumière (Sanders *et al*, 1999 ; Kim *et al*, 2003, Harada et Shimazaki, 2009). Les signaux calciques sont perçus grâce à des protéines qui en fixant le Ca^{2+}, changent de conformation et interagissent avec des protéines cibles. Les plus importantes sont : les calmodulines (CaM ou CaM-like proteins), les calcineurin B-like proteins (CBLs) et les Ca^{2+}-dependant protein kinases (CDPKs) (White et Broadley, 2003 ; Tuteja et Mahajan, 2007).

Afin de confirmer le rôle que peut jouer la signalisation calcique dans la stimulation de la K_F par la lumière, des études pharmacologiques ont été réalisées sur des feuilles de noyer dans des conditions différentes d'obscurité et de lumière (Figs. 34 A et B). Il a déjà été reporté qu'à l'obscurité la K_F est faible et insensible à la cycloheximide (CHX : inhibiteur de la synthèse protéique) et à la température et serait associée à une faible abondance des transcrits *JrPIP2s* (Cochard *et al*, 2007). Ces résultats suggèrent que la majeure partie de l'eau transportée dans les feuilles à l'obscurité suit un transport apoplasmique. Cette hypothèse a été validée dans notre étude par le fait que la perfusion de 30mM de W7 ou de $LaCl_3$ n'affecte pas la K_F à l'obscurité dans les feuilles traitées comparées aux témoins (Fig. 34A). Par contre, la stimulation de la K_F à la lumière se trouve fortement sensible à la cycloheximide et la température et strictement associée à une accumulation des aquaporines *JrPIPs2* (Cochard *et al*, 2007). La perfusion de 30mM de $LaCl_3$ ou de W7 dans les feuilles pendant 1h avant l'illumination réduit la K_F de 48% et 46% respectivement comparées aux feuilles témoins (Fig. 34A). Ces effets inhibiteurs confirment le rôle de la signalisation calcique dans la stimulation de la K_F par la lumière.

Le lanthanum ($LaCl_3$) est un inhibiteur des canaux calciques (Balestrasse *et al*, 2008, Gueta-Dahan *et al*, 2008, Pang *et al*, 2007, Phean-o-pas *et al*, 2005), son effet inhibiteur sur la stimulation de la K_F par la lumière signifie que la transduction du signal lumineux implique une élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, probablement par un flux de Ca^{2+} depuis l'apoplasme vers le cytosol. Le même scénario a déjà été reporté chez plusieurs espèces dans d'autres contextes

physiologiques (Shacklock *et al*, 1992, Baum *et al*, 1999, Frohnmeyer *et al*, 1999). A l'intérieur des cellules, les fluctuations de $[Ca^{2+}]$cyt sont perçues par des protéines fixatrices de Ca^{2+} de la famille EF hand , qui sont groupés en 4 familles dont les calmodulines (CaMs). Ces protéines sont les plus caractérisées dans la perception et la transduction du signal calcique. Elles sont impliquées dans diverses réponses Ca^{2+}-dépendantes à plusieurs stimuli abiotiques tels que la lumière, la gravité, le stress mécanique et la salinité (White et Broadly 2003, Yang et Poovaiah 2003, McCormack *et al*, 2005).

Dans notre étude, la perfusion de W7 dans les feuilles 1h avant l'illumination, est accompagnée d'une réduction remarquable de la K_F comparée aux feuilles témoins (Fig. 34A). W7 est un antagoniste des calmodulines (CaMs) (Li *et al*, 1998, Sun *et al*, 2006). Une réduction similaire a été observée quand W7 est appliqué après 90min d'illumination (W7-lumière2, Fig. 34B et C). Ces résultats supposent que le signal lumineux nécessaire pour la stimulation de la K_F est perçu par le complexe Ca^{2+}/calmoduline.

Aussi, la perfusion des feuilles avec du W7 ou $LaCl_3$ 1h avant l'exposition à la lumière, provoque une réduction remarquable du taux des transcrits de la majorité des *JrPIPs* isolées (Fig. 35). Les isoformes *JrPIP1.1*, *JrPIP1.4*, *JrPIP2.2*, *JrPIP2.3* et *JrPIP2.4* sont les plus sensibles aux inhibiteurs calciques. En effet, quelque soit l'inhibiteur utilisé, le niveau d'expression se trouve plus bas que le niveau basal d'expression. L'expression de *JrPIP1.1* est insensible au traitement $LaCl_3$ mais complètement inhibée par le traitement W7.

Très peu de données sont fournies quant à l'effet du calcium sur l'expression des aquaporines et la seule étude porte sur le système racinaire d'*Arabidopsis* en relation avec une privation nutritionnelle (Maathuis *et al*, 2003). Cette étude a montré qu'un manque de Ca^{2+} conduit à une inhibition transcriptionelle des aquaporines et que cet effet peut s'étendre à d'autres nutriments comme le potassium, l'azote, le phosphore (Carvajal *et al*, 1999, Liu *et al*, 2007, Shangguan *et al*, 2005). Bien que ces résultats relient l'état nutritionnel et l'état hydrique de la plante, le mécanisme par lequel la privation de calcium réduit l'expression des aquaporines reste encore inconnu. L'inhibition coordonnée de la majorité des *JrPIPs* observée dans les feuilles traitées avec du $LaCl_3$ et W7 (Fig. 35), prouve l'implication du complexe Ca^{2+}/calmoduline dans la stimulation des *JrPIPs* par la lumière requise pour la stimulation de la K_F. Concernant son mode d'action, le complexe Ca^{2+}/calmoduline peut réguler soit l'expression des gènes en interagissant avec des facteurs de transcriptions spécifiques (Kim *et al,* 2007, Doherty *et al*, 2009), soit en régulant l'activité protéique dans divers processus physiologiques (Popescu *et al*, 2007). Aucune de ses deux options n'est à exclure dans nos conditions expérimentales. D'autre part, des études ont reporté la régulation calcique des

aquaporines dans d'autres espèces (Alleva *et al*, 2006, Cabaňero *et al*, 2006, Ionenko *et al*, 2006, Johansson *et al*, 1996 ; 1998, Martinez-Ballesta *et al*, 2008), selon lesquels le Ca^{2+} agirait directement sur l'ouverture des aquaporines. Dans ce cadre, un modèle d'action d'une protéine kinase Ca^{2+}-dépendante (Johansson *et al*, 1996, Johanson et Chrispeels, 1992, Van Wilder *et al*, 2008, Weaver *et al*, 1991) et/ou l'interaction directe entre le Ca^{2+} et les aquaporines a été proposée (Alleva *et al*, 2006, Gerbeau *et al*, 2002).

DISCUSSION GENERALE

Le noyer (Juglans regia) : un modèle d'étude de la modulation de la K_F par la lumière

La stimulation de la K_F à la lumière a été reportée chez plusieurs espèces : *Quercus macrocarpa* : (Voicu *et al*, 2008 ; Voicu *et al*, 2009), le mais (Kim et steudle, 2007 ; 2009), le noyer (Cochard *et al*, 2007), *Tilia cordata* (sellin et Kupper, 2007), *Betula pendula* (Sellin *et al*, 2008).

Au contraire, d'autres espèces ne révèlent aucune stimulation de leur K_F à la lumière comme *Quercus rubra* (Rockwell *et al*, 2011) ou *Populus tremuloides* (Voicu et Zwiazek, 2010) ou même une stimulation à l'obscurité comme chez *Arabidopsis thaliana* (Postaire *et al*, 2010).

Cependant, la stimulation de la K_F à la lumière n'est pas générale. Dans cette étude, nous investiguons la réponse de la K_F de cinq espèces forestières à la lumière. Trois d'entre elles montrent une forte stimulation à la lumière (*Quercus robur*, *Fagus sylvatica* et *Juglans regia*). Aussi, le maximum de stimulation de la K_F varie selon les espèces étudiées (Sack et Tyree, 2005). Dans notre étude, le noyer (*Juglans regia*) détient la plus forte K_F parmi les espèces étudiées. Ces différences interspécifiques restent encore inexplicables et seraient liées à la contribution de la voie xylémienne et extraxylémienne dans la feuille (Sack et Holbrook, 2006).

Des études ont montré que la voie extraxylémienne (à travers les cellules de mésophylle) représente entre 50 à 90% de la résistance totale de feuille (Trifilò *et al*, 2003, Cochard *et al*, 2004, Gascó *et al*, 2004). Chez le noyer, la plus grande fraction de la résistance hydraulique foliaire 88% est assurée par la voie extraxylémienne (Cochard *et al*, 2004).

Plusieurs travaux ont démontré que l'effet stimulateur de la K_F à la lumière serait assuré par la voie extraxylémienne impliquant les aquaporines (Henzler *et al*, 1999 ; Tyree *et al*, 2005 ; Moshelion *et al*, 2002 ; Lopez *et al*, 2003 ; Voicu *et al*, 2009 ; Kim et steudle, 2009). Chez le noyer, on a pu relier la stimulation de la K_F à la lumière à l'accroissement du taux de deux isoformes d'aquaporines *JrPIP2.1* et *JrPIP2.2*. Selon la même étude, deux voies de circulation de la sève sont possibles. La première est la voie apoplasmique qui a lieu l'obscurité, elle est associée à une faible valeur de K_F et une faible abondance des transcrits *JrPIP2*. La deuxième est la voie transcellulaire qui a lieu à la lumière, elle serait marquée par une valeur de K_F élevée et est associée à une forte abondance des transcrits *JrPIP2* (Cochard *et al*, 2007). Néanmoins, les mécanismes moléculaires régulant cette réponse restent encore inconnus.

En plus, la corrélation entre la stimulation de la K_F et celle des transcrits d'aquaporines n'est pas générale. Dans notre étude, à l'exception du noyer, aucune corrélation n'a été trouvée entre le taux de stimulation de K_F et celle des transcrits d'aquaporines (*Juglans regia*) (Fig. 16B). Des observations similaires ont été reportées chez un bon nombre d'espèces (Martre *et al*, 2002 ; Lee *et al*, 2008 ; 2009 ; Voicu *et al*, 2009 ; Postaire *et al*, 2010 ; Voicu et Zwiazek, 2010).

Tous ces arguments, rendent les feuilles de noyer un modèle d'étude robuste pour l'étude des bases moléculaires de la stimulation des aquaporines à la lumière, ainsi que la recherche de nouvelles isoformes PIP1 et PIP2 afin d'étudier leurs rôles dans la modulation de la K_F à la lumière.

Participation des deux familles PIP1 et PIP2 dans la réponse de la K_F à la lumière

Les aquaporines constituent une famille large avec 35 isofomes chez *Arabidopsis thaliana* (Johanson *et al*, 2001), 33 isoformes chez le riz (Sakurai *et al*, 2005) et 36 isoformes chez le mais (Chaumont *et al*, 2001). La famille PIP compte 13 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Jusqu'à présent nous ne connaissons que 2 isoformes PIPs chez le noyer : *JrPIP2.1* et *Jr.PIP2.2*, toutes les deux positivement régulées par la lumière. Dans cette étude, nous avons identifié 8 nouvelles isoformes : 4 *JrPIP1s* et 4 *JrPIP2s*. Toutes les isoformes étudiées sont positivement régulées par la lumière, ce qui prouve la participation de ces 2 familles dans la réponse à la lumière. L'effet de la lumière sur l'activation de l'expression des aquaporines a été également reporté dans d'autres contextes physiologiques comme les cellules motrices chez *Mimosa pudica* (Fleurat-Lessard *et al*, 1997, Moshelion *et al*, 2002) ou les cellules racinaires de *Lotus japonicus* et *Zea mays* (Henzler *et al*, 1999, Lopez *et al*, 2003).

La co-présence de ces 2 familles d'aquaporines a été reportée dans les feuilles de plusieurs espèces tels que: *Arabidopsis thaliana* (Jang *et al*, 2004 ; Postaire *et al*, 2010), le riz (Sakurai *et al,* 2005; 2008), le mais (Hachez *et al*, 2008) et le chêne (*Quercus macrocarpa*) (Voicu *et al*, 2009).

Comme pour le système racinaire, quasiment toutes les isoformes PIPs sont exprimés à des degrés différent dans les feuilles matures (Alexandersson *et al*, 2005, Hachez *et al*, 2008, Jang *et al*, 2004). Ceci est en accord avec les profils d'expression des 10 *JrPIPs* étudiées dans les feuilles de noyer (Fig. 22), mais le rôle respectif de chaque isoforme dans les relations hydriques dans la feuille reste encore indéterminé. Aussi, toutes les isoformes étudiées sont

accumulées à la lumière avec une accumulation plus prononcée pour les *JrPIP2s*. Ce qui nous laisse supposer que les PIP1s assurent probablement d'autres fonctions dans la feuille de noyer.

La lumière bleue serait responsable de la stimulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines

L'utilisation du filtre anti bleue nous a permis d'estimer le rôle de cette qualité de lumière dans la stimulation de la K_F et celle des transcrits d'aquaporines chez le noyer. Nos résultats montrent qu'en présence de ce filtre la K_F est réduite de 65% par rapport aux feuilles témoins. Ce ci est en accord avec la seule étude qui porte sur l'effet de la qualité de lumière sur la K_F (Voicu *et al*, 2008). Selon cette dernière étude, la stimulation de la K_F est plus importante en présence de lumière bleue que les autres longueurs d'onde. Aussi, la réponse de la K_F à la lumière blanche est plus importante que celle de l'une des longueurs d'onde appliquée individuellement (Voicu *et al,* 2008).

Aussi la majorité des aquaporines étudiées se trouvent fortement réprimées en absence de cette qualité de lumière sauf pour *JrPIP2.1* et *JrPIP2.6*. L'expression de ces aquaporines serait indépendante de la lumière bleue, elles seraient potentiellement responsables des 35% de stimulation de la K_F en absence de cette qualité de lumière par rapport à l'obscurité. Ce qui nous laisse suggérer que ces 2 aquaporines soient probablement régulées par d'autres longueurs d'ondes.

La régulation des aquaporines par la lumière bleue a été reportée chez *Arabidopsis thaliana AthH2* (Kaldenhoff *et al*, 1995) et le tabac *NtAQP1* (Lorenz *et al*, 2003).

Plus intéressant, le taux d'accumulation des transcrits *JrPIPs* dans les feuilles privées de lumière bleue est plus faible que le taux basal d'expression à l'obscurité pour la majorité des transcrits *JrPIPs* (Fig. 24). Ceci prouve qu'en absence de lumière bleue, les transcrits *JrPIPs* se trouvent fortement réprimés. Comme la lumière blanche utilisée dans nos expérimentations est essentiellement composée de bleue et de rouge, la lumière rouge régulerait probablement négativement les transcrits d'aquaporines et la réponse à la lumière blanche serait le résultat d'une balance entre la lumière rouge et la lumière bleue.

Mécanismes précocement régulés dans la réponse de la K_F à la lumière

Efficacité de l'approche globale cDNA-AFLP

Dans notre étude, l'approche globale cDNA-AFLP a été utilisée afin de caractériser les mécanismes moléculaires précoces accompagnant (ou potentiellement impliqués) dans la modulation de la K_F par la lumière chez le noyer. Cette technique a été un outil efficace pour l'identification des marqueurs moléculaires potentiels impliqués dans cette régulation sur des feuilles exposées à des courts intervalles de lumière. En effet, en raison de sa rigueur et sa haute reproductibilité, elle a été adoptée par plusieurs études dans le but d'obtenir un grand nombre de gènes candidats qui pourront être le sujet d'analyses ultérieures (Wakefield *et al*, 2011 ; Cheng *et al*, 2010 ; Gutierrez *et al*, 2006 ; Yang *et al*, 2003 ; Eckey *et al*, 2004). Il s'agit d'une étude globale du transciptome qui ne nécessite pas la connaissance préalable du génome donc un outil approprié pour les espèces végétales, pour lesquelles les outils de la génomique fonctionnelle ne sont pas encore développés.

Les partenaires moléculaires potentiellement impliqués dans la modulation de la K_F et les aquaporines *JrPIPs* par la lumière

A l'issue de l'étude cDNA AFLP nous avons identifié 592 TDFs différentiellement exprimés selon la durée d'éclairement dont 225 TDFs marqueurs « précoces » dans leur réponse à la lumière. Au final, seulement 187 TDFs ont servi dans la recherche d'homologie de séquences, les 38 TDFs restants ont des séquences redondantes. 47.6 % des séquences obtenues (89 sur 187 TDs) ne présentent aucune annotation fonctionnelle, ce qui suggère que la réponse de la feuille à la lumière implique probablement des gènes qui sont encore inconnus.

La classification fonctionnelle des différents TDFs identifiés montre que les gènes relatifs à la régulation cellulaire représentent la majorité des TDFs identifiés. Cette catégorie fonctionnelle se décline en 3 grands groupes : la transduction du signal, la maintenance des acides nucléiques et des protéines et la régulation protéique (Fig. 31). Ceci pourrait constituer une première indication de leur éventuelle implication dans la stimulation de la K_F à travers la régulation des transcrits d'aquaporines chez le noyer.

Le résultat le plus intéressant est l'identification de TDFs impliqués dans la signalisation calcique tels que *Jr CaBP, JrCIPK, JrCDPK* et *JrCAM*. La lumière induit des changements de la concentration de Ca^{2+} dans la feuille (Babourina *et al*, 2002; Baum *et al*,

1999 ; Harada *et al*, 2003; Stoelzle *et al*, 2003 ; Shabala et Newman, 1999 ; Roelfsema et Hedrich, 2010 ; Stange *et al*, 2010). L'accumulation de *JrCDPK* dans notre étude est en accord avec une étude récente qui montre une accumulation de *StCDPK* dans la feuille de pomme de terre en réponse à la lumière (Giammaria *et al*, 2011). Ce ci suggère l'implication directe de la signalisation calcique dans la transduction du signal lumineux. Une autre éventualité serait l'implication du message calcique dans la régulation des gènes stimulés à la lumière comme l'a démontré une étude récente, selon laquelle un régulateur de la signalisation calcique : AtCLB (Ca^{2+}-dependent lipid-binding protein) fixe le promoteur d'une synthase (AtTHAS1) dont l'expression est stimulé par la lumière (de Silva *et al*, 2011). Ainsi, le calcium peut jouer un rôle important dans la régulation directe ou indirecte des aquaporines.

L'identification des facteurs de transcription WRKY constitue aussi un important résultat. La surexpression du facteur WRKY89 a été reportée en réponse à la lumière UVB dans les plantules de riz (Wang *et al*, 2007). Ici nous reportons un résultat contraire avec la répression de 3 TDFs WRKY (tableau IV, transduction du signal), en réponse à l'exposition précoce à la lumière. Ces nouveaux résultats soulignent l'importance des facteurs WRKY dans la reprogrammation transcriptionelle de la réponse des plantes à la lumière, probablement en agissant comme des répresseurs. Une étude a montré récemment le même profil d'expression des aquaporines et des WRKY sous stress salin (Diédhou *et al*, 2009), ce qui appuierait l'hypothèse de la régulation potentielle des aquaporines via les facteurs WRKY.

L'identification d'une protéine régulatrice nucléaire FRS7 est d'une grande importance. Les protéines nucléaires FRS semblent être liées à la voie de signalisation par le phytochrome (Lin et Wang, 2004). L'implication donc de phytochrome dans ce processus physiologique serait possible (Fig. 36).

Selon la dernière étude qui a porté sur 2 aquaporines de noyer, la stimulation de la K_F à la lumière est inhibée par un traitement à la cycloheximide (CHX : un inhibiteur de la traduction) dans les feuilles, ce qui prouve que cette stimulation par la lumière se fait par une biosynthèse *de novo* des aquaporines *JrPIP2s* (Cochard *et al*, 2007). L'identification de TDFs intervenant dans la régulation protéique tels que les protéines chaperons Hsps, vient appuyer ce résultat. Dans ce même cadre une accumulation transitoire des gènes codant 5 Hsps (types : 18; 40; 70; 101 KD) et 2 Hsfs (types HsfA2 et HsfA4) a été observée (tableau IV, régulation protéique). Les Hsps interviennent dans la stabilisation et le maintien des protéines nouvellement synthétisées (Baniwal *et al*, 2004 ; Lee et Vierling, 2000). La modulation de la

transcription de ces gènes est sous le contrôle des facteurs de transcription Hsfs (Heat shock factor transcription factors).

Par conséquent, *Hsp70* contribuerait au renforcement de la structure des aquaporines et la sauvegarde de leur transport quand la température des feuilles augmente. Il est intéressant de supposer que *HsfA4* et *HsfA2* différentiellement exprimés dans nos conditions d'étude (tableau IV, transduction du signal), pourraient être les facteurs de transcription potentiels qui contrôlent la modulation des gènes *JrHsp70* et ainsi les *JrPIPs*.

Une fois les aquaporines synthétisées, elles vont être transportées depuis le site de leur synthèse (réticulum endoplasmique, RE) jusqu'à la surface cellulaire à travers la voie de sécrétion, un processus majeur des organismes eucaryotes (Hwang et Robinson, 2009). La stimulation des gènes impliqués dans le trafic vésiculaire à la lumière vient appuyer l'implication de cette voie de transport dans la stimulation des *JrPIPs* à la lumière (Fig. 36). Ainsi *ADP-ribosylation-factor 1(ARF1*) et *SYP121* (syntaxin 121) (Fig. 32F) se trouvent fortement accumulés à la lumière. Pour *JrSYP121* qui est localisé dans les citernes *cis* de golgi, sa stimulation à la lumière suppose un accroissement du trafic vésiculaire entre le réticumum endoplasmic et l'appareil de golgi. La modification du trafic des vésicules *trans* de golgi comme les endocytosomes (corps sphériques, Fig. 36), parait sous le contrôle des adaptateurs membranaires de clathrine, eux-mêmes régulés par les ARFs (Ooi *et al*, 1998).

L'implication de la voie protéolytique ubiquitine- protéasome a été aussi démontrée dans cette étude avec l'identification de 11 gènes reliés potentiellement au processus de protéolyse qui subissent une stimulation précoce et significative à la lumière (tableau IV, maintenance protéique). L'implication de l'ubiquitination dans le fonctionnement des aquaporines a été démontrée chez *Arabidopsis thaliana* avec l'identification d'une interaction physique entre une RING ubiquitine ligase E3 et l'aquaporine (*AtPIP2;1*) (Lee *et al*, 2009).

L'identification d'une enzyme clé dans la signalisation des sphingolipides : la céramidase (*JrCDase*) qui est réprimée dans le cas de notre étude est d'une grande importance. En effet, cette enzyme sépare la céramide des acides gras pour former la sphingosine qui est phosphorylée par une sphingosine kinase pour former la sphingosine-1-phosphate (S1P). Il a été démontré que S1P constitue un messager calcique actif dans les wqwWcellules stomatiques en réponse à la sécheresse et la signalisation par l'acide abscissique (Ng *et al*, 2001). En se basant sur nos résultats, on peut suggérer que l'inhibition de *JrCDase* (Fig. 32D) conduit à des fluctuations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ qui peuvent être perçues par au moins l'une des protéines fixatrices de calcium conduisant à une régulation de la K_F ainsi que l'expression des aquaporines.

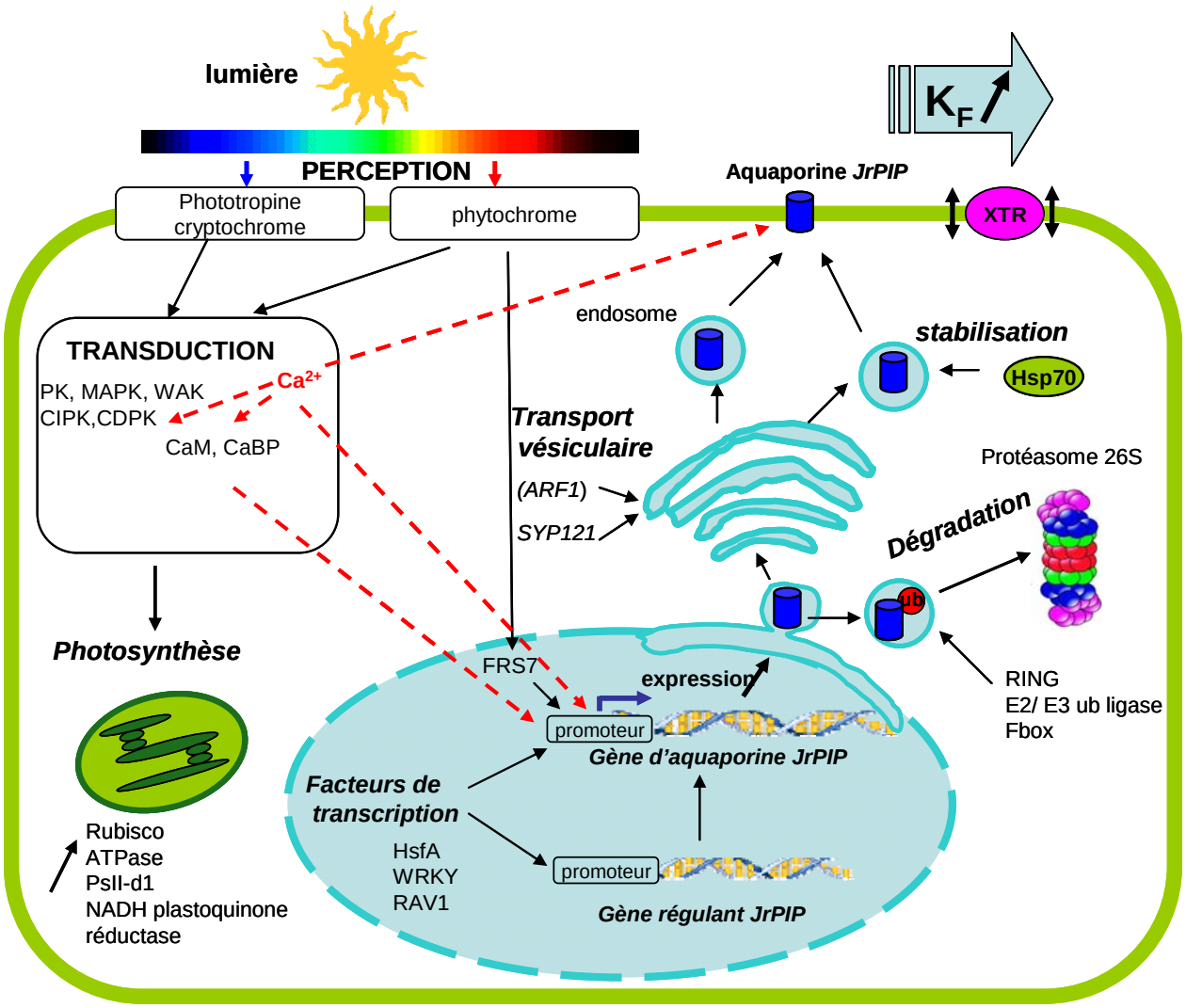


Figure 36 : Modèle intégratif hypothétique montrant les partenaires moléculaires (sur une sélection des TDFs identifiés) potentiellement modulés avec la stimulation de la conductivité hydraulique (K_F) et les aquaporines *JrPIPs* dans les feuilles de noyer exposées à la lumière.

L'effet de la lumière sur la feuille pourrait aussi modifier la rigidité de la paroi cellulaire. L'inhibition de la xyloglucane endotransglycosylase (*JrXTR*) (Fig 32D) jouerait en faveur d'une grande extensibilité de la paroi cellulaire. L'inhibition de XTRs par la lumière a été déjà reportée (Xu *et al*, 1996 ; Kuno *et al*, 2000)**.** Un tel événement couplé à la stimulation des *JrPIP2s* à la lumière serait responsable d'une grande turgescence foliaire dans nos conditions expérimentales.

Enfin, l'identification de TDFs reliés à la photosynthèse (tableau IV, métabolisme carboné) suggère qu'il y'aurait un lien entre les mécanismes de régulation de la photosynthèse et ceux de la modulation de la K_F comme précédemment démontré par Brodribb *et al*. (2007).

Aussi, la stimulation d'une NADH-plastoquinone reductase (*JrPlastQ*), une enzyme clé dans le complexe NADH déshydrogénase chloroplastique impliquée dans la réponse au stress oxidatif a été reportée (Fig. 32D). Ainsi, la synthèse de composés photo-protecteurs comme les plastoquinones, peut avoir lieu immédiatement afin de protéger l'intégrité de l'appareil chloroplastique contre le stress (photo) oxydatif, aussi bien que l'ouverture des aquaporines connues pour être inhibées par les espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Kim and Steudle 2009).

Au final et en tenant compte de la connaissance des processus moléculaires impliqués dans les réponses des plantes à la lumière, cette analyse cDNA AFLP, dévoile plusieurs mécanismes hypothétiques pouvant être impliqués dans la régulation précoce de certains TDFs par la lumière (Fig. 36). L'accumulation ou l'inhibition rapide de ces TDFs serait nécessaire pour la modulation de l'expression des aquaporines et ainsi la K_F dans les feuilles de noyer.

Le complexe Ca2+/CaM modulerait les transcrits d'aquaporines et la K_F du noyer à la lumière

Les résultats de la cDNA-AFLP ont dévoilé l'importance du calcium dans la transduction du signal lumineux avec l'identification plusieurs acteurs de la signalisation calcique (tableau IV, transduction du signal).

Dans cette étude, nous validons le rôle du signal calcique dans la modulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines par la lumière par l'étude de l'effet d'un inhibiteur des canaux calciques : le lanthanum ($LaCl_3$) et d'un antagoniste de calmoduline : N- 6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) sur la K_F et sur les transcrits de 10 aquaporines de

noyer. Une étude récente a prouvé le rôle de la signalisation calcique dans la transduction de la lumière rouge chez le blé, en utilisant ces deux inhibiteurs (Gupta *et al*, 2010).

En se basant sur nos résultats pharmacologiques et moléculaires, on peut déduire que la voie de transduction Ca^{2+}/CaMs peut être impliquée dans la réponse de la K_F à la lumière.

L'effet inhibiteur du lanthanum ($LaCl_3$) sur la stimulation de la K_F par la lumière signifie que la transduction du signal lumineux implique une élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, probablement par un flux de Ca^{2+} depuis l'apoplasme vers le cytosol. Les fluctuations de $[Ca^{2+}]$cyt sont perçues par des protéines fixatrices de Ca^{2+} de la famille EF hand. Parmi les protéines Ca^{2+}dépendantes identifiées, *JrCaM* est fortement accumulée durant la cinétique lumière et retourne à son niveau basal d'expression à l'obscurité (Fig. 32B).Une accumulation similaire des transcrits CaM a été observée en réponse à différents stimuli et témoigne de l'implication des CaM dans la transduction du signal dans ces stimuli (Du *et al*, 2009, Poovaiah *et al*, 2002, Phean-o-pas *et al*, 2005).

Aussi, la perfusion de W7 (antagoniste de calmoduline) dans les feuilles 1h avant l'illumination, est accompagnée d'une réduction remarquable de la K_F comparée aux feuilles témoins (Fig. 34A). Une réduction similaire a été observée quand W7 est appliqué après 90min d'illumination (W7-lumière2, Fig. 34B et C), correspondant au maximum d'accumulation des transcrits *JrCaM* (Fig. 32B).

Quant aux transcrits d'aquaporines, la perfusion des feuilles avec du W7 ou $LaCl_3$ provoque une réduction remarquable du taux des transcrits de la majorité des *JrPIPs* isolées (Fig. 35).

Ces résultats supposent que le signal lumineux nécessaire pour la stimulation de la K_F est perçu par le complexe Ca^{2+}/CaM qui peut réguler soit l'expression des gènes en interagissant avec des facteurs de transcriptions spécifiques (Kim *et al,* 2007, Doherty *et al*, 2009), soit en régulant l'activité protéique (Popescu *et al*, 2007). Ces deux possibilités sont envisagées dans le cas des aquaporines.

Jusqu'à maintenant les études qui ont porté sur la régulation calcique des aquaporines, ont montré que le calcium agirait directement sur l'ouverture des aquaporines (Alleva *et al*, 2006, Cabaňero *et al*, 2006, Ionenko *et al*, 2006, Johansson *et al*, 1996 ;1998, Martinez-Ballesta *et al*, 2008). Dans ce travail, nous reportons pour la première fois le rôle potentiel de la signalisation calcique dans la stimulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines à la lumière chez le noyer.

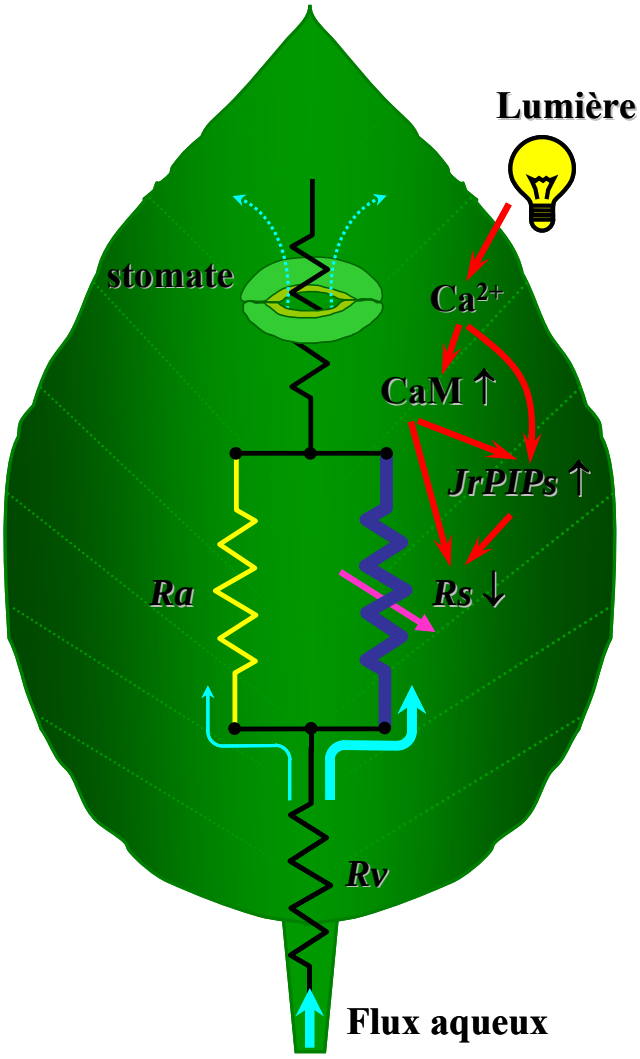


Figure 37 : Modèle putatif de résistance de la conductivité hydraulique dans les feuilles de noyer impliquant une voie de signalisation calcique dans la modulation des transcrits *JrPIPs* par la lumière Ra: résistance hydraulique de l'apoplasme dans le mésophylle; Rs: résistance hydraulique du symplasme dans le mésophylle ; Rv: résistance hydraulique du système vasculaire ; flèches noires: régulations de l'abondance des transcrits; flèches rouges: réseau de signalisation ; flèches bleues: flux aqueux ; flèches roses: diminution de la résisatnce hydraulique Rs (Rs = $1/K_F$).

En se basant sur les résultats antérieurs reportés chez le noyer (Cochard *et al*, 2007), nous proposons un modèle hypothétique de transport d'eau dans les feuilles de noyer (Fig. 37) selon lequel l'eau peut emprunter deux voies différentes et dépendantes de la lumière. Ce modèle hypothétique tient compte de nos résultats pharmacologiques et moléculaires (Figs. 34 et 35). A l'obscurité, la faible K_F reflète la prédominance de la voie apoplasmique. Cette dernière est corrélée avec l'expression basale des aquaporines *JrPIPs* et semble indépendante de la signalisation calcique. Par contre, la stimulation de la K_F à la lumière résulte de la stimulation de la voie transcellulaire qui nécessite une forte accumulation de la majorité des aquaporines *JrPIP1s* et *JrPIP2s* et implique la signalisation calcique en particulier le complexe Ca^{2+}/CaM. Ces nouvelles considérations fournissent un nouveau fondement dans les aspects mécanistiques de la régulation de la K_F ainsi que l'expression des aquaporines par la lumière, et contribueraient à la compréhension des relations hydriques dans la feuille.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La capacité des plantes à approvisionner les feuilles en eau, détermine leur productivité et leur survie. La résistance hydraulique foliaire R_F est une composante majeure du transport d'eau dans toute la plante. Elle contribue jusqu'à 60 à 80% dans la résistance hydraulique aérienne et 50% dans la résistance hydraulique de toute la plante (Sack et Holbrook, 2006). De ce fait, ce paramètre influence le taux de transpiration ainsi que la capacité photosynthétique.

Comme celle de la racine, la résistance hydraulique foliaire est une variable dynamique et est sous le contrôle des facteurs environnementaux. L'implication des aquaporines dans le contrôle de la conductance hydraulique racinaire a été largement documenté (Javot et Maurel, 2002 ; Tyerman *et al*, 2002 Martínez-Ballesta *et al*, 2003 ; Beaudette *et al*, 2007 ; Bramley *et al*, 2009 North *et al*, 2004 ; Secchi *et al*, 2007 ; Vandeleur *et al*, 2009).

La stimulation de la conductivité hydraulique foliaire (K_F) par la lumière a été relativement bien documentée durant les cinq dernières années (Cochard *et al*, 2007 ; Voicu *et al*, 2008 ; Voicu *et al*, 2009 ; Kim et steudle, 2007 ; 2009 ; sellin et Kupper, 2007 ; Sellin *et al*, 2008). Chez plusieurs espèces, la stimulation de la K_F a été liée à l'accroissement du taux des aquaprines (Moshelion *et al*, 2002 ; Lopez *et al*, 2003 ; Cochard *et al*, 2007; Kim et steudle, 2009). De plus, les bases moléculaires de cette réponse restent très peu étudiées.

Chez le noyer (*Juglans regia*), les premiers travaux menés au laboratoire ont permis de relier la stimulation de sa K_F par la lumière à l'accroissement de la quantité de transcrits de deux isoformes d'aquaporines (*JrPIP2.1* et *JrPIP2.2)* (Cochard *et al*, 2007). Notre travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces derniers travaux et avait pour objectif majeur d'**identifier les mécanismes moléculaires précoces potentiellement impliqués dans la modulation de la conductivité hydraulique foliaire chez le noyer.**

A) L'effet de la lumière sur la conductivité hydraulique dépend de l'espèce étudiée

La stimulation de la K_F à la lumière varie selon les espèces (Sack et Tyree, 2005, Sack et Holbroock, 2006). Ici, nous avons comparé la réponse de cinq espèces forestières à la lumière : le noyer (*Juglans regia),* le hêtre *(Fagus sylvatica),* le saule blanc *(Salix alba),* le chêne *(Quercus robur)* et le tremble *(Populus tremula*) en mesurant leurs K_F respectifs à l'obscurité et après deux heures d'illumination. Les résultats montrent que trois d'entre elles montrent une stimulation importante à la lumière (*Quercus robur*, *Fagus sylvatica* et *Juglans*

regia). La plus forte stimulation a été observée pour le noyer avec une valeur de 26 mmol s^{-1} m^{-2} MPa^{-1} au bout de deux heures d'illumination (Fig. 16A). Ces différences interspécifiques restent encore inexplicables. Néanmoins, des études suggèrent que les différences dans l'intensité de la K_F dépendent de la contribution de la voie xylémienne et extraxylémienne dans la feuille (Sack et Holbrook, 2006). Aussi, les caractéristiques structurales de la feuille comme la densité, la taille, la géométrie des faisceaux vasculaires et leur arrangement dans les nervures qui sont très variables selon les espèces (Roth-Nebelsik *et al*, 2001), semblent jouer un rôle majeur dans la distribution de l'eau dans la feuille.

B) Les aquaporines joueraient un rôle important dans la modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le noyer

La corrélation entre la K_F et les transcrits d'aquaporines n'est pas générale. Ainsi, nous avons comparé les profils d'expression des sous-familles PIP1 et PIP2 chez *Juglans regia*, *Fagus sylvatica, Quercus robur, salix alba et Populus tremula* sous deux conditions contrastées à l'obscurité et à la lumière. A l'obscurité, pour les différentes espèces étudiées, la faible K_F est associée à une faible accumulation des transcrits *PIP1s* et *PIP2s*. A la lumière, aucune corrélation n'a été trouvée entre le taux de stimulation de K_F et celle des transcrits d'aquaporines sauf pour le noyer (*Juglans regia*). L'absence de corrélation entre la réponse de K_F et celle des transcrits d'aquaporines prouvent que ces dernières ne jouent pas un rôle dans la réponse de la K_F à la lumière pour ces espèces.

Par contre, chez le noyer la stimulation de la K_F a été associée à une accumulation à la fois des transcrits *JrPIP1s* et *JrPIP2s* (Fig. 16B). Ceci indique une relation entre l'expression des aquaporines PIP1 et PIP2 et la stimulation de la K_F à la lumière chez cette espèce. Par rapport aux premiers résultats montrant une possible implication de deux isoformes d'aquaporines (*JrPIP2,1* et *JrPIP2,2*), (Cochard *et al*, 2007). Ce travail a été complété par l'identification de 8 nouvelles isoformes 4 *JrPIP1s* et 4 *JrPIP2s*, toutes positivement régulées par la lumière avec une accumulation plus prononcée pour les *JrPIP2s* (Fig. 22).

La lumière agit sur la quantité de transcrit d'aquaporines par sa qualité. En absence de lumière bleue, la K_F est réduite de 65% par rapport aux feuilles témoins. Cette dernière retrouve sa valeur maximale quand le filtre est enlevé (Fig.23).

Aussi, en absence de lumière bleue, la majorité des transcrits d'aquaporines (*JrPIP2,3 ; JrPIP2,4; JrPIP2,5; JrPIP1,1; JrPIP1,3* et *JrPIP1,4)* se trouvent fortement

réprimés ; ceci suggère la contribution majeure de la lumière bleue dans la stimulation des aquaporines à la lumière.

Plus intéressant, le taux d'accumulation des transcrits *JrPIPs* dans les feuilles privées de lumière bleue est plus faible que le taux basal d'expression à l'obscurité pour la majorité des transcrits *JrPIPs* (Fig. 24). Ceci prouve qu'en absence de lumière bleue, les transcrits *JrPIPs* se trouvent fortement réprimés. Il nous semble désormais nécessaire d'étudier l'effet d'autres qualités de lumière en particulier la lumière rouge afin de comprendre la contribution de chaque longueur d'onde dans la modulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines chez le noyer.

C) Le calcium serait impliqué dans la transduction de signal lumineux nécessaire à la stimulation de la conductivité hydraulique et expression d'aquaporines

Afin d'élucider les mécanismes moléculaires accompagnant et potentiellement impliqués dans la modulation de la K_F ainsi que la régulation des transcrits *JrPIPs* par la lumière chez le noyer, nous avons entrepris une approche globale sans apriori, la cDNA-AFLP sur une cinétique lumière (0, 15mn, 30mn, 1h, 2h et retour à l'obscurité). Cette approche avait pour but de dégager les acteurs moléculaires précoces qui potentiellement pourraient être impliqués dans ce processus.

L'approche cDNA-AFLP a été efficace avec l'identification de 592 TDFs différentiellement exprimés selon la durée d'éclairement dont 225 TDFs classés comme marqueurs « précoces » dans leur réponse à la lumière (15 et/ou 30min). Parmi les 225 TDFs précoces, 126 marqueurs sont stimulés et 99 sont réprimés par lumière. Au final, seulement 187 TDFs ont servi dans la recherche d'homologie de séquences, les 38 TDFs restants ont des séquences redondantes. 47.6 % des séquences obtenues (89 sur 187 TDFs) ne présentent aucune annotation fonctionnelle correspondant soit à des protéines hypothétiques ou des gènes non encore identifiés.

Au final, les 93 séquences pour lesquelles une fonction putative a été trouvée, ont été classées en 10 catégories fonctionnelles comme suit : métabolisme carboné, métabolisme d'acides gras, métabolisme des dérivés, métabolisme cellulaire, transport, maintenance protéique, transduction du signal, stress et défense, protéines de régulation et maintenance ARN/ADN (Fig. 31).

La validation de l'analyse cDNA-AFLP par analyse RT-PCR en temps réel, a été menée sur 30 gènes qui ont été sélectionnés selon leur réponse précoce à la lumière. Pour tous

les gènes étudiés, les profils de PCR en temps réel confirment globalement les résultats de l'analyse AFLP.

Les principaux résultats relatifs à cette partie sont les suivants : L'identification de 9 **facteurs de transcription** : un facteur de la sous famille RAV1-AP2domain, un facteur de réponse à l'éthylène de type 5, un facteur de réponse à l'auxine, un facteur de transcription homéotique, 2 facteurs de transcription du type Heat shock (HsfA2 et HsfA4) et 3 facteurs de transcription WRKY. Dans notre étude, les 3 facteurs WRKY sont réprimés à la lumière. Nous avons prêté une attention particulière à l'un d'entre eux (*JrWRKY*) qui est inversement corrélé avec la dynamique de K_F et les profils d'expression des *JrPIPs* (Fig. 32A). Les facteurs WRKY agiraient probablement comme des répresseurs sur la transcription des aquaporines en réponse des plantes à la lumière. Comme l'effet de la lumière sur la K_F est corrélé avec l'abondance des transcrits de plusieurs aquaporines : *JrPIP2,1* et *JrPIP2,2, JrPIP2,4 et JrPIP2,5* (Fig. 22), l'identification d'un élément cis de réponse à *JrWRKY* dans le promoteur de ces aquaporines serait la première étape dans la compréhension du rôle des facteurs de transcription WRKY dans la stimulation de la K_F par la lumière.

- L'identification des **protéines régulatrices** telles que : les Hsps (heat shock proteins), la protéine FRS7 (pour FAR1-related Sequence 7), et la protéine BTB à domaine TAZ.

Dans nos conditions expérimentales, une accumulation transitoire des gènes codant 5 Hsps (types : 18; 40; 70; 101 KD) et 2 Hsfs (types HsfA2 et HsfA4) a été observée. Les protéines Hsps qui sont sous le contrôle des facteurs de transcription Hsfs (Heat shock factor transcription factors), jouent un rôle essentiel dans la maintenance et/ou la réparation des protéines nouvellement synthétisées. Nous avons prêté une attention particulière à 3 d'entre eux: 2 *JrHsp70* qui montrent une modulation contrastée: *JrHsp70a* est fortement accumulé, alors que *JrHSP70b* est réprimé à la lumière, et un facteur de transcription *JrHsfA4* qui montre une accumulation différentielle précoce (Fig 32C). Par conséquent, *JrHsp70* contribuerait à la stabilisation des aquaporines en condition d'éclairement. Un rôle similaire de *JrHsfA* dans la stimulation de la K_F serait possible vu l'implication de biosynthèse *de novo* des protéines dans ce processus (Cochard *et al*, 2007). Ainsi une interaction serait possible entre la protéine de régulation Hsp 70 et les aquaporines. L'identification d'interaction par double hybride entre ces 2 partenaires appuierait cette hypothèse.

La protéine régulatrice nucléaire FRS7, qui est stimulé dans nos conditions d'étude, est d'une grande importance car ces protéines semblent être liées à la voie de signalisation par

le phytochrome (Lin et Wang, 2004). L'implication donc de phytochrome dans ce processus physiologique serait possible (Fig. 36).

Quant à *JrBtbTaz*, il est plutôt réprimé à la lumière et retourne à son niveau basal d'expression quand les feuilles sont remises à l'obscurité. Le rôle de ces protéines dans les voies de signalisation par la lumière a été documenté (Mandadi *et al*, 2009). Il serait intéressant de déterminer si ces 2 modulateurs de transduction (FRS7 et BTB) pourraient interagir, directement ou indirectement avec les facteurs de transcriptions régulant les gènes d'aquaporines.

- La stimulation des gènes impliqués dans le **trafic vésiculaire** tels que *ADP-ribosylation-factor 1(ARF1*) et *SYP121* (syntaxin 121) qui se trouvent fortement accumulés à la lumière (Fig. 32F) vient appuyer l'implication de cette voie de transport dans la stimulation des *JrPIPs* à la lumière. L'utilisation du Brefeldin A et/ou le Tyrphostin A23, un inhibiteur du chargement des protéines transportées des endosomes vers la membrane plasmique et l'analogue structural de la tyrosine qui interfère avec la fonction de clathrine, serait d'un grand intérêt pour valider l'implication de cette voie de transport dans la stimulation des *JrPIPs* à la lumière.

- L'implication de la **voie protéolytique ubiquitine-protéasome** a été aussi démontrée dans cette étude avec l'identification de 11 gènes reliés au processus de protéolyse. Les plus signifiants d'entre eux sont : un gène codant pour une protéine E2 ubiquitine ligase, un codant pour plusieurs isoformes de E3 ubiquitine ligases, un codant pour une protéine RING-finger copine-like et un autre codant pour une protéine F-box, tous sont stimulés à la lumière. Des études pharmacologiques utilisant un inhibiteur du protéasome 26S (MG132) peuvent être envisagées dans le futur afin de comprendre le rôle de cette voie dans la stimulation des *JrPIPs* à la lumière.

- l'identification de TDFs reliés à la **photosynthèse** tels que la ribulose biphosphate carboxylase (*JrRUB*), la protéine J du photosystème II, la protéine D1 du photosystème II (*JrPSII-d1*) et la sous unité beta d'une ATP synthase chloroplastique (*JrATPase*), suggère qu'il y'aurait un lien entre les mécanismes de régulation de la photosynthèse et ceux de la modulation de la K_F. Il serait intéressant dans le futur d'étudier la corrélation entre la stimulation de la K_F à la lumière avec la stimulation de la photosynthèse et la conductance du mésophylle (g_m) au CO_2 et si ces événements physiologiques sont couplés à une modulation d'aquaporines chez le noyer.

Hypothèse CALCIQUE :

- L'identification de protéines calcium-dépendantestelles que *JrCAM* (calmoduline), *JrCDPK* (Ca^{2+} dependant protein kinase), *JrCIPK* (CBL-interacting protein kinase) et *JrCaBP* (calcium binding protein). A l'exception de *JrCaBP*, l'accumulation des transcrits de *JrCIPK*, *JrCDPK* et *JrCAM*, est précoce et transitoire ; Ce résultat suggère l'implication de la signalisation calcique dans la transduction du signal lumineux dans les feuilles de noyer.

Dans ce cadre, nous avons validé le rôle potentiel que peut jouer le signal calcique dans la modulation de la K_F et des transcrits *JrPIPs* par la lumière. Nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur des canaux calciques : le lanthanum ($LaCl_3$) et d'un antagoniste de calmoduline : N- 6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) sur la K_F et sur les transcrits de 10 *JrPIPs* identifiées.

Il en ressort que la perfusion des inhibiteurs calciques dans les feuilles 1h avant l'illumination, provoque une réduction remarquable de la K_F à la lumière comparée aux feuilles témoins (Fig. 34A). Une réduction similaire a été observée quand ces inhibiteurs sont appliqués après 90min d'illumination quand la K_F ait atteint son maximum de stimulation (Fig. 34B). Aussi, la perfusion des feuilles avec du W7 ou $LaCl_3$ provoque une réduction remarquable du taux des transcrits de la majorité des *JrPIPs* isolées (Fig. 35). Ces résultats supposent que le signal lumineux nécessaire pour la stimulation de la K_F est perçu par le complexe Ca^{2+}/CaM qui peut réguler soit directement ou indirectement l'expression des gènes d'aquaporines. Il serait intéressant d'envisager la visualisation du ca^{2+} intracellulaire en injectant un marqueur fluorescent afin de mettre en évidence la libération de ce signal sous l'effet de la lumière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Aasamaa K, Niinemets Ü, Sober A (2005) Leaf hydraulic conductance in relation to anatomical and functionnal traits during *Populus tremula* leaf ontogeny. Tree Physiol. **25(11):** 1409-18.

Aasamaa K, Sober A (2001) Hydraulic conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in six deciduous tree species. Biol Plant **44:** 65-73.

Aasamaa K, Sober A, Rahi M (2001) Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. Aust J Plant Physiol. **28:** 765-74.

Aasamaa K, Sober A (2005) Seasonal courses of maximum hydraulic conductance in shoots of six temperate deciduous tree species. Functional Plant Biology **32:** 1077 - 1087.

Agre P, Bonhivers M, Borgina MJ (1998) The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. Journal of biological chemistry **273:** 14659-14662.

Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ (1993) Aquaporins a family of water channel proteins. Am J physiol **256:** 461.

Ahmad M, Cashmore AR (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. Nature **366:** 162-166

Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J (2001) The NAF domain defines a novel protein–protein interaction module conserved in Ca^{2+}-regulated kinases. EMBO Journal **20**: 1051–1063.

Aletta J M, Cimato T R, Ettinger MJ (1998) Protein methylation: a signal event in post-translational modification. Trends Biochem. Sci. **23**: 89–91.

Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, et al (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. Plant Mol. Biol. **59(3):** 469-84.

Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. Nature **411**: 1053–1057.

Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF *et al* (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis *det3* mutant. Science **289**: 2338–2342.

Alleva K, Niemietz CM, Sutka M, Maurel C, Parisi M, et al (2006) Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. J. Exp. Bot. **57**: 609–21

Altus DP, Canny MJ, Blakman DR (1985) Water pathways in wheat leaves. 2. Water conducting capacities and vessel diameters of different vein types, and the behaviour of the integrated vein network. Aust J Plant Physiol. **12:** 183-99.

Amodeo G, Dorr R, Vallejo A, Sutka M, and Parisi M (1999) Radial and axial water in the sugar beet storage root J. Exp. Bot. **50 (333):** 509-516.

Ang L, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A, Deng X-W (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. Molecular Cell **1:** 213-222

Anil VS, Sankara Rao K (2001) Calcium-mediated signal transduction in plants: a perspective on the role of Ca^{2+} and CDPKs during early plant development. Journal of Plant Physiology **158**: 1237–1256.

Aroca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, Chrispeels MJ (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots.Plant Physiol. **137(1):**341-53.

Azad AK, Sawa Y, Ishikawa T & Shibata H (2004) Characterization of protein phosphatase 2A acting on phosphorylated plasma membrane aquaporin of tulip petals. Biosci Biotechnol Biochem. **68(5):** 1170-4.

-B-

Babourina O, Newman I, Shabala S (2002) Blue light-induced kinetics of H+ and Ca2+ fluxes in etiolated wildtype and phototropin-mutant Arabidopsis seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99:** 2433–38

Bachem, CW, van der Hoeven, RS, de Bruijn, SM, Vreugdenhil, D, Zabeau, M and Visser, RG (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant J**. 9(5):** 745-53.

Balestrasse KB, Zilli CG & Tomaro ML (2008) Signal transduction pathways and haem oxygenase induction in soybean leaves subjected to salt stress. Redox Rep. **13(6):** 255-62.

Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. - Journal of Biosciences **29**: 471-487.

Barrowclough DE, Peterson CA, Steudle E (2000) Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. J Exp Bot **51:** 547-557.

Batschauer A (1993) A plant gene for photolyase : an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. The Plant Journal **4:** 705-709

Baum G, Long JC, Jenkins GI, Trewavas AJ (1999) Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca2+. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:13554–59

Beaudette C, Chlup M, Yee J, Neil Emery RJ (2007) Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in Pisum sativum: diurnal patterns and the response to HgCl2 and ABA Journal of Experimental Botany, **58 (6):**1291–1300.

Becquey J (1997) Les noyers à bois. Les guides du sylviculteur.Institut pour le développement forestier (troisième édition coordonnée). p 144 (ouvrage informatif sur la plantation et la culture des noyers).

Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S (1999) Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal **17**: 657–665

Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R (1999) The Nicotina tabacum plasma membrane aquaporin NTAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. Plant J. **18**. 565-570.

Bogre L, Ligterink W, Meskiene I, Barker PJ, Herbele-Bors E, Huskisson NS, Hirt H (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. Plant Cell **9**: 75-83.

Bouché N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm H (2002) A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. Journal of Biological Chemistry **277**: 21851–21861.

Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, Van Den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. Plant Physiol **139**: 790-805.

Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G, Chua NH (1994) Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. Genes Dev, **8**:2188-2202.

Boyer JS (1985) Water transport. Annu. Rev. Plant Physiol. **36**: 473-512.

Bramley H, Turner NC, Turner DW, Tyerman SD (2009) Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. Plant Physiol. **150(1):**348-64.
Breviario D, Morello L & Giani, S (1995) Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependant protein kinases. Plant Mol Biol. **27**: 953-967.
Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue light receptors. Trends Plant Sci. **7:**204–10
Briggs WR, Christie JM, Salomon M (2001) Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. Antioxid Redox Signal; **3(5):**775-88.
Brodribb TJ, Field TS, Jordan GJ (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. - Plant Physiol. **144**: 1890-1898.
Brodribb TJ, Holbrook NM (2003) Changes in leaf hydraulic conductance during leaf shedding in seasonally dry tropical forest. New physiologist **158**: 295-303.
Brodribb TJ, Holbrook NM (2004)a Diurnal depression of leaf hydraulic conductance in a tropical tree species. Plant Cell Environ. **27**:820-27.
Brodribb TJ, Holbrook NM (2004)b Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. New Physiologist **162**: 663-670.
Brodribb TJ, Holbrook NM (2005) Leaf physiology does not predict leaf habit; examples from tropical dry forest. Tree Struct. Funct: **19**: 290-95.
Brodribb TJ, Holbrook NM, Edwards EJ, Gutierrez MV (2003) Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. Plant Cell Environ. **26**: 443-450.
Brodribb TJ, Holbrook NM, Gutierrez MV (2002) Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. Plant Cell Environ. **25**: 1435-44.
Brouwer R (1954) The regulation influence of transpiration and suction tension on the water and salt uptake by roots of intact *Vicia faba* plants. Acta Botanica Neerlandica **3,** 264–312.
Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts VA, Todo T, Tainer JA, Getzoff ED (2003) Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. Molecular Cell **11:** 59-67
Bush DS (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **46**: 95–122.

-C-

Cabañero FJ, Martinez-Ballesta MC, Teruel JA &Carvajal M (2006) New evidence about the relationship between water channel activity and calcium in salinity stressed pepper Plant Cell Physiol. **47(2):**224-33.
Canny MJ (1990) What becomes of the transpiration stream? New Phytol. **114**: 341-68.
Carvajal M, Martinez V, Alcaraz CF (1999) Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paparika pepper. Physiol Plant **105**: 95-101.
Chalhoub BA, ThibaultS, LaucouV, Rameau C, Hofte H, Cousin R (1997) Silver staining and recovery of AFLP Amplification Products on large denaturing polyacrylamide gels. BioTechniques. **22(2)**:216-220
Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter, **11(2):** 113-116
Chaumont F, Moshelion M , Daniels M J (2005). Regulation of plant aquaporin activity Biol. Cell **97:**749–764
Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. Plant Physiol. **125(3):**1206-15.

Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004) LIGHT SIGNAL TRANSDUCTION IN HIGHER PLANTS Annu. Rev. Genet **38**:87–117

Chen R, Fearnley I M, Palmer D N, Walker JE (2004) Lysine 43 is trimethylated in subunit c from bovine mitochondrial ATP synthase and in storage bodies associated with Batten disease. J. Biol. Chem **279**:21883–21887

Cheng SF, Huang YP, Wu ZR, Hu CC, Hsu YH, Tsai CH (2010) Identification of differentially expressed genes induced by Bamboo mosaic virus infection in Nicotiana benthamiana by cDNA-amplified fragment length polymorphism. BMC Plant Biol.**10**:286.

Cheng S-H, Willmann MR, Chen H-C, Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. Plant Physiology **129**: 469–485.

Choi WG, Roberts DM (2007) *Arabidopsis* NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. J. Biol. Chem. **282**:24209–18.

Chrispeels MJ, Maurel C (1994) Aquaporins : The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells ? Plant physiology. **105**: 9-13.

Christensen AH, Quail PH (1989) Structure and expression of a maize phytochrome-encoding gene. Gene **85:** 381-390

Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, SteudleE (2000) Root hydraulic conductance : diurnal aquaporin expression and the effect of nutriment stress. J Exp Bot **51**:61-70.

Cochard H, Hölttä T, Herbette S, Delzon S, Mencuccini M (2009) New insights into the mechanisms of water-stress-induced cavitation in conifers. Plant Physiol. **151(2):**949-54.

Cochard H, Martin R, Gross P, Bogeat-Triboulot MB (2000) Temperature effects on hydraulic conductance and water relations of *Quercus robur L*. J Exp Bot **51**: 1255-1259.

Cochard H, Nardini A, Coll L (2004) Hydraulic architecture of leaf blades: Where is the main resistance? Plant Cell Environ. **27:** 1257-67

Cochard H, Venisse JS, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guilliot A, Tyree MT, Sakr S (2007) New Insights into the Understanding of Variable Hydraulic Conductances in Leaves. Evidence for a Possible Implication of Plasma Membrane Aquaporins. Plant Physiol **143(1)**:122-33.

Colwell CS (2000) Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. Eur. J. Neurosci. **12**,571.

Cosmstock J (2000) Variation in hydraulic architecture and gas exchange in two desert sub-shrubs, *Hymenoclea salsola* and *Ambrosia dumosa*. Oecologia.**125**, 1-10.

Cruiziat P, Améglio T, Cochard H (2001) La cavitation : un mécanisme perturbant la circulation de l'eau chez les végétaux. Mec. Ind. **2:** 289-298.

-D-

Daniels MJ, Chrispeels MJ & Yeager, M (1999) Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. J. Mol. Biol. **294,** 1337–1349.

Davies WJ (**1986)** Transpiration and the water balance of plants. In Plant Physiology, ed. FC Steward, pp. 49-154. Orlando, FL: Academic.

de Silva K, Laska B, Brown C, Sederoff HW, Khodakovskaya M (2011) Arabidopsis thaliana calcium-dependent lipid-binding protein (AtCLB): a novel repressor of abiotic stress response. J Exp Bot. **62(8):**2679-89.

Delk NA, Johnson KA, Chowdhury NI & Braam J (2005) CML24, Regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca 2+ sensor that functions in responses to abscisic acid, aaylength, and ion stress. Plant Physiol. 139 **(1):** 240-253

Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. - Curr. Biol. **17**: 520-527.

Diédhiou CJ, Popova OV, Golldack D (2009) Transcript profiling of the salt-tolerant Festuca rubra ssp. litoralis reveals a regulatory network controlling salt acclimatization. - Journal of Plant Physiol. **166**: 697-711.

Dixon HH, Joly J (1894) On the ascent of sap. Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B **186**: 563-576.

Dodd AN, Love J, Webb AA (2005) The plant clock shows its metal: circadian regulation of cytosolic free Ca(2+). Trends Plant Sci. **10,** 15.

Doherty, CJ, Van Buskirk, HA, Myers, SJ and Thomashow, MF (2009) Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. Plant Cell **21(3):** 972-984.

Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy AS et al (2009) Ca2+ /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. Nature **26,457(7233):** 1154-1158.

Du L, Chen Z(2004) Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. - Plant J. **24**: 837-847.

-E-

Eckey C, Korell M, Leib K, Biedenkopf D, Jansen C, Langen G, Kogel KH (2004) Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. Plant Mol Biol. **55(1):**1-15.

Edinger RS, Yospin J, Perry C, Kleyman TR, Johnson J P (2006) Regulation of epithelial Na^+ channels (ENaC) by methylation: a novel methyltransferase stimulates ENaC activity. J. Biol. Chem**. 281:**9110–9117.

Eisenbarth DA, Weig AR (2005) Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in Ricinus communis L. seedlings. J Exp Bot. J **56(417):**1831-42.

Ellard-Ivey M, Hopkins RB, White TJ, Lomax TL (1999) Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (Cucurbita pepo L) - Plant Mol. Biol. **39**: 199-208.

Engelbrecht BMJ, Velez V, Tyree MT (2000) Hydraulic conductance of two co-occuring neotropical understroy shrubs with different habitat preferences. Ann. For. Sci. **57**: 201-8.

Ennajeh M, Tounekti T, Vadel AM, Khemira H, Cochard H (2008) Water relations and drought-induced embolism in olive (Olea europaea) varieties 'Meski' and 'Chemlali' during severe drought. Tree Physiol. **28(6):**971-6.

Esau K (1965) Plant Anatomy. New York: Wiley. 2nd ed.

Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (1999) Early nuclear events in plant defence signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. - EMBO Journal **18**: 4689-4699.

Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I (2009) Resistances along the CO_2 diffusion pathway inside leaves. - J. Exp. Bot. **60**: 2235-2248.

-F-

Fankhauser C, Lorrain S (2006) Quand les plantes sortent de l'ombre. Pour la science. N°**349**. 68-73.

Fasano JM, Massa GD, Gilroy S (2002) Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. Journal of Plant Growth Regulation **21**: 71–88.

Felle H (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. Planta **174**: 495–499.
Fetter K,Wider VV, Moshelion M, Chaumont F (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. The Plant Cell **16**, 215–228.
Fleurat-Lessard P, Frangne N, Maeshima M, Ratajczak R, Bonnemain JL, Martinoia E (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H + -ATPase related to motor cell function in Mimosa Pudica L. Plant Physiol. **114(3):** 827-834.
Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO_2 concentration around leaves. - Plant Cell Environment **30**: 1284-1298,
Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (**2008)**. Mesophyll conductance to CO_2: current knowledge and future prospects. Plant Cell Environment **31**: 602-621,
Fotiadis D, Jeno P, Mini T, Wirtz S, Mulle SA, Fraysse L, Kjellbom P, Engel A (2001) Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. J. Biol. Chem. **276**, 1707–1714
Fouquet R, Léon C, Ollat N, Barrieu F (2008) Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. Plant Cell Rep. **27(9):**1541-50.
Fredeen AL, Sage RF (1999) Temperature and humidity effects on branchlet gas- exchange in white spruce: An explanation for the increase in transpiration with branchlet temperature. Trees: Structure and Function. **14**:161-168
Frohnmeyer H, Loyall L, Blatt MR, Grabov A (1999) Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca 2+ and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. Plant J. **(20)1**: 109-117.
Fry SC (**1989)** Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. Physiol. Plant. **75:** 532-536.
Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J & Stroud RM (2000) Structure of a glycerolconducting channel and the basis for its selectivity. Science **290**, 481-486.
Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S (1993) Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. Nature **361**: 549-552.

-G-

Gascò, A, A Nardini and S Salleo (2004) Resistance to water flow through leaves of *Coffea arabica* is dominated by extravascular tissues. Funct. Plant Biol. **31**:1161–68.
Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C (2002) The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. The Plant Journal **30**, 71–81.
Gerbeau P, Güclü J, Ripoche P, Maurel C (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. Plant J. **18**:577–87.
Giammaria V, Grandellis C, Bachmann S, Gargantini PR, Feingold SE, Bryan G, Ulloa RM (2011) StCDPK2 expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling. Planta **233(3):**593-609.
Girault T, Bergougnoux V, Combes D, Viemont JD, Leduc N (2008) Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa sp.* Plant Cell Environ. **31(11):**1534-44

Goldstein G, Andrale JL, Meinzer FC, Holbrook NM, Cavelier J (1998) Stem water storage and diurnal patterns of water use in tropical forest canopy trees. Plant Cell Environ. **21**: 397-406.
Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace I S, Cobb JA & Roberts DM (2003) Phosphorylation of soybean Nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. PlantCell **15**, 981–991.
Gueta-Dahan Y, Avsian-Kretchmer O, Ben-Hayyim G (2008) The involvement of calcium in the regulation of GPX1 expression. Planta **228(5):** 725-734.
Guo H, Mockler T, Duong H, Lin C (2001) SUB1, an Arabidopsis Ca2+-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* **291**:487–90
Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu J-K (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383–1400
Gupta V, Roy A, Tripathy BC (2010) Signaling events leading to red-light-induced suppression of photomorphogenesis in wheat (Triticum aestivum). Plant Cell Physiol. **51(10):**1788-99.
Gutierrez L, Conejero G, Castelain M, Guénin S, Verdeil JL, Thomasset B, Van Wuytswinkel O (2006) Identification of new gene expression regulators specifically expressed during plant seed maturation. J Exp Bot **57(9):**1919-32.

-H-

H Wang, XW Deng (2002) Arabidopsis FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1**.** EMBO J **21**:1339–1349
Hachez C, Heinen RB, Draye X, Chaumont F (2008) The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. Plant Mol Biol **68(4-5):**337-53.
Hachez C, Zelazny E, Chaumont F (2006) Modulating the expression of aquaporin genes *in planta*: a key to understand their physiological functions? Biochimica Biophysica Acta **1758**, 1142–1156.
Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **97**: 3735–3740.
Halperin SJ, Gilroy S, Lynch JP(2003) Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. Journal of Experimental Botany **54**: 1269–1280.
Hamer SL, Hogenesch LB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. Science **290,** 2110-2113.
Harada A, Sakai T, Okada K (2003) Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca2+ differently in Arabidopsis leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**:8583–88
Harada A, Shimazaki K (2007) Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. Photochem Photobiol **83(1):**102-11.
Harada A, Shimazaki K (2009) Measurement of changes in cytosolic Ca2+ in Arabidopsis guard cells and mesophyll cells in response to blue light. Plant Cell Physiol **50(2):**360-73.
Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF (2001) The CDPK superfamily of protein kinases. New Phytologist **151**: 175–183.

Harvengt P, Vlerick A, Fuks B, Wattiez R, Ruysschaert JM, Homble F (2000) Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg2+-dependent and Ca2+-regulated kinase. The Biochemical Journal **352**, 183–190.
Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. Plant Molecular Biology **29:** 1143-1155
Hayashi T (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40:** 139-168
Hecker U (1985) Echte Walnuss. In: Laubgehölze. Wildwachsende Bäume, Sträucher und Zwerggehölze. BLV Verlagsgesellschaft, München. p. 38-39.
Hendricks G, Koudijs M, van Balkom BWM, Oorschot V, Klumperman J, Deen PMT, van der Sluijs P (2004) Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem **279**:2975–2983
Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Carvajal M, Cooke DT, Schaffner AR, Steudle E, Clarkson DT (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicum*. Planta **210**: 50-60.
Hetherington AM, Brownlee C (2004) The generation of Ca2+ signals in plants. Annu Rev Plant Biol **55:**401–427
Hoecker U (2005) Regulated proteolysis in light signaling. Curr Opin Plant Biol **8**: 469-76.
Hoffman PD, Batschauer A, Hays JB (1996) PHH1, a novel gene from Arabidopsis thaliana that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. Mol Gen Genet **253(1-2):**259-65.
Höfte H, Hubbard L, Reiser J, Ludevid D, Herman EM, Chrispeels MJ (1992) Vegetative and seed-specific isoforms of a putative solute transporter in the tonoplaste of *Arabidopsis thaliana.* Plant physiology. **99:** 561-570.
Holm LM, Jahn TP, Møller AL, Schjoerring JK, Ferri D, et al (2005) NH3 and NH4+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. Pflugers Arch. **450 (6)**:415–28
Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng X-W (2002) Two interactions bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. Genes and Development **16:** 1247-1259
Hu XJ, Zhang ZB, Xu P, Fu ZY, Hu SB, Song WY (2010) Multifunctional genes: the cross-talk among the regulation networks of abiotic stress responses. Biol. Plant. **54**: 213-223,
Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kianse with a putative redox-sensing domain. Science **278:** 2120-2123
Hwang I, Robinson DG (2009) Transport vesicle formation in plant cells. Curr Opin Plant Biol. **12(6):**660-9.

-I-

Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, Allen CN (2003) Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca2+ in single suprachiasmatic nucleus neurons. Neuron. **38(2):**253-63.
Ionenko IF, Anisimov AV & Karimova FG (2006) Water transport in maize roots under the influence of mercuric chloride and water stress: a role of water channel. Biol Plant. **50:** 74-80.
Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in Arabidopsis thaliana. FEBS Lett **24;579(25):**5814-20.
Ito H, Nishitani K (1999) Visualization of EXGT-mediated molecular grafting activity J.

Clin. Invest. **94**, 1043–1049

-J-

Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miège C, Gaude T (2008) Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. Plant J **53**:237-247.

Jang JY, Kim DG YO Kim, Kim JS & Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology **54**:713-725.

Javot H**, Lauergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Guclu J, Vinh J, Heyes J, Franck KI**, **Schaffner AR, Bouchez D, Maurel C (2003)** Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. Plant Cell **15**: 509-622.

Javot H, Maurel C (2002) The role of aquaporins in root water uptake. Annals of Botany **90**:301-313.

Jeje AA (1985) The flow and dispersion of water in the vascular network of dicotyledonous leaves. Biorheology.;**22(4):**285-302.

Jiao Y, Lau OS, Deng XW (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. Nat Rev Genet **8(3):**217-30.

Johanson U, Gustavsson S (2002) A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. Mol. Biol. Evol. **19,** 456–461.

Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. Plant Physiol. **126(4):**1358-69.

Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. Biochim Biophys Acta **1465**: 324-342.

Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. Plant Cell **10(3):**451-9.

Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca2+ and apoplastic water potential. Plant Cell **8**, 1181–1191.

Johnson CH, Knight MR, Kondo T, Masson P, Sedbrook J, Haley A, Trewavas A (1995) Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. Science **269**: 1863–1865.

Johnson KD, Chrispeels MJ (1992) Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. Plant Physiol. **100(4):** 1787-1795.

Jones HG (1992) Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. 2 edn. Cambridge: Cambridge University Press.

-K-

Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M (2001) *Arabidopsis* NPL1 : a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. Science **291:** 2138-2141

Kaldenhoff R, A Kölling, J Meyers, U Karmann, G Ruppel & G Richter (1995) The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarly expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. Plant J. **7:**87-95.

Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water- transport in *rabidopsis thaliana*. Plant **J 14**: 121-128.
Kaldenhoff R, Kölling A, Richter G (1996) Regulation of the Arabidopsis thaliana aquaporin gene AthH2 (PIP1b).J Photochem Photobiol B. **36(3):**351-4.
Kammerloher W, Schäffner AR (1993) PIP- An *Arabidopsis thaliana* plasma membrane MIP homologue cloned by expression in mammalian cells. In fifth international conference on *Arabidopsis* Research. Ohio State University, Columbus, OH, p185.
Katsuhara M, Hanba YT, Shiratake K and Maeshima M (2008) Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. Functional Plant Biology **35**, 1–14
Kawasaki S, Borchet C, deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell **113**: 889-905.
Kendrick RE, Kronenberg GHM (1994) Photomorphogenesis in plants. Kluwer, Dordrecht, Pays-Bas, 828p
Kim BH, Schöffl F (2002) Interaction between Arabidopsis heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. J Exp Bot 53**(367):**371-5.
Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S (2003) CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. Plant Cell. **15(2):** 411-423.
Kim MC, Chung WS, Yun D, Cho MJ (2009) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. Molecular plant **2**: 13-21.
Kim, HS, Park, BO, Yoo, JH, Jung, MS, Lee, SM, Han, HJ et al (2007) Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in Arabidopsis. J Biol Chem. **14;282(50):**36292-302.
Kim YX & Steudle H (2009) Gating of aquaporins by light and reactive oxygen species in leaf parenchyma cells of themidrib of *Zea mays*. J Exp Bot.**60 (2):**547-56.
Kim YX & Steudle E (2007) Light and turgor affect the water permeability (aquaporins) of parenchyma cells in the midrib of leaves of *Zea mays*. J Exp. Bot. **58(15-16):**4119-29.
Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. Nature **414:** 656-660
Kirch HH, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ (2000) Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol **123**: 111-124.
Kitajima K, Mulkey SS, Samaniego Mn Wright SJ (2002) Decline of photosynthetic capacity with leaf age and position in two tropical pioneer tree species Ann. J. Bot. **89**: 1925-32.
Kleine T, Lockhart P, Batschauer A (2003) An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. The Plant Journal **35:** 93-103
Kluck R M, Ellerby L M, Ellerby H M,Naiem S, Yaffe M P, Margoliash E, Bredesen D, Mauk A G,Sherman F, Newmeyer D D (2000) Determinants of cytochrome *c* pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. J. Biol. Chem **275**: 16127–16133
Klüsener B, Young JJ, Murata Y, Allen GJ, Mori IC, Hugouvieux V, Schroeder JI (2002) Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in Arabidopsis guard cells. Plant Physiology **130**: 2152–2163
Knight H (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. International Review of Cytology **195**: 269–324.
Kobayashi A, Takahashi A, Kakimoto Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani A, Takahashi H (2007) A gene essential for hydrotropism in roots. Proc Natl Acad Sci U S A. **13: 104(11):**4724-9.
Kramer PJ, Boyer JS (1995) Water relations of plants and soil. Orlando: Academic Press.

Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R (2006) The aquaporins.Genome Biol. **7(2):**206.
Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **96**: 4718–4723.
Kukulski W, Schenk AD, Johanson U, Braun T, de Groot BL, Fotiadis D, Kjellbom P & Engel A (2005) The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. J. Mol. Biol. **350**, 611–616.
Kumar KG, Ullanat R & Jayabaskaran C (2004) Molecular cloning, characterization, tissue-specific and phytochrome-induced expression of calcium-dependent protein kinase gene in cucumber (*Cucumis sativus L*.). J Plant Physiol. **161(9):** 1061-1071.
Kuno N, Muramatsu T, Hamazato F, Furuya M (2000) Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of Arabidopsis using a fluorescent differential display technique.Plant Physiol.**22(1):**15-24.

-L-

Lange OL, Nobel PS, Osmond CB& H Ziegler (1982) Physiological plant ecologyII; water relations and carbon assimilation. Encyclopedia of Plant physiology, vol 12B. Springer, Berlin Heidelberg New York.
Larson PR (1984) The role of subsidiary trace bundles in stem and leaf development of the dicotiledoneae. In contemporary problems in Plant Anatomy, ed. RA White, WC Dickison, pp. 109-43. London Academic.
Larson PR, Isebrands JG (1978) Functionnal significance of the nodal constricted zone in *Populus deltoides*. Canadian Journal of Botany **56**: 801-804.
Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Plant Cell **14**: 2627–2641
Lee GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 system to reactivate a heat-denatured protein. Plant Physiol. **122**: 189-197.
Lee SH, Chung GC, Zwiazek JJ (2009) Effects of irradiance on cell water relations in leaf bundle sheath cells of wild-type and transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants overexpressing aquaporins. Plant Science **176,** 248–255.
Lee SS, Cho HS, Yoon GM, Ahn J-W, Kim H-H, Pai H-S (2003) Interaction of NtCDPK1 calcium-dependent protein kinase with NtRpn3 regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum*. Plant Journal **33**: 825–840.
Lee SH, Zwiazek JJ, Chung GC (2008) Light-induced transpiration alters cell water relations in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) seedlings exposed to low root temperatures. Physiologia Plantarum **133**, 354–362.
Leitch, V, Agre P, King LS (2001) Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **98:** 2894-2898.
Lewit-Bentley A & Réty S (2000) EF-hand calcium-binding proteins. Curr. Op. Struct. Biol, **10,** 637 – 643
Lhuissier FGP, De Ruijter NCA, Sieberer BJ, Esseling JJ, Emons AMC (2001) Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by Rhizobium Nod factors: state of the art. Annals of Botany **87:** 289–302
Li C, Xiang Z, Ling Q & Shang K (1998) Effects of calmodulin and calmodulin binding protein BP-10 on phosphorylation of thylakoid membrane protein Sci China C Life Sci. **41(1):** 64-70.

Lin C, Ahmad M, Cashmore AR (1996) Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. The Plant Journal **10:** 893-902

Lin C, Shalitin D (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. **54:** 469–96

Lin R, Wang H (2004) Arabidopsis FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of Arabidopsis development. Plant Physiol. **136(4):**4010-22.

Liscum E, Briggs WR (1995) Mutations of Arabidopsis in potential transduction and response components of the phototrophic signaling pathway. Plant Physiology **112:** 291-296

Liu HY, Yu X, Cui DY, Sun WN (2007) The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. Cell Res. **17(7):**638-49.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods **25,** 402-408.

Lo Gullo MA, Castro Noval L, Salleo S, Nardini A (2004) Hydraulic architecture of plants of *Helianthus annuus* L.cv.Margot: evidence for plant segmentation in herbs. Journal of experimental Botany **55 (402)**: 1549- 1556.

Lo Gullo MA, Nardini A, Trifilo P, Salleo S (2005) Diurnal and seasonal variations in leaf hydraulic conductance in evergreen and deciduoud trees. Tree Physiol. **25**: 505-12.

Lo Gullo MA, Salleo S, Piaceri EC, Rosso R (1995) Relations between vulnerability to xylem embolism and xylem conduit dimensions in young trees of Quercus cerris. Plant, Cell and Environment **18**: 661-669.

Lopez F, Bousser, Sissoëf I, Gaspar M, Lachaise B, Hoarau J, Mahé A (2003) Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. Plant Cell Physiol **44**: 1384-1395.

Lorenz A, Kaldenhoff R, Hertel R (2003) A major integral protein of the plant plasma membrane binds flavin. Protoplasma. **221(1-2):**19-30.

Love J, Dodd AN, Webb AA (2004) Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in Arabidopsis.Plant Cell **16**, 956.

Lovisolo C, Schubert A (2006) Mercury hinders recovery of shoot hydraulic conductivity during grapevine rehydration: evidence from a whole-plant approach. New Phytol **172(3):**469-78.

Lu HA, Sun TX, Matsuzaki T, Yi XH, Eswara J, Bouley R (2007) Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking. Journal of Biology and Chemistry **282:** 28721-28732.

Luan S, Kudla J, Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S, Gruissem W (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. Plant Cell **14:** 389–400.

Ludevid D, Höfte H, Himelblau E, Chrispeels MJ (1992) The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ-TIP in Arabidopsis thaliana is correlated with cell enlargement. Plant Physiol **100:** 1633-1639.

Luu DT, Maurel C (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. Plant Cell Environ **28:** 85-96.

-M-

Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, et al (2006) A silicon transporter in rice. Nature **440**:688–91.

Maathuis FJ, Filatov V, Herzyk P, Krijger G, Axelsen KB, Chen S (2003) Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. Plant J. **35**: 675-692.

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity a drought stresses: an overview Arch Biochem Biophys. **444**: 139–158

Malhó R, Moutinho A, van der Luit A, Trewavas AJ (1998) Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B **353**: 1463–1473.

Mandadi KK, Misra A, Ren S, McKnight TD (2009) BT2, a BTB protein, mediates multiple responses to nutrients, stresses, and hormones in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, **150**:1930-1939.

Mariaux JB, Bockel C, Salamoni F, Bartels D (1998) Desiccation and abscissic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. Plant Mol Biol **38**: 1089-1099.

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. London academic press.

Martinez-Ballesta MC, Cabanero F, Olmos E, Carvajal M, Periago PM et al (2008) Two different effects of calcium on aquaporins in salinity-stressed pepper plants. Planta **228**: 15-25.

Martínez-Ballesta MC, Diaz R, Martínez V, Carvajal M (2003) Different blocking effects of HgCl2 and NaCl on aquaporins of pepper plants. J Plant Physiol.;**160(12**):1487-92.

Martre P(1999) Architecture hydraulique d'un thalle de fétuque élevée (*Festuca arundinacea Scheb.*). Implications pour les relations entre la transpiration et l'expansion foliaire. Thèse de Doctorat à l'Université de Poitiers.

Martre P, Cochard H, Durand JL (2001) Hydraulic architecture and water flow in growing grass tillers (*Festuca arundinacea* Scherb). Plant Cell and Environment **24**: 65-76.

Martre P, Durand JL, Cochard H (2000) Changes in axial hydraulic conductivity along elongation leaf blades in relation to xylem maturation in tall fescue. New Phytol. 146:235-47.

Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. Plant physiol **160**: 689-697.

Matheson LA Suri SS, Hanton SL, Chatre L, Brandizzi F (2008) Correct targeting of plant ARF GTPases relies on distinct protein domains. Traffic **9**: 103-120.

Mathews S, Sharrock RA (1996) The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): a phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. Molecular Biology and Evolution **13:** 1141-1150

Matsumoto N, Hirano T, Iwasaki T, Yamamoto N (2003) Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. Plant Physiology **133:** 1494-1503

Maurel C (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties .FEBS Letters **581** :2227–2236

Maurel C, Chrispeels MJ (2001) aquaporins. A molecular entry into plant water relations. Plant physiology. **125**: 135-138.

Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. Embo J **14**: 3028-3035.

Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein γ-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes. Embo J **12**: 2241-2247.

Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins : membrane channels with multiple integrated functions. Annu. Rev. Plant Biol.**59** :595-624.

Mazars C, Bourque S, Mithöfer A, Pugin A, Ranjeva R (2008) Calcium homeostasis in plant cell nuclei. New Phytol. **181(2):** 261-274.

McAinsh MR, Hetherington AM (1998). Encoding specificity in Ca2+ signalling systems. Trends Plant Sci.3:32–36.

McAinsh MR, Pittman JK (2009) Shaping the calcium signature. New Phytol **181(2):**275-94.

McBride AE, Silver PA (2001). State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. Cell **106:** 5–8.
McCann MC, Wells B, Roberts K (1990) Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. J Cell Sci **96**: 323-334.
McCormack E, Tsai YC, Braam J (2005) Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. Trends Plant Sciences. **10(8):** 383-389.
McElrone AJ, Bichler J, PockmanWT, Addington RN, Linder CR, Jackson RB (2007) Aquaporin-mediated changes in hydraulic conductivity of deep tree roots accessed via caves. Plant Cell Environ **30:** 1411–1421
Means AR, Dedman JR (1980) Calmodulin-an intracellular calcium receptor. Nature **285:**73-7.
Messerli MA, Créton R, Jaffe LF, Robinson KR (2000) Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca^{2+} during pollen tube growth. Developmental Biology **222**: 84–98.
Miao GH, Hong Z, Verma DPS (1992) Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. J. Cell Biol. **118**, 481–490
Mitsui T, Loboda T, Kamimura I, Hori H, Itoh K, Mitsunaga S (1999) Sucrose controlled transport and turnover of alpha-amylase in rice (*Oriza sativa L*) cells. Plant Cell Physiol **40**: 773-783.
Moore CA, Bowen HC, Scrase-Field S, Knight MR, White PJ (2002) The deposition of suberin lamellae determines the magnitude of cytosolic Ca^{2+} elevations in root endodermal cells subjected to cooling. Plant J.**30**:457–466
Morillon R, Chrispeels MJ (2001) The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. Proceeding of the National Academy of Sciences Vol 98. **24:** 14138-14143.
Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H Moran N, Kaldenhoff R (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of Samanea Saman: diurnal and circadian regulation. Plant cell **3**: 727-739.
Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A & Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. Nature (London) **407**, 599–605
Mustilli AC, Bowler C (1997) Tuning in to the signals controlling photoregulated gene expression in plants. EMBO J. **16**:5801–6

-N-

Nagatani A (2004) Light-regulated nuclear localization of phytochromes. Current Opinion in Plant Biology **7:** 708-711.
Nardini A (2001) Are sclerophylls and malacophylls hydraulically different? Biologia Plantarium **44:** 239-245.
Nardini A, Salleo S (2000) Limitation of stomatal conductance by hydraulic traits: sensing or preventing xylem cavitation? Trees **15**:14-24.
Nardini A, Salleo S (2005) Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. J Exp Bot ;**56(422):**3093-101.
Nardini A, Gortan E, Salleo S, (2005)a Hydraulic efficiency of the leaf venation system in sun- and shade-adapted species. Funct Plant Biol. **32**: 953-61.
Nardini A, Salleo S, Andri S (2005)b Circadian regulation of leaf hydraulic conductance in sunflower (*Helianthus annuus* L.cv Margot). Plant cell Environ **28**: 750-759.
Nardini A, Salleo S, Raimondo F (2003) Changes in leaf hydraulic conductance correlate with leaf vein embolism in *Ceris siliquastrum L.* Trees **17**: 529-534.

Nardini A, Tyree MT (1999) Root and shoot hydraulic conductance of seven Quercus species. Annals of Forest Science **56**: 371-377.
Negulyaev YA, Vedernikova EA, Kinev AV, Voronin AP (1996) Exogenous heat shock protein hsp70 activates potassium channels in U937 cells. - Biochimica and Biophysica Acta **1282**: 156-62.
Ng, CK, Carr, K, McAinsh, MR, Powell, B, Hetherington, AM (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. - Nature **410**: 596-599.
North GB, Martre P, Nobel PS (2004) Aquaporins account for variations in hydraulic conductance for metabolically active root regions of Agave deserti in wet, dry and rewetted soil. Plant Cell Environ **27**: 219–228.
North GB, Nobel PS (1991) Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave deserti* (Agavaceae).Am J Bot **78**: 906–915.
North GB, Nobel PS (1996) Radial hydraulic conductivity of individual root tissues of *Pountia ficus-indica* (L.) Miller as soil moisture varies. Ann Bot (Lond) 77: 133–142.
Nozawa A, Koizumi, Sano H (2001) An Arabidopsis SNF1-related protein kinase, AtSR1, interacts with a calcium-binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light. Plant and Cell Physiology **42**: 976–981

-O-

Obara M, Tamura W, Ebitani T, Yano M, Sato T, Yamaya T (2010) Fine-mapping of qRL6.1, a major QTL for root length of rice seedlings grown under a wide range of NH4(+) concentrations in hydroponic conditions. Theor Appl Genet. **121(3):**535-47.
Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS (1998) ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. J Cell Biol, 142:391-402.
Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng X-W (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. Nature **405:** 462-466

-P-

Paciorek T, Zazímalová E, Ruthardt N, Petrásek J, Stierhof YD, Emans N, Jürgens G, Geldner N, Friml J (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. Nature **435**: 1251-1256.
Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci. **12(4):**357-8.
Pandey SP, Somssich IE (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiol. **150**: 1648-1655,.
Pang X, Halaly T, Crane O, Keilin T, Keren-Keiserman A, Ogrodovitch A et al (2007) Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds. J Exp Bot. **58(12):** 3249-3262.
Perrotta G, Ninu L, Flamma F, Weller JL, Kendrick RE, Nebuloso E, Giuliano G (2000) Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochromes 1 and 2. Plant Molecular Biology **42:** 765-773
Phean-O-Pas S, Punteeranurak P & Buaboocha T(2005) Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in Oryza sativa L. J Biochem Mol Biol. 31;**38(4):** 432-439.
Piao HL, Lim JH, Kim SJ, Cheong G-W, Hwang I (2001) Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis*. Plant Journal **27**: 305–314

Plieth C (2001) Plant calcium signaling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. Protoplasma **218**: 1–23.
Plieth C, Trewavas AJ (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiology **129**: 786–796
Poovaiah BW, Yang T and van Loon JJ (2002) Calcium/calmodulin-mediated gravitropic response in plants. J Gravit Physiol. **9(1):** 211-214.
Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Seay M, Gerstein M, & al (2007) Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **104(11)**: 4730-4735.
Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, Boursiac Y, Morillon R, Schäffner AR, Maurel C (2010) A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. Plant Physiol. **152(3):**1418-30.
Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P (1992) Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science **256**: 385-387.
Pretzsch H (1995) Juglans regia Linné, 1753. In: Schütt, P, Schuck, H.J, Aas, G, Lang, U. (Éd.), 1995: Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie.

-Q-

Quail PH (1998) The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353:** 1399-1403
Quail PH (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **3:**85–93
Quigley F, **Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2002)** From genome to function: the Arabidopsis **aquaporins**. Genome Bio 3

-R-

Reddy ASN (2001) Calcium: silver bullet in signaling. Plant Science **160**: 381–404.
Reddy ASN, Reddy VS, Golovkin M (2000) A calmodulin binding protein from *Arabidopsis* is induced by ethylene and contains a DNA-binding motif. Biochemical and Biophysical Research Communications **279**: 762–769.
Reddy VS, Ali GS, Reddy ASN (2002) Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. Journal of Biological Chemistry **277**: 9840–9852.
Reich PB (1984). Loss of stomatal function in aging hybrid poplar leaves. Am. Bot. **53**:691-98.
Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr (1993) The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol **28**: 235-257.
Ren S, Mandadi KK, Boedeker AL, Rathore KS & McKnight TD (2007) Regulation of telomerase in Arabidopsis by BT2, an apparent target of TELOMERASE ACTIVATOR1. Plant cell.19 **(1):** 23-31.
Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel ML(1997) Functional analysis of Nodulin 26, an aquaporin in soybean root symbiosomes. J. Biol. Chem.**272**:16256–61.

Robert HS, Quint A, Brand D, Vivian-Smith A & Offringa, R (2008) BTB and TAZ DOMAIN scaffold proteins perform a crucial function in Arabidopsis development. Plant J. **58**: 109-121.
Robinson DG, Sieber H, Kammerloher W, Schaeffner AR (1996) PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of Arabidopsis thaliana mesophyll. Plant Physiology **111**, 645–649.
Roca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, Chrispeels MJ (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. Plant Physiol **137:** 341-353.
Rockwell FE, Holbrook NM, Zwieniecki MA (2011) Hydraulic conductivity of red oak (Quercus rubra L.) leaf tissue does not respond to light. Plant Cell Environ **34(4):**565-79.
Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. **57:** 837-858
Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Zik M, *et al* (1999)The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. EMBO J **18**: 1996-2007.
Roelfsema MR, Hedrich R (2010) Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements. - Plant and Cell Environment **33**: 305-321.
Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. EMBO Journal **20**: 5556–5567.
Roth-Nebelsik A, Uhl D, Mosbrugger V, Krep H (2001) Evolution and function of leaf venation architecture: a review. Ann. Bot. **87**:553-66.
Rudd JJ, Franklin-Tong VE (2001) Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. New Phytol. **151**:7–33.
Ruiter RK, Van Eldik Gj, Van Herpen MMA, Scharauwen JAM, Wullems GJ (1997) Expression in anthers of two genes encoding *Brassica oleracea* transmembrane channel proteins. Plant Mol Biol **34**: 163-168.

-S-

Sack L, Cowan PD, Jaikumar N, Holbrook NM (2003) The hydrology of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. Plant, Cell and Environment **26**:1343-1356.
Sack L, Frole K (2006) Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rainforest trees. Ecology **87**: 483-91.
Sack L, Holbrook NM (2006) Leaf hydraulics. Annu. Rev. Plant Biol **57**: 361-381.
Sack L, Melcher PJ, Zwieniecki MA, Holbrook NM (2002) The hydraulic conductance of the angiosperm leaf lamina: a comparison of three measurements methods. J Exp Bot **53**: 2177-2184.
Sack L, Streeter CM, Holbrook NM (2004) Hydraulic analysis of water flow through leaves of sugar maple and red oak. Plant Physiol **134**: 1824-1833.
Sack L, Tyree MT (2005) Leaf hydraulics and its implications in plant structure and function. In Holbrook NM, Zweiniecki MA, eds. Vascular transport in plants. Oxford. Elsevier/ Academic Press, **93**-114.
Sack L, Tyree MT, Holbrook NM (2005) Leaf hydraulic architecture correlates with regeneration irradiance in tropical rainforest trees. New Phytol. **16**7: 403-13.
Sade, N, M Gebretsadik, R Seligmann, A Schwartz, R Wallach and M Moshelion (2010) The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. Plant Physiol. **152(1):**245-54.

Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca^{2+}-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. Plant Journal **23**: 319–327.

Saijo Y, Hata S, Sheen J & Izui K (1997) cDNA cloning and prokaryotic expression of maize calcium-dependant protein kinases. Biochem Biophys Acta **1350**: 109-114.

Sakamoto K, Briggs WR (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. The Plant Cell **14:** 1723-1735

Sakr S, Alves G, Morillon R, Maurel K, Decourteix M, Guilliot A, Fleurat-Lessard P, Julien JJ, Chrispeels MJ (2003) Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. Plant Physiol **133:** 630-641.

Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M (2008) Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities.Plant Cell Physiol **49(1):**30-9.

Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. Plant Cell Physiol **46(9):**1568-77.

Salleo S, Lo Gullo MA, Raimando F, Nardini A (2001) Vulnerability to cavitation of leaf minor veins: any impact on leaf gas exchange? Plant Cell and Environment **24**:851-859.

Salleo S, Nardini A, Lo Gullo MA, Ghirardelli LA (2002) Changes in stem and leaf hydraulics preceding leaf shedding in Castanea sativa L. Biologia Plantarum **45**: 227-234.

Salomon M, Knieb E, von Zeppelin T, Rüdiger W (2003) Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. Biochemistry **42:** 4217-4225

Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. Chemical Reviews **103:** 2203-2237

Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. Plant Cell **11**: 691-706,

Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell **14**: S401–S417

Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C (2006) Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. Biochem. J **400**: 189–97

Schafer E, Nagy F (2006) Photomorphogenesis in Plants and Bacteria: Function and signal Transduction Mechanisms. Springer, 662p

Schäffner AR (1998) Aquaporin function, structure and expression: are there more surprises to surface in water relations? Planta **204**: 131-139.

Schultz HR, Matthews MA (1993) Xylem development and hydraulic conductance in sun and shade shoots of grapevine (*Vitis vinifera L.*): evidence that low light uncouples water transport capacity from leaf area. Planta **190:** 393-406.

Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, Kaldenhoff R, Schubert A (2007) Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea L.*) Planta **225**: 381–392.

Sedbrook JC, Kronebusch PJ, Borisy GG, Trewavas AJ, Masson PH (1996) Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic Ca^{2+} responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Physiology **111**: 243–257

Seiberer T, Seifert G, Hauser MT, Grisafi P, Fink GR, Lusching C (2000) Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. Current Biology **10**:1595-1598.

Sellin A, Kupper P (2007) Temperature, light and leaf hydraulic conductance of little-leaf linden (*Tilia cordata*) in a mixed forest canopy. Tree Physiol. **27:**679–688.

Sellin A, Ounapuu E, Kupper P (2008) Effects of light intensity and duration on leaf hydraulic conductance and distribution of resistance in shoots of silver birch (*Betula pendula*). Physiol. Plant. **134:**412–420.

Shabala S, Newman I (1999) Light-induced changes in hydrogen, calcium, potassium, and chloride ion fluxes and concentrations from the mesophyll and epidermal tissues of bean leaves. Understanding the ionic basis of light-induced bioelectrogenesis. Plant Physiol **119:** 1115-1124.

Shacklock PS, Read ND, Trewavas AJ (1992) Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. Nature **358**: 753–755.

Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC, Lin C (2002) Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. Nature **417:** 763-767

Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler TC, Lin C (2003) Blue light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. Plant Cell **15:** 2421-2429

Shangguan, Z.P, Lei, TW, Shao, MA and Xue, QW (2005) Effects of phosphorus nutrient

Sharrock RA, Quail PH (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes and Development **3:** 1745-1757

Shaw SL, Long SR (2003) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. Plant Physiology **131**: 976–984.

Sheen J (1996) Ca^{2+}-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. Science **274**: 1900–1902.

Shi J, Kim K-N, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, Luan S, Kudla J (1999) Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. Plant Cell **11**: 2393–2405

Sidel VW, Solomon AK (1957) Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. J Gen Physiol **41**: 243-257.

Siefritz F, Otto B, Bienert GP, Krol A, Van Den Dries N, Kaldenhoff R (2004) The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. Plant J **37:** 147-155.

Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. Plant Cell **14**: 869-876.

Sjövall-Larsen S, Alexandersson E, Johansson I, Karlsson M, Johanson U & Kjellbom P (2006) Purification and characterization of two protein kinases acting on the aquaporin SoPIP2;1. Biochim. Biophys. Acta **1758,** 1157–1164.

Smart LB, Moskal WA, Cameron KD, Bennett AB (2001) MIP genes are down-regulated. under drought stress in *Nicotiana glauca*. Plant Cell Physiol **42**: 686-693.

Smith BL, Preston GM, Spring FA, Anstee DJ, Agre P (1994) Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens.

Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants: an emerging synthesis. Nature **407:** 585-591

Snedden WA, Fromm H (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. New Phytologist **151**: 35–66.

Sober A (1997) Hydraulic conductance, stomatal conductance, and maximal photosynthetic rate in bean leaves. Photosynthetica **34**: 599-603.

Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. Plant , Cell and Environment **11**: 35-40.

Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK (2005) Comparative analysis of end wall resistance in xylem conduits. Plant , Cell and Environment **11**: 35-40.

Stange A, Hedrich R, Roelfsema MR (2010) Ca(2+)-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization. Plant J. **62(2):**265-76.

Steudle E (1992) The biophysics of plant water. compartimentation, coupling with metabolic processes, and water flow in plant roots. In GN Somero, CB Osmond, CL Bolis, eds, Water and Life: A comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels. Springer-Verlag, Berlin : **173**-204.
Steudle E (2000)a water uptake by roots: effects of water deficit. Journal of Experimental Botany **51,** Special Issue, 1531–1542.
Steudle E (2000)b Water uptake by plant roots: an integration of views. Plant Soil **226**:45–56
Steudle E (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. Annual review of plant physiology and plant molecular biology **52**: 847-875
Steudle E, Peterson CA (**1998**) How does water get through roots? Journal of Experimental Botany **49,** 775–788
Stoelzle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**:1456–61
Strynadka NCJ, James MNG (1989) Crystal structures of the helix–loop–helix calcium-binding proteins. Annual Review of Biochemistry **58**: 951–998.
Sun QP, Guo Y, Sun Y, Sun DY & Wang XJ (2006) Influx of extracellular Ca 2+ involved in jasmonic-acid-induced elevation of [Ca 2+] cyt and JR1 expression in Arabidopsis thaliana. J Plant Res. **119(4):** 343-350.
Szymanski DB, Liao B, Zielinski RE (1996) Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the Arabidopsis *Cam-3* promoter. Plant Cell **8**: 1069–1077.

-T-

Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wiren N, Fujiwara T (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. Plant Cell **18:**1498–509.
Tazawa M, Ohkhuma E, Shibasaka M, Nakashima S (1997) Mercurial-sensitive water transport in barley roots. Journal of Plant Research **110:** 435–442.
Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N, Kuwahara M, Sasaki S, Tsuchiya T (2005) Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. FEBS Letters **579**: 4417–4422.
Thompson JD, DG Higgins &TJ Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **11; 22(22)**:4673-80.
Thompson JE, Smith RC, Fry SC (1997) Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall in vivo: evidence from 13 C/ 3 H dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. Biochemi J. **327**: 699-708.
Tornroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. Nature **439**, 688–694.
Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DFT, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. Nature **425**, 393–397.

Trifilò P, Gascó A, Raimondo F, Nardini A, Salleo S (2003) Kinetics of recovery of leaf hydraulic conductance and vein functionality from cavitation-induced embolism in sunflower. J Exp Bot. **54(391):**2323-30.
Tsuda M, Tyree MT (2000) Plant hydraulic conductance measured by the high pressure flow meter in crop plants. J Exp Bot **51**: 823-828.
Tungngoen K, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Katsuhara M, Brunel N, Sakr S, Narangajavana J, Chrestin H (2009) Involvement of *HbPIP2;1* and *HbTIP1;1* aquaporins in ethylene stimulation of latex yield through regulation of water exchanges between inner liber and latex cells in *Hevea brasiliensis*. Plant Physiol **151 (2):** 843-56.
Tuteja N, Mahajan S (2007) Calcium Signaling Network in Plants Plant Signaling & Behavior **2:2**, 79-85
Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. Plant Cell Environ **25:** 173-194.
Tyree MT, Nardini A, Salleo S, Sack L, Bouchra el Omari (2005) The dependence of leaf hydraulic conductance on irradiance during HPFM measurements: any role for stomatal response? Journal of Experimental Botany Vol 56. **412 :** 737-744.
Tyree MT, Patiño S, Becker P (1998) Vulnerability to drought-induced embolism of Bornean heath and dipterocarp forest trees. Tree Physiol. **18(8-9):** 583-588.
Tyree MT, Sobrado MA, Stratton LJ, Becker P (1999) Diversity of hydraulic conductance in leaves of temperate and tropical species: possible causes and consequences. Journal of Tropical Forest Science **11**: 47-60.
Tyree MT, Sperry JS (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40:** 19-38.
Tyree MT, Zimmermann MH (2002) Xylem structure and the ascent of sap. Berlin, Germany: Springer Verlag.

-U-

Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO2 pore with physiological functions. Nature **425**:734–37.
Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R (2008) Function of Nicotiana tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO2 permeability. - Plant Cell **20**: 648-657.

-V-

Van Wilder V, Miecielica U, Degand H, Derua R, Waelkens E, Chaumont F (2008) Maize Plasma Membrane Aquaporins Belonging to the PIP1 and PIP2 subrgoups are in vivo phosphorylated. - Plant Cell Physiol. **49**: 1364-1377
Vandeleur RK, Mayo G, Shelden MC, Gilliham M, Kaiser BN, Tyerman SD (2009) The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. Plant Physiol. **149(1):**445-60.
Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. Plant Physiol **135**:2318–29.
Vilagrosa A, Bellot J, Vallejo VR, Gil-Pelegrín E (2003) Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedling of two co-occuring Mediterranean shrubs during an intense drought. Journal of Experimental Botany Vol 54. **390**: 2015-2024.

Voicu MC & JJ Zwiazek (2010) Inhibitor studies of leaf lamina hydraulic conductance in trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) leaves. Tree Physiol. **30(2):**193-204.

Voicu MC, JE Cooke & JJ Zwiazek (2009) Aquaporin gene expression and apoplastic water flow in bur oak (*Quercus macrocarpa*) leaves in relation to the light response of leaf hydraulic conductance. J Exp Bot. **60 (14):**4063-75.

Voicu MC, Zwiazek JJ (2004) Cycloheximide inhibits root water flow and stomatal conductance in Aspen (*Populus tremuloides*) seedling. Plant Cell Environ **27**: 199-208.

Voicu MC, Zwiazek JJ, Tyree MT (2008) Light response of hydraulic conductance in bur oak (Quercus macrocarpa) leaves. Tree Physiol **28(7):**1007-15.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res **23(21):**4407-14.

-W-

Wakefield L, Gadoury D, Seem RC, Milgroom MG, Sun Q, Cadle-Davidson L (2011) Differential gene expression during conidiation in the grape powdery mildew pathogen, Erysiphe necator. Phytopathology. **Mar 15. [Epub ahead of print]**

Wallace IS, Choi WG & Roberts DM (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. Biochim. Biophys. Acta **1758**, 1165–1175.

Wan X, Zwiazek JJ (1999) Mercuric chloride effects on root water transport in aspen seedlings. Plant Physiol **121**: 939-946.

Wang H, Deng X-W (2004) Phytochrome signaling mechanism. The Arabidopsis Book**:** 1-28

Wang X, Hao J, Chen X, Hao Z, Wang H, Lou, Y, Peng Y, Guo Z (2007) Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. Plant Mol. Biol. **65**: 799-815.

Weatherley PE (1982) Water uptake and flow into roots. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Zeigler H, eds. Encyclopedia of plant physiology, Vol. 12B. Berlin: Springer Verlag, 79–109.

Weaver CD, Roberts DM (1991) Phosphorylation of nodulin-26 by a calcium-dependent protein-kinase. FASEB J. **5**, A426–A426

Weaver CD& Roberts DM (1992) Determination of the site of phosphorylation of nodulin-26 by the calcium-dependent proteinkinase from soybean nodules. Biochemistry **31**, 8954–8959

Wei H, Dhanaraj AL, Arora R, Rowland LJ, Fu Y, Sun L (2006) Identification of Cold acclimation-responsive *Rhododendron* genes for lipid metabolism, membrane transport and lignin biosynthesis: importance of moderately abundant ESTs in genomic studies. Plant Cell Environ. **29**:558-70.

Wei W, Zhang Y, Han L, Guan Z, Chai T (2008) A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco. Plant Cell Rep. **27**: 795-803.

White PJ & Broadley, MR (2003) Calcium in plants. Annals. Bot **92**: 487-511.

White PJ (1998) Calcium channels in the plasma membrane of root cells. Annals of Botany **81**: 173–183

White PJ (2001) The pathways of calcium movement to the xylem. Journal of Experimental Botany **52**: 891–899.

Whitelam GC, Halliday KJ (2007) Light and Plant Development. Blackwell Publishing,

Oxford, 325p
Wood NT, Haley A, Viry-Moussaïd, Johnson CH, van der Luit AH, Trewavas AJ (2001) The calcium rhythms of different cell types oscillate with different circadian phases. Plant Physiology **125**: 787–796.
Worrall D, Liang YK, Alvarez S, Holroyd GH, Spiegel S, Panagopulos M, Gray JE, Hetherington AM (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. - Plant J. **56**: 64-72.

-X-

Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell **14**: S165–S183
Xu W, Campbell P, Vargheese AK, Braam J (1996) The Arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. Plant J. **6**:879-89.

-Y-

Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, Michalowski CB, Bohnert HJ (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue specific expression in the common ice plant. Plant Cell **7:** 1129-1142.
Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992) Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA that encode a putative transmembrane channel protein. Plant Cell Physiol **33**: 217-224.
Yang J, Lin R, Sullivan JH, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng X-W, Wang H (2005) Light regulated COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. The Plant Cell **17:** 804-821
Yang L, Zheng B, Mao C, Yi K, Liu F, Wu Y, Tao Q, Wu P (2003) cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit. Gene. **314**:141-8.
Yang S, Tyree MT (1994) Hydraulic architecture of *Acer saccharinum* and *A. rubrum*: comparison of branches to whole trees and the contribution of leaves to hydraulic resistance. J. Exp. Bot **45 (2):** 179-186.
Yang T & Poovaiah BW (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. Trends Plant Sci. **8(10):** 505-512.
Yang T, Poovaiah BW (2000) An early ethylene up-regulated gene encoding a calmodulin-binding protein involved in plant senescence and death. Journal of Biological Chemistry **275**: 38467–38473.

-Z-

Zeitlinger HJ (1992) Der Nussbaum. Baumartenporträt 15. Der Nussbaum. Österreichische Forstzeitung **103, 3:** 31-34.
Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localisation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**, 12359–12364.
Zielinski RE (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**: 697–725
Zielinski RE (2002) Characterization of three new members of the *Arabidopsis thaliana* calmodulin gene family: conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. Planta **214**: 446–455

Zimmermann MH (1978) Hydraulic architecture of some diffuseporous trees. Canadian Journal of Botany **56:** 2286-2295.
Zimmermann MH (1983) Xylem structure and the ascent of sap Springer Verlag. Berlin.
Zwieniecki MA, Hutyra L, Thompson MV & Holbrook NM (2000) Dynamic changes in petiole specific conductivity in red maple (*Acer rubrum L.*), tulip tree (*Liriodendron tulipifera L.*) and northern fox grape (*Vitis labrusca L.*). Plant Cell and Environment. **23**: 407-414.
Zwieniecki MA, Melcher PJ, Holbrook NM (2001) Hydrogel control of xylem hydraulic
Zwieniecki MA, PJ Melcher, CK Boyce, L Sack & NM Holbrook (**2002)** The hydraulic architecture of leaf venation in *Laurus nobilis* L. Plant, Cell and Environment.**25 (11)**:1445-1450.

PUBLICATIONS

ANNEXES

Annexe 1 : Alignement des séquences d'aquaporines PIP1 de *Juglans regia*, *Fagus sylvativa, Quercus robur, Salix alba*, *Populus trichocarpa x Populus deltoides PtdPIP1.3* (GQ249666) et *Populus tremula x Populus tremuloides PtdPIP1.2* (AJ849322).

```
                    550        560        570        580        590        600
                     |          |          |          |          |          |
JrPIP1      ------------------TGCAGGGTGGTGGAGCTAATGTTGTGAAACCCGGTTACACC
QrPIP1      ----------------------CAGGGTGGTGGAGCTAATGTTGTGAACCATGGCTACACC
SaPIP1      --------------------TCAGGGTGGTGGAGCTAATGTTGTGAATCATGGATACACT
PttPIP1.2   GGAAGCCACAACTTCGAGCTTCAGGGTGGTGGAGCTAATGTTGTGAATCATGGATACACC
PtdPIP1.3   GGAAGCCACAACTACGAGCTTCAGGGTGGCGGAGCTAATGTTGTGAATCATGGATACACC
FsPIP1      ------------------TACAGGGTGGTGGAGCTAATGTTGTTGCCCCTGGCTACACT
Primer for                                                        TACACi

                    610        620        630        640        650        660
                     |          |          |          |          |          |
JrPIP1      AAGGGTGATGGCCTTGGAGCTGAGATTGTTGGCACTTTCGTTCTCGTTTACACCGTTTTC
QrPIP1      AAGGGTGATGGCCTTGGAGCTGAGATTGTTGGCACTTTTGTCCTTGTCTACACTGTCTTC
SaPIP1      AAGGGTGATGGCCTTGGTGCTGAGATAATTGGTACCTTTGTTCTTGTCTACACTGTCTTC
PttPIP1.2   AAGGGTGATGGCCTTGGTGCAGAGATAGTCGGTACCTTTGTTCTCGTGTACACTGTATTC
PtdPIP1.3   AAGGGTGATGGCCTTGGTGCAGAGATAGTCGGTACCTTCGTTCTTGTCTACACTGTCTTC
FsPIP1      AAAGGTGATGGCCTTGGTGCTGAAATTGTCGGTACCTTTGTTCTTGTTTACACTGTGTTC
            AAiGGTGATGGCCTTGG

                    670        680        690        700        710        720
                     |          |          |          |          |          |
JrPIP1      TCTGCAACTGATGCCAAGAGGAATGCTAGAGACTCCCATGTCCCTATCTTGGCTCCACTT
QrPIP1      TCTGCTACTGATGCCAAGAGAAACGCCAGAGACTCTCACGTCCCTATTTTGGCTCCACTT
SaPIP1      TCTGCCACTGATGCCAAGAGAAATGCCAGAGACTCTCACGTCCCTATTTTGGCTCCTCTT
PttPIP1.2   TCTGCCACTGATGCCAAGAGAAACGCTAGAGACTCTCATGTCCCTATTTTGGCTCCCCTT
PtdPIP1.3   TCTGCCACTGATGCTAAGAGGAACGCTAGAGACTCTCATGTCCCTATTTTGGCTCCCCTT
FsPIP1      TCTGCCACCGATGCCAAGCGTAGCGCTAGGGACTCCCATGTTCCCATTTTGGCACCTCTA

                    730        740        750        760        770        780
                     |          |          |          |          |          |
JrPIP1      CCAATTGGGTTTGCAGTGTTTTTGGCGCATTTGGCTACCATCCCCATAACTAAT------
QrPIP1      CCCATAGGGTTTGCTGTGTTCTTGGTTCATTTGGCTACCATCCCCATAACT---------
SaPIP1      CCCATTGGATTCGCAGTCTTCTTGGTTCATTTGGCTACCATCCCCATAACT---------
PttPIP1.2   CCCATTGGATTCGCAGTCTTCTTGGTTCATTTGGCTACCATCCCCATAACTGGAACTGGC
PtdPIP1.3   CCCATTGGATTCGCAGTCTTCTTGGTTCATTTGGCTACCATCCCCATAACTGGAACTGGC
FsPIP1      CCTATTGGGTTCGCAGTGTTTTTGGTGCATTTGGCTACCATCCCCATAACT---------
Primer rev                                    TGGCTACCATCCCCATAACT
```

Annexe 2 : Alignement des séquences d'aquaporines PIP2 de *Juglans regia*, *JrPIP2.1* (AY189973) ; *JrPIP2.2* (AY189974), *Fagus sylvativa, Quercus robur, Salix alba*, *Populus trichocarpa x Populus deltoides PtdPIP2.6* (GQ249668) et *Populus tremula x Populus tremuloides PttPIP2.1* (AJ849324).

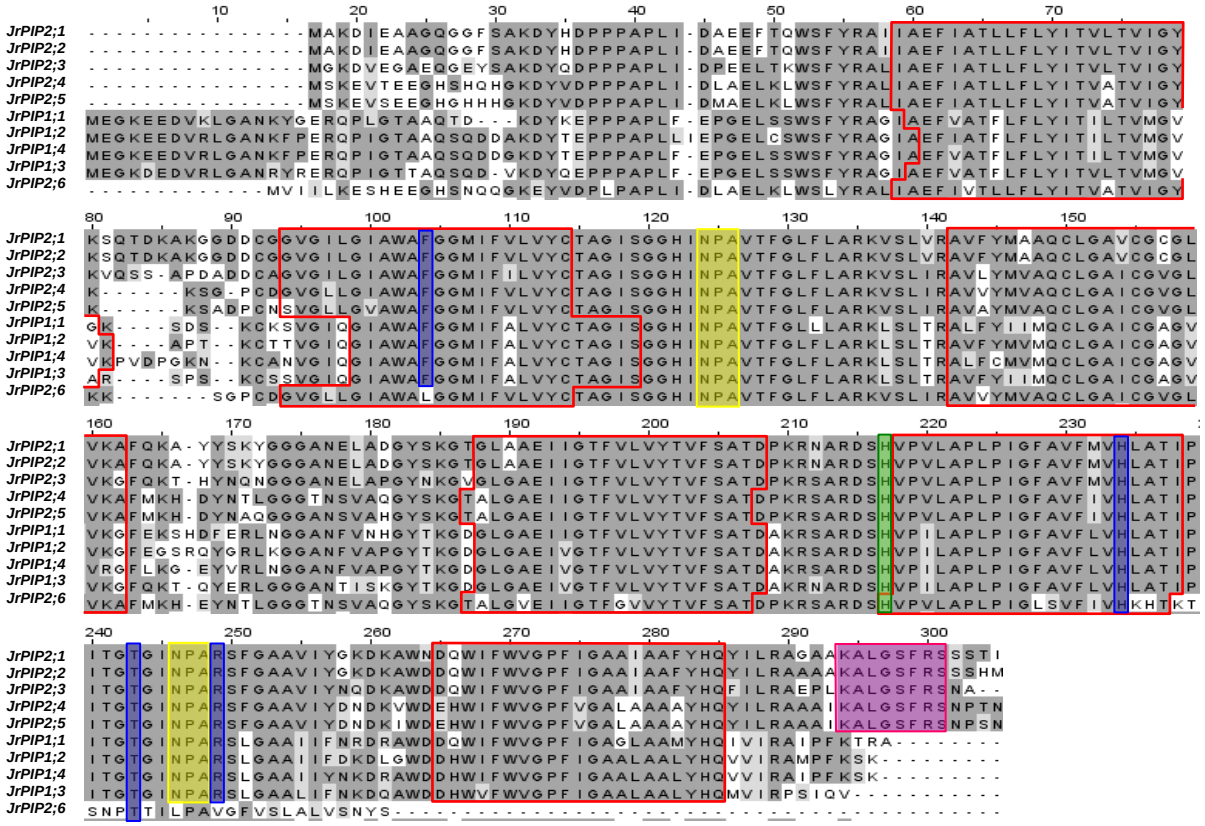
```
                730       740       750       760       770       780
                  |         |         |         |         |         |
FsPIP2      GAGATTCCCATGTTCCGGTTTTGGCACCACTCCCAATTGAATTTGCGGTGTTCATTGTTC
JrPIP2.1    GAGATTCCCATGTACCTGTCTTGGCACCACTTCCAATCGGGTTTGCTGTGTTTATGGTTC
JrPIP2.2    GAGATTCCCATGTTCCTGTATTGGCACCACTTCCAATCGGATTTGCCGTGTTCATGGTTC
PtdPIP2.6   GTGACTCCCACGTCCCTGTGTTGGCTCCACTTCCAATCGGGTTTGCTGTGTTCATGGTAC
PttPIP2.1   GTGACTCTCATATCCCTGTCTTGGCTCCCCTTCCAATTGGGTTTGCTGTGTTCATGGTCC
QrPIP2      ------------------------------------TGGGTTTGCTGTGTTCATGGTAC
SaPIP2      ------------------------------------GGGTTTGCTGTGTTCATGGTTC
Primer for                                      GGiTTTGCTGTGTTiATGGT

                790       800       810       820       830       840
                  |         |         |         |         |         |
FsPIP2      ACTTG-GCCACAATCCCAATCACTGGCACTGGCATCAACCCCGCTAGGAGCCTTGGAGCT
JrPIP2.1    ATCTG-GCTACCATTCCAATCACCGGAACTGGTATCAATCCGGCTCGAAGCTTCGGAGCT
JrPIP2.2    ACCTG-GCCACCATTCCAATCACCGGAACTGGTATTAATCCGGCTCGAAGCTTCGGAGCT
PtdPIP2.6   ACTTG-GCCACAGTCCCTATAACTGGTACTGGCATCAACCCTGCCAGGAGCTTCGNCGCT
PttPIP2.1   ACCTA-GCCACAATCCCTATTACTGGTACTGGCATTAACCCTGCTAGGAGCTTTGGTGCT
QrPIP2      ACTTG-GCCACCATCCCCATCACTGGTACTGGTATTAACCCAGCTAGGAGTTTTGGGGCT
SaPIP2      ACTTGTGCCACAATCCCTATTACCGGTACTGGTATTAACCCTGCCAGGAGCTTTGGAGCT

                850       860       870       880       890       900
                  |         |         |         |         |         |
FsPIP2      GCTGTTATCTACAACAAGGACACGGCCTGGGATGACCAATGGATCTTTTGGGTTGGGCCA
JrPIP2.1    GCTGTCATCTACGGCAAGGACAAGGCATGGAATGACCAATGGATTTTCTGGGTTGGACCA
JrPIP2.2    GCTGTGATCTATGGCAAGGATAAGGCATGGGATGACCAATGGATTTTCTGGGTCGGACCC
PtdPIP2.6   GCTGTCATCTTCAACAATGAAAAAGCCTGGGATGATCATTGGATTTTCTGGGTTGGGCCA
PttPIP2.1   GCTGTCATCATCAACGATAAGAAAGCCTGGGATGATCATTGGATTTTCTGGGTTGGGCCA
QrPIP2      GCTGTGATCTACAACAACGAAAAAGTTTGGGATGAGCATTGGATCTTCTGGGTTGGTCCA
SaPIP2      GCTGTCATCTTCAACAATGAGAAAGCCTGGGATGATCATTGGATTTTCTGGGTTGGGCCA
Primer Rev                                              TGGATiTTCTGGGTTGGiCCA

                910       920       930       940       950       960
                  |         |         |         |         |         |
FsPIP2      TTCATTGGTGCAGCTATTGCAGCTTTCTACCACCA-ATTCATCTTGAGAGCCGGTGCTGT
JrPIP2.1    TTCATTGGAGCTGCTATTGCTGCATTCTATCACCA-GTACATCTTGAGAGCTGGCGCTGC
JrPIP2.2    TTCATTGGTGCCGCAATAGCTGCATTCTATCACCA-GTACATTTTGAGAGCTGCCGCTGC
PtdPIP2.6   TTTGTGGGAGCATTAGCAGCTGCCGCATACCACCA-GTACATTTTGAGAGCGGCAGCAAT
Pttpip2.1   TTTGTTGGAGCATTAGCAGCAGCTGCATACCACCA-GTACATTTTGAGAGCAGGAGCCAT
QrPIP2      TTTGTTGGAGCACTAGCAGCAGCAGCTTATCACCAAGTACATATTGAGAGCGGCAGCAAT
SaPIP2      TTTGTGGGAGCATTAGCAGCTGCTGCATACCACCA-GTACATTTTGAGAGCGGCAGCAAT
            TT
```

Annexe 3: Alignement des sequences protéiques JrPIP1 et JrPIP2 obtenues par le programme CLUSTALX . Les motifs NPA conservés sont en jaune. Les hélices transmembranaires sont encadrées en rouge. les résidus de sélectivité sont en bleu. Les résidus histidine sont en vert et les motifs de phosphorylation sont en rose



Annexe 4 : Protéines inconnues obtenues par cDNA AFLP à partir de TDFs précocement régulés dans les feuilles de noyer exposées à la lumière.

TDF[a]	Accession Number	AFLP[b] profil	Size (pb)
TDF009	GR410241	+	71
TDF001	GR410235	+	80
TDF004	GR410237	+	122
TDF013	GR410245	+	222
TDF014	GR410246	+	93
TDF016	GR410248	+	141
TDF020	GR410252	+	83
TDF026	GR410258	+	152
TDF028	GR410260	+	215
TDF069	GR410299	+	250
TDF072	GR410302	+	999
TDF076	GR410306	+	230
TDF088	GR410317	+	102
TDF092	GR410320	+	124
TDF099	GR410326	+	81
TDF100	GR410327	+	150
TDF102	GR410329	+	133
TDF103	GR410330	+	169
TDF105	GR410332	+	167
TDF106	GR410333	+	72
TDF112	GR410339	+	149
TDF115	GR410341	+	123
TDF126	GR410346	+	124
TDF127	GR410347	+	264
TDF133	GR410350	+	151
TDF136	GR410353	+	63
TDF140	GR410355	+	145
TDF141	GR410356	+	149
TDF145	GR410360	+	160
TDF151	GR410365	+	133
TDF153	GR410367	+	87
TDF035	GR410266	-	87
TDF037	GR410268	-	158
TDF040	GR410271	-	172
TDF042	GR410273	-	176
TDF043	GR410274	-	268
TDF048	GR410279	-	188
TDF049	GR410280	-	255
TDF052	GR410283	-	224
TDF054	GR410285	-	196
TDF055	GR410286	-	190
TDF056	GR410287	-	158
TDF057	GR410288	-	136
TDF058	GR410289	-	118
TDF059	GR410290	-	102
TDF063	GR410293	-	55
TDF065	GR410295	-	86
TDF066	GR410296	-	223
TDF067	GR410297	-	59
TDF174	GR410381	-	202
TDF175	GR410382	-	248
TDF177	GR410384	-	426
TDF179	GR410386	-	84
TDF180	GR410387	-	229
TDF183	GR410390	-	182
TDF184	GR410391	-	214
TDF187	GR410394	-	259
TDF189	GR410395	-	201
TDF193	GR410398	-	139
TDF198	GR410402	-	324
TDF199	GR410403	-	68
TDF208	GR410409	-	126
TDF212	GR410413	-	110
TDF218	GR410418	-	267
TDF220	GR410419	-	54
TDF221	GR410420	-	84
TDF223	GR410422	-	73

Abstract:

Leaf hydraulic conductance (K_{leaf}) takes a significant part in plant water relations. In walnut leaves, K_{leaf} was stimulated by light and tightly related to accumulation of *JrPIP2s* aquaporin transcripts. However, the light effect on K_{leaf} value is not systematically related to aquaporin regulation. Here we investigated the relationship between light, K_{leaf} and transcript levels of aquaporin in five species (*Juglans regia*, *Fagus sylvitica*, *Quercus robur*, *Salix alba* and *Populus tremula*) differing by the response of their K_{leaf} to light. Only for walnut leaves, we showed that light-increased K_{leaf} value is closely related to higher stimulation of both PIP1s and PIP2s aquaporins. To further investigate the involvement of aquporins (*JrPIP1s* and *JrPIP2*) in the light K_{leaf} modulation, 8 new full length aquaporins have been identified in walnut leaves and their expression pattern was monitored. All the aquaporin tested was turned up to be upregulated under light condition and downregulated under darkness. Moreover, we showed that the K_{leaf} response to light is quality-dependant, since it was reduced of 65% in the absence of blue light. Interstingly, this K_{leaf} reduction was correlated with a high downregulation of almost all aquaporins tested.

To give an insight into the early molecular events involved in the light-induced K_{leaf} regulation, a large-scale transcriptomic analysis consisting of the cDNA-AFLP procedure was carried out on walnut leaves, kept at different light conditions. We obtained a total of 12,000 transcript-derived fragments (TDFs) by cDNA-AFLP with 128 primer pairs. Reliable sequences were obtained for 187 of these TDFs, and functions were attributed to 93 TDFs through BLAST searches in GenBank databases. Most of the 93 TDFs corresponded to genes encoding proteins involved in cellular regulation (58%). Leaves exposed to light showed changes in the Ca^{2+}-signaling pathway, the ubiquitin-proteasome pathway, vesicle trafficking process and the expression of multiple transcription factors and protein regulators.

To progress in understanding of a potential role for calcium signalling in light-modulated K_{leaf}, K_{leaf} values and transcript accumulation of 10 *JrPIPs* were monitored in leaves perfused with either a blocker of calcium channels [$LaCl_3$] or a CaM antagonist [W7]. Compared to control, these Ca^{2+} -effectors led to a significant reduction in K_{leaf} and transcripts accumulation of almost all *JrPIPs* under light conditions. Our results indicate that Ca^{2+} /calmodulin complex may transduce the light signal required for stimulation of K_{leaf} and its correlated aquaporin expression.

Key words: Walnut leaves, leaf hydraulic conductance, blue light, aquaporin, cDNA-AFLP, Ca^{2+} -effectors.

Résumé:

La conductivité hydraulique foliaire (K_F) est une composante majeure du transport d'eau dans toute la plante. Dans les feuilles de noyer, la K_F est stimulée à la lumière et est étroitement liée à l'accroissement du taux des transcrits d'aquaporines *JrPIP2s.* Par ailleurs, la corrélation entre la stimulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines à la lumière, n'est pas générale et dépend de l'espèce. Ici, nous étudions cette corrélation chez cinq espèces forestières (*Juglans regia*, *Fagus sylvitica*, *Quercus robur*, *Salix alba* et *Populus tremula*) différant par leur réponse à la lumière. Nous démontrons seulement chez le noyer (*Juglans regia*), la contribution des deux familles d'aquaporines PIP1s et PIP2s. Afin de mieux comprendre le rôle des *JrPIP1s* et *JrPIP2* dans la réponse à la lumière, nous avons isolé 8 nouvelles isoformes dans les feuilles de noyer et nous avons étudié leurs profils d'expression sur une cinétique lumière. Toutes les isoformes étudiées sont accumulées à la lumière et réprimées à l'obscurité. De plus, la K_F est dépendante de la qualité de lumière. Elle est réduite de 65% en absence de lumière bleue. Cette diminution serait liée à l'inhibition des transcrits d'aquaporines. Afin de caractériser les mécanismes moléculaires précoces impliqués dans la modulation de K_F par la lumière, l'approche globale cDNA-AFLP a été menée sur des feuilles de noyer sous différentes conditions d'éclairement. Nous obtenons 12000 transcrits différentiels dérivés (TDFs) générés par les 128 couples d'amorces. Parmi les 187 séquences obtenues, 93 d'entre elles ont une fonction putative. Leur classification fonctionnelle montre que les gènes relatifs à la régulation cellulaire représentent environ 58% des TDFs identifiés. Les feuilles exposées à la lumière, montrent des changements dans les voies de : signalisation calcique, protéolyse, trafic vésiculaire et l'expression de divers facteurs de transcription et protéines de régulation.

Pour mieux comprendre le rôle potentiel de la signalisation calcique dans la modulation de la K_F par la lumière, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur des canaux calciques [$LaCl_3$] et d'un antagoniste de calmoduline [W7] sur la K_F et les transcrits des 10 *JrPIPs*. Comparées aux feuilles témoins, les inhibiteurs calciques provoquent une réduction de la K_F et de la majorité des *JrPIPs* étudiées à la lumière. Nos résultats confirment l'implication du complexe Ca^{2+} /calmoduline dans la transduction du signal lumineux responsable de la stimulation de la K_F et des transcrits d'aquaporines chez le noyer.

Mots clés: Feuilles de noyer, conductivité hydraulique foliaire, lumière bleue, aquaporine, cDNA-AFLP, inhibiteurs calciques.