

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
U.F.R SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée pour obtenir

Le Grade de DOCTEUR EN SCIENCE
de L'UNIVERSITE PARIS XI – ORSAY

par

Aurélie URBAIN

Sujet :

Etude de la dynamique de la croissance racinaire par
microspectroscopie infra rouge à transformée de Fourier chez
Arabidopsis thaliana

Soutenue le 16 avril 2009 devant la commission d'examen :

Pr Michel Dron
M. Bruno Beccard
Pr Hervé Cardot
Dr Fabienne Guillon
Dr Grégory Mouille
Pr Jean-Jacques Daudin

Université Paris Sud XI
ThermoFisher Scientific
Université de Bourgogne Dijon
INRA Nantes
INRA Versailles
INRA/AgroParisTech

Président du jury
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

Merci aux membres du jury pour leur soutien et pour me permettre de soutenir cette thèse.

Merci à l'INRA pour m'avoir engagée pendant au moins 3 ans et plus si affinités, et notamment, je remercie Guy Riba et François Houliez pour avoir promu la thématique « Biologie des Systèmes » au sein de l'institut. Les postes ASC se font de plus en plus rares et c'est bien dommage. Ce genre de postes devrait être largement développé car nous, jeunes chercheurs, sommes intégrés dans des projets un peu futuristes qui se révèlent être de véritables *challenges*. J'ai toujours travaillé sur des sujets extrêmement pointus et désormais il serait souhaitable que je me dirige vers des projets qui me permettent de faire de plus nombreuses publications.

Je remercie chaleureusement mon chef de département Loïc Lepiniec pour la confiance qu'il m'a accordée, pour les discussions que nous avons eues quant à l'avenir de l'INRA et des possibilités de recrutement dans les 3 années à venir. Merci aux départements BV et MIA, aux directeurs d'unité Herman Höfte et Stéphane Robin pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe.

J'ai eu la chance d'obtenir ce poste et je remercie donc (un peu forcée quand même...) mon directeur biologiste Grégory Mouille pour m'avoir recrutée. Pas toujours évident de bosser avec le chef Greg mais je dois admettre que l'on s'est bien entendu quand même. Merci de m'avoir inculqué les rudiments de la biologie végétale, d'avoir été patient au vu de la méconnaissance que j'avais de ce sujet, d'avoir répondu à mes questions et de m'avoir soutenue pendant ces 3 années et demie. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes et de ne pas t'avoir dégoûté d'accompagner un thésard, un peu buté parfois.

Un grand merci, également, à mon directeur statisticien Jean-Jacques Daudin dont la disponibilité et la patience ont été remarquables. Grâce à toi, j'ai enrichi mes connaissances en stats et j'espère pouvoir poursuivre dans cette voie. Merci de m'avoir acceptée dans ton grand bureau lumineux. J'ai pu me vanter auprès des petits nouveaux et faire des envieux. Je te suis également reconnaissante de ton aide très efficace dans la rédaction de ce manuscrit et de ton implication durant toutes ces années de thèse.

Sur le site de Versailles :

Merci à l'ensemble de l'équipe « paroi primaire et élongation » : à Herman pour ses intarissables connaissances bibliographiques, à Martine Gonneau pour sa gentillesse et ses entrées secrètes dans la bibliothèque de Versailles, à Thierry Desprez pour sa bonne humeur et ses précieux conseils en biologie moléculaire ou en bricolage, à Samantha Verhnettes pour ses connaissances sur le cytosquelette et les enzymes pariétales et sa disponibilité et à Alexis Peaucelle fraîchement recruté.

J'adresse toute ma reconnaissance aux non-permanents de passage et collègues durant ces 3 années: Kian Hematy, Jorunn Johansen, Elizabeth Crowell, Michel Jurianec, Jürgen Van Orden et Shi-peng dit « le chinois ». Un clin d'œil particulier à Volker Bischoff et à Aurélia Rolland pour tous les moments passés ensemble, je vous souhaite tout le bonheur du monde dans votre vie personnelle et professionnelle.

Merci infiniment aux personnes travaillant pour la plateforme de Cyto. Merci aux « mecs du Confocal » Olivier Grandjean, Lionel Gissot, Jean-Christophe Palauqui, Bertrand Dubreucq, et aux petites nanas de cyto, Jocelyne Kronenberger, Halima Morin, Adeline

Berger et Katia Belcram. Sympa les filles de vous être acharnées à découper des racines en tranches, je crois qu'on a fait de notre mieux. Et encore, merci messieurs, pour votre aide au Confocal et d'avoir répondu à toutes mes questions stupides: « Pourquoi je ne vois rien ??? »

Lors de mes essais nombreux et calamiteux de culture *in vitro* de racines, j'ai cru devenir folle et je dois une fière chandelle à Emilie Montes, Catherine Pannetier et Marie-Christine Chupeau pour leurs précieux conseils, leurs encouragements et leur soutien. Merci les filles, je n'y serais pas arrivée sans vous.

Dans un même registre, merci à l'équipe de la laverie, Mamadou, Jean-Pierre et Dominique pour les petits-déjeuners, les bonnes parties de rigolade, votre disponibilité et le super stage laverie lors de mon arrivée 2 jours avant Noël. Que de bons souvenirs !

Merci à mon ami Gérard Picon, le super bricoleur du bâtiment 2, mon chauffeur perso et compagnon de galère du RER C. Je te souhaite une superbe retraite avec « la Vieille ».

Rien ne fonctionne à l'INRA sans une tonne de paperasse à remplir et j'exprime toute mon admiration au service administratif auquel j'ai eu affaire : Claude Couton, Sylvie Bellaton, Hélène Novotniak, Sonia Debèche, et Anne Ther-Guillet du service du personnel à qui j'ai posé de nombreuses questions.

Au revoir Dr Binet !!

Spéciales dédicaces en vrac :

Je suis heureuse de vous avoir rencontré et d'avoir partagé tous ces moments avec vous : les serristes, Marie-Lise Vin et Eric Biot les informaticiens de la « biocel », les thésards du centre, Aurélie Chapelle, Serge Berthet, Lara Spinner, Lien Bach, Thomas Blein, Julie Benneteau, Bennedicté Wenden, Anne Plessis, Loren Castaing, Laure Gaufichon. Merci aux petites poulettes de l'équipe « paroi secondaire et coton », Hélène Jouy, Madeleine Bouvier, Maïté et son homme, Johanne Thevenin et mes remerciements à Richard Sibout pour sa bonne humeur et ses blagues ringardes.

A l'agro :

Merci à l'ensemble de l'équipe « Statistique et Génome » pour son soutien et son accueil chaleureux : à Marie-Laure Martin-Magnette pour ses conseils et sa gentillesse, à Julie Aubert pour son aide en R et revelec, à Nathalie Coqué pour son aide en SAS et pour avoir rajouté mon nom sur le site Internet de l'agro, à Stéphane Robin pour nos discussions sur le « modèle mixte et linéaire » et ses nombreuses idées pour traiter les spectres IR, merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur, à Michel Koskas pour ses idées en algo et programmation, à Emilie Lebarbier pour ses nombreux conseils en segmentation, sa patience, ses explications sur les stats et sa disponibilité pour l'écriture et la correction de ce manuscrit. Merci de ta gentillesse, j'ai pris beaucoup de plaisir à faire des stats avec toi, t'es une bonne prof.

Mon dévouement éternel à toute l'équipe du CRI, et plus particulièrement à Marc, Hamid, Laurent et Benjamin pour avoir partitionner mon disque dur, pour m'avoir alloué de l'espace mémoire, installé des licences logiciels et s'arranger pour que mon ordinateur fasse des sauvegardes automatiques. Vous êtes des génies les gars.

Merci à Alain Céliste et Tristan Mary-Huar pour m'avoir supportée dans leur bureau durant leur thèse, et de m'avoir écoutée quand j'avais besoin d'aide.

Autres dédicaces à Avner, les bayésiens de l'ENGREF, Marie-Pierre et Eric, et à tous les nouveaux thésards Stevonn, Nathalie, Guillem et Caroline.

En outre, une pensée à ceux qui sont partis comme Baba Thiam et Franck Picard. Merci les gars pour votre bonne humeur, le beau sourire de Baba et la gentillesse de Franck.

Remerciements aux personnes extérieures ayant participées de près ou de loin, à cette thèse, au cours de ces 3 dernières années :

- Christine Dillmann à Grignon pour m'avoir fait confiance et m'avoir donné la chance de faire mon premier cours de R. Je me suis bien amusée à préparer ce premier cours et j'ai trouvé ça tellement enrichissant que j'ai recommencé tous les ans.
- Frédéric Jamme du Synchrotron Soleil et son boss Paul Dumas (soyons *fair-play* !!) pour m'avoir formé sur leur array et pour m'avoir indiqué des logiciels d'analyse de spectres IR.
- Véronique Rouchon du Muséum National d'Histoire Naturelle pour m'avoir permis de mettre en marche son array, de faire plus ample connaissance avec les subtilités de cette version 7 d'OMNIC, et pour son accueil chaleureux au sein de son superbe labo.
- La société Thermo-Fisher Scientific pour nous avoir fourni l'ensemble du matériel IR, les nombreux accessoires (je n'ai pas cassé beaucoup de lames, je le jure !!), leur disponibilité pour répondre à nos questions, pour leur démo, pour leur super buffet lors du lancement de l'IN10. Miam ! Miam !

Bien entendu, j'adresse ma reconnaissance à tous ceux qui ont participé à ce travail, qui ont fait des flashes pour moi, lancer la FTIR, mis de l'azote, ou je ne sais quoi encore, merci de votre aide...

Et pour finir en beauté, mes cerises sur cet énorme gâteau :

Merci à mes parents qui me soutiennent dans tout ce que j'entreprends. Je sais qu'ils sont fiers de moi et je ne serais pas arrivée jusqu'ici sans eux. Bienvenue aux petits nouveaux dans la famille, Chiara, Noah, Mathys et Maël qui j'espère assureront la relève.

Mon amour éternel à mon homme, qui a su faire preuve de patience et d'attention, qui m'a fait répéter mon premier topo en anglais dans la cuisine jusque tard le soir, qui a géré la maison pendant la rédaction de ce manuscrit et qui au cours de cette thèse m'a fait deux merveilleux enfants. Ma petite Claire, tu es la plus adorable des petites filles et j'espère que ton frère à venir sera aussi facile à vivre que toi. Vous êtes tous les 3 mes rayons de soleil et mon équilibre en dehors du labo. J'ai de la chance d'avoir une vie personnelle aussi réussie. Je vous aime.

Une dernière réflexion à méditer : être une femme, faire des enfants, aimer son mari et partir en vacances ne sont pas, de mon point de vue, des handicaps pour devenir un bon scientifique.

A mes enfants

Abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléotide
AGP	ArabinoGalactan protein
AIA	Acide indol 3-acétique (Auxine)
ARNm	Acide ribonucléiques messagés
ASC	Assitant scientifique contractuel
CAZY	Carbohydrate-active enzymes
CESA	Cellulose Synthase
<i>Cob</i>	<i>Cobra</i>
Col-0	Columbia
CORE	Conditional Root Expansion
DCB	2,6 dichlorobenzonitrile
FTIR	Fourier Transform Infra Red
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Glycosides Hydrolases
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTs	Glycosyl-Transférases
HG	Homogalacturonane
HRGP	Hydroxyprolin rich glyco protein
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IR	Infra Rouge
Isox	Isoxaben
<i>Lit</i>	<i>Lion's tail</i>
MIA	Mathématiques et informatique appliquées
NO	Nombres d'ondes
OMS	Organisation mondiale de la santé
PL	Profil longitudinal
PME	Pectines Méthyles estérases
PR	Profil radial
<i>Prc</i>	<i>Procuste</i>
<i>Qual</i>	<i>Quasimodo 1</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
RG I	Rhamnogalacturonane type I
RG II	Rhamnogalacturonane type II
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
<i>Sab</i>	<i>Sabre</i>
<i>Shr</i>	<i>Short-Root</i>
TCER	Taux de croissance élémentaire relatif
XET	Xyloglucane Endo Transglycosylase

Table des Matières

Introduction	1
La paroi végétale	1
1- Structure	1
2- Composition de la paroi primaire	3
Les polysaccharides	3
1- La cellulose	3
2 - Les hémicelluloses	4
3 - Les pectines	4
Les protéines	5
1 - Protéines structurales	5
2 – Protéines fonctionnelles	6
Remodelage et élongation	9
1- La croissance cellulaire	9
La pression de turgescence	9
Architecture de la paroi primaire	9
1- Le réseau Cellulose/Xyloglucanes	10
2-Le réseau de pectines	10
Deux grands modèles pour l'élongation cellulaire	10
1- La croissance acide	10
2- la croissance apicale	11
Le relâchement pariétal	12
2- Le criblage de mutants affectés dans la paroi	13
Crible par microspectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)	13
1- Principe de la FTIR	13
2- Analyse des polysaccharides pariétaux	14
Les principaux mutants	14
1- <i>Kobito</i>	14
2- <i>Procuste</i>	15
3- <i>Korrigan</i>	15
4- <i>Quasimodo</i>	15
5- <i>Mur</i>	16
La racine	16
1- Un organe fascinant !	16
Structure de la racine primaire	17
1- Embryogénèse	17
2- Mise en place des tissus	17
Elongation de la racine	18
1- Mécanismes	18
2-Quelques mutants perturbés dans le système racinaire	18
2- Quelques études récentes	20
Croissance racinaire sous influence d'oscillateurs	21
Conclusions	24
Objectifs de la thèse	24
1- Contexte	24
2- Position du département Biologie Végétale (BV) de l'INRA	25
Le projet Agrobi	25
Sujet de thèse ASC BV/MIA	26
1- Développement d'une méthode d'imagerie chimique des parois au sein d'un organe en croissance	27
2- Démarche de l'analyse statistique	27
Matériels et Méthodes	28
Biotechnologies végétales	28
1- Matériel végétal	28

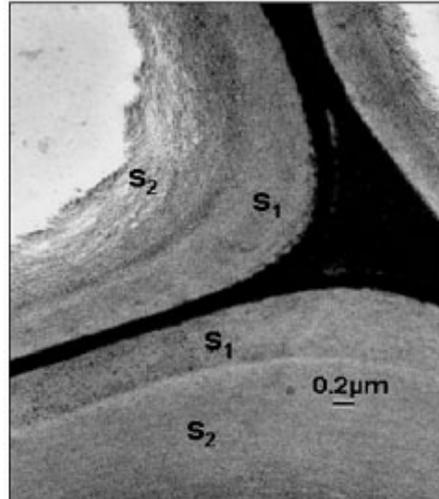
2- Stérilisation des graines	28
3- Mise en culture	28
Conditions classiques de culture in vitro	28
Traitements herbicides	30
4- Calculs des vitesses de croissance et mesures de distances	30
Vitesse de croissance	30
Distance apex – premier poil racinaire	30
5- Techniques d’immunolocalisation	31
Marquage anticorps de coupes racinaires	31
1- Préparation des échantillons	31
2- Déshydratation des échantillons	31
3- Inclusion	31
4- Coupes	32
5- Re-hydratation	32
6 -Marquage	32
7- Montage des lames	32
Marquage anticorps de surface	33
Techniques d’imagerie	33
1- Microscopie confocale	33
Principe	34
Nature des échantillons utilisés	34
Matériel	35
2- Imagerie de surfaces racinaires	35
Nature des échantillons utilisés	35
Matériel	36
3- Microspectroscopie FTIR	36
Principe	36
Nature des échantillons utilisés	37
1- Préparation des lames de BaF2	37
2- Acquisition des spectres IR et format de fichier	38
Matériel	39
Méthodes d’analyses de données	41
1- Méthodes de classification non supervisées	41
Analyse en Composante Principale	41
1- Principe	41
2- Logiciels utilisés	41
Clustering hiérarchique	42
1- Principe	42
2- Logiciel utilisé	42
2- Modélisation et test statistique	43
Modèle linéaire généralisé	43
Modèle mixte	43
Test de Student	43
3- Segmentation de processus	44
Segmentation d’un seul signal	45
1- Modèle de détection de ruptures dans la moyenne d’un signal gaussien	45
2- Procédure d’estimation des paramètres lorsque le nombre de segments K est fixé	45
3- La programmation dynamique	46
4- Choix du nombre K de segments par critère de vraisemblance pénalisée	47
5- Applications de la segmentation à des données biologiques	47
Segmentation simultanée de plusieurs signaux	48
1- Le modèle	48
2- Estimation des paramètres pour un nombre de segments K fixés	48
3. Estimation du nombre de segments	49
Variabilité de l’élargissement de la racine	50
Introduction	50
Etude de la reproductibilité des expériences sur racines	51

1- Etude de la reproductibilité de la Vitesse de Croissance	51
Les facteurs de variation	51
1- Les milieux de culture	51
2- Les dates d'expérience et de mesure	52
3- La boîte de Pétri	52
Le plan d'expériences	52
Analyse Statistique des résultats	52
1- Variance des effets aléatoires	53
2- Analyse des effets milieu et temps	53
Conclusions	54
2- Etude de la reproductibilité de la distance entre la pointe et le premier poil racinaire	55
Analyse de la variance	55
Test de Bartlett	56
3- Conclusions sur l'étude de la reproductibilité	56
Peut-on définir les différentes étapes de la croissance racinaire à partir de données IR ?	57
1- Segmentation des données IR	57
Première approche : Single scan	57
1- Segmentation préliminaire des données	58
2- Segmentation de la moyenne	59
3- Conclusion	60
Seconde approche : Mapping	61
1- Premiers clustering	61
2- Segmentation de dérivées secondes	62
5- Conclusion	65
Existe-t-il une variabilité histologique ?	66
1- Marquages anticorps de surface	66
LM5	67
LM6	67
2- Coupes immunologiques	67
LM5	67
LM6	68
3- Conclusion	68
Existe-t-il une variabilité transcriptionnelle ?	68
1- Découpage de la pointe racinaire en 15 zones	68
2- Découpage de la pointe racinaire en 228 zones	69
3- Conclusion	70
Conclusion générale	70
Effets des herbicides DCB et Isoxaben sur la croissance racinaire	72
Introduction	72
1- L'Isoxaben	72
2- Le 2,6 dichlorobenzonitrile (DCB)	73
Changements phénotypiques des racines traitées	74
1- Vitesse de croissance	75
Plan d'expériences	75
Analyse des résultats	75
2- Distance pointe – poil	76
3 - Conclusion	77
Changements qualitatifs des racines traitées	78
1- Identification des zones	78
Clustering hiérarchique et segmentation	78
1-Racines ayant reçues un traitement Isoxaben.	78
2- Racines ayant reçues un traitement DCB	80
3- Conclusion	82
Différences entre les contrôles et les traitements herbicides	82
1- Le nombre de segment	82

2- La taille des segments _____	82
3- Analyse qualitative entre les segments _____	83
2- Conclusion _____	88
Discussion _____	89
Variation de la composition et de la structure le long de l'axe d'élongation racinaire _____	89
Extraction des NO informatifs _____	90
Corrélation entre les NO _____	91
Variabilité radiale des racines _____	91
Références _____	94

INTRODUCTION

A



B

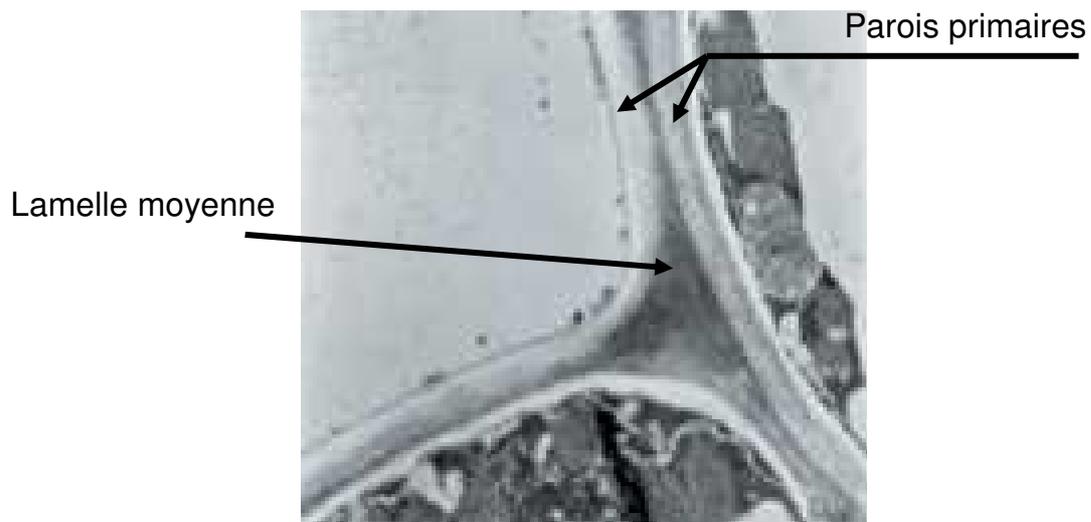


Figure 1 : (A) Intersection cellulaire présentant des cellules avec une paroi primaire (S1) et plusieurs couches de paroi secondaire (S2) chez le peuplier.

(B) Zoom sur la jonction entre plusieurs cellules végétales ne possédant pas de parois secondaires.

Buchanan, Gruissem and Jones (ed.) 2000 Biochemistry & Molecular Biology of Plants

Introduction

Premier institut de recherche agronomique en Europe, deuxième dans le monde, l'Inra mène des recherches finalisées pour une alimentation adaptée, pour un environnement préservé et une agriculture compétitive et durable.

La compréhension du développement et de l'adaptation des plantes à leur environnement joue un rôle majeur dans l'industrie agroalimentaire, notamment dans la conservation de la qualité des produits végétaux destinés à l'alimentation humaine ou animale. En effet, la maturation des fruits et des légumes est associée aux changements de structure et de composition de leur paroi. Beaucoup de produits alimentaires employés commercialement contiennent des quantités significatives de polysaccharides pariétaux tels que les gommés, les gels ou les stabilisateurs. Certains polysaccharides ont des propriétés particulières comme lier les métaux lourds, stimuler le système immunitaire ou corriger le cholestérol. Il est donc indispensable de pouvoir suivre la qualité et la quantité de ces produits, de leur fabrication *in planta* au produit industriel alimentaire, afin de protéger la santé des consommateurs.

La paroi végétale

La cellule végétale est l'unité structurale et fonctionnelle fondamentale de toute plante. Sa particularité vient du fait qu'elle possède une paroi. Cette paroi constitue le squelette et l'enveloppe de la cellule, assure son maintien et permet d'en contrôler la forme. Les changements dans la morphologie des tissus qui apparaissent lors du développement de la plante résultent du contrôle de la croissance et de la division cellulaire et s'accompagnent de la synthèse et de l'insertion de nouveaux matériaux dans la paroi existante et de modifications, de réorganisations structurales de cette paroi.

La paroi sert aussi de barrière contre les stress biotiques (issus de pathogènes) ou abiotiques (par exemple les stress hydriques), ou au contraire permet de nombreux échanges entre cellules.

1- Structure

La paroi cellulaire est donc une structure hautement dynamique. Elle est une actrice majeure des mécanismes de grandissement cellulaire. Il résulte d'une augmentation du volume de la cellule par entrée d'un flux d'eau induit par des changements dans les forces osmotiques et d'un relâchement de la tension pariétale. En effet, il est maintenant admis que l'expansion cellulaire est dirigée par un relâchement contrôlé de certaines zones de la paroi. Lorsque la pression de turgescence de la cellule est suffisamment forte, ces zones où la paroi est relâchée permettraient l'allongement de la cellule dans toutes les directions, ce phénomène est appelé expansion cellulaire, au contraire de l'élongation cellulaire où l'allongement se fait dans une direction précise (Nicol et al., 1998).

La paroi est un compartiment complexe, composé de polysaccharides et de protéines structurales (figure 1).

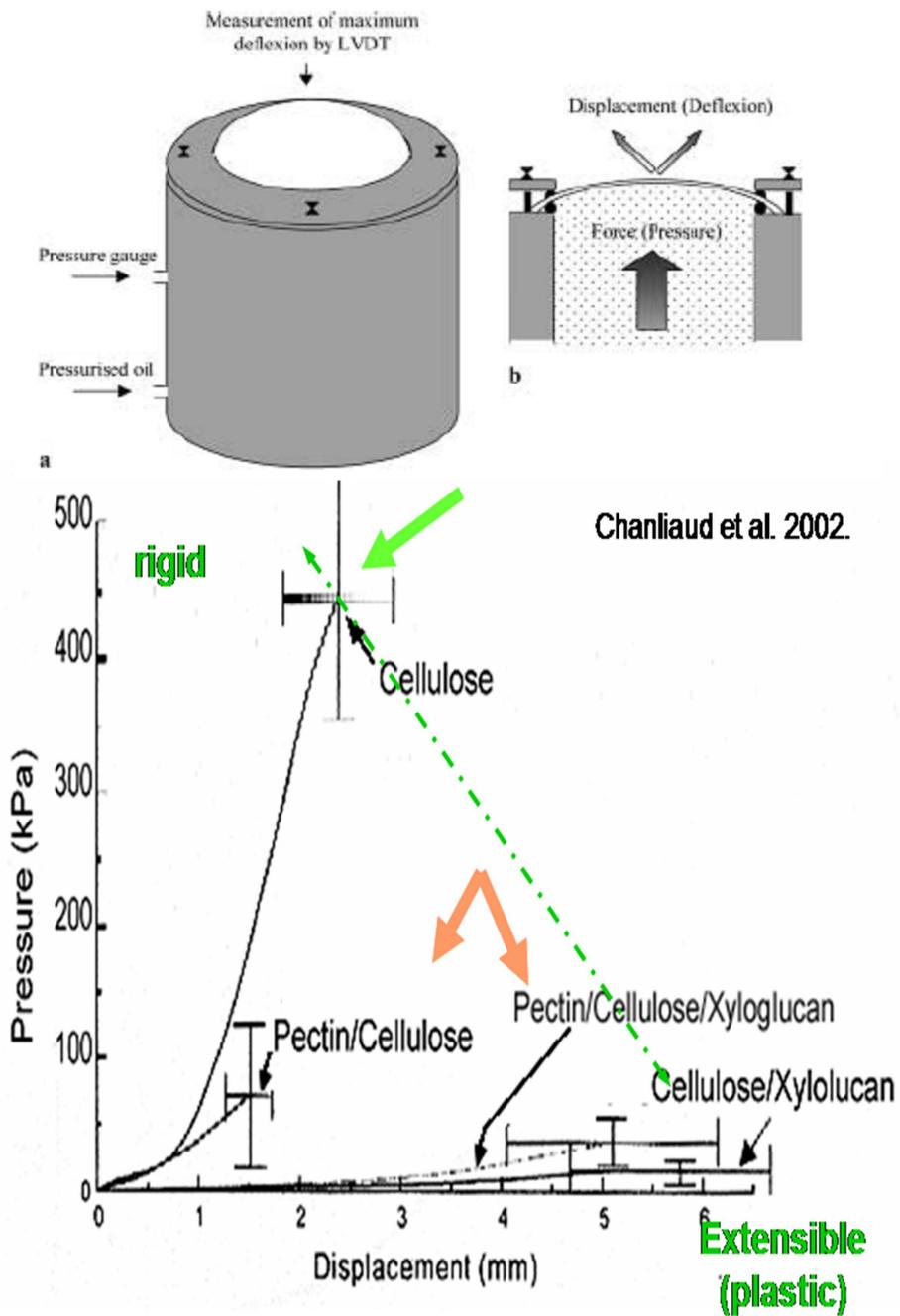


Figure 2 : la première partie de cette figure montre le schéma du dispositif expérimental. Le graphique représente des courbes de pression obtenues par l'application d'une tension bi-axiale sur des composés cellulose issus d'*Acetobacter xylinus*.

- La paroi primaire

De nature pectocellulosique, la paroi primaire est caractéristique des cellules végétales jeunes. Elle confère à la cellule une plasticité lui permettant de se diviser, de s'allonger ou de se différencier. L'extensibilité de cette couche permet donc la croissance cellulaire notamment l'élongation (figure 1B).

- La paroi secondaire

Ce compartiment apparaît dans certain tissu lors de la différenciation de la cellule, après arrêt de la croissance. Elle est constituée de cellulose et peut être enrichie en composés phénoliques : lignine (pour renforcer la rigidité), cutine et subérine (pour l'imperméabiliser). Cette différenciation s'observe pour les cellules conductrices de sève du xylème et pour différents tissus de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège) (figure 1A).

- La lamelle moyenne

C'est la couche la plus externe de la paroi. Elle est composée essentiellement de polysaccharides adhésifs appelés pectines (Van-Buren, 1979; Ng et al., 1998). La lamelle moyenne est commune à deux cellules contiguës et permet donc leur assemblage en tissu (figure 1B).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de l'élongation cellulaire, il faut se concentrer sur la mise en place de la paroi primaire au cours de la croissance. L'expansion cellulaire nécessite la synthèse et le remodelage des polymères de la paroi. Ces polysaccharides forment un réseau dynamique dans la paroi primaire des cellules en croissance. A l'arrêt de la croissance la paroi se rigidifie avec un dépôt massif de microfibrilles de cellulose et de lignine, cette paroi est alors référencée comme étant la paroi secondaire.

Actuellement, des techniques de micromécanique *in situ* permettent d'obtenir des informations quantitatives sur les propriétés mécaniques des polymères de la paroi primaire (Davies et al., 1998). Cependant, le rôle intrinsèque de chaque famille de polymères n'est pas connu. L'étude expérimentale utilise une paroi simplifiée synthétisée à partir de cellulose d'*Acetobacter xylinus*, puis les composants les plus abondants comme les pectines et les xyloglucanes sont ajoutés au système pour simuler les dépôts des différents polysaccharides de la paroi primaire (Chanliaud et al., 2002). Deux types de pression peuvent être exercés sur cette paroi artificielle : tension uni- ou bi-axiale (figure 2). Les résultats de ces expériences ont permis de montrer que le réseau de cellulose seul est un matériel très résistant à la pression (point de rupture très élevé), mais peu élastique. L'incorporation de pectines au réseau cellulose réduit considérablement son point de rupture et rend la structure plus fragile mais aussi légèrement plus élastique. Par contre, l'ajout de xyloglucane au réseau de cellulose augmente très fortement son élasticité. Le comportement de l'association des 3 polymères, cellulose, pectines et xyloglucanes est intermédiaire entre le réseau cellulose/pectines et cellulose/xyloglucanes : une forte élasticité et une faible résistance à la pression (figure 2).

Ainsi, ces modèles de simulation de résistance à la pression montrent que la nature des composants et leurs interactions dans la paroi cellulaire altèrent les propriétés physiques de ces parois. Comprendre et définir la nature exacte des composés pariétaux et leur organisation

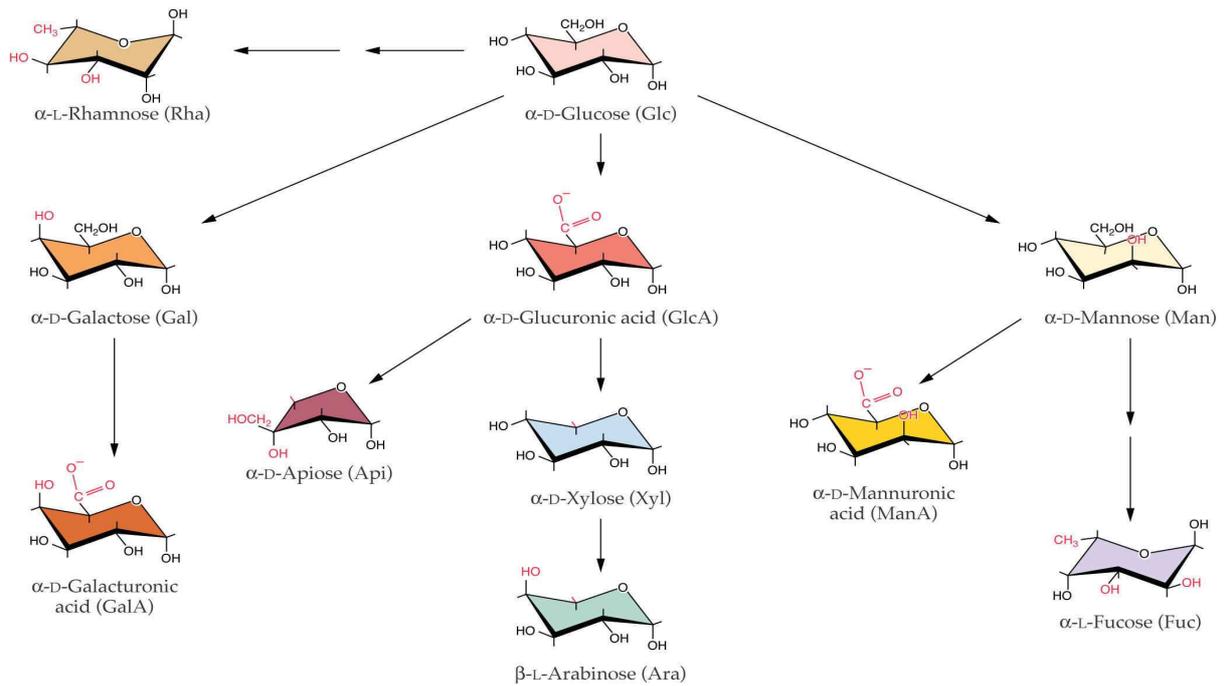


Figure 3 : Schéma d'interconversion des principaux sucres entrant dans la composition des polysaccharides de la paroi primaire. *Buchanan, Grissem and Jones (ed.) 2000 Biochemistry & Molecular Biology of Plants.*

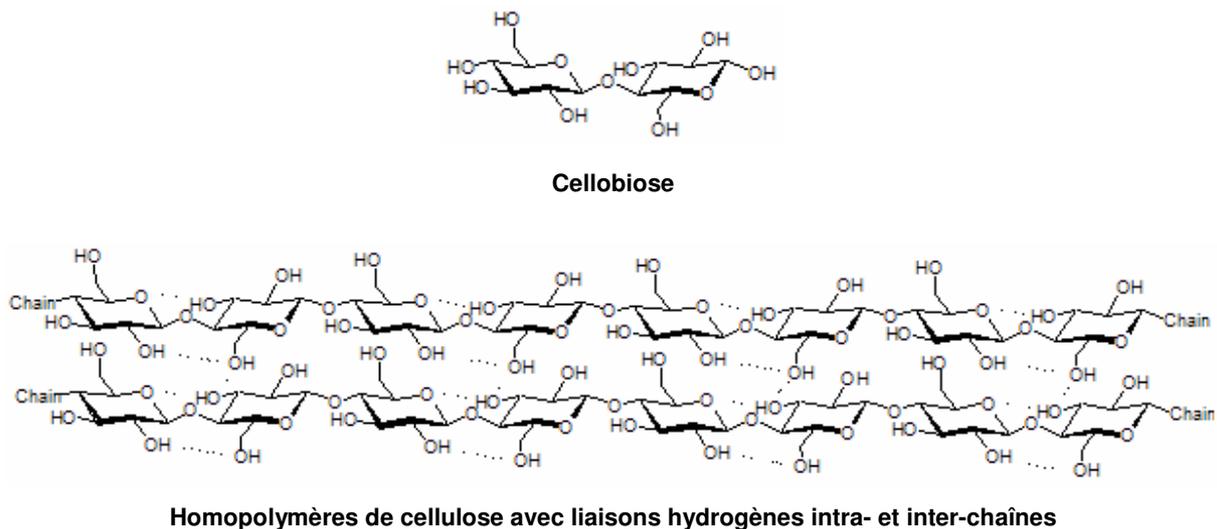


Figure 4 : La cellulose constitue la trame principale de la paroi primaire. Cet assemblage polysaccharidique est constitué d'un motif de base nommé la cellobiose (2 unités α -D-glucose reliées en β -1,4). Les chaînes de cellulose sont linéarisées grâce à la présence de liaisons hydrogènes intra-chaînes. L'existence de liaisons hydrogènes inter-chaînes donne au final une accumulation linéaire de fibres.

sont des informations indispensables pour déterminer les mécanismes de la croissance cellulaire.

2- Composition de la paroi primaire

La composition des parois végétales chez les angiospermes est un sujet d'étude depuis plus de 50 ans. Les connaissances obtenues ont permis l'élaboration de modèles d'organisation entre les différents composés : les polysaccharides, les protéines de structure, les composés phénoliques, des ions et de nombreuses enzymes pour la synthèse et le remodelage de la paroi. Notre étude se fonde uniquement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, seul le modèle construit pour les dicotylédones sera abordé.

La paroi primaire est une structure fortement hydratée (90% d'eau) et constituée de trois polysaccharides majeurs la cellulose, les hémicelluloses, et les pectines (Carpita and Gibeaut, 1993).

Les polysaccharides

Les plantes sont autotrophes et les monosaccharides utilisés pour la biosynthèse de leurs parois sont indirectement issus de la photosynthèse. La synthèse de ces monosaccharides nécessite l'action de nombreuses enzymes (par exemple les épimérase, les déhydrogénases ou les décarboxylases) impliquées dans l'interconversion des sucres (figure 3). Par exemple, la synthèse de nombreux polyosides dépend de l'UDP-glucose issu de l'hydrolyse du saccharose ou de l'amidon.

1- La cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant sur terre. Il est retrouvé aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes et représente un enjeu économique important, notamment dans les industries papetières et textiles, mais aussi dans le futur pour la production de biocarburants.

La cellulose est un polymère non ramifié de D-glucoses liés par des liaisons β -1,4-glucosidiques. L'unité répétée de ces glucanes est appelée cellobiose (2 glucoses). Dans la nature, la cellulose n'apparaît pas comme une chaîne isolée, mais sous forme de réseau paracrystallin composé de plusieurs chaînes de glucose associées en microfibrilles via des liaisons hydrogènes et de van der Waals (figure 4). La longueur exacte de ces microfibrilles n'est pas connue, elle peut varier d'une quarantaine d'unités glucose à plusieurs milliers. Par exemple, des fibres de 14 000 unités glucose formant une fibre de 7 μ m environ et de 3 nm de diamètre ont été observées (Vincken et al., 2003).

Grâce à cette organisation en microfibrilles, la cellulose confère des propriétés structurantes à la paroi végétale et des facultés de résistance à la tension cellulaire. La synthèse de ce polymère s'effectue au niveau de la membrane plasmique par des celluloses synthases (CESA) organisées, chez les plantes, en complexe membranaire nommé rosette (Doblin et al., 2002). Chez *Arabidopsis thaliana*, 10 isoformes de sous-unités catalytiques de CESA ont été identifiées (Desprez et al., 2002) et seules les isoformes CESA1, CESA3 et CESA6 semblent s'associer pour former un complexe cellulose synthase dans la paroi primaire. D'après le modèle actuel, chaque rosette comporterait 6 sous-unités, et chaque sous-unité serait composée de 6 CESA. Au final une rosette pourrait donc polymériser 36 chaînes de glucose autoassemblées (ou non) en microfibrilles (figure 5A).

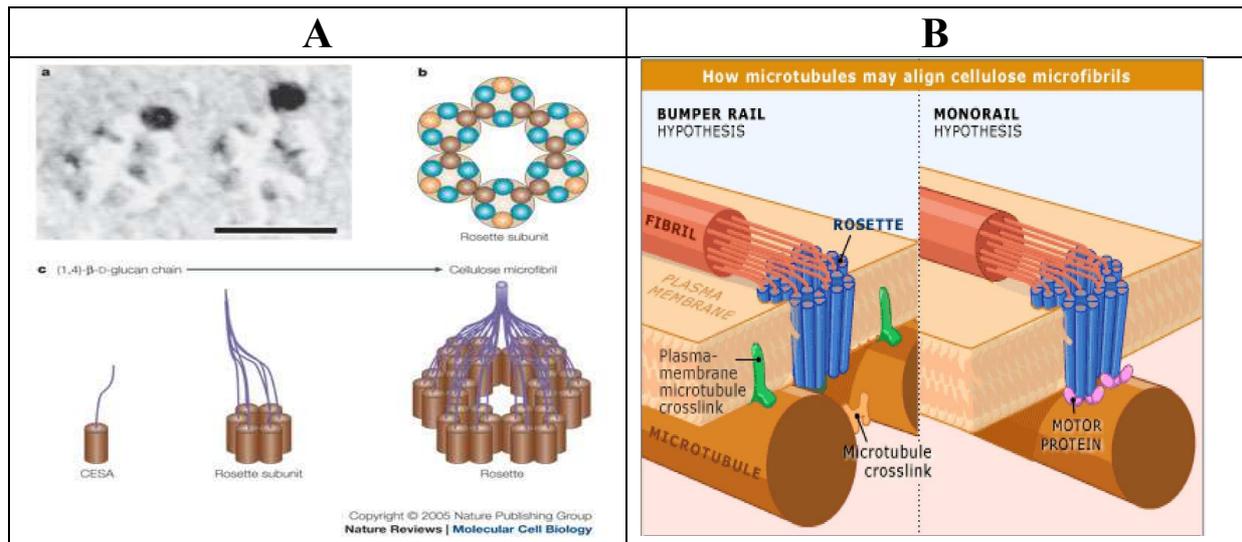
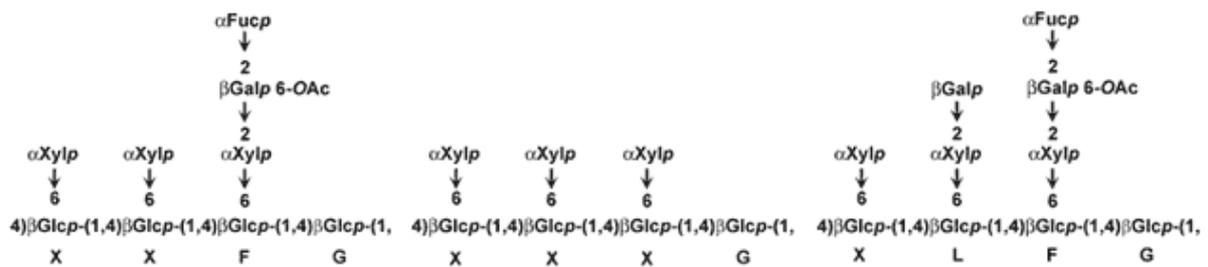


Figure 5 : (A) Organisation en rosette du complexe permettant la synthèse de la cellulose en microfibrilles, d'après Doblin et al. (2002).

(B) La cellulose étant synthétisée le long de la membrane plasmique comme décrit par ce schéma, les microtubules entrent en contact avec la cellulose et orientent son dépôt dans la paroi. Deux hypothèses ont été proposées : soit la rosette est coincée entre 2 microtubules, soit elle est posée sur un microtubule. Buchanan, Grussem and Jones (ed.) 2000 *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*



Un exemple de xyloglucane

Figure 6 : Les xyloglucanes sont des hémicelluloses majeurs des parois primaires de dicotylédones et de monocotylédones non-poacées. Elles peuvent représenter jusqu'à 20% du poids sec de la paroi primaire. Leur squelette se compose de β -D-Glucopyrannoses reliés par des liaisons β -1,4. Jusqu'à 75% de ces résidus sont substitués par des chaînes latérales (1 à 3 résidus) via des liaisons α -1,6. La composition de ces chaînes varie, avec en général du xylose, du galactose et du L-fucose. Nomenclature du site du CCRC <http://www.crcr.uga.edu/>

Du fait de sa présence au niveau de la membrane plasmique, le complexe de CESA peut rentrer en relation avec le cytosquelette. Les microtubules réguleraient l'orientation de ces fibres en fonction de l'état de la paroi et du stade de croissance en cours. Ils auraient un rôle de moteur sur les complexes de CESA (figure 5B).

2 - Les hémicelluloses

La classe des hémicelluloses comporte de nombreux polysaccharides différents (par exemples : le glucomannane, le xylane, les arabinoxyanes, le glucuronoarabinoxylane), dont les xyloglucanes, qui sont les plus abondants au sein des parois primaires des dicotylédones. Ils sont composés de β -1,4-D-glucanes substitués par des sucres neutres comme le xylose, le galactose, ou le fucose. Une nomenclature permet de désigner les structures des unités répétées des xyloglucanes en fonction de leur type de ramification (Fry et al., 1993) (figure 6).

Les xyloglucanes font en moyenne 200 nm, ce qui correspond à une chaîne principale d'environ 400 monomères et sont solubles en milieu alcalin (Zablackis et al., 1995). Les xyloglucanes ont un rôle important de structure en permettant la plasticité du réseau de microfibrilles de cellulose. En effet, ces polymères interagissent via des liaisons hydrogènes avec les fibres de cellulose et peuvent ainsi ajuster les propriétés mécaniques pour faciliter la croissance cellulaire ou agréger la cellulose pour rigidifier la paroi (McCann et al., 1992). Ces « mouvements » sont notamment régulés par des enzymes qui interagissent directement avec les xyloglucanes comme les endoglucanases, ou les xyloglucanes endo trans-glycosylase/hydrolases (XET). Ces mécanismes seront détaillés dans la partie concernant la croissance cellulaire.

Quatre classes d'enzymes (glycosyltransférases) sont impliquées dans la synthèse de ce polysaccharide au niveau du Golgi, les xyloglucanes étant ensuite sécrétés par exocytose : les α -fucosyltransférases (Perrin et al., 1999), les β -galactosyltransférases (Edwards et al., 1999), les α -xylosyltransférases et les β -1,4-glucanes synthases (Faik et al., 2002). Le rôle de ces enzymes a été mis en évidence par l'étude de mutants qui seront détaillés dans une partie dédiée.

3 - Les pectines

Ces polysaccharides sont définis par la présence d'acide uronique, l'un des composants majeurs de ces sucres complexes. Elles représentent 30 à 35 % du poids sec des parois cellulaires. Les pectines sont fortement hydrophiles et forment un gel hydraté. Ce gel incompressible contient trois sortes de polysaccharides :

- les homogalacturonanes (HG).

Ce sont les pectines les plus simples, polymères non branchés d'acides α -1,4-D galacturonanes (Thibault et al., 1993). Ces acides polygalacturoniques sont plus ou moins méthylestérifiés, et certaines chaînes latérales peuvent être acétylées (figure 7).

Les HG sont enrichis dans la lamelle moyenne et servent donc de ciment entre des cellules adjacentes. Ces polysaccharides sont impliqués dans l'adhésion cellulaire et contrôlent la porosité. Ils sont totalement méthylestérifiés dans le golgi médian par des pectinéméthyltransférases. Le taux de méthylation des HG arrivant à la paroi peut atteindre les 80%. Ils suivent le même parcours que les hémicelluloses : synthèse golgienne à partir de sucres catalysés par des enzymes, puis elles sont sécrétées à la paroi où elles forment de

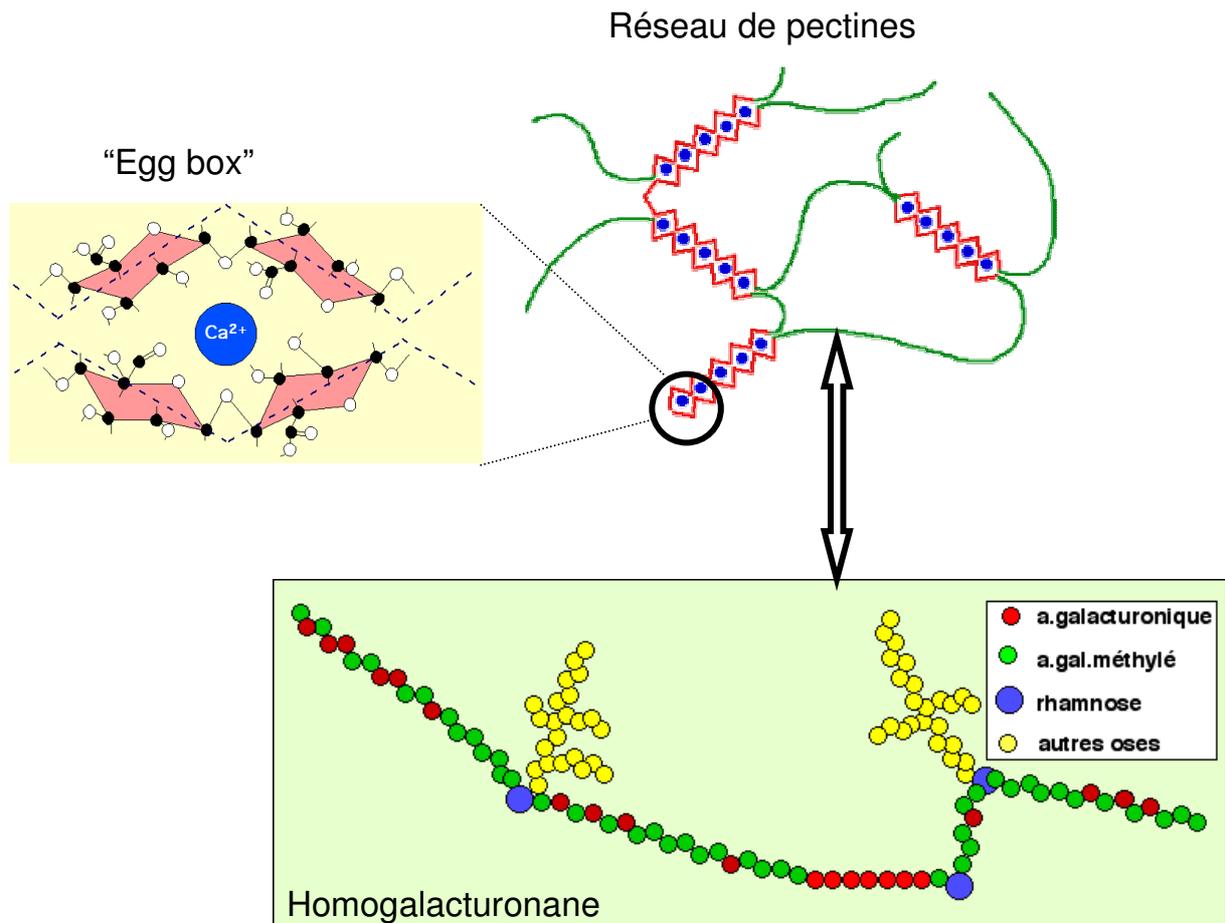


Figure 7 : Représentation schématique de la structure des homogalacturonanes. Lorsqu'il existe une longue chaîne d'acides galacturoniques non méthylés, deux molécules de pectine peuvent alors se lier via des ions calcium grâce à une structure nommée « boîte à œufs » ou « egg box ». C'est l'assemblage de ces molécules de pectines qui permet de former un gel hydraté.

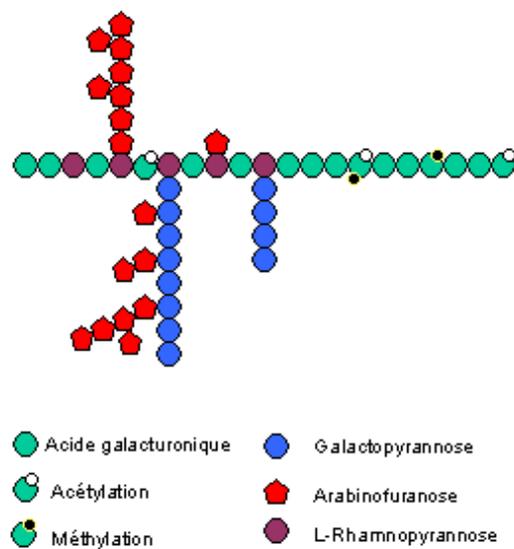


Figure 8 : Représentation schématique d'une portion d'homogalacturonane et d'une portion de RGI avec des substituants arabinane, galactane et arabinogalactane.

multiples liaisons incluant des liaisons covalentes, ioniques, ou hydrogènes (Willats et al., 2001).

- les rhamnogalacturonanes de type I (RG I)

Ils sont constitués de motifs alternés L rhamnose liés en α -1,2 et d'acide D galacturonane pour former un squelette ramifié par des chaînes d'arabinanes et de galactanes (O'Neill et al., 1990) (figure 8). Les rhamnoses sont intercalés dans ces chaînes et forment des coudes où se placent les chaînes latérales osidiques. Leur biosynthèse n'est pas connue, et à ce jour, aucun mutant affecté dans la synthèse de RG I n'a été identifié.

- les rhamnogalacturonanes de type II (RG II)

Les RG II sont les polysaccharides les plus complexes qui existent à l'état naturel. Leur squelette est constitué uniquement d' α -1,4 galacturonanes. Quatre types de chaînes latérales (A, B, C, D) peuvent substituer ce squelette. Les deux chaînes principales sont les chaînes A et B (figure 9). Un grand nombre de GTs sont nécessaires pour son élaboration et il comporte des résidus rares comme l'apiose responsable de la formation de complexe avec du bore (Kobayashi et al., 1996). Ainsi, la formation de liaisons diesters de borate entre des résidus apiose de chaînes latérales de type A permet l'association en dimères de molécules de RG II. Ce mécanisme permet de former des liens entre les différentes chaînes après assemblage des polymères (O'Neill et al., 2001).

Les protéines

Les protéines de la paroi ont un rôle tout aussi important que les sucres et sont généralement classées en deux catégories. Les protéines de structures telles que les glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP) ou glycines et les arabinogalactanes protéines (AGP). Les protéines ayant des activités sur les polysaccharides, telles que les pectine méthylestérases (PME), les glycosyltransférases (GTs), les endoglucanases ou hydrolases, les expansines et les xyloglucanes endo transglycosylases (XET).

1 - Protéines structurales

- HRGP

Les HRGP sont les protéines de structure, appelées à tort « extensines » lors de leur découverte. En fin de croissance, elles bloquent les propriétés de plasticité du réseau polyosidique. Elles ne sont pas synthétisées dans le Réticulum Endoplasmique (RE) mais au niveau des ribosomes disposés à la surface cytosolique du réticulum. Cette protéine passe ensuite dans la lumière du RE puis par le golgi grâce à un peptide signal avant d'être exocytée.

Ces protéines contiennent, comme leur nom l'indique, une séquence répétée riche en prolines dont le motif principal est SerPro (Sommer-Knudsen et al., 1998). Peu d'informations sont disponibles quant à leurs modifications post-traductionnelles ou leur glycosylation, par contre, elles sont capables de s'associer avec les hémicelluloses en formant des ponts diphénoles (Sommer-Knudsen et al., 1998). Cette association permettrait de rigidifier la paroi.

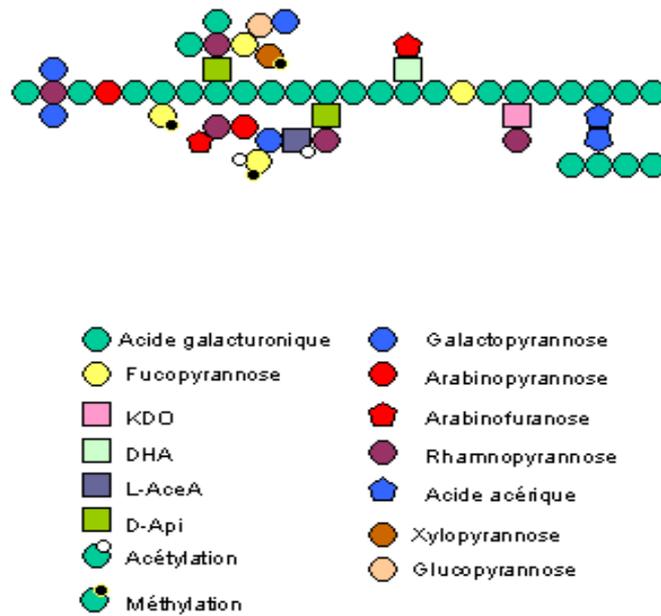


Figure 9 : La structure des RGII est bien plus complexe. Ce polysaccharide semble présent de manière universelle chez les plantes. Il comprend un squelette de structure variable, contenant des acides D-galacturoniques, des rhamnopyranoses, mais également des galactopyranoses, des glucopyranoses ou encore des fucopyranoses. Les substituants sont de nature et de diversité tout aussi large, ce qui donne au final des structures ramifiées assez complexes identifiées comme les « zones hérissées » des pectines.

D'autres types de protéines ont un rôle structural comme les protéines riches en proline (PRP) ou les protéines riches en glycine (GRP), mais leur fonction exacte et leur interaction ne sont pas encore connues.

- AGP

Une autre catégorie de protéines structurales est les AGP. Ce sont des protéoglycanes composés en majorités d'arabinose et de galactose, mais aussi parfois d'acides glucuronique. Les résidus arabinoses et galactoses sont arrangés en unités polysaccharidiques attachées en de multiples points sur le core (Showalter, 2001) de la protéine via un résidu hydroxyproline, sérine ou thréonine. Ces unités varient de 30 à 120 résidus osidiques. En général, le polysaccharide est composé d'un squelette de β -1,3-D-galactane avec des chaînes latérales de β -1,6-D-galactane qui peuvent être modifiées par de l'arabinose ou des sucres moins abondants comme le L-rhamnose, le D-xylose, ou le D-mannose, mais aussi le L-fucose, le D-glucosamine ou des acides (Clarke et al., 1979; Nothnagel, 1997).

Les configurations possibles et nombreuses dans la composition du core protéique et des chaînes polysaccharides font des AGPs des protéoglycanes difficilement classables (Showalter, 2001). De plus, le core protéique subit de nombreuses modifications post-traductionnelles par hydroxylation et glycosylation, qui peuvent changer leur structure et leur fonctionnalité. Même si l'ensemble du processus de leur synthèse reste inconnu, certaines AGPs possèdent un domaine hydrophobe glycosylphosphatidylinositol (GPI) en C-terminal permettant leur ancrage dans la membrane du RE. Les protéines sont orientées dans la lumière du RE où elles subissent des modifications puis se retrouvent dans la membrane du golgi avant d'être sécrétées sur la face externe de la membrane plasmique. Elles peuvent ensuite rester accrochées à la membrane ou se faire cliver par une phospholipase C ou D pour rejoindre la paroi ou le milieu extracellulaire. De plus, le système de dégradation des AGPs n'est pas encore bien connu, mais il semble hautement régulé par un système de *turn-over* et il existerait un équilibre entre les formes membranaires et solubles servant de réserve pour la paroi (Herman and Lamb, 1992).

Les AGPs sont des molécules ubiquitaires chez les plantes supérieures qui peuvent être marquées par des anticorps ou le réactif de Yariv (Yariv et al., 1962). Ces analyses ont permis de mettre en évidence que certaines AGPs avaient une expression changeante au cours du développement et de la croissance de la plante, mais aussi que certaines sont spécifiques d'organes voire de tissus. Certaines AGPs sont ainsi considérées comme des marqueurs de types cellulaires (Pennell et al., 1991). De plus, une nouvelle hypothèse, restant à confirmer, suppose que les AGPs membranaires serviraient de récepteur, et pourraient, via une cascade de phosphorylation, jouer un rôle dans la transduction du signal intracellulaire (Showalter, 2001).

L'étude de ces protéines constitue un intérêt pour l'industrie agroalimentaire, car elles sont utilisées couramment sous forme d'additif comme la gomme arabique. Elles auraient aussi des capacités à stimuler le système immunitaire et des études cliniques sont en cours pour tester leur utilisation comme adjuvant dans les traitements anticancéreux (Kelly, 1999).

2 – Protéines fonctionnelles

Une autre catégorie de protéines contenues dans la paroi est les enzymes ou des protéines coopérant avec ces enzymes comme les expansines.

- Expansines

Les expansines ont été identifiées par leur capacité à restaurer sur le long terme l'extension de parois isolées provenant de tissu végétal en croissance (McQueen-Mason et al., 1992). L'analyse du génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a montré que 38 gènes correspondent à des expansines putatives. La construction d'un arbre phylogénétique a mis en évidence 3 familles baptisées α -expansine, β -expansine et γ -expansine (Li et al., 2003). La famille des γ -expansines comporte peu de gènes et leur fonction est encore inconnue du fait que les protéines issues de ces gènes sont tronquées en C-term.

L'étude de ces protéines est difficile car elles ne sont pas facilement purifiables et peu abondantes. Cependant l'étude, chez le concombre, de l'activité d'une α -expansine a permis de mettre en évidence son rôle dans la croissance cellulaire : les expansines seraient responsables de la rupture des liaisons hydrogènes entre les microfibrilles de cellulose et le réseau de xyloglucanes. Elles auraient en outre un haut degré de spécificité car elles ne reconnaissent que les xyloglucanes *in vitro* (Whitney et al., 2000). De plus, il a été démontré que chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les expansines induisent l'expansion des tissus *in vivo*. En effet, leur application locale sur des zones méristématiques permet l'induction de la formation de feuilles chez la plante (Fleming et al., 1997). Elles semblent donc avoir un rôle primordial dans la croissance cellulaire.

Ainsi, le modèle d'élongation cellulaire proposé actuellement par McQueenMason est un mécanisme en 2 étapes :

- 1- Relâchement de la paroi par l'action des expansines qui induit un allongement de la cellule sous la pression de turgescence.
- 2- Action des XET et des glucanases qui modifient la structure de la paroi pour adapter la cellule lors de la croissance.

Les expansines auraient un rôle uniquement de gel isolant entre le réseau de cellulose et le réseau de xyloglucanes permettant de les faire coulisser et permettant l'action d'enzymes restructurantes (XET).

- XET

Les XET appartiennent à la famille des Glycosides hydrolases (GH) qui comprend notamment les galactanases/glucanases. Dans la base de données CAZY¹ elles sont référencées comme la famille GH16 (Rose et al., 2002). Ces enzymes sont de structure complexe et possèdent un double mécanisme d'hydrolyse et de transglycosylation, appelé vulgairement le mécanisme du « couper/coller ». Elles possèdent deux chaînes catalytiques latérales composées d'acides aminés ayant des fonctions carboxyliques. Ces chaînes peuvent alors mener entre autre des attaques nucléophiles contre le carbone anomérique d'un squelette de glucose non substitué pour produire un composé enzymatique intermédiaire (Vocadlo et al., 2001). L'enzyme est alors lié à un xyloglucane de type XXXG selon la nomenclature de Fry. Ce complexe transitoire formé peut faire intervenir deux types de mécanismes :

- 1- il peut être hydrolysé (transfert d'un glycosyl à une molécule d'eau) pour produire un clivage de la molécule de xyloglucane
- 2- il peut être intercepté par un substrat d'oligosaccharide ou de polysaccharides pour former un produit de transglycosylation (transfert d'un glycane donneur sur un glycane accepteur), ce qui permet de relier 2 chaînes de xyloglucanes clivées².

¹ Site de classement des enzymes actives sur des carbohydrates - <http://www.cazy.org/>

² Voir p.12 figure 13 pour le mode d'action des XET

Des études en cristallographie ont permis de construire un modèle 3D des XET et de mieux comprendre leur fonctionnement. De plus, ce modèle fait la lumière sur l'étendue des possibilités fonctionnelles de ces enzymes et de leur probable rôle dans le remodelage de la paroi et la mobilisation des polysaccharides (Baumann et al., 2007).

- PME

Les PME appartiennent à une autre catégorie d'enzymes, qui ont un rôle majeur dans le remodelage *in muro* de la paroi. Elles catalysent de façon spécifique la deméthylestérfication des HG à l'intérieur des parois en rejetant dans le milieu du méthanol et des protons. Les HG se retrouvent alors avec des groupes carboxyles chargés négativement. Ils peuvent ensuite devenir la cible d'autres enzymes de dégradation des pectines comme les polygalacturonases. Ces changements de structure des pectines affectent la texture et la rigidité des parois (Moustacas et al., 1991).

Les PME sont composées de plusieurs domaines : la partie active de la protéine est appelée domaine PME, elle est précédée en N-term par une extension appelée le domaine PRO, qui varie en longueur et en composition selon les isoformes. Ces domaines sont sensibles au pH et déterminent l'activité de la protéine. De plus, il existe un troisième domaine nommé domaine PME1, inhibiteur de PME, qui a permis de réaliser la classification des PME chez *Arabidopsis thaliana*. Les PME du groupe 1 ne possèdent pas de domaine PME1, tandis que les enzymes du groupe 2 possèdent 1 à 3 domaines.

Chez *Arabidopsis*, il y aurait environ 67 gènes codant des PME. Ces enzymes enlèvent les méthyles des esters dans la paroi libérant ainsi des groupes carbonyles pouvant former des ponts calciques entre les fonctions carboxylates de plusieurs chaînes d'HG. En effet, du calcium bivalent peut se lier à 9 oxygènes et assurer la liaison entre 2 chaînes de HG. Ainsi, 4 acides galacturoniques sont associés à chaque calcium. Les structures ainsi formées sont appelées « egg box » (figure 7) (Liners et al., 1992).

Ainsi les PME jouent un rôle important dans la défense de la plante (Micheli, 2001) mais surtout dans le mécanisme de croissance cellulaire : élongation cellulaire (Moustacas et al., 1991; Al-Qsous et al., 2004), élongation de la pointe racinaire (Pilling et al., 2004) ou encore dans la croissance des feuilles (Hasunuma et al., 2004). Il est connu que les PME agissent durant la différenciation cellulaire du xylème et récemment, il a été démontré que les PME réguleraient la longueur des fibres en modifiant l'adhésion cellulaire et en inhibant l'élongation apicale de ces fibres (Pelloux et al., 2007).

Cependant, bien que quelques mécanismes aient été mis en lumière ces dernières années, de nombreuses enzymes restent à découvrir, notamment par l'étude de mutants. Ainsi, le génome d'*Arabidopsis* contient 730 gènes codant d'hypothétiques glycosyltransférases (GTs) ou glycosylhydrolases (Henrissat et al., 2001), mais moins de 10% de ces gènes ont été caractérisés. Bien que l'architecture 3D des GTs soit plutôt conservée, leur diversité réside dans le nombre important de leurs substrats. Chaque type de substrat est associé à une famille de GTs particulière. Ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides, et les GTs les plus abondantes catalysent le transfert d'une fraction d'un sucre d'une molécule donneur vers une molécule accepteur spécifique en formant des liaisons glycosidiques.

Ces enzymes sont localisées dans le Golgi. En effet, ce sont des protéines transmembranaires de type II possédant un domaine catalytique en C-term baignant dans la lumière du Golgi. Les repliements structuraux de cette partie globulaire confèreraient sa spécificité aux GTs et permettraient la reconnaissance du substrat spécifique à chaque famille (Breton et al., 2006). Ainsi, les études sur les substrats des GTs montrent qu'environ 53 GTS

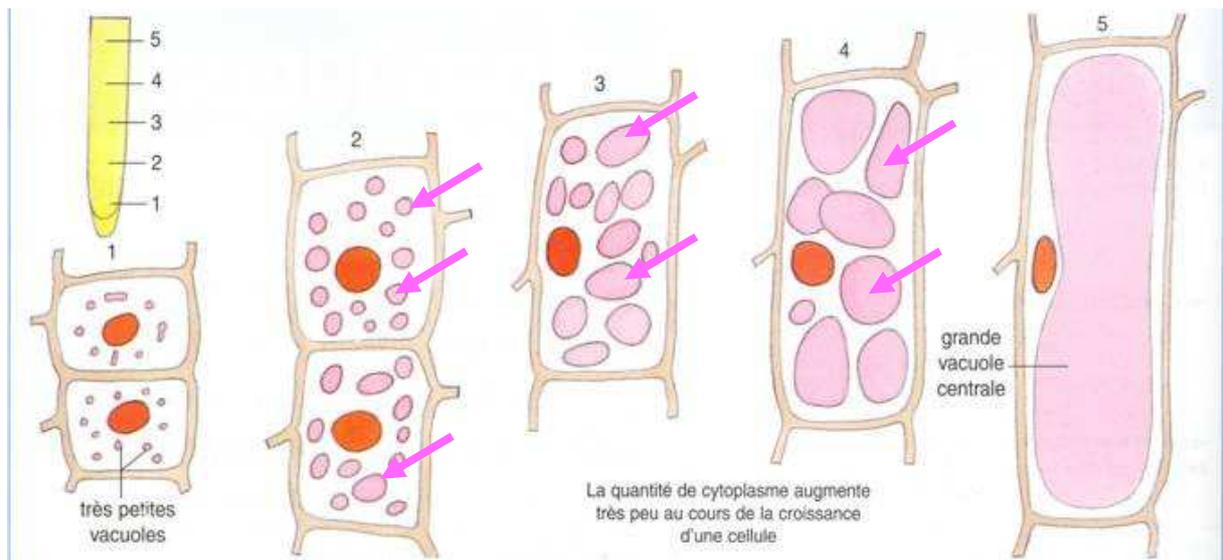


Figure 10 : L'observation des cellules en croissance montre que plus les cellules grandissent, plus la vacuole est grande. La vacuole exerce une pression de turgescence sur la paroi, ce qui permet la croissance de la cellule. Les vacuoles contiennent un liquide (suc vacuolaire) riche en eau, sels minéraux, acides aminés, saccharose) qui crée un appel d'eau vers l'intérieur par osmose.

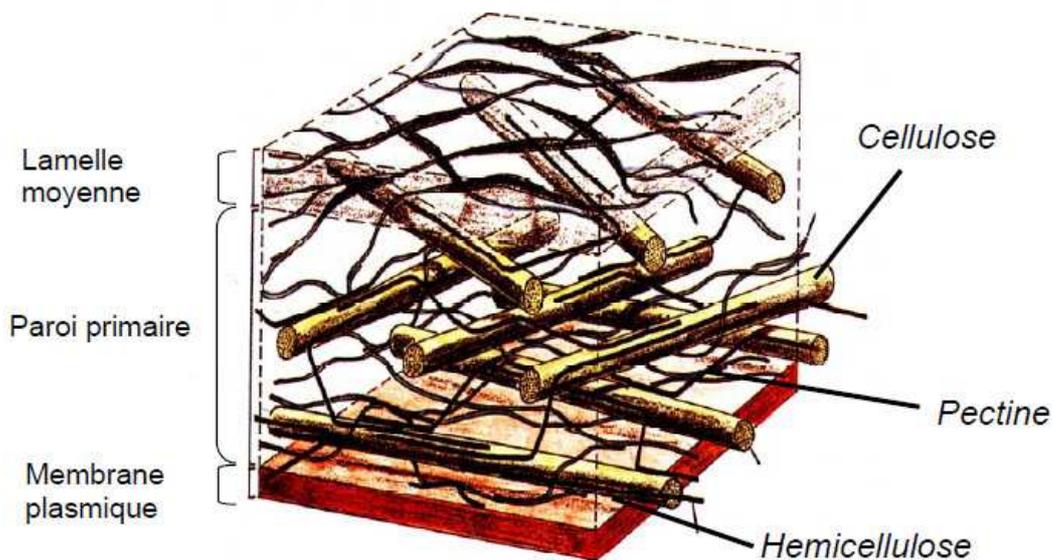


Figure 11 : Modèle d'organisation de la paroi primaire chez les dicotylédones d'une cellule méristématique. *D'après McCann et Roberts (1994).*

seraient impliquées dans la synthèse des pectines (Willats et al., 2001) et 4 dans la synthèse des hémicelluloses (Edwards et al., 1999; Perrin et al., 1999; Faik et al., 2002).

Remodelage et élongation

La croissance des cellules végétales constitue un problème particulier en biologie cellulaire. En effet, la cellule est entourée d'une paroi rigide qui lui donne sa forme et la protège des déformations. La croissance ne peut donc se réaliser que grâce à des modifications de la structure et de la composition de la paroi.

1- La croissance cellulaire

La pression de turgescence

La croissance cellulaire est une déformation irréversible de la cellule. Le moteur de cette croissance est la pression de turgescence exercée sur les cellules végétales (Green and Cummins, 1974). Cette tension est permanente, mais l'élongation de la cellule n'est possible que lorsque la plasticité de la paroi primaire le permet.

La pression de turgescence est le résultat d'une différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Lorsque deux milieux de concentration différente sont séparés par une membrane semi-perméable, des flux d'eau sont observés. La membrane ne laissant passer que les molécules d'eau et non les petits solutés, l'eau se dirige du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré pour rétablir l'équilibre des concentrations (figure 10).

Lorsque l'eau entre dans la cellule végétale, la vacuole se remplit et grossit et ses membranes se tendent. L'eau des cellules exerce une pression sur leurs parois et donne de la rigidité aux parties souples de la plante (tige, feuille, jeunes pousses,...). Si les cellules se vident d'eau, la turgescence cesse, les vacuoles se rétractent, les membranes cytoplasmiques se décollent de la paroi, et la plante se fane. L'état de turgescence maintient les ressources en eau de la plante et assure l'élongation cellulaire lorsque les parois sont relâchées.

Architecture de la paroi primaire

La modélisation visant à intégrer l'ensemble des propriétés physico-chimiques des différents polymères de la paroi, afin de rendre compte de leur organisation *in muro*, évolue régulièrement. Les modèles doivent se fonder sur deux événements contradictoires : les différents polysaccharides ont la propriété de rigidifier les parois pour assurer le maintien de la plante, mais leur remaniement au sein des parois permet le relâchement de celles-ci et facilite la croissance cellulaire.

Un premier modèle, proposé par Keegstra en 1973, envisageait des liaisons covalentes entre les pectines, les hémicelluloses et les protéoglycanes, tandis que des liaisons hydrogènes étaient responsables du maintien de la cellulose aux hémicelluloses. De nombreuses découvertes permettent aujourd'hui d'établir un autre modèle où les polysaccharides ne sont plus liés de manières covalentes et où la paroi est composée de deux réseaux indépendants : un réseau pectines et un réseau cellulose/hémicelluloses (figure 11).

Carpita et Gibeaut proposent donc en 1993, un modèle pour les parois primaires des dicotylédones. Les hémicelluloses majoritaires sont des xyloglucanes. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'étude de ses parois primaires a démontré que les deux réseaux sont interconnectés mais distincts.

1- Le réseau Cellulose/Xyloglucanes

Ce réseau porte les activités mécaniques de la structure des parois primaire. Il est composé de l'assemblage de microfibrilles de cellulose cristalline avec des molécules d'hémicellulose, comme le xyloglucane, via des liaisons hydrogènes. L'étude des interactions entre la cellulose synthétisée par une bactérie et un xyloglucane exogène a permis de montrer que les xyloglucanes permettent une organisation spatiale des microfibrilles de cellulose (Whitney et al., 1995). Les xyloglucanes seraient intimement liés aux microfibrilles qu'elles recouvriraient en majorité, tandis qu'une portion moindre interviendrait dans le pontage des différentes microfibrilles (Whitney et al., 1995).

De plus, la recherche de Markus Pauly (Pauly et al., 1999) sur les différents niveaux d'interactions entre cellulose et xyloglucanes a mis en évidence que 8% du poids sec des parois correspond aux domaines des xyloglucanes accessibles par une endoglucanase spécifique, domaines supposés intervenir dans la formation des pontages entre microfibrilles. De même, 10% de cette paroi correspond à des xyloglucanes associés à la surface des microfibrilles et 3% serait susceptible d'être des molécules de xyloglucanes enchâssées dans les microfibrilles de cellulose.

2-Le réseau de pectines

Les polymères pectiques sont d'autant plus importants qu'ils ont été mis en évidence de façon prépondérante au niveau de la lamelle moyenne (Van-Buren, 1979; Ng et al., 1998) et seraient donc fortement impliqués dans les phénomènes d'adhésion cellulaire. Ce réseau détermine aussi la porosité de la paroi, permet de moduler le pH (via la présence des acides galacturoniques), l'équilibre ionique (le Calcium pour les egg-box et bien que présent en faible quantité le Bore pour les RG II) et limite la progression de pathogènes (Liners et al., 1992). L'ensemble de ces propriétés contribue à renforcer la cohésion de la matrice pariétale nécessaire au développement du végétal.

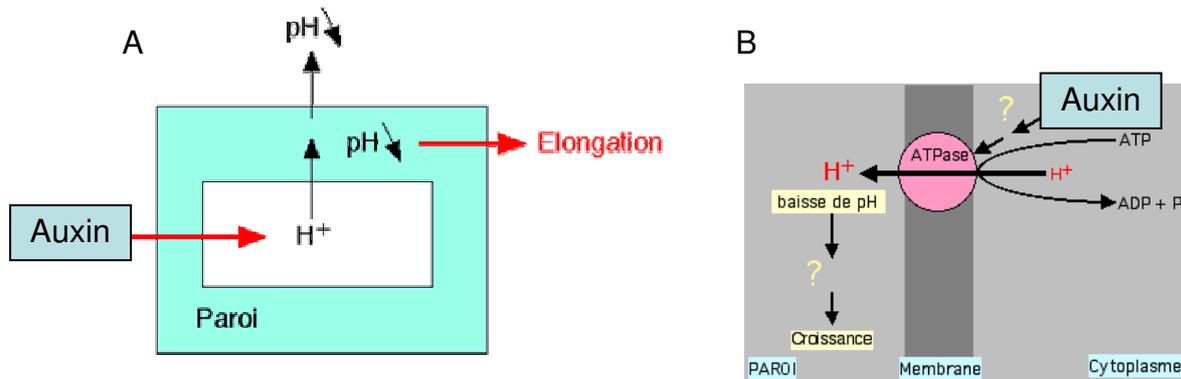
Les pectines peuvent être extraites par traitement des parois en milieu alcalin faible et cela indépendamment des autres constituants de la paroi. Cette caractéristique renforce l'hypothèse de l'indépendance entre les deux types de réseaux. Cependant, tout n'est pas si simple et certaines expériences ont mis en évidence des liaisons covalentes entre des pectines et des xyloglucanes dans des cellules de rose en suspension ou des interactions fortes entre pectines et cellulose (Thompson and Fry, 2000). Un autre problème apparaît : celui de l'association des différentes classes de polymères pectiques entre eux. Depuis, quelques années, un nouveau modèle émerge et suggère que les homogalacturonanes seraient en fait des chaînes latérales du RG I. Le RG I serait quant à lui le squelette des pectines (Vincken et al., 2003).

Deux grands modèles pour l'élongation cellulaire

1- La croissance acide

L'auxine est la seconde hormone caractérisée chez les plantes après les gibbérellines. C'est un acide faible synthétisé à partir du tryptophane, l'acide indole 3-acétique (AIA). Cette hormone a plusieurs rôles. Elle agit sur le phototropisme, le contrôle de la dominance apicale, la formation des racines latérales (Cosgrove, 2000, 2000; Cho and Cosgrove, 2002) et favorise parfois la croissance cellulaire en longueur.

Le mode d'action de l'auxine semblait bien connu, or depuis ces 3 dernières années, le modèle de la « croissance acide » proposé change et ne semble plus aussi évident.



Schématisation des corrélations auxine, baisse de pH et croissance

Figure 12 : (A) L'auxine entre dans la cellule et provoque une sortie d'ions H^+ dans la paroi cellulaire. Cette acidification provoque une stimulation de la croissance cellulaire et se traduit conjointement par une acidification du milieu (par diffusion). (B) Une des premières actions de l'auxine se réalise au niveau des ATPases membranaires et aboutit à la sécrétion d'ions H^+ dans la paroi.

Dans la racine, l'auxine produite au niveau du méristème racinaire transite entre les cellules par simple diffusion à travers la membrane plasmique ou plus majoritairement via une protéine G nommée AUX1 (Marchant et al., 1999). L'entrée de cette hormone provoque une augmentation de la concentration en ions calcium, et surtout engendre l'activation de pompe à protons. Ces ATPases membranaires vont rejeter des protons dans l'apoplaste, ce qui a pour conséquence une baisse du pH. Le pH dans la paroi est en général de 5,5, tandis que le pH cytoplasmique est neutre. L'acidification de la paroi permet l'activation des enzymes pariétales sensibles au pH acide, notamment les XET et des protéines agissant sur les polysaccharides comme les expansines, qui vont provoquer le relâchement de la paroi. La sortie de protons va favoriser l'entrée de potassium et d'eau grâce au mécanisme d'osmose, ce qui va permettre une augmentation de la pression de turgescence. Cette pression s'applique sur la totalité de la paroi. Lorsqu'elle dépasse l'élasticité de la paroi, la pression de turgescence induit l'élongation cellulaire (figure 12).

L'hormone n'est pas ensuite sécrétée, mais elle est polarisée dans la cellule dans le sens de l'élongation. Un gradient se forme alors et les molécules d'auxine peuvent passer d'une cellule à l'autre grâce à une protéine carrière nommée PIN1 (Sabatini et al., 1999). Ce phénomène est jugé responsable de la coordination de la croissance des organes lors de la croissance.

De plus, des travaux récents ont montré que dans la racine d'*Arabidopsis thaliana* les influx d'auxine arrivent par vague le long de l'axe d'élongation. Des marquages ont permis de mettre en évidence « une fontaine » d'auxine au sein de la racine dont la base se situe à l'apex avec des courants ascendants et descendants le long de l'axe de croissance (Grieneisen et al., 2007). Il semble donc que la croissance soit plutôt due à des oscillations dans la concentration des hormones.

Cette théorie de la croissance acide est un bon modèle de croissance pour la racine. Cependant, un autre modèle de croissance a été identifié pour le tube pollinique et les poils racinaires.

2- la croissance apicale

L'étude de certains radicaux libres (ou ROS pour Reactive Oxygen Species), comme les peroxydes, a permis de mettre en lumière d'autres phénomènes d'oscillation du pH liés à la croissance. Il a été ainsi démontré que les PME agissent plutôt en milieu alcalin dans le tube pollinique (Bosch and Hepler, 2005).

Dans un premier temps, l'étude chez *Arabidopsis thaliana* des carences en potassium montre que les cellules racinaires en élongation augmentent leurs taux de ROS et d'éthylène pour réguler l'expression des gènes. Ainsi, le H₂O₂ produit par la NADPHoxidase régule l'expression des gènes en réponse au manque de potassium (Shin and Schachtman, 2004). Puis les études suivantes vont montrer que les ROS sont activés lors d'attaques de pathogènes, et que les sources de H₂O₂ sont pH-dépendants dans les parois cellulaires (Torres et al., 2006). De plus, leur concentration doit être contrôlée, sinon les ROS induisent la mort cellulaire.

Les dernières études sur la croissance des poils racinaires, montre que le mutant ROS *rhd3* ne forme plus de poils et que ces composants sont donc essentiels pour l'élongation cellulaire (Carol and Dolan, 2006). Un modèle d'action des ROS dans la croissance est alors proposé. Suite à un stress mécanique, du calcium entre dans la cellule à travers la membrane plasmique. La NADPHoxidase est une protéine transmembranaire possédant un domaine

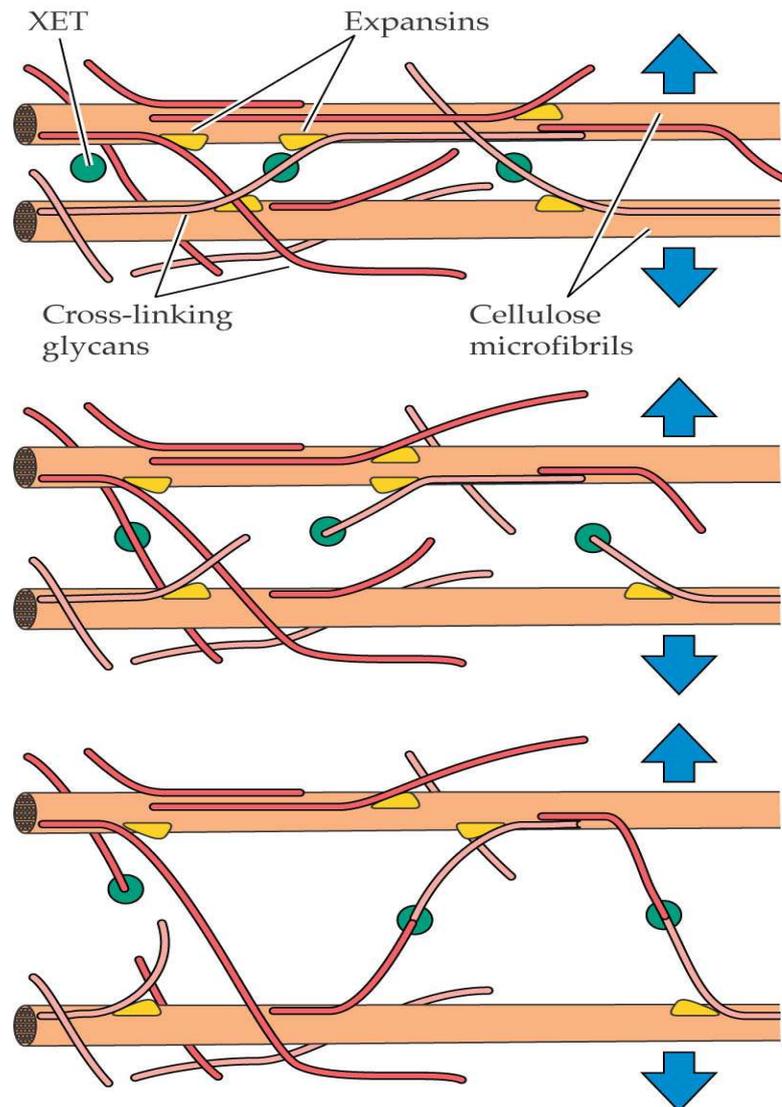


Figure 13 : La séparation des microfibrilles est conduite par la pression osmotique de la cellule et facilitée par le relâchement de la paroi. Ce relâchement est le résultat de l'action coordonnée des expansines, qui cassent les interactions entre les chaînes de glycanes et la cellulose, et les XET, qui ont pour fonction de former de nouvelles microfibrilles. *Buchanan, Gruissem and Jones (ed.) 2000 Biochemistry & Molecular Biology of Plants*

cytosolique pouvant fixer le calcium. Elle se situe sur la membrane plasmique ou sur les mitochondries. Cette augmentation du calcium intracellulaire active la NADPHoxidase qui relargue des ROS dans l'apoplaste et dans le cytosol. L'augmentation des ROS induirait en parallèle une augmentation de l'éthylène et de l'acide abscissique, mais leur rôle dans la croissance n'a pas été démontré (Ma et al., 2003). Cependant, la présence de ROS dans la paroi modifie le pH pour le rendre alcalin. Les PME seraient alors activées pour déméthyliser

les pectines provoquant le relâchement de la structure. Cette déméthylation entraînerait une baisse du pH qui pourrait ensuite activer les XET et les expansines. La localisation précise des ROS et des gradients de calcium n'est pas encore élucidée, plusieurs hypothèses sont possibles (Knight, 2007). Cette alcalinisation de la paroi est observée en regardant l'évolution du pH autour des poils racinaires en croissance (Monshausen et al., 2007).

Beaucoup de zones d'ombre persistent dans ces modèles d'élongation cellulaire. Il ressort de ces études que la concentration des différentes espèces est un équilibre précaire qu'il faut maintenir. Les ROS, le calcium, l'auxine et le pH semblent jouer des rôles majeurs dans la croissance, mais leur interconnexion n'est pas encore bien élucidée et certains partenaires restent sûrement à découvrir. De plus, il ne faut pas oublier que l'élongation cellulaire est orientée, les cellules ne grandissent pas dans toutes les dimensions et les modifications de structure ou de compositions permettant cette orientation ne sont pas encore connues. Le cytosquelette est sûrement impliqué dans ces phénomènes, mais son rôle précis n'a pas encore été déterminé.

Le relâchement pariétal

Le relâchement pariétal est indispensable à la croissance. Il consiste en un écartement des microfibrilles de cellulose. Les expansines cassent les liaisons hydrogènes entre les chaînes de xyloglucanes et les microfibrilles de cellulose, augmentant la distance entre les fibres (figure 13). Cette action permet d'épaissir la paroi, mais pour pouvoir allonger la cellule, il faut que les microfibrilles se décalent les unes par rapport aux autres ou grandissent. Les XET permettent de couper les chaînes de xyloglucanes reliant deux microfibrilles entre elles. Cette coupure permet donc à la cellulose de coulisser sous l'influence de la pression de turgescence. Une fois l'opération terminée, les XET peuvent faire le travail inverse et rabouter 2 chaînes de xyloglucanes clivées. Les liaisons hydrogènes se reforment rapprochant les microfibrilles et rigidifiant *de novo* la paroi.

Ce mécanisme simple et efficace intervient suite à de nombreux autres événements, et il est encore difficile aujourd'hui d'expliquer clairement comment fonctionne l'élongation cellulaire chez les plantes. En effet, les expériences menées jusqu'à présent ne permettent pas de savoir si la synthèse des composants de la paroi est simultanée avec la croissance ou si tous les composants sont synthétisés, stockés et utilisés au fur et à mesure. De même que le remodelage des composés et l'élongation ne sont pas clairs : comment la cellule contrôle-t-elle la croissance dans une seule dimension ? Existe-t-il des différences de composition et de structure qui bloquent l'élongation des pôles apical et distal ?

Seules des études avancées sur des mutants affectés dans la croissance permettront de répondre à certaines questions, mais il est encore difficile de relier tous les événements entre eux et de générer un modèle fiable.

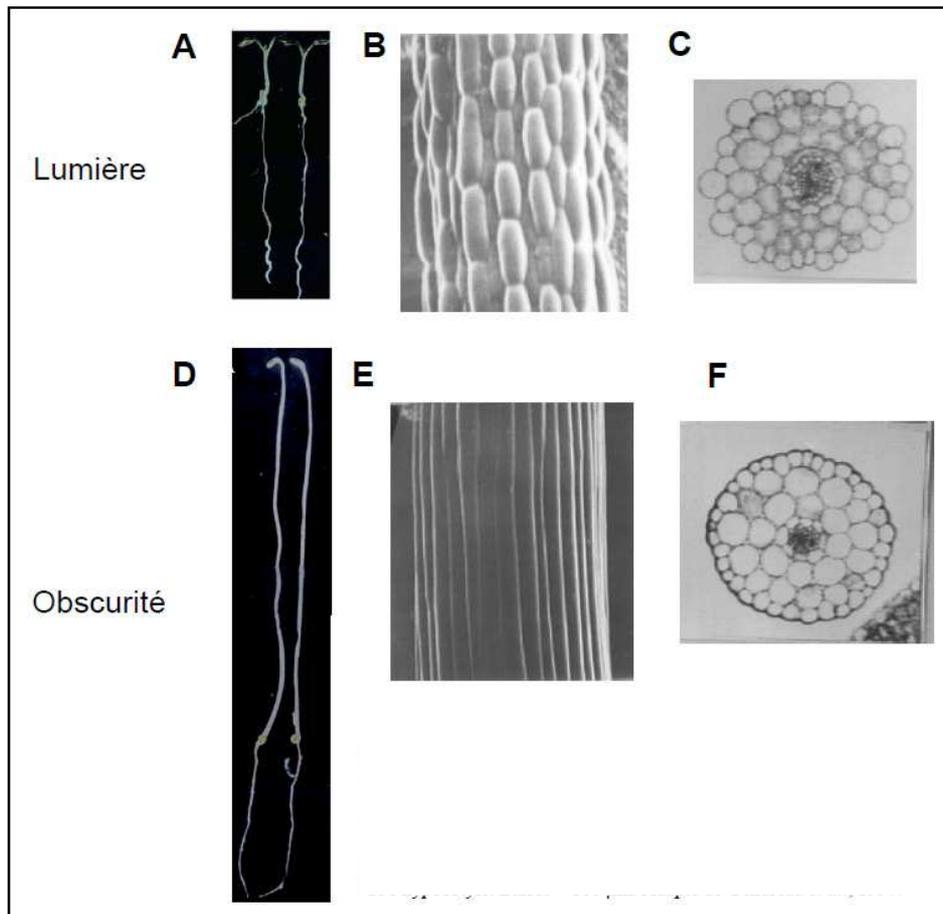


Figure 14 : Deux modes de développement précoce d'*Arabidopsis thaliana*.

A la lumière, (A) phénotype du type sauvage Columbia après 7 jours de croissance (B) surface épidermique et (C) coupe transversale de l'hypocotyle.

A l'obscurité, (D) phénotype du type sauvage Columbia après 7 jours de croissance (E) surface épidermique et (F) coupe transversale de l'hypocotyle.

Adapté de Gendreau et al. (1997)

2- Le criblage de mutants affectés dans la paroi

Une approche génétique a été développée pour étudier la mise en place de la paroi primaire lors de l'élongation cellulaire, en utilisant l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* comme système d'étude. L'hypocotyle, qui relie les cotylédons à la racine, est un organe d'origine embryonnaire dont la croissance à l'obscurité, après germination, est uniquement due à l'élongation cellulaire. A l'obscurité, cet organe subit une croissance importante (hypocotyle étioilé) et constitue donc un modèle d'étude idéal (figure 14).

Pour la recherche de mutants, deux stratégies peuvent être envisagées. La première est de définir des critères de sélection très précis visant à isoler des mutants affectés dans des mécanismes très spécifiques. La seconde consiste à choisir un crible plus large aboutissant à des mutants affectés dans un plus grand nombre d'étapes du phénomène biologique étudié, et donc d'obtenir une image plus claire du mécanisme analysé. Dans le cas de l'étude de l'élongation cellulaire, le choix de cribler des mutants nains permet d'isoler des mutants affectés dans la mise en place de la paroi, de l'orientation des microtubules ou dans la biosynthèse/signalisation des hormones... Cependant, le manque de définition de ce crible mène à l'isolement de mutants très différents et il est donc nécessaire de faire des sous-classements à l'aide d'autres cribles comme des cribles phénotypiques (longueur des hypocotyles par exemple) ou des cribles biochimiques permettant d'appréhender la qualité de la paroi des mutants isolés. Les 2 grandes approches disponibles à l'époque et adaptables à l'étude de centaines de mutants étaient : l'analyse de la composition en monosaccharides de la paroi ou l'utilisation d'anticorps spécifiques des polysaccharides. L'inconvénient de la première méthode réside dans le fait que les échantillons sont broyés et que les données acquises correspondent à l'ensemble de la plantule et non uniquement à l'hypocotyle. De plus, cette approche n'apporte aucune information sur les modifications structurales donc qualitatives pouvant être à l'origine du nanisme des mutants. L'utilisation d'anticorps quant à elle, ne permet pas une approche quantitative aisée dans l'identification des modifications de la paroi. Le groupe d'Herman Höfte a donc choisi une approche "haut débit" permettant d'aborder les modifications tant qualitatives que quantitatives de la paroi

Crible par microspectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

1- Principe de la FTIR

Les ondes infrarouges (IR) se situent dans la partie du spectre électromagnétique comprise entre la région visible et celle des micro-ondes. La région limitée entre 4000 et 700 cm^{-1} est la plus utilisée (région IR moyen) même si les régions du proche IR (800-2500 nm) et de l'IR lointain (700-200 cm^{-1}) suscitent un certain intérêt. Les radiations IR sont absorbées par des molécules organiques en tant qu'énergie de vibration moléculaire. Cette absorption est quantifiée et le spectre de vibration apparaît sous forme de bandes (Silverstein et al., 1991). La position des bandes dans un spectre IR est présentée en unités de nombre d'onde qui est l'inverse du centimètre (cm^{-1}) et elle est proportionnelle à l'énergie de vibration. Quant aux nombres d'onde, ils sont inversement proportionnels aux longueurs d'onde. Les intensités de ces bandes sont exprimées en absorbance. Ces bandes d'absorption forment alors un spectre considéré comme l'empreinte « digitale » de la molécule étudiée (figure 15).

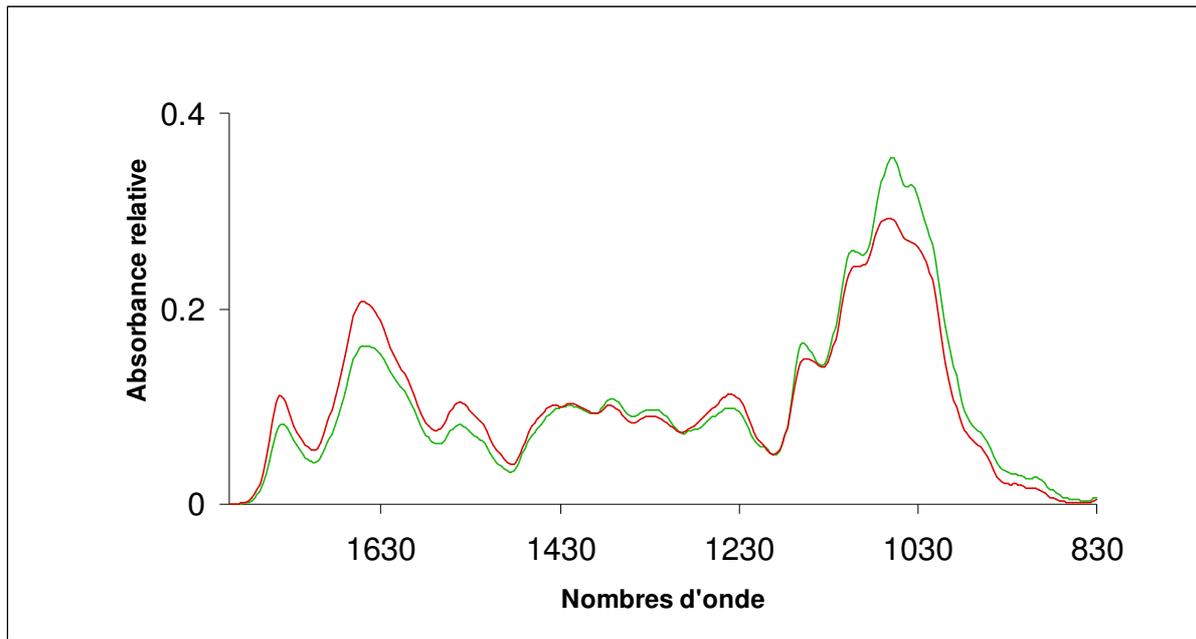


Figure 15 : Représentation d'un spectre IR. L'axe des ordonnées comporte les absorbances relatives et l'axe des abscisses comporte les NO en cm^{-1} . Ce graphe permet de visualiser les différences de composition et de structure de 2 échantillons distincts : le mutant cellulose déficient en vert et le contrôle en rouge.

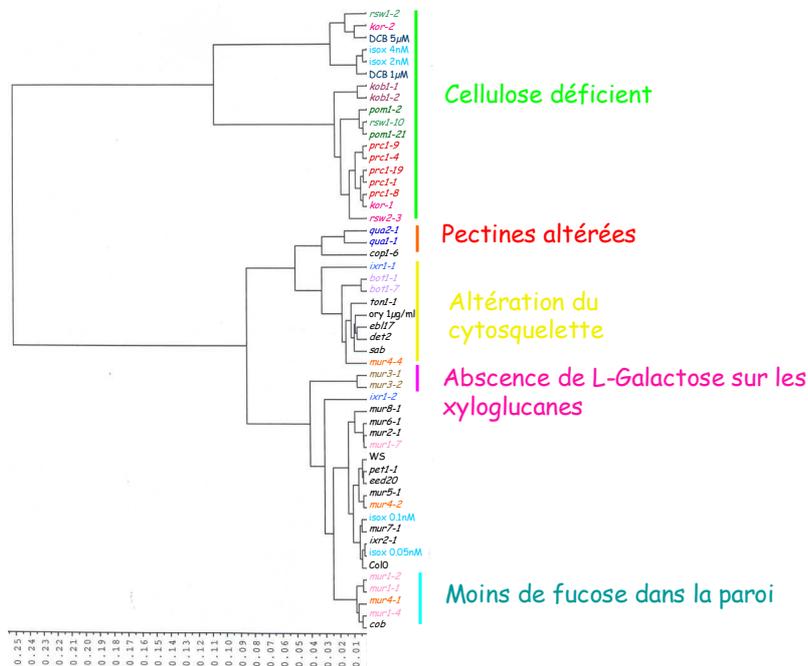


Figure 16 : Dendrogramme issu de la classification de différents mutants possédant des défauts pariétaux (Mouille et al., 2003).

Cette empreinte est fonction de la nature des atomes de la molécule, de leur environnement chimique, de la force de liaisons et de la configuration des atomes.

La microspectroscopie IR est donc une méthode d'analyse particulièrement informative et rapide. Elle permet de travailler sur des échantillons divers (coupe, poudre, ou liquide), sur des petites surfaces (au minimum 100 μm^2) et des quantités d'échantillons faibles de l'ordre du femtogramme.

Il existe un grand nombre de catalogues de spectres de composés organiques simples. Ces bibliothèques sont très utiles pour l'identification des composés inconnus ou en mélange. Pour des composés organiques, l'observation du spectre suffit pour l'identification de sa composition, tandis que l'identification des polymères pariétaux est beaucoup plus complexe. Le traitement mathématique des données se révèle indispensable (Wilson et al., 2000; Kacurakova et al., 2002). Les données structurales étudiées par spectroscopie IR concernent principalement la cellulose (Sene et al., 1994; Coimbra et al., 1999)

2- Analyse des polysaccharides pariétaux

L'apport de la microscopie dans le domaine de l'étude des parois végétales permet d'appréhender des différences entre tissus d'une même plante sans avoir recours à la dissection (McCann et al., 1997), mais aussi de regarder les différences entre les tissus de plantes différentes. La méthode est assez rapide pour pouvoir s'affranchir de la variabilité entre individus d'une même lignée en acquérant un nombre de spectres adéquats. Ainsi, il apparaît possible de détecter des plantes présentant des défauts dans la composition ou dans l'assemblage des polymères pariétaux (figure 16). Des méthodes statistiques permettent même de classer les mutants en fonction des polymères affectés (Mouille et al., 2003; Robin et al., 2003).

Les principaux mutants

L'étude, de divers mutants, affectés dans la biosynthèse et/ou le dépôt de polysaccharides de la paroi, permettra sur le long terme de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régissant l'élongation cellulaire.

1- *Kobito*

La paroi est le facteur limitant de la croissance chez les plantes. L'élongation de la paroi résulte du relâchement de sa structure, mais les études n'ont pas permis de comprendre comment ce relâchement est coordonné avec la synthèse de la paroi.

Deux mutants nains, cellulose déficients *kobito 1.1* et *kobito 1.2* ont été caractérisés (Pagant et al., 2002). La déficience en cellulose a été confirmée par observation directe des microfibrilles de cellulose pariétale dans la plupart des tissus des cellules racinaires en élongation. En comparaison avec des plantes sauvages de référence, qui possèdent des microfibrilles transversales, les microfibrilles de *kobito* sont orientées de manière aléatoire. Ce genre de changements n'a pas été observé chez un autre mutant nain, suggérant que la déficience en cellulose de *kobito* n'est pas un résultat indirect de la réduction de l'élongation cellulaire. L'étude de la racine chez *kobito* montre que la zone méristématique ne présente pas d'altération dans l'orientation de ces microfibrilles de cellulose par rapport à une racine sauvage.

Le gène *KOBI* code une protéine spécifique des plantes très conservée et liée à la membrane plasmique dont le rôle dans la synthèse de cellulose reste à définir.

2- Procuste

Le mutant *procuste* présente un phénotype très marqué à l'obscurité, tandis que les parties aériennes sont normales à la lumière. Les racines de ce mutant sont plus courtes et plus épaisses que chez le sauvage quelles que soient les conditions de lumière.

La mutation responsable de ce phénotype affecte une sous-unité catalytique de CESA (CESA6) (Fagard et al., 2000). Des dosages biochimiques et des études par FTIR montrent que *procuste* est effectivement déficient en cellulose dans les conditions où s'exprime le phénotype et que ce phénomène est compensé par une augmentation des pectines. La cellulose est synthétisée via un complexe multiprotéique localisé au niveau de la membrane plasmique. L'ensemble des partenaires de ce complexe n'a pas encore été identifié. Les différentes isoformes de CESA interagissent entre elles et ont une régulation spatio-temporelle très spécifique (Taylor et al., 2000). Mais les détails des interactions, des partenaires et de la stochiométrie ne sont pas encore bien établis.

3-Korrigan

Korrigan est un mutant d'insertion affecté dans l'expansion cellulaire de tous ces organes. Le gène porteur de cette mutation a été cloné et code une endo- β -1,4-glucanase (Nicol et al., 1998). Mais contrairement à la plupart des endoglucanases décrites, qui sont des protéines solubles, KOR est une protéine membranaire de type II ancrée dans la membrane grâce à une séquence hydrophobe de 20 acides aminés (Nicol et al., 1998). Les résultats obtenus montrent que KOR est directement impliqué dans la mise en place de la cellulose de la paroi lors de l'élongation. Les analyses FTIR ont montré que le mutant *korrigan* est déficient en cellulose cristalline dans les parois et que cette déficience est corrélée à une augmentation des pectines.

Des études enzymatiques suggèrent que KOR pourrait cliver la cellulose non cristalline. En effet elle a montré une activité sur de la carboxy méthyl cellulose. Cette protéine serait donc directement impliquée dans la biosynthèse de cellulose. Des études sont en cours pour élucider le rôle précis de cette protéine dans la machinerie complexe des CESA.

4- Quasimodo

La biosynthèse des pectines dans la paroi requiert environ une cinquantaine de GTs. Or très peu de mutants caractérisés présentent des altérations de la biosynthèse des pectines. Seul le mutant *quasimodo1 (qual)* présente une réduction de 25% de sa quantité en acide galacturonique. Ce mutant présente un développement dépendant à la fois de la source de carbone et de la source d'azote. Les résultats ont montré que *qual* accumule en particulier du saccharose et de la glutamine et que ces deux métabolites sont toxiques pour son développement. L'analyse structurale des mutants *qual* a mis en évidence une perte d'adhésion cellulaire corrélée au défaut de synthèse des pectines. Ces mutants sont facilement identifiables en microscopie optique classique, car ils présentent une desquamation des cellules de l'hypocotyle.

Ce phénotype est le résultat d'une altération d'un gène codant une glycosyltransférase de la famille GT8 jouant un rôle dans la synthèse des chaînes des HomoGalacturonanes (HG) des pectines (Bouton et al., 2002). Afin de trouver d'autres mutants affectés dans la biosynthèse des pectines, des analyses statistiques sont réalisées sur des données FTIR issus d'une centaine de mutants nains chez *Arabidopsis* (Mouille et al., 2003). Les résultats ont montré qu'un des mutants serait affecté dans un gène codant une putative méthyltransférase.

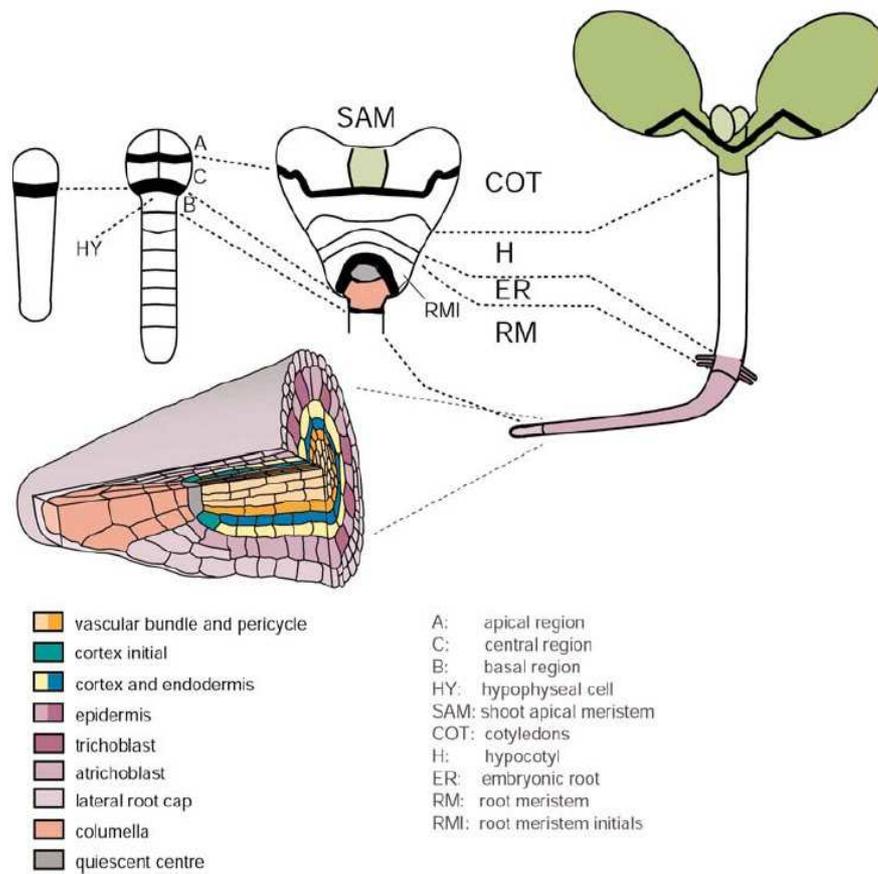


Figure 17 : Origine embryogénique de la racine d'*Arabidopsis*. De gauche à droite : première division zygotique, stade embryonnaire 8 cellules, embryon stade cœur, plantule avec une région méristématique racinaire.
The Arabidopsis book (2002).

nécessaire à la biosynthèse normale des HG. Ce gène pourrait être une pectin méthyltransférase (PMT) dont l'action serait couplée à l'activité Galacturonosyltransférase codée par le gène *qual*.

5- Mur

Les mutants *mur* ont été sélectionnés sur la base d'une altération de la composition de leur paroi cellulaire et présentent des déficiences dans la biosynthèse des xyloglucanes (Reiter et al., 1997). Ils présentent un phénotype nain et leurs parois sont fragiles. *Mur1* est muté dans une GDP-man-4,6-déhydratase intervenant dans la synthèse du GDP-L-fucose. Cette mutation engendre une forte baisse de la production de L-fucose qui est remplacé par du L-galactose dans les xyloglucanes (Zablackis et al., 1996). Le L-fucose est aussi retrouvé dans la composition des RG II. Les altérations de *mur1* sont atténuées en présence d'acide borique et le phénotype sauvage peut être restauré par ajout de fucose dans le milieu de croissance des plantes. Cependant, le nanisme de *mur* ne semble pas lié à l'absence de fucose dans les glycoprotéines ni dans les xyloglucanes. Il résulte d'une réduction de la capacité des RG II à former des liaisons de diester de bore.

Mur2 est muté dans une xyloglucane fucosyltransférase tandis que *mur3* est muté dans une xyloglucane galactosyltransférase (Vanzin et al., 2002). Ces deux mutants présentent également des altérations dans la structure des xyloglucanes. De plus, le mutant *mur3* produit des xyloglucanes variants. Il ne semble pas qu'il y ait des différences de liaisons des xyloglucanes sur les microfibrilles de cellulose (même poids moléculaire), mais par contre les XET seraient moins efficaces lors des étapes de remodelage pendant l'élongation, ce qui rendrait les parois plus fragiles. L'idée d'une co-évolution entre les enzymes et les polysaccharides apparaît dans ce cas de figure.

En parallèle des études FTIR et biochimiques, des analyses par spectroscopie de masse ont permis de déterminer avec précision la structure exacte des différents xyloglucanes produits par ces mutants (Lerouxel et al., 2002).

Ainsi, l'étude de l'hypocotyle de mutants chez *Arabidopsis thaliana* a permis de comprendre certains mécanismes de la croissance. Ces expériences ont surtout montré l'importance des nombreuses enzymes agissant dans la biosynthèse des composés pariétaux. Bien que l'hypocotyle soit un modèle de choix pour l'étude de l'élongation cellulaire, de plus en plus de chercheurs s'intéressent au cas de la racine.

La racine

La différence entre la racine et l'hypocotyle d'un point de vue embryonnaire n'est pas évidente. Cependant, sur une plantule de quelques jours, la différence est clairement marquée par des types de cellules individuelles, de caractéristiques bien distinctes, comme la formation des poils racinaires ou la teneur en chlorophylle des cellules (figure 17) (Scheres et al., 1995).

1- Un organe fascinant !

D'un point de vue développemental, la racine d'*Arabidopsis thaliana* semble très simple. En effet, un petit nombre de cellules souches situées à l'extrémité de la racine

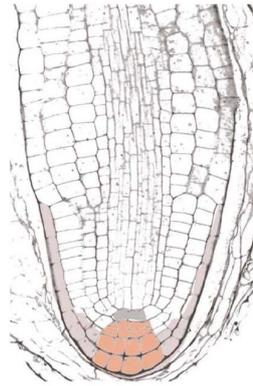


Figure 18 : Les cellules latérales de la coiffe (en violet), dans un embryon mature, entourent les cellules de la columella (en rose) qui vont devenir mitotiquement actives pendant la germination pour devenir le méristème racinaire. Les cellules du centre quiescent sont en gris.

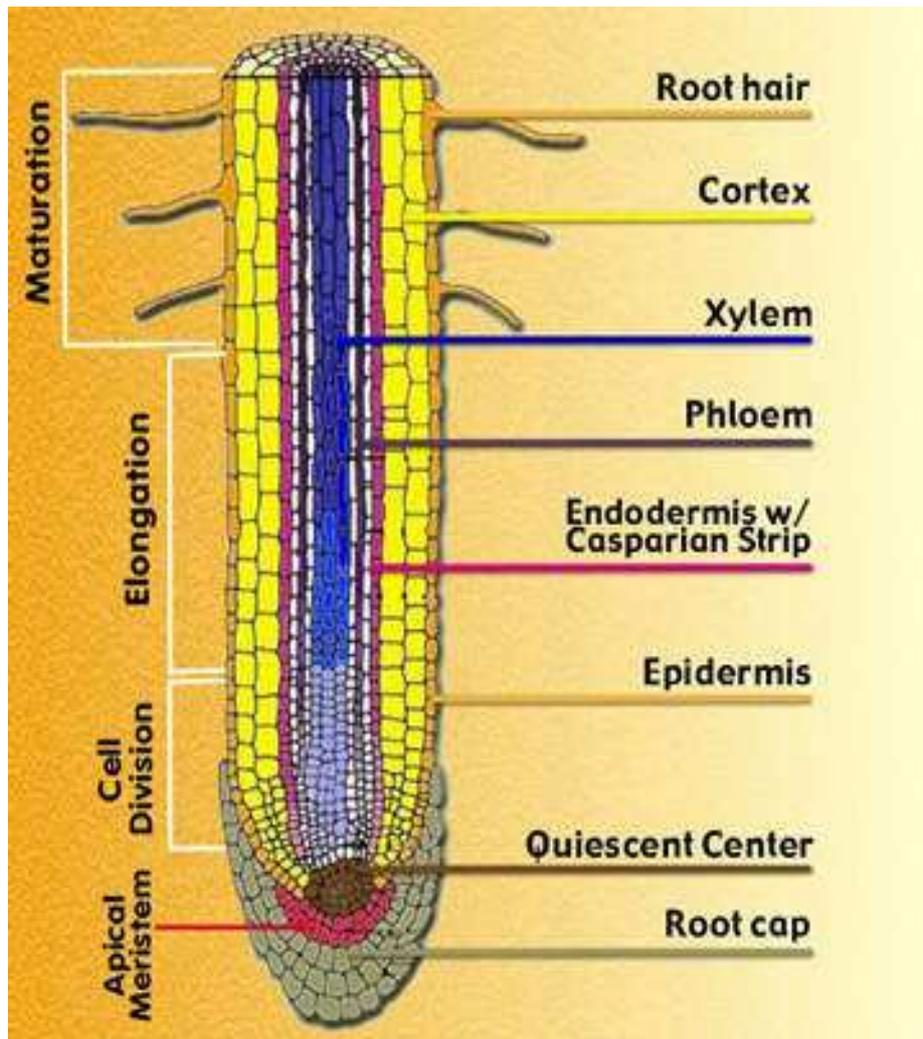


Figure 19 : Organisation des différents tissus d'une racine d'*Arabidopsis*, selon les différents stades de croissance.

gènèrent l'ensemble des types cellulaires. Les plans de division de ces cellules permettent la différenciation cellulaire et la régulation de l'élongation.

Structure de la racine primaire

1- Embryogénèse

Durant le développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana*, la division des cellules engendre des stéréotypes différents. Les cellules fondatrices de la racine primaire sont donc facilement identifiables. L'origine du pool des cellules, qui seront à la base de tous les types cellulaires de la racine dérive d'une cellule unique nommée l'hypophysis (Scheres et al., 1994). Cette cellule dérive elle-même d'une cellule fille basale issue de la première division zygotique.

Les techniques de clonage mises en place pour l'analyse des cellules embryonnaires, montrent que l'arrangement radial des cellules de la racine mature est déterminé au stade cœur embryonnaire. Cette organisation cellulaire embryonnaire, qui sera maintenue au cours du développement, est appelée proméristème (Clowes, 1954). Ce proméristème évoluera en méristème racinaire entouré par la première coiffe racinaire. Il pourra réinitialiser la division cellulaire après la levée de la dormance de la graine (figure 18).

2- Mise en place des tissus

L'intérêt majeur de l'étude de cet organe réside dans le fait que la croissance racinaire est un processus continu, tous les stades de développements sont présents. Des images microscopiques établissent une organisation spatio-temporelle qui permet de suivre des files cellulaires à partir de leur origine (figure 19). Ces travaux ont montré qu'il existe 4 types de cellules souches dans la pointe racinaire (Dolan et al., 1993) :

- Le premier type donne l'épiderme et la partie externe de la coiffe.
- Le deuxième type donne la partie centrale de la coiffe et la columella.
- Le troisième type donne le cortex et l'endoderme.
- Le quatrième type donne les tissus vasculaires et le péricycle.

Ces cellules souches dérivent quant à elles d'un petit nombre de cellules centrales qui sont mitotiquement inactives appelé le centre quiescent. Le centre quiescent et les cellules en division forment donc le méristème de la racine primaire.

De plus, comme évoqués précédemment, les plans de division de ces cellules souches définissent l'organisation de la racine. Une division cellulaire anticlinale, c'est-à-dire perpendiculaire à l'axe d'élongation, donne naissance à une file cellulaire. Une division anticlinale puis périclinale, c'est-à-dire parallèle à l'axe d'élongation, permet la formation de plusieurs couches cellulaires (figure 20). Les cellules formant la columella subissent uniquement des divisions anticlinales puis une rapide élongation pour former la partie de la racine responsable du contrôle de la gravité. Les autres types de cellules forment une petite file puis constituent plusieurs couches avant de s'allonger.

Ainsi, la racine d'*Arabidopsis* peut être décrite comme un assemblage de cylindres concentriques. Les 4 couches extérieures sont l'épiderme, le cortex, l'endoderme et le péricycle. Elles entourent les tissus vasculaires au centre de la racine (figure 21).

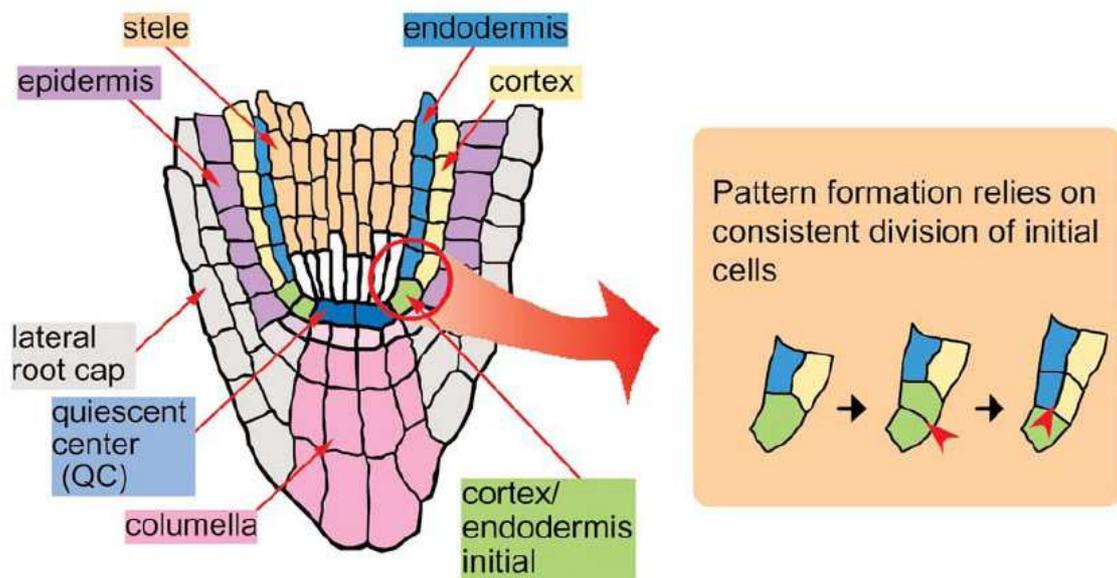


Figure 20 : Les différents plans de division cellulaire possibles à partir d'un méristème racinaire. La pointe a été colorée pour pouvoir identifier l'ensemble des types cellulaires. Le schéma à droite montre les deux types de division cellulaire qui permettent d'initier les cellules filles de l'endoderme et du cortex.

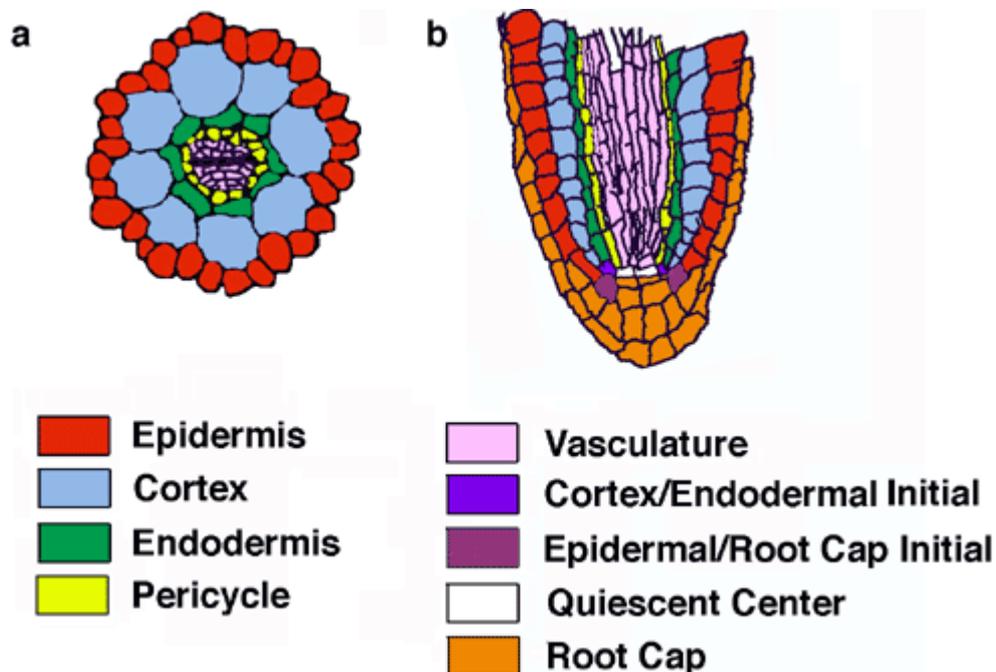


Figure 21 : Représentation schématique de la pointe racinaire, (a) coupe transversale, (b) représentation sous forme de cylindre.

L'épiderme de surface est composé de 2 types cellulaires : les cellules formant des poils racinaires et celles qui n'en forment pas. L'endoderme et le cortex sont formés d'un seul type cellulaire. Le péricyle, par contre, possèdent des cellules capables de former des racines latérales lorsqu'elles sont proches des pôles de xylem. Et enfin, dans le centre de la racine, les tissus vasculaires ont une symétrie bilatérale, le xylème pour le transport de l'eau et le phloème pour le transport des sucres.

Elongation de la racine

Parce qu'il n'y a pas de mouvement des cellules durant le développement de la plante, l'élongation cellulaire est le paramètre clé qui détermine la forme des organes végétaux. Deux facteurs sont hautement régulés dans l'élongation : dans quelle direction la cellule grandit-elle et de combien a-t-elle le droit de s'allonger ?

Pour connaître la réponse à ces questions, la racine d'*Arabidopsis* est un système d'étude idéal. En effet, certaines mutations identifiées affectent l'allongement ou l'orientation de l'élongation cellulaire.

1- Mécanismes

Différents types d'élongation cellulaire apparaissent dans différentes régions de la racine. Généralement, la racine est divisée en 3 ou 4 zones (figure 20) : la zone méristématique comportant le centre quiescent et les cellules souches, la zone de division pour la construction des files et des couches cellulaires, une zone de transition pas toujours décrite, et la zone d'élongation.

Pour générer des files cellulaires, les cellules souches et leurs descendants immédiats subissent un processus continu de division et d'expansion cellulaire. L'expansion de ces cellules racinaires en division est relativement lente et non orientée. Elles ont une taille constante et sont décrites comme des petites cellules carrées. Pendant ce temps, la zone méristématique continue de se diviser et de générer des cellules, poussant les cellules néoformées plus haut dans la file cellulaire. Elles vont alors subir une expansion anisotrope. La forme des cellules va alors changer transitoirement : elles seront plus larges que hautes, c'est-à-dire que leur expansion radiale sera favorisée par rapport à leur dimension longitudinale. Ce phénomène est facilement observable sur les cellules de l'épiderme. Puis, encore poussées par des cellules néoformées, elles vont subir une autre phase vers le milieu de la zone méristématique : une élongation longitudinale hautement polarisée, combinée à un arrêt total de la division. Cette élongation est rapide et spécifiquement orientée le long de l'axe longitudinal (Scheres et al., 2002).

Il semble logique de croire que la paroi des cellules végétales contrôle l'orientation et la distance autorisée de l'élongation cellulaire. Les premières molécules, soupçonnées d'être impliquées, sont bien entendues les microfibrilles de cellulose arrangées comme des cercles autour d'un tonneau. Ainsi, il ne serait pas surprenant que la plupart des gènes identifiés dans des mutants affectés pour le système racinaire jouent un rôle dans la synthèse de la cellulose.

2- Quelques mutants perturbés dans le système racinaire

Afin de comprendre les caractéristiques des mutants, il est nécessaire de bien définir la morphologie de la racine sauvage d'*Arabidopsis thaliana*. Pour l'écotype Columbia, plusieurs zones sont décrites : la zone méristématique, la zone d'élongation et la zone de différenciation. La zone méristématique contient les cellules souches. La zone d'élongation

comporte des petites cellules en division et en expansion dont le cytoplasme est très dense. Enfin, la zone de différenciation est la région dans laquelle les cellules acquièrent une spécificité. Sur une coupe transversale, l'organisation radiale des tissus racinaires est facilement observable. L'épiderme, le cortex et l'endoderme ne présentent qu'une seule couche de cellules, ainsi que le péricycle. La visualisation de ces couches tissulaires est possible par des marquages anticorps dirigés contre des antigènes de paroi et notamment contre les pectines (Knox et al., 1990). Ces immunomarquages permettent aussi de déterminer la forme et la taille des cellules.

Ainsi, plusieurs mutations sont responsables de déformations cellulaires dans le système racinaire. Par exemple, le mutant *rsw1* est sensible à la température. Il présente des cellules gonflées et peu de rosettes qui s'accompagne d'une réduction du taux de cellulose cristalline (Arioli et al., 1998). Le gène *RSW1* a été identifié et coderait une protéine proche d'une sous-unité catalytique d'une CESA bactérienne. Cependant, tous les mutants affectés dans le système racinaire ne sont pas dus à des perturbations directes des CESA, des problèmes dans l'expansion cellulaire peut aussi déformer les cellules (Benfey et al., 1993).

- Classe de mutants *CORE* (Conditional Root Expansion)

Ces mutants sont conditionnés par le taux de croissance, c'est-à-dire qu'ils dépendent de la température et de la concentration en sucre du milieu. Dans des conditions de basses températures et de taux faibles en sucre, la croissance est lente et ces mutants présentent un phénotype sauvage.

Les mutants *cobra* (*cob*) et *lion's tail* (*lit*) ont des phénotypes similaires. Leur racine est sensiblement plus large que le phénotype sauvage et le degré d'expansion cellulaire varie le long de l'axe d'élongation. Le volume cellulaire est plus petit et la zone d'élongation fortement réduite. Leurs parties aériennes ressemblent à celles du sauvage, mais il y a parfois quelques imperfections, notamment dans la taille des hypocotyles. Cependant, ces mutants ne réagissent pas de la même façon aux conditions environnementales. Le mutant *lit* est beaucoup plus sensible au taux de sucre que *cob*. L'expansion cellulaire de *lit* est observée pour des concentrations plus basses en sucre.

Un autre mutant, nommé *sabre* (*sab*), augmente le diamètre de ces racines et présente des racines plus courtes que le sauvage. Mais contrairement à *cob* et *lit*, *sab* possède une expansion cellulaire relativement uniforme le long de l'axe d'élongation et les changements de concentration en sucre du milieu n'affecte pas son expansion racinaire. Cependant, les parties aériennes de *sab* sont plus petites que celles du sauvage, et les plantes homozygotes sont peu fertiles même si quelques fleurs sont formées (Aeschbacher et al., 1995).

L'étude des croisements de ces trois mutants avec le type sauvage a permis de comprendre que les mutations *sab* et *lit* sont récessives et portées par un seul locus, tandis que la mutation *cob* est semi-dominante.

Il existe quatre autres mutants *CORE* : *quill*, *cudgel*, *pom-pom1* et *pom-pom2*. Ces mutations engendrent des cellules plus larges que les cellules du sauvage et joueraient un rôle dans la structure ou la régulation de l'expansion (Hauser et al., 1995). Il est intéressant de voir que ces mutations identifiées sur des mutants racines ont un lien étroit avec des mutants identifiés pour des défauts pariétaux dans l'hypocotyle.

En effet, le mutant *procuste* possède un hypocotyle très court du à un défaut d'élongation cellulaire. Des études de génétique montrent que ce mutant possède également l'allèle *quill* (Desnos et al., 1996). *Procuste/quill* code une sous-unité catalytique du

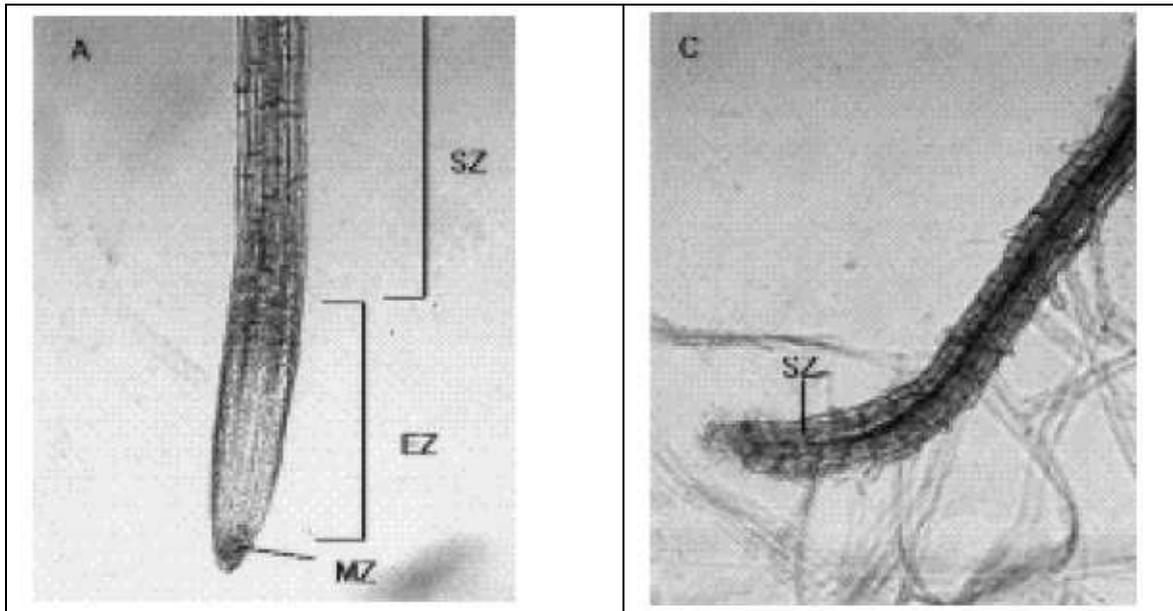


Figure 22 : Morphologie de la racine (A) racine contrôle, (C) mutant *shr*. La racine contrôle comporte une zone méristématique (MZ), une zone d'élongation (EZ) et une zone de différenciation (SZ), alors qu'il manque la zone EZ et MZ chez le mutant. (*Benfey et al., 1993*)

complexe enzymatique des CESA (Fagard et al., 2000). De même, le mutant *korrgan* possède l'allèle *lit* (Sato et al., 2001).

Il semble donc que ces mutants présentant des parties aériennes réduites, possèdent également des racines courtes, mais plus épaisses, et surtout qu'un fort taux de sucre ne permette pas le développement de la plante.

- Un autre exemple de mutant

Le mutant *Short-Root (shr)* comporte une partie aérienne normale, mais des racines extrêmement courtes. De plus, de nombreuses racines secondaires sont initiées à la jonction entre l'hypocotyle et la racine primaire. Une observation de la pointe des racines les plus longues, primaires ou secondaires, montre une absence des petites cellules au cytoplasme dense dans la zone méristématique (figure 22). En plus d'une croissance anormale, des études de marquages anticorps montrent que *shr* ne présente pas d'endoderme et qu'une partie de la stèle (cette partie comprend le péricycle, le xylème et le phloème) est manquante (Benfey et al., 1993). Ainsi, le méristème racinaire perd sa capacité à maintenir la croissance et il ne fabrique plus ces deux couches cellulaires. Après croisement du mutant avec une plante sauvage, l'étude de la descendance montre que *shr* est une mutation récessive située sur un seul locus et qu'elle est responsable à elle seule des défauts de croissance et du manque de certaines couches cellulaires.

Lorsque les plantes sont cultivées *in vitro* dans des boîtes de Pétri, les parties aériennes sont normales. Leur transfert dans des pots pour une culture en serre engendre un retard de croissance manifeste. Les plantes présentent un phénotype dit « rabougri » et ne fabriquent pas beaucoup de graines. Cette différence observée de phénotype dans ces deux conditions de culture est sûrement due au fait que les racines trop courtes du mutant ont des difficultés à puiser les nutriments nécessaires à la croissance de la plante dans le sol.

En fait, il a été démontré par métaanalyse de données de puces à ADN (microarray), que le gène *SHR* code un facteur de transcription. Ce facteur est un composant clef dans le développement pour la mise en place de la niche des cellules souches puis dans la différenciation d'un petit groupe de cellules souches dans la racine (Levesque et al., 2006). De plus, les analyses suggèrent que la voie *SHR* ne régule pas seulement le développement de la racine via un réseau régulant la transcription, mais aussi en régulant la voie hormonale et la voie de signalisation utilisant des récepteurs de type protéine kinase. *SHR* joue un rôle dans la régulation globale du développement de la racine, ainsi que sur le tissu vasculaire et permet la différenciation de l'épiderme chez *Arabidopsis*. D'autres expériences montrent que ce facteur a des mouvements limités dans une seule couche cellulaire dans la racine chez le riz. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore connus, l'interaction avec une autre protéine, nommé *scrarecrow*, bloquerait la diffusion de ce facteur de transcription dans le noyau (Cui et al., 2007).

2- Quelques études récentes

Ces dernières années beaucoup de travaux de recherche portent sur le développement des plantes et le contrôle de leur croissance. Certains mécanismes sont connus très précisément, comme le montre l'étude de certains mutants, mais dans la grande majorité, les mécanismes exacts de la modification des parois cellulaires, pour permettre l'expansion, restent un mystère.

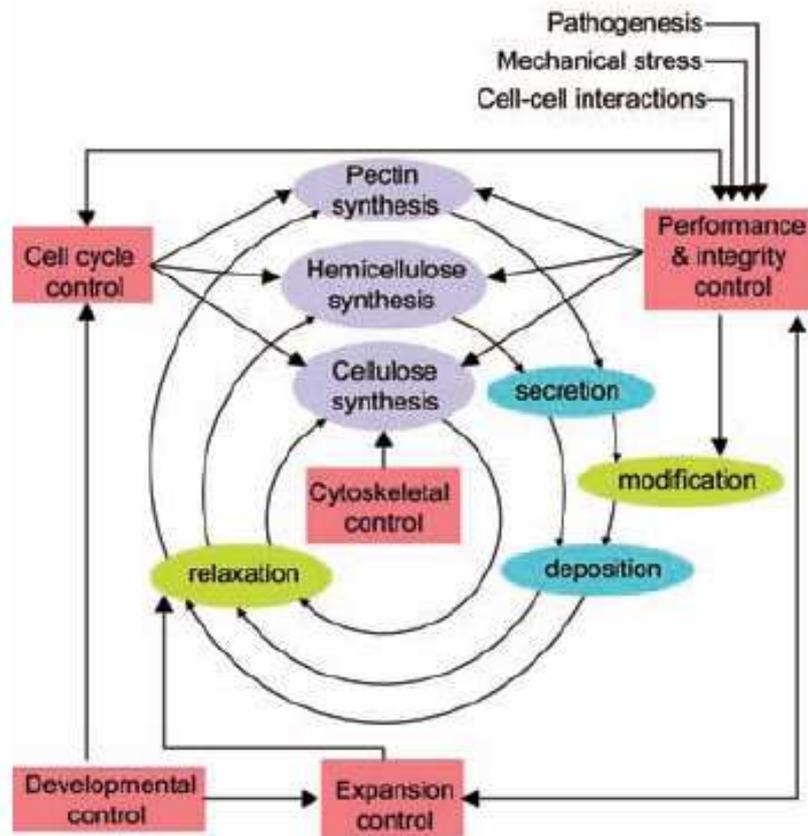


Figure 23 : Diagramme simplifié pour la synthèse de la paroi primaire (Somerville et al., 2004).

Croissance racinaire sous influence d'oscillateurs

En 2004, l'équipe de Sommerville propose un diagramme simplifié pour la synthèse de la paroi primaire (figure 23) (Somerville et al., 2004). La synthèse de la cellulose est placée au cœur de ce système et serait le moteur de la biogenèse de la paroi. Cette hypothèse semble crédible compte tenu du nombre de mutants pariétaux étudiés qui comportent des défauts cellulose, aussi bien dans l'hypocotyle que dans la racine. Cependant, il ne faut pas oublier les nombreux autres facteurs influençant ces mécanismes et notamment ceux que Sommerville appelle les « contrôles de performance et d'intégrité ». Ces points de contrôles se manifestent en réponse à des inhibiteurs, des pathogènes et des facteurs environnementaux et peuvent considérablement bouleverser la mise en place de la paroi et la croissance de l'organe étudié. Ces phénomènes sont particulièrement visibles sur la croissance racinaire.

En outre, il apparaît de plus en plus souvent que la croissance racinaire est liée à des phénomènes oscillatoires. L'équipe de Scheres en 2007 a réussi à modéliser « une fontaine » d'auxine le long de l'axe longitudinal et à prouver que ce gradient est crucial pour l'élongation des cellules (Grieneisen et al., 2007). En effet, il faut que la concentration en auxine soit forte dans la zone méristématique pour favoriser la division et faible dans la zone d'élongation pour permettre l'allongement cellulaire. Ce gradient d'auxine serait corrélé au gradient de pH observé le long du même axe (Monshausen et al., 2007). Des vagues alcalines le long de l'axe d'élongation de racines en élongation sont observées. Ce phénomène d'oscillation est assez rapide environ 400 μ m/min (Gilroy communication personnelle). Ces résultats vont à l'encontre de la théorie acide, et l'ajout d'auxine inhibe les vagues alcalines. Tous ces phénomènes oscillatoires suggèrent une régulation en continu de la croissance racinaire. Cependant, il est difficile de déterminer si les oscillations sont synchronisées ou si elles se stimulent l'une l'autre et comment s'effectuent exactement ces corrélations.

Une façon de comprendre comment s'organisent ces oscillations est l'étude de la distribution des vitesses de croissance le long de l'axe d'élongation de la pointe racinaire. L'analyse de la distribution spatiale du taux de croissance, qui augmente et diminue à l'intérieur d'une zone de quelques millimètres de long, fait l'objet d'investigations depuis plus d'un siècle (Sachs, 1887; Goodwin and Stepka, 1945). Afin de visualiser et de quantifier le taux de croissance des différents segments de la pointe racinaire, les scientifiques utilisent des méthodes photographiques (Erikson and Sax, 1956). Ces premières études ont été réalisées chez le maïs du fait de la grosseur de ces racines et surtout de la grandeur de la zone de croissance. L'analyse de la distribution du taux de croissance élémentaire relatif (TCER) s'effectue en plaçant des marqueurs sur la racine et se calcule grâce à une équation de continuité développée par Erikson en 1976. Ces méthodes d'analyses sont laborieuses et difficiles à mettre en œuvre. De plus, la résolution spatiale et temporelle n'est pas très précise.

Les progrès technologiques permettent maintenant d'obtenir des images séquentielles. Des traitements informatiques assurent une quantification automatique et précise de la distribution du TCER racinaire et de la fréquence des oscillations dans la pointe de la racine pendant la croissance sans utiliser de marqueur. La prise d'images peut être effectuée sur plusieurs jours avec une résolution spatiale d'environ 20 μ m et une résolution temporelle de quelques minutes. Le système de capture d'images utilise une caméra capable de suivre la croissance des racines de maïs cultivées dans un rhizotron en milieu hydroponique où les

conditions environnementales peuvent être modifiées afin de regarder l'impact sur la croissance (Walter et al., 2002).

Les résultats de ces expériences montrent qu'à température constante, il n'existe pas de variation diurne statistiquement significative de la croissance racinaire. Cependant, l'analyse des courbes de distribution du TCER sur une période de quelques heures définit deux pics d'activité de croissance maximale dans la zone d'élongation. L'intensité et la localisation de ces pics diffèrent énormément entre racines individuelles et fluctuent dans le temps. Bien que les vitesses de la pointe racinaire varient dans chaque expérience, le cycle jour/nuit ne semble pas responsable de ces changements. De plus, la visualisation de la distribution du TCER peut être réalisée par une superposition en code couleur des cartographies ou sous forme de clips vidéo. Ces images montrent, de manière efficace, la diversité des positions des zones maximales du TCER au cours du temps sous des conditions environnementales constantes. Si un changement de température intervient, comme une augmentation de quelques degrés, la racine réagit très rapidement (environ 1 heure) et change son TCER préférentiellement dans la zone de maximum d'élongation (Walter et al., 2002). Ces résultats soulèvent un autre type de question : existe-t-il une véritable interaction dynamique entre l'environnement et le contrôle endogène de la croissance des plantes ?

Afin de répondre à cette question, l'équipe d'Ulrich Schurr a utilisé le même système pour l'étude de la feuille et de la racine chez *Nicotiana tabacum* (Walter and Schurr, 2005). Il s'avère que la feuille et la racine ne réagissent pas du tout de la même manière aux changements de conditions de croissance. En effet, la feuille suit un cycle diurne et met longtemps à moduler sa croissance face à des conditions de culture modifiées et suffisamment maintenues. La distribution spatiale du TCER dans la racine est beaucoup plus complexe que dans la feuille chez les dicotylédones. Les racines sont très susceptibles aux changements de nombreuses conditions environnementales (Pritchard, 1994), comme les variations de températures (Pahlavanian and Silk, 1988), les déficits en eau ou en nutriments (Fan and Neumann, 2004). Ainsi, l'adaptation aux conditions environnementales varie selon les organes de la plante. La racine a besoin d'être plus réactive pour adapter l'apport des composants essentiels à la survie de la plante. En outre, si une cellule racinaire finit sa croissance en quelques heures, une cellule de feuille chez les dicotylédones peut mettre plusieurs semaines pour atteindre sa maturité. Si le gradient spatial et organe-spécifique du TCER suit le gradient de développement des cellules dans une zone de croissance, il est alors indispensable d'étudier le comportement de la croissance dans des petits systèmes tissulaires isolés (Walter and Schurr, 2005).

Les résultats de l'analyse de disques prélevés sur des feuilles de tabac ne permettent pas de conclure de manière significative sur la nature des mécanismes de contrôle de la croissance. En revanche, des segments isolés de racines montrent des comportements complètement différents selon leur environnement : incubation dans de l'eau ou une solution nutritive, ou l'addition de sucre dans le milieu de culture. Les auteurs de ces expériences pensent qu'il existe des influx permanents d'hormones ou d'autres signaux issus du reste de la plante qui contrôlent la croissance racinaire. Ils n'arrivent cependant pas à conclure sur la nature des régulations internes qui permettent le contrôle de la croissance, mais suggèrent de prendre en compte l'ensemble des mécanismes moléculaires jusqu'aux propriétés biophysiques pour comprendre le phénomène. Il s'avère que l'étude macroscopique de la croissance au niveau moléculaire nécessite des méthodes non destructives et de hautes résolutions.

De nos jours, seules les techniques de puces à ADN comme les micro-arrays permettent d'obtenir ce niveau de précision. L'équipe de Philip Benfey a développé une

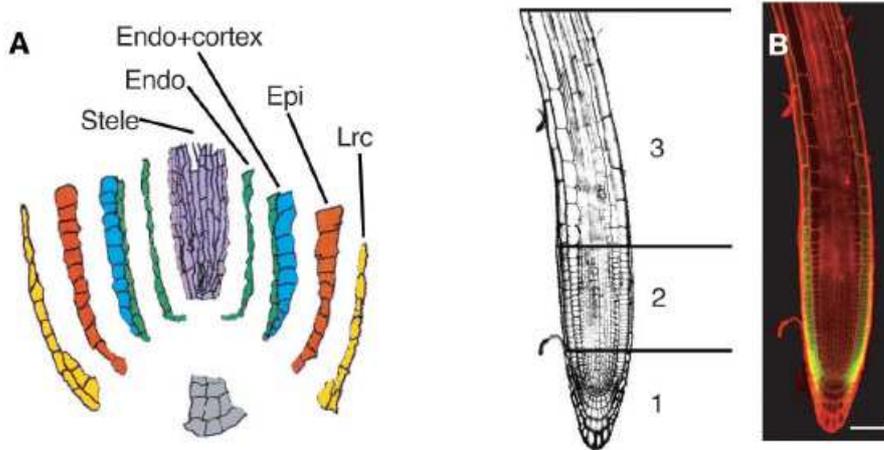


Figure 24 : Profils d'expression des cellules et des tissus à 3 stades de développement (A) expression radiale, (B) expression longitudinale. (Birnbaum et al., 2003)

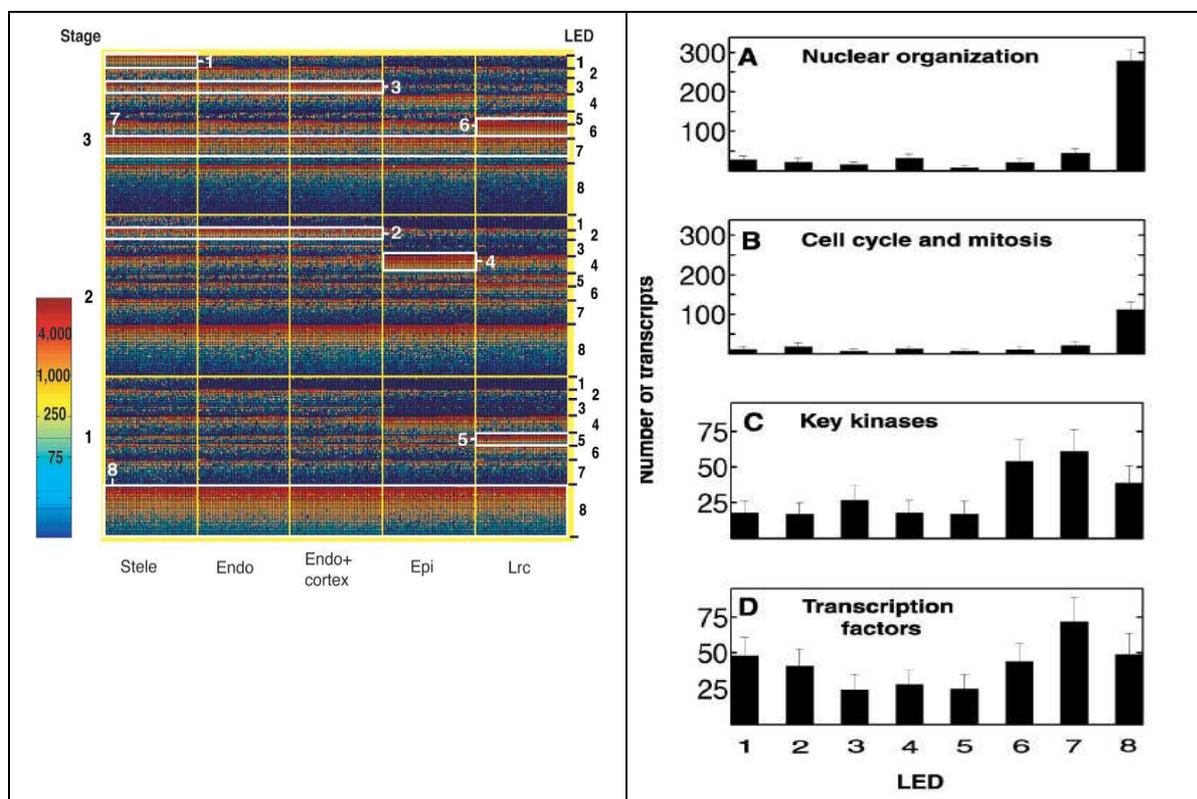


Figure 25 : A gauche, visualisation des différents profils d'expression de gènes. La grille est organisée en 15 zones correspondant aux 15 zones définies dans la racine. Chaque zone contient l'expression du signal de l'ensemble des gènes. A droite : classes fonctionnelles de surexpression des différents domaines. En ordonnée, est représenté le nombre de transcrits, et en abscisse sont représentés les 8 profils d'expression localisés sur la figure de droite. (Birnbaum et al., 2003)

méthode originale fondée sur cette technologie, nommée le *digital in situ*. Cette méthode permet de doser l'expression des gènes en fonction des types cellulaires selon un gradient développemental dans la pointe racinaire chez *Arabidopsis thaliana* (Birnbaum et al., 2003).

La zone de croissance de la racine est découpée en trois stades en fonction de la distance de certains marqueurs du développement par rapport au méristème apical. En 2003, l'équipe dispose de 5 marqueurs tissulaires, nommées lignées GFP (marqueur fluorescent dans le vert), pour la stèle, l'endoderme, l'endoderme-cortex, l'épiderme et la coiffe latérale (figure 24). Une fois les cellules marquées, elles subissent une digestion enzymatique qui permet de digérer la paroi (*protoplasting*), elles sont ensuite triées par cytométrie de flux. Les Acides Ribonucléotides messagés (ARNm) sont extraits de chaque type cellulaire et analysés par microarrays. Ainsi, le taux d'expression de chaque gène sera défini pour les 3 stades de développement et les 5 types cellulaires, en tout 15 zones permettent d'établir une carte d'expression. La première étape du traitement des données est d'enlever de l'analyse les gènes induits par le protocole expérimental. Deuxièmement, seuls les gènes dont le taux d'expression varie de 4 fois leur taux minimum sont considérés comme différenciellement exprimés. Les auteurs concluent que 54% des gènes changent d'expression entre les 3 stades de développement et que le taux d'erreur du *digital in situ* est de 5,5%. De plus, ils identifient des profils dominants d'expression. L'analyse de ces profils par analyse en composantes principales (ACP) et méthodes de regroupements par *kmeans* suggère que 8 profils moyens expliquent 85% de la variation des 5717 gènes restant dans l'analyse (figure 25). Ces approches permettent de savoir quels sont les gènes majoritairement exprimés dans les zones définies (figure 25). Les résultats montrent que les facteurs de transcription nécessaires aux mécanismes de régulation sont présents dans les 8 profils et semblent donc ubiquitaires. Les gènes nécessaires à l'organisation nucléaire, à la mitose et au cycle cellulaire se retrouvent en majorité dans le profil 8, c'est-à-dire dans tous les tissus de la zone méristématique. De plus, il est possible de déterminer les zones d'action des principales hormones (figure 26). L'auxine agit préférentiellement dans la stèle au stade 3 du développement (profil 1), l'acide jasmonique dans la coiffe de la zone méristématique et l'épiderme du stade 2 (profil 5 et 4 respectivement), et les gibberellines dans la stèle, l'endoderme et le cortex du stade 2 (profil 2).

La découverte de nouveaux marqueurs a permis une analyse encore plus fine du taux de transcrits par cette technique (Brady et al., 2007). L'équipe de Benfey dispose maintenant de 19 marqueurs GFP et la racine est découpée en 13 sections de 3 à 5 cellules le long de l'axe longitudinal (figure 27). L'étude de deux racines en parallèle est menée pour définir la variabilité naturelle.

Les résultats obtenus confirment qu'il existe une expression fluctuante des gènes au cours du développement et révèlent une variabilité considérable de cette expression entre racines individuelles. Les analyses statistiques par anova de la variation de l'expression entre les différents types cellulaires mettent en lumière 51 profils radiaux (PR, variation dans les tissus) et 40 profils longitudinaux (PL, variation dans les 13 zones de développement). Les données des PR montrent que l'enrichissement a lieu dans un seul type cellulaire, et que 17 PL sur 40 présentent des profils fluctuants au cours du temps avec de multiples pics d'expression. Bien que certains mécanismes transcriptionnels oscillatoires aient été décrits avant, l'équipe de Benfey est la première à montrer cet effet dans le développement d'un organe (Brady et al., 2007).

Comme les travaux présentés en 2003, les résultats les plus lisibles concernent les transcrits codants des hormones, des facteurs de transcription, ou des transcrits impliqués dans le cycle cellulaire, la mitose et l'initiation de la transcription. Par exemple, les gènes de la biosynthèse de l'auxine sont enrichis dans le centre quiescent, les primordia des racines latérales, le péricycle et les pôles de phloème. Les enzymes amido-synthases, qui jouent un

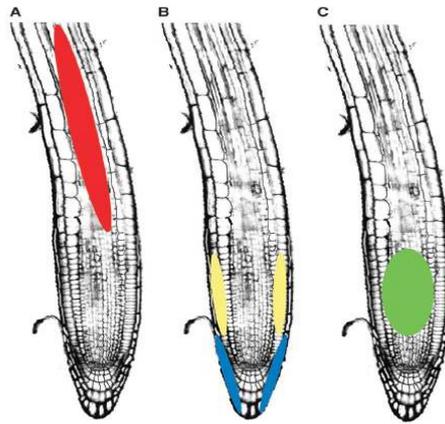


Figure 26 : Centre d'activité des hormones. (A) auxine, (B) acide jasmonique, (C) giberrilline (Brady et al., 2007)

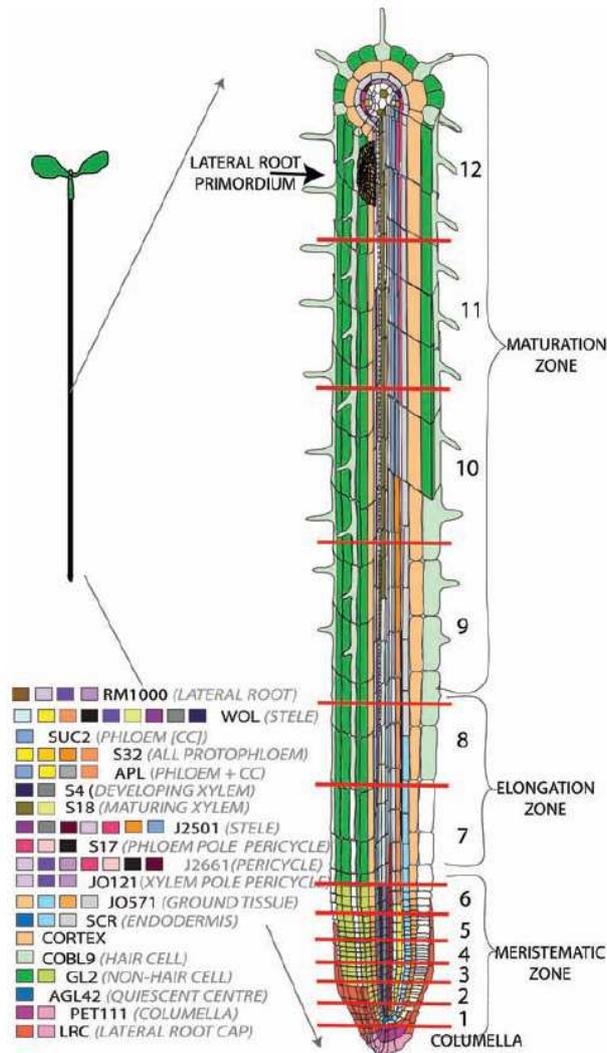


Figure 27 : Analyse de 19 lignées GFP. Les couleurs associées à chaque marqueur reflètent un stade de développement et un type cellulaire. (Brady et al., 2007)

rôle dans l'homéostasie de l'auxine, sont enrichies dans la columella. Les transporteurs de l'auxine (PIN-FORMED2) et leurs régulateurs (PINOID, WAG1) sont quand à eux enrichis dans la columella, les poils racinaires et le cortex (figure 28).

Conclusions

L'ensemble de ces travaux montre que la croissance racinaire est soumise à différentes contraintes sous forme d'oscillations d'hormone et de pH le long de l'axe d'élongation. Bien que la croissance des racines soit décrite comme un phénomène continu, ces oscillations d'auxine et de pH engendrent une oscillation des taux de croissance le long de l'axe longitudinal. En fait, bien que la croissance soit permanente dans le temps, il existe des zones dans la racine où le taux de croissance est très élevé. Ces pics de croissance sont fluctuants dans l'espace, dépendants des oscillations, de contrôles endogènes et des conditions environnementales. Ces phénomènes oscillatoires sont rapides et permettent aux racines d'être réactives face à des changements environnementaux brusques.

De plus, il a été montré que ces oscillations se retrouvent au niveau transcriptionnel. Certains gènes, impliqués dans les processus de la croissance, sont différentiellement exprimés le long de l'axe d'élongation. Ces taux de transcrits connaissent des augmentations et de diminutions au cours du temps.

Ainsi, les résultats de ces études montrent que la croissance de la racine est régie par une véritable interaction dynamique entre l'environnement et les contrôles endogènes. Ces contrôles agissent au niveau de la transcription des gènes et de la régulation des vitesses de croissance. Loin d'expliquer de manière simple l'expansion cellulaire, ces études rajoutent un degré de complexité. L'expansion et l'élongation cellulaire sont de savants mélanges impliquant des hormones, des facteurs de transcription, le pH, des taux de transcrits adéquates, et une structure pariétale idéale. Même si ces mécanismes oscillatoires semblent en partie décryptés, même si les méthodes de microarray permettent de connaître les gènes, impliqués dans la croissance, dans les différents tissus à différents stades cellulaires, la structure et la composition de la paroi permettant/contrôlant l'expansion cellulaire n'ont toujours pas été élucidées.

Objectifs de la thèse

1- Contexte

Au cours des années 90, une approche nouvelle de la Biologie, qualifiée de « Biologie intégrative » s'est développée. Elle est actuellement considérée par certains comme une véritable révolution pour les Sciences de la Vie. En grande partie, elle a pour origine le développement spectaculaire, des nouvelles technologies de la génomique et du séquençage des génomes aux techniques d'analyse fonctionnelle des réseaux de gènes et de protéines. Les masses de données disponibles, sans commune mesure avec celles manipulées auparavant par les biologistes, nécessitent un véritable changement de paradigme pour, au delà de la description mécaniste des réseaux moléculaires en jeu, parvenir à une interprétation pertinente intégrant les différents niveaux d'organisation biologique. Ce changement apparaît d'autant plus nécessaire du fait de la prévalence des approches analytiques et réductionnistes au cours

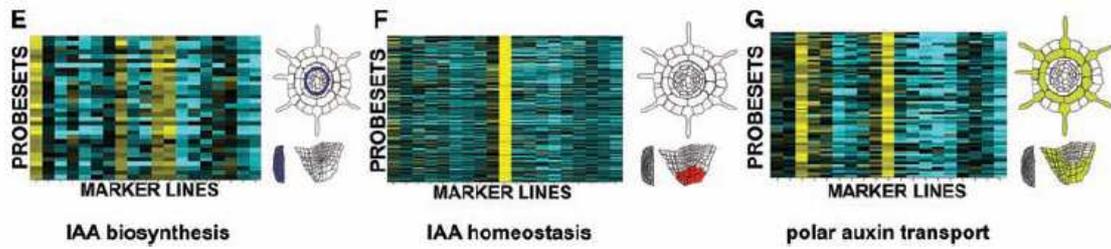


Figure 28 : Profils d'expression des gènes où l'expression est enrichie dans un seul ou plusieurs types cellulaires pour l'étude de la régulation et de la synthèse des flux d'auxine. (*Brady et al., 2007*)

des décennies précédentes, qui atteint actuellement son stade ultime -et ses limites probables- avec le séquençage de génomes complets ou les approches "métabolomiques". A la demande de la Direction Générale de l'INRA, le Conseil Scientifique a constitué un groupe de réflexion chargé d'élaborer un rapport sur la biologie intégrative végétale. Il a reçu pour mandat :

1. d'établir un état de l'art sur la Biologie intégrative ;
2. d'analyser la place de l'INRA et son organisation dans ce domaine ;
3. de clarifier les enjeux scientifiques et les questions de recherche prioritaires ;
4. d'identifier les compétences et les formations à développer.

Le collège de direction a ainsi identifié le besoin pour 2005 de poursuivre le renforcement des capacités de recherche de l'institut sur l'approche intégrée des systèmes, qu'ils soient biotechniques (poursuite des efforts entamés en 2004, notamment sur l'articulation entre processus biotechniques et processus socio-économiques) ou biologique *sensu stricto*.

Ces domaines impliquent un investissement particulier dans la formation de jeunes chercheurs car il est mal couvert par les filières de formation classiques, ce qui entraîne une difficulté à y recruter des chargés de recherche. Les compétences à former reposent en effet sur la combinaison de plusieurs disciplines, et s'appliquent à des objets complexes plutôt abordés dans des écoles d'ingénieurs et/ou universités technologiques, dont les diplômés sont majoritairement attirés par d'autres secteurs d'emplois que la recherche. C'est précisément à de telles situations que les bourses de thèse correspondant au statut d'Assitant Scientifique Contractuel (ASC) sont désormais spécifiquement affectées. Une demi-douzaine de postes d'A.S.C. sera donc réservée en 2005 pour ces deux domaines.

2- Position du département Biologie Végétale (BV) de l'INRA

Le département BV de l'INRA, par nature pluridisciplinaire, est un des lieux privilégiés de la construction d'une biologie intégrative végétale. Il développe en particulier une physiologie moléculaire dont le but est de comprendre l'intégration des processus physiologiques et développementaux dans la physiologie de la cellule et de la plante.

L'émergence de nouveaux outils pour identifier, cloner les gènes et modifier les génomes rend possible l'exploration des relations fonctionnelles entre les aspects moléculaires et l'expression globale (phénotype) au niveau de la plante entière. Elles sont principalement développées sur des plantes modèles pour lesquelles le séquençage du génome est acquis ou en cours, ainsi que la modélisation de la croissance et de l'architecture.

En conséquence, le département focalise ses efforts sur la physiologie moléculaire de la nutrition carbonée, azotée et minérale de plantes modèles, avec des études sur les réponses intégrées de la plante à la qualité de l'environnement et aux contraintes environnementales. Ces études nécessitent d'établir des collaborations avec d'autres départements pour l'analyse des données obtenues par des techniques à haut débit, et principalement le département Mathématiques et Informatique Impliquées (MIA) de l'INRA.

Le projet Agrobi

Le projet porte sur l'approche intégrée des mécanismes explicatifs d'une fonction biologique, mobilisant observations expérimentales, notamment fournies par les technologies

à haut débit (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) mais aussi venant de la connaissance générale de la physiologie ou de la physiopathologie, bases de données disponibles, de natures variées (génomiques séquencés, annotés, connaissances des effets des gènes ...) et modélisation mathématique. L'objectif est de promouvoir, auprès des biologistes, l'utilisation de la bioinformatique et des mathématiques, en synergie avec les données expérimentales. Il ne s'agit pas de renforcer nos compétences en bioinformatique par la formation de jeunes chercheurs ayant un cursus de mathématicien / informaticien, ni de développer des méthodes nouvelles d'analyse informatique des données du génome, mais de donner à des jeunes issus du monde de la biologie des compétences en modélisation au sens large afin de promouvoir les disciplines des mathématiques et de l'informatique dans les laboratoires de biologistes.

Les sujets de thèse proposés intégrés dans ce projet devront donc être centrés sur l'étude d'une fonction ou d'un ensemble de fonctions précis et devront utiliser la modélisation et la bioinformatique comme outil d'intégration des connaissances. Tout naturellement, ces thèses seront co-encadrées par des chercheurs biologistes et biomathématiciens.

Sujet de thèse ASC BV/MIA

Mon sujet s'inscrit dans les priorités thématiques suivantes : la maîtrise de l'architecture de la plante et la réponse de la plante à son environnement et l'amélioration de la digestibilité et la qualité des aliments.

En plus de leur rôle fondamental dans la croissance et le développement de la plante, les polysaccharides de la paroi ont une grande importance économique. En effet, ils contribuent aux propriétés mécaniques et texturales de l'alimentation ainsi qu'à sa digestibilité et ses propriétés nutritives. Par ailleurs, les propriétés mécaniques du bois, du papier et des fibres de textiles reflètent la composition et l'architecture des parois. Enfin, les polysaccharides pariétaux sont une source importante d'énergie renouvelable.

Dans ce contexte, l'équipe « Paroi primaire et élongation » a développé plusieurs collaborations, avec l'équipe « statistique et génome » de l'UMR 518 d'AgroParisTech (MIA) dans le cadre du projet Agrobi, et avec des équipes européennes dans le cadre du projet Agronomics pour l'étude de la croissance des plantes.

Les questions initiales du sujet de thèse étaient les suivantes :

1. Comment la variation dans la croissance d'un organe se décompose au niveau des processus cellulaires : accélération et décélération de croissance et division ?
2. Quelles sont les relations causales entre les modifications pariétales et des variations dans la croissance ?

Chaque cellule végétale est entourée d'un matériau composite majoritairement constitué de polysaccharides, la paroi. Il s'agit d'une structure hautement dynamique : au cours de la croissance, on observe une synthèse et un remodelage continus des composants de la paroi. Dans des conditions standard, la paroi est le facteur limitant pour la croissance et la cible de facteurs environnementaux et endogènes contrôlant la croissance.

Au sein d'un organe, la composition pariétale est hétérogène dans l'espace et dans le temps. L'analyse chimique fait intervenir une homogénéisation des tissus ce qui entraîne la perte de cette information spatiale. La microspectroscopie FT-IR est une méthode analytique microscopique pour l'étude de la composition de la paroi qui tient compte de la variation

spatiale. Grâce à une collaboration entre les deux équipes d'accueil, une méthode originale de classification de mutants d'*Arabidopsis* basée sur les spectres FT-IR a été développée. Ceci a permis d'identifier de nouveaux mutants avec des altérations dans différents polymères pariétaux (Mouille et al., 2003; Robin et al., 2003). La méthode avait également permis d'observer la variation naturelle de la qualité de la paroi.

1- Développement d'une méthode d'imagerie chimique des parois au sein d'un organe en croissance

Jusqu'en 2006, la méthode développée a permis d'effectuer uniquement des observations statiques. Dans cette étude, nous proposons d'étudier l'évolution de la paroi en fonction du temps grâce à l'imagerie FT-IR d'un organe en croissance. Chaque organe en développement contient des cellules à différents stades de différenciation. La répartition spatiale représente donc une séquence temporelle de développement cellulaire. Nous avons donc étudié la répartition des absorbances de la lumière IR le long de la zone de croissance d'une racine d'*Arabidopsis*.

2- Démarche de l'analyse statistique

Chaque racine est caractérisée par un tableau à deux dimensions : position longitudinale et nombre d'onde. L'hypothèse la plus courante est que les racines sont composées de zones homogènes le long de l'axe d'élongation. Pour identifier ces zones homogènes, nous avons d'abord utilisé des méthodes de classification non supervisée sans tenir compte de la position de la mesure. Nous avons ensuite développé des méthodes spécifiques pour identifier les zones homogènes basées sur la segmentation de processus (Lebarbier, 2005), méthodes qui ont très récemment été utilisées avec succès en biologie par les statisticiens de l'UMR518 (Picard et al., 2005; Guedon et al., 2007).

Matériels et Méthodes

Biotechnologies végétales

1- Matériel végétal

Les travaux décrits dans ce mémoire ont été menés sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* sauvage d'accession Columbia (Col-0). L'ensemble des graines utilisées a été fourni par le laboratoire de biologie cellulaire de L'INRA de Versailles.

2- Stérilisation des graines

Mettre environ 20 mg de graines dans un tube Eppendorf. La solution de stérilisation est à préparer le jour même. La solution mère est composée d' ¼ de comprimé de bayrochlore dissout dans 10 mL d'eau déminéralisée. La solution de stérilisation finale est faite en mettant 1 mL de cette solution mère dans 9mL d'éthanol 96,5%. Ajouter 1mL de la solution de stérilisation dans le tube Eppendorf contenant les graines, agiter le tube et laisser les graines sédimenter. Au bout de 5 min, il faut enlever le surnageant et rincer les graines avec 1 mL d'éthanol absolu. Ne pas oublier d'agiter le tube pour rincer l'ensemble des graines. Une fois le surnageant enlevé, laisser le tube ouvert sécher sur la nuit sous une hotte à flux laminaire.

3- Mise en culture

Conditions classiques de culture in vitro

Pour toutes les solutions et les milieux de culture, nous avons utilisés de l'eau osmosée. Le milieu de culture de base est réalisé d'après Estelle et Somerville (Estelle and Somerville, 1987).

- Milieu de base

Composants	Concentration finale	Quantité pour 1L
KNO ₃	5mM	5mL
KH ₂ PO ₄	2,5mM	2,5mL
MgSO ₄	2mM	2mL
Ca(NO ₃) ₂	2mM	2mL
Microéléments		1mL
Vitamines M et W		2mL
BCP		5mL
MES		5mL
Agarose Litex	0,8%	8g
Fer citrate ammoniacal		5mL

Autoclaver 20 min à 120°C

- Microéléments (solution 1000X)

Composants	Concentration finale	Quantité pour 1L
H3BO3	70mM	4328mg
MnCL2(4H2O)	14mM	2770mg
CuSO4(5H2O)	0,5mM	125mg
Na2MoO4(2H2O)	0,2mM	50mg
NaCl	10mM	584mg
ZnSO4(7H2O)	1mM	288mg
CoCl2(6H2O)	0,01mM	2,5mg

Solution à autoclaver 20 min à 120 °C

- Vitamines de Morel et Wetmore (solution 500X)

Composants	Quantité pour 100 mL
Myo-inositol	5000mg
Panthoténate de calcium	50mg
Niacine	50mg
Pyriodoxine	50mg
Thiamine HCL	50mg
Biotine	0,5mg

Aliquoter et congeler à -20°C

- Solution de fer citrate ammoniacal

Composants	Quantité pour 1L
Fer citrate ammoniacal	10g
Eau	Qsp 1L

- Solution de BCP (pourpre de bromocrésol)

Composants	Quantité pour 1L
BCP	1,6g
Ethanol	10 à 20 mL
Eau	Qsp 1L

Autoclaver pendant 20 min à 120°C

- Solution de MES 14% (acide 2-N-Morpholino éthane sulfonique)

Composants	Quantité pour 1L
MES	140g
BCP 0,16%	5mL
KOH 10N	2 à 3 mL
Eau	Qsp 1L

Le milieu, noté A0 dans cette étude, est un milieu classique sans saccharose. Le milieu, noté A2, est un milieu contenant 2% de saccharose, soit 20g pour 1L.

Le milieu de culture ainsi préparé est coulé dans des boîtes carrées de 120x120 mm. Les graines d'*Arabidopsis* sont semées une par une sur le haut de ces boîtes (environ 10 graines par ligne) puis les semis sont placés en chambre froide à 4°C pendant 48H. Les boîtes sont ensuite placées verticalement en chambre de culture pendant 5 jours. La température est

constante et de 20°C, avec une hygrométrie de 80% et des jours longs de 7H à 23H. La lumière ne doit pas être située trop près des semis sous peine de modifier la teneur en eau du milieu et de provoquer un changement de pression osmotique induisant des conditions de stress.

Traitements herbicides

Les deux herbicides sont ajoutés au milieu de base au moment de couler les boîtes de Pétri. Dans un tube Falcon de 50mL, on ajoute soit 2,5µL de DCB à 0,1M (concentration finale de 5µM), soit 10µL d'Isoxaben à 2.10⁻⁵M (concentration finale de 4nM).

Cinq jours après germination sur milieu classique, les plantules sont alors transférées pendant 3H sur un autre milieu, soit sur un milieu contenant du DCB, soit sur un milieu contenant de l'Isoxaben, soit sur un autre milieu classique pour faire des plantules contrôles. Une fois le transfert terminé, les plantules sont écrasées entre deux lames de BaF₂, rincées et séchées 20 min à 37°C pour être analysées en FTIR.

4- Calculs des vitesses de croissance et mesures de distances

Le calcul des vitesses de croissance et la mesure des distances coiffe – premier poil s'effectuent à partir de photos prises par une caméra montée sur une loupe binoculaire (objectif x0,5 et grossissement x6).

Vitesse de croissance

Plusieurs mesures sont effectuées au cours de la journée : à 9H une photo permet de définir la distance apex – premier poil, puis on place un morceau de scotch au dos de la boîte de Pétri au ras de la racine. Une deuxième photo est alors prise afin de définir la distance entre le marqueur et la pointe de la racine. Cette même distance sera évaluée à 11H, 13H et 15H afin de définir la vitesse au cours de la matinée et de l'après midi.

L'ensemble des distances, entre la pointe racinaire et le marqueur, est calculé avec le logiciel ImageJ (version 1.37*vl* pour PC). La vitesse se définit comme suit :

$$V_{(\mu M / H)} = \Delta D_{(\mu M)} / \Delta T_{(H)}$$

Où V est la vitesse, D la distance entre la pointe et le marqueur et T le temps.

Distance apex – premier poil racinaire

Le calcul de cette distance permet de définir la zone d'étude à parcourir en IR. Lors de la préparation des échantillons sur les lames de BaF₂, cette distance est définie, grâce au logiciel ImageJ (version 1.37*vl* pour PC), en prenant une photo avant le transfert de l'ensemble des racines puis après 3h de transfert afin de mesurer l'effet des herbicides sur la zone de croissance de la racine. La distance mesurée après le transfert permet de définir la longueur de la cartographie IR nécessaire pour couvrir l'ensemble de la zone.

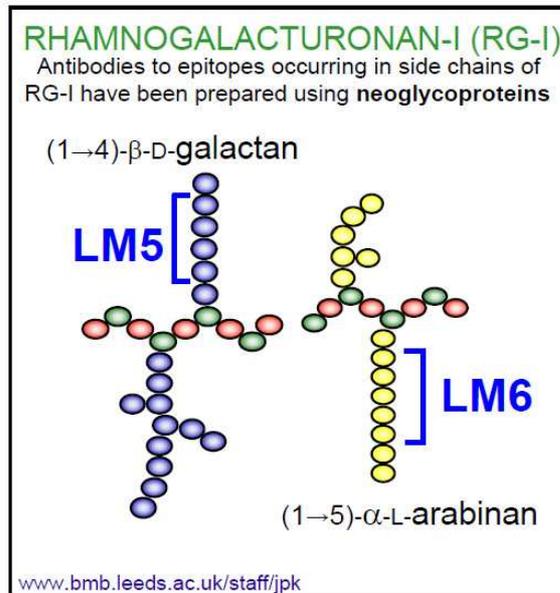
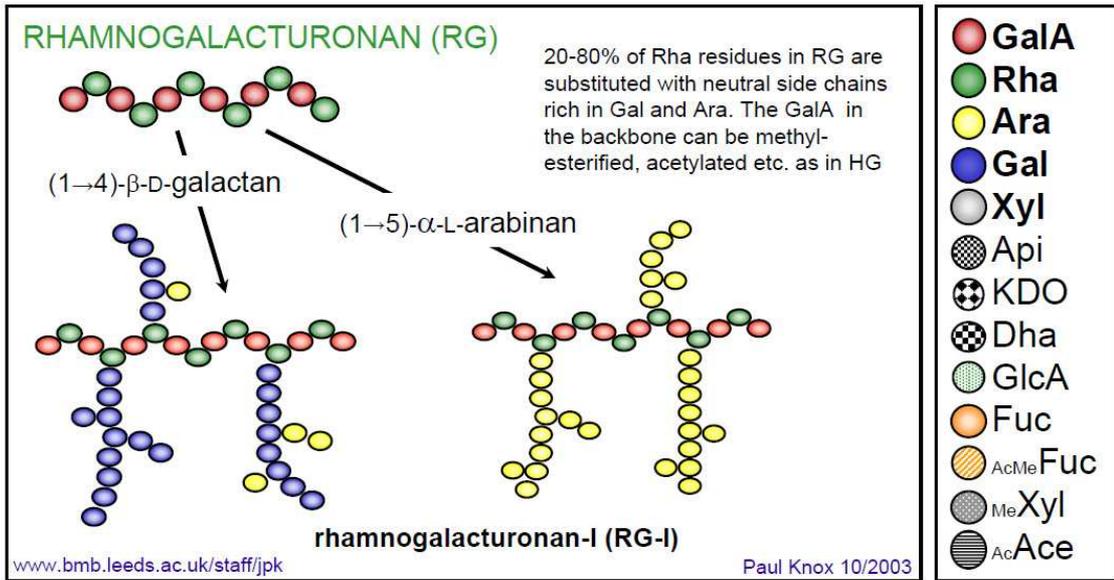


Figure 29 : Structure des RGI et spécificité des anticorps LM5 et LM6

5- Techniques d'immunolocalisation

Marquage anticorps de coupes racinaires

Le matériel utilisé est des plantules d'*Arabidopsis* 5 jours après germination avec 2% de saccharose. Le marquage est réalisé avec les anticorps LM5 et LM6 du laboratoire de Paul Knox (figure 29).

1- Préparation des échantillons

- Prélever délicatement les plantules avec une pince sur la gélose et les déposer dans un tube.
- Fixation des plantules dans 10mL de Formaldéhyde 4% pendant 1H sous vide et dans de la glace. Casser le vide 2 ou 3 fois au début avant de laisser la pompe en marche.
- Rincer 30 min dans 10mL de MTSB à température ambiante.

Préparation MTSB : dans 500mL d'eau osmosée ajouter 25mL de PIPES 100mM, 5mL EGTA 500mM et 5mL de MgSO₄ 1M.

Préparation PIPES : pour 100mL, il faut 500mM à pH 8 de PIPES soit 14,9g dissout dans 50mL d'eau osmosée. Le pH doit être ajusté avec du NaOH 8N, qsp 100mL.

Préparation EGTA : pour 50mL, il faut 500mM à pH 7,27 d'EGTA soit 9,6g dissout dans 30mL d'eau osmosée. Le pH doit être ajusté avec du NaOH 8N, qsp 50mL.

Préparation du MgSO₄ 1M : dissoudre 24,6g de MgSO₄ dans 100mL d'eau osmosée.

- Rincer 2 fois 10 min dans du PBS 1M

2- Déshydratation des échantillons

Dans la glace ou à 4°C, sous agitation douce :

- 30 min dans 10mL 30% alcool absolu dans PBS
- 30 min dans 10mL 50% alcool absolu dans PBS
- 30 min dans 10mL 70% alcool absolu dans PBS
- 30 min dans 10mL 90% alcool absolu dans PBS
- 30 min dans 10mL éthanol 96,2°

3- Inclusion

Dans une étuve à 40°C, ajouter 15mL de bleu toluidine 0,01% dans l'éthanol. Laisser poser sur la nuit.

Ajouter la cire liquide (préparation à partir d'un mélange de polyéthylène glycol et de polyéthanol, Sigma) le long du tube et attendre que les plantules passent de la phase de coloration dans la cire. Une fois que les plantules sont dans la cire, enlever la phase de bleu toluidine, enlever la cire et remettre 10mL de cire propre. Laisser poser 2H et changer *de novo* la cire pendant 2H ou sur la nuit.

Sur une plaque chauffante à 40°C, préparer les moules, couper les plantules avec un scalpel pour inclure dans les moules uniquement la pointe racinaire. Bien disposer les échantillons parallèlement dans les moules et assez proches les uns des autres. Laisser refroidir et conserver à 4°C jusqu'à la coupe.

4- Coupes

Après avoir démoulé les blocs de cire contenant les racines, il faut les monter sur des supports afin de pouvoir les couper au microtome. Selon l'orientation de ceux-ci, les coupes de racines sont transversales ou horizontales. Le microtome permet d'obtenir des coupes sériées tous les 8µm, pour des coupes transversales. Pour les coupes horizontales, les coupes doivent être faite au minimum tout les 10 ou 12 µm selon la qualité de l'inclusion, et pour faire de la reconstruction 3D il faut des coupes tout les 20 µm.

Les coupes obtenues à partir des blocs sont déposées sur des lames de polylysine (Menzel_Gläser, Braunschweig, Allemagne) et collées avec de l'eau. Laisser sécher les lames à température ambiante sur la nuit.

5- Re-hydratation

Les lames sont placées dans des cuves de contenances de 100mL, on les rince :

- 3 fois 10 mins dans l'éthanol 96,2°, pour enlever la cire.
- 10 min dans 90% alcool absolu et PBS
- 10 min dans 50% alcool absolu et PBS
- 10 min dans 30% alcool absolu et PBS
- 2 fois 10 min dans PBS 1M

6 -Marquage

- Saturation des coupes à la BSA (Euromedex, Mundolsheim, France) 3% pendant 30 mins à température ambiante (1,5g BSA dans 50 mL PBS). La BSA peut être remplacée par du lait en poudre 5% dilué dans du PBS.
- Etaler les lames dans une boîte noire et mettre 200µL de BSA par lame.
- Mettre l'anticorps primaire dilué au 1/10^{ème} dans BSA 3% ou lait 5%, pendant 1H30 à 37°C ou 4°C sur la nuit. Les anticorps LM5/LM6 sont fournis par Paul Knox.
- Rincer 2 fois au PBS 1M.
- Mettre l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa A488 (Molecular Probes, Eugene, USA). On le dilue au 1/2000^{ème} dans du PBS pour éviter le bruit de fond. Pendant 2H à température ambiante.
- Rincer 2 fois au PBS 1M.
- Conserver les lames dans PBS à l'obscurité totale et à 4°C jusqu'au montage.

7- Montage des lames

Il faut bien enlever le PBS des lames sans faire tomber les coupes, en le laissant couler lentement sur du papier absorbant. Les lames sont montées en déposant 2 gouttes de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Californie, USA) et par le dépôt d'une lamelle. La lamelle est scellée sur la lame grâce à du vernis à ongles transparent.

Marquage anticorps de surface

Ce marquage est réalisé sur des plantules entières intactes à 5 jours après germination et après transfert sur un milieu contrôle. Nous avons adapté un protocole issu du site de Paul Knox (<http://www.bmb.leeds.ac.uk/staff/jpk/>).

- Prélever les plantules entières avec une pince et les déposer dans des puits en plaque.
- Préparer une solution 1 : 5% de lait en poudre et PBS 1M.
- Incuber les plantules 1H à température ambiante sous agitation douce dans 3mL de solution 1 avec l'anticorps primaire dilué au 1/10^{ème}. Anticorps LM5 ou LM6 fournis par Paul Knox.
- Rincer 3 fois 10 min au PBS 1M.
- Incuber les plantules 1H à température ambiante sous agitation douce dans 3mL de solution 1 avec l'anticorps secondaire dilué au 1/2000^{ème}. Anticorps secondaire couplé au fluorochrome alexa A488.
- Rincer 3 fois 10 min au PBS 1M.
- Conserver à 4°C avant le montage

Les montages se font entre lames et lamelles avec quelques gouttes de citifluor. Les plantes sont montées intégralement sur les lames et les photos des plantules sont effectuées avec une loupe équipée pour la détection de fluorescence de l'Alexa A488.

Techniques d'imagerie

Lors de cette thèse, différents types de microscopies ont été utilisés : un microscope confocal spectral SP2 AOBS, pour Acousto Optical Beam Splitter (Leica, Heidelberg, Germany) afin de définir les positions des anticorps LM5/LM6 sur des coupes de racines ainsi que deux systèmes IR à transformée de Fourier de chez ThermoFisher Scientific afin de définir la qualité de la paroi cellulaire le long de l'axe d'élongation de la racine. L'ensemble des photos ayant servies aux mesures de distance et de vitesse a été fait avec une loupe binoculaire équipée pour l'épifluorescence.

1- Microscopie confocale

La plateforme de cytologie et d'imagerie végétale (PCIV) regroupe les activités et les équipements d'imagerie cellulaire nécessaires aux recherches menées par les équipes de l'IJPB du centre INRA de Versailles. Initialement, ce service concernait surtout la microscopie confocale et l'analyse d'images ; depuis, il a été étendu à d'autres applications comme l'histologie, l'immunocytochimie, l'hybridation in situ, et la cytogénétique appliquée à la recherche en biologie végétale. Le laboratoire dispose d'équipements de haute technologie permettant l'imagerie sur cellules végétales vivantes et fixées.

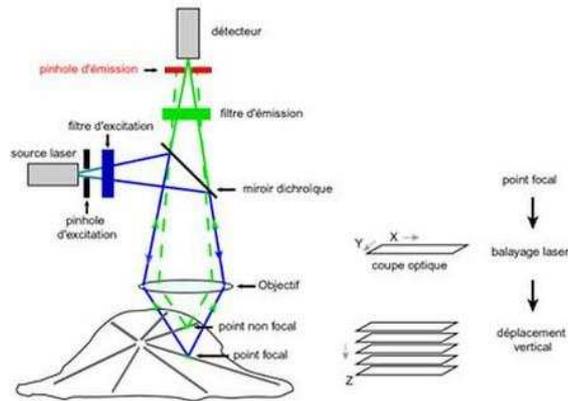


Figure 30 : Principe général du fonctionnement d'un microscope confocal.

Principe

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est sa perte de résolution axiale dû à la superposition d'informations issues des plans adjacents. La microscopie confocale à balayage laser permet de pallier cet inconvénient puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan focal (Pawley, 1990; Matsumoto, 1993; Stevens et al., 1994).

La microscopie confocale s'est récemment imposée comme moyen d'investigation volumique et temporelle des échantillons. Une représentation 3 D du spécimen est obtenue par construction d'une pile de coupes sériées 2 D, se référant à des sections optiques dans des plans confocaux. Le principe général de cette approche est schématisé sur la figure 30.

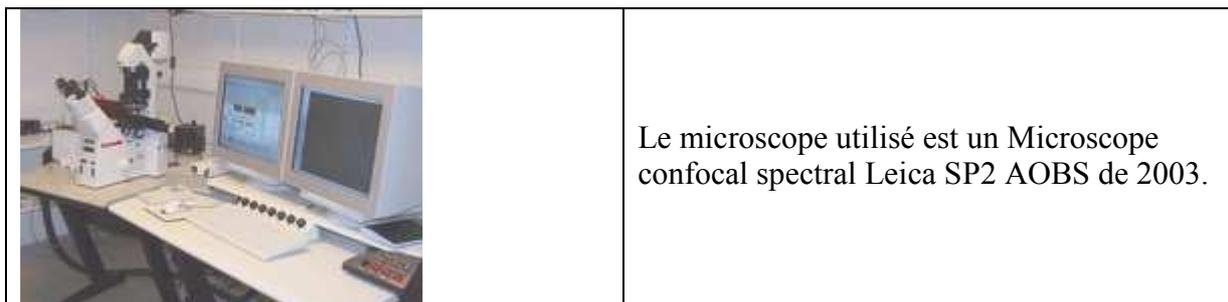
Le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes, auparavant répertoriés et choisis en fonction de leurs propriétés à se fixer sur des molécules particulières d'une structure ou d'un objet d'intérêt. Lors de l'impact optique, il y a émission de photons provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable ("trou d'aiguille" - *pinhole*), il est possible de sélectionner les photons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer le signal provenant d'autres plans. Ils sont sélectionnés optiquement en fonction de leurs longueurs d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs qui les convertissent en photon-électrons. Le signal électrique reçu est converti en signal numérique, contribuant à la création d'une image, codée sur 8 bits typiquement, voire 12 ou 16 bits.

Chaque section optique est générée par déplacement en hauteur (Z) de l'échantillon. La vitesse de balayage est limitée par l'inertie du système mécanique en mouvement. La profondeur du plan focal est déterminée par l'ouverture numérique de l'objectif et l'ajustement du *pinhole* de détection. La séquence de sections est produite par le déplacement de l'échantillon contrôlé par un moteur piezzo-électrique ou un moteur interne au statif. On peut ainsi choisir l'espace entre les coupes et s'approcher de la résolution de la lumière (200 nm). Une structure peut supporter un découpage spatial (échantillonnage) sans perte d'information, si la plus petite distance optiquement résolue est soumise à au moins deux points d'enregistrement (théorème de Nyquist) La valeur typique sur beaucoup d'architectures est proche de 100 nm.

Nature des échantillons utilisés

Nous utilisons des coupes de racines (agées de 5 jours après germination) longitudinales et transversales fixées et marquées par des anticorps selon la technique décrite dans la partie « Biotechnologies végétales ». Ces coupes ont une épaisseur comprise entre 8 μm et 10 μm pour les coupes transversales, et 12 à 14 μm pour les coupes longitudinales. Les échantillons sont montés dans du glycérol (Citifluor AF1, Agar Scientifique) entre lames et lamelles. La lamelle est scellée sur la lame + polylysine et peut-être observée au microscope.

Matériel



Il possède un statif inversé Leica DM IRE2 entièrement motorisé pour le passage en mode confocal. Des blocs de filtres sont disponibles pour le repérage des échantillons avant le mode confocal. La roue de filtres possède 3 positions motorisées équipée de filtres de fluorescence adaptés à l'observation de fluorochromes excités dans l'UV de type DAPI, de la GFP et ses dérivés dans le bleu, de la DsRed dans le vert jaune, et Texas Red dans l'orange ainsi que d'autre marqueurs dans le rouge.

Le repérage des échantillons sur la lame se fait avec l'objectif 10X 0,40 NA à sec de type HC PL APO CS. La prise d'images et de séries s'effectue avec un objectif 20X 0.7 NA à immersion de type HC APO, d'autres détails sont observés avec un objectif 40X 1.25 NA à huile de type HCX PL APO CS.

Le laser d'excitation est un laser Argon (458, 476, 488, 496, 514 nm). L'anticorps secondaire permettant de voir la localisation des épitopes sur les coupes est couplé à une sonde fluorescente, Alexa A 488 (Invitrogen, France), dont les caractéristiques spectrales sont proches de celles de la GFP (excitation à 488 nm et émission maxi à 520 nm). Le signal sera donc récolté dans une fenêtre comprise entre 495 et 600 nm après excitation avec la raie 488 nm.

2- Imagerie de surfaces racinaires

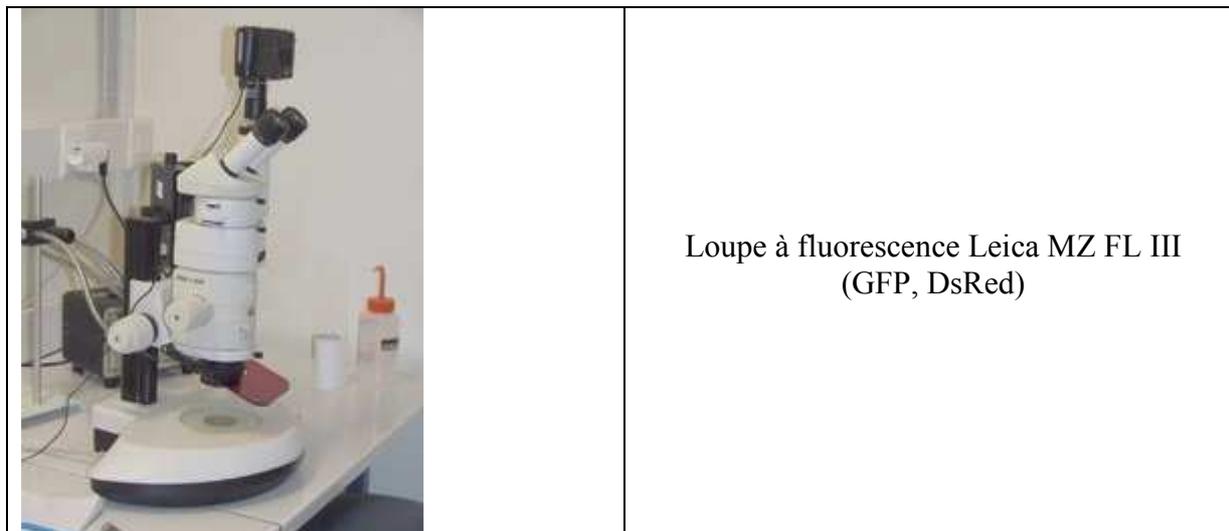
Le but est d'obtenir des images précises de la surface des racines afin de pouvoir mesurer les distances entre l'apex et le premier poil racinaire, de mesurer des vitesses de croissance en regardant la distance de l'apex par rapport à un marqueur sur la boîte, ou encore de regarder l'étendue du marquage anticorps sur l'épiderme et la coiffe des racines.

Nature des échantillons utilisés

Les marquages anticorps de surfaces sont réalisés sur des plantules entières, âgées de 5 jours après germination et selon le protocole décrit dans la partie « Biotechnologies végétales ». Les plantules sont étalées sur une lame porte-objet avec une goutte d'eau avant d'être observées.

Pour les mesures de vitesses de croissance et des distances apex – premier poil, les plantules sont directement prises en photos dans la boîte de Pétri.

Matériel



La loupe est reliée à un appareil photo numérique ou pour certaine à une caméra digitale couplée à un logiciel de capture d'images ProgresPlus version 1.7.4 (C10Plus). Les photos sont enregistrées au format TIFF. Ce format est nécessaire afin que les images puissent être analysées par le logiciel ImageJ version 1.37*vl* qui permet de mesurer des distances en pixels grâce à la fonction *Analyze/set Measurements*. L'objectif utilisé est l'objectif 0.5X avec un grossissement 6X. Une photo de papier millimétré permet grâce à la fonction *Analyze/set scale* d'ImageJ de convertir les distances en pixels, en millimètre.

3- Microspectroscopie FTIR

La microscopie IR est une technique d'analyse moléculaire permettant d'obtenir des informations sur les liaisons chimiques et sur la structure moléculaire des matériaux analysés. Elle est utilisée pour permettre l'identification des composés et la structure de la paroi primaire de la racine chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Le but de ce projet est de savoir si les données IR acquises sur la paroi racinaire peuvent nous permettre de définir les différentes étapes de la croissance (division, expansion, élongation). De plus, nous cherchons à savoir s'il existe des caractéristiques structurelles pour chacune de ces étapes.

Principe

Dans les molécules organiques, les liaisons ont une énergie qui dépend de la masse réduite des atomes et de la force de cette liaison dépendante de la densité électronique. Il existe des caractéristiques différentes pour chaque type de liaison (par exemple : C-H, C-OH, C=O, ou C=C). Ces énergies de liaison sont sensibles aux radiations électromagnétiques qui vont provoquer des mouvements entre les atomes et entraîner des vibrations dans la molécule ce qui se traduira par une absorption de l'énergie reçue.

Un faisceau IR passe donc à travers l'échantillon et a pour but d'exciter les molécules. Ces molécules vont vibrer en absorbant une partie de l'énergie de rayonnement. Pour une molécule donnée, les énergies de liaison sont toutes quantifiées, c'est-à-dire que la molécule ne peut présenter que certains états de vibrations, ou de rotations. On obtient donc des bandes

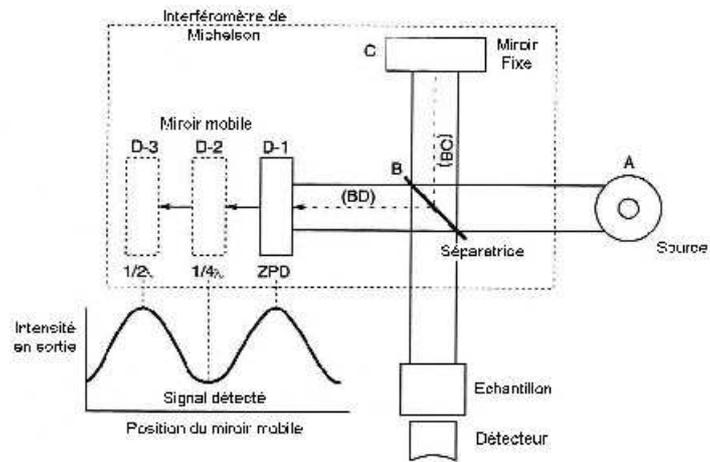


Figure 31 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre FT-IR

d'absorption caractéristiques des vibrations, et, en faisant défiler les nombres d'onde (NO), on obtient ainsi le spectre complet de toutes les vibrations du produit analysé.

Un spectromètre FT-IR est un instrument qui acquiert un spectre large bande du proche IR à l'IR lointain. Contrairement aux instruments dispersifs, comme les monochromateurs ou les spectrographes de réseau, les spectromètres FT-IR collectent simultanément toutes les NO. Cette caractéristique est appelée l'avantage Multiplex ou de Fellgett.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

Le faisceau IR provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque NO du faisceau à une fréquence différente (figure 31).

Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique. Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est à dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre IR par une opération mathématique appelée transformée de Fourier.

Les informations tirées des spectres sont de deux sortes :

- Informations qualitatives :

Les NO auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents et notamment des tableaux présentent les bandes de vibrations caractéristiques des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques.

- Informations quantitatives

L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de l'épaisseur des films, les uns par rapport aux autres. Pour avoir une mesure absolue il convient d'étalonner auparavant les couches par une autre technique pour pouvoir établir une relation expérimentale entre intensité du signal et proportion ou épaisseur.

Nature des échantillons utilisés

1- Préparation des lames de BaF₂

Après le transfert des racines pendant 3H sur un milieu « contrôle », un milieu contenant du DCB ou un milieu contenant de l'Isoxaben, la distance après le traitement entre la pointe racinaire et le premier poil est mesurée.

Les plantules sont prélevées délicatement de la gélose au niveau des cotylédons avec une pince. Elles sont ensuite déposées sur une lame de BaF₂ (13mm de diamètre, 2mm

d'épaisseur) pour être écrasés entre deux lames. Cette action permet de faire éclater les cellules pour les vider de leur contenu cytoplasmique. Les plantules ainsi écrasées sont ensuite rincées dans de l'eau milliQ, repositionnées sur une lame en mettant la racine le plus rectiligne possible et au centre de la lame. Les lames sont placées dans une étuve à 37°C afin que les échantillons sèchent. En effet, il faut éliminer l'excès d'eau dans les échantillons qui absorbe la lumière IR et donc altère la qualité des spectres.

2- Acquisition des spectres IR et format de fichier

- En mode single scan (Nicolet continuum, détecteur MCT)

Les spectres sont acquis de manière individuelle et de façon automatique par le logiciel d'acquisition OMNIC version 4.3 (méthode d'acquisition décrite dans matériel). Chaque spectre est sauvé au format JDX dans un fichier numéroté de 1 à N, N étant dépendant de la distance de la zone d'intérêt.

Un utilitaire³, en *WSF*, permet de regrouper l'ensemble des N fichiers dans un seul fichier, nommé fichier.BRUT, formaté de la façon suivante :

Date de l'acquisition	Nom échantillon	Numéro du spectre	Gammes des NO
-----------------------	-----------------	-------------------	---------------

Ce fichier BRUT était destiné au départ pour des analyses statistiques décrites dans (Mouille et al., 2003; Robin et al., 2003) et le format de ce fichier a dû être modifié légèrement par un utilitaire SAS (version 9.1) : tri des spectres par ordre alphanumérique croissant et par nom d'échantillon.

Les spectres sont ensuite normalisés, grâce à un utilitaire R (version 2.8), et le nombre de variables réduit uniquement aux NO compris entre 1820 et 800 cm^{-1} toujours selon la méthode décrite dans (Mouille et al., 2003; Robin et al., 2003). On obtient alors un fichier.NORM. L'ensemble des spectres de chaque racine est ensuite visualisée afin d'éliminer les points aberrants, notamment les spectres saturés.

Il existe donc un fichier.NORM par racine qui va permettre ensuite d'effectuer les ACP et les clustering décrits dans le chapitre 1. L'ensemble de ces analyses a été codé grâce au logiciel R version 2.8.

- En mode imaging (Nicolet Continuum, détecteur XL array)

Le format de fichier change complètement car le système d'acquisition des données est différent (cf. paragraphe sur le matériel). La version d'OMNIC 7.3 permet d'acquérir directement une cartographie. L'ensemble des spectres acquis est contenu dans un fichier unique, nommé fichier.MAP. La fonction *Atlas/Truncate data set* permet de réduire le nombre de variables car les spectres sont acquis sur l'ensemble de la gamme des NO. La zone d'intérêt est celle d'absorption des molécules organiques et est comprise entre 1820 et 800 cm^{-1} . Ensuite la fonction *Atlas/split map* permet d'extraire les spectres de la cartographie dans un format, nommé .SPA, qui est reconnu par la plupart des logiciels d'analyses de spectres IR. Ce format de fichier conserve les coordonnées des spectres au sein de la cartographie et les fichiers sont sauvés en étant numéroté de bas en haut et de gauche à droite de la cartographie.

³ Utilitaire développé par JP Tamby INRA Versailles

Les fichiers de type SPA sont ensuite chargés dans le logiciel Unscrambler version 9.7. Ce logiciel permet de visualiser facilement les spectres et de les normaliser :

1. correction de la ligne de base par la fonction : *Modify/Transform/Baseline*, la méthode utilisée est *Linear baseline correction*.
2. normalisation des données :
 - *Modify/Transform/Normalize*, méthode de type *area normalization*. Cette normalisation est équivalente à ce que l'on faisait avec l'utilitaire R et permet de visualiser et de comparer les spectres entre eux.
 - *Modify/Transform/Derivatives/S.golay*. Cette fonction permet de calculer la dérivée seconde des spectres ayant subi uniquement une correction de ligne de base selon la méthode de Stavisky-Golay (Luo et al., 2005). Cette méthode effectue un lissage des données pendant le calcul de la dérivée seconde, ce qui réduit fortement le bruit des spectres et améliore les calculs statistiques effectués *a posteriori*. Les options utilisées sont : un lissage de la dérivée seconde sur 5 points et une approximation par un polynôme de degré 2.

Le logiciel Unscrambler permet donc de lire les fichiers SPA, de transformer les données et surtout de les sauvegarder dans un format plus standard pour pouvoir être traités par d'autres logiciels. Ainsi, un fichier ASCII peut être généré et formaté de la façon suivante : nom du spectre – ensemble des NO en ligne. Le nom du spectre comporte un numéro qui permet de le repositionner dans la cartographie. Toutes les informations de la cartographie tiennent donc dans un fichier texte au format standard où chaque ligne représente un spectre. Ce fichier est facilement manipulable par des logiciels de statistiques.

Les spectres ainsi modifiés, un utilitaire R (version 2.8) permet d'éliminer les spectres vides (acquis en dehors de l'échantillon) et les spectres saturés et d'attribuer pour chaque spectre un numéro de ligne et de colonne reflétant de manière plus simple sa position dans la cartographie. Le but de cette manœuvre est de pouvoir faire la moyenne des spectres pour une même position le long de l'axe d'élongation. En effet, lors d'acquisition point par point, certaines positions sur un même échantillon n'étaient pas valables car nous ne pouvions pas acquérir de spectre (spectre saturé). Le fait d'avoir plusieurs points pour la même position nous permet donc d'être sûr de la qualité des spectres tout le long de l'axe d'élongation et le calcul de la moyenne de ces spectres nous permet de réduire la variabilité.

Une fois la moyenne effectuée, nous avons le même format de données que lors des expériences point par point : le nom de l'échantillon, numéro du spectre (un seul spectre par position dans la gamme des NO choisis pour l'étude) et les NO.

Ce type de fichier sera ensuite utilisé pour les analyses par ACP, les classifications hiérarchiques et l'algorithme de segmentation.

Matériel

Au cours de nos travaux deux types de microscopes couplés à un spectromètre IR ont été utilisés.

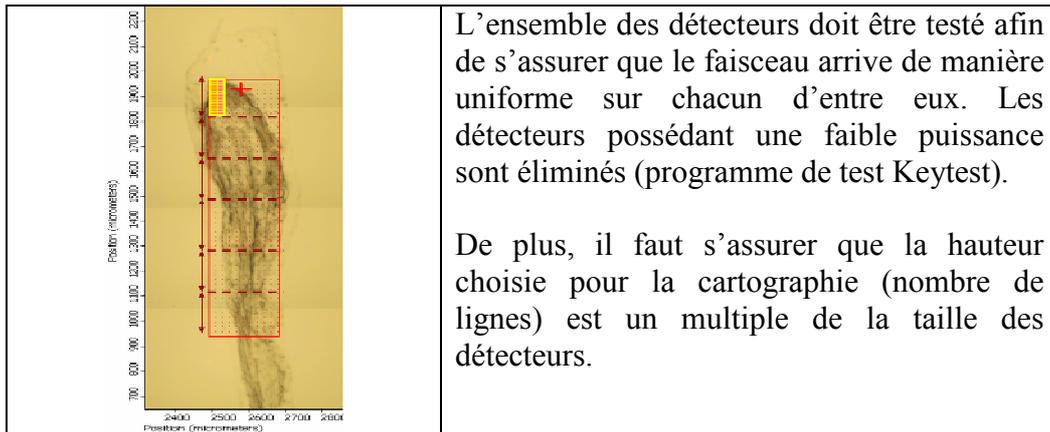


Figure 32 : Schéma d'acquisition d'une cartographie sur une racine d'Arabidopsis en mode *imaging*.



Nicolet Continuum MCT FT-IR

Les premières acquisitions point par point le long de l'axe d'élongation ont été réalisées avec le matériel présent en 2007 au laboratoire de biologie cellulaire de l'INRA de Versailles. C'est un modèle Nicolet Continuum de chez ThermoFisher Scientific comportant un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide couplé à un spectromètre IR. Nous avons utilisé un objectif x15 avec une fenêtre de 30x30 μm , 25 scans et une résolution de 8. Le logiciel permettant l'acquisition des spectres était la version 4.3 d'OMNIC. Les points sont définis un à un tous les 30 μm le long de l'axe d'élongation grâce au curseur et aux coordonnées fournies directement dans la fenêtre de visualisation de l'échantillon (fonction *Atlas/nouvelle cartographie*). Les points sont placés directement sur l'image visible dans la fenêtre dédiée, et il faut bien faire attention de se placer sur le bord de l'échantillon pour éviter le cylindre central comportant les vaisseaux qui absorbent beaucoup. Nous cherchons à nous placer sur les tissus les plus externes comme le cortex, l'endoderme et l'épiderme.

De plus, il faut évaluer la teneur en eau et en CO₂ de la pièce où se trouve l'appareil afin de substituer ces bandes d'absorption particulières aux spectres. Le background doit être placé sur une zone propre de la lame pas trop loin de l'échantillon, il est acquis avant chaque lancement de cartographie.

Une fois les points définis, le logiciel lance les acquisitions en mode automatique (fonction *collect samples*).



Nicolet Continuum XL FT-IR imaging systems

Les acquisitions avec le système *imaging* ont été réalisées avec un modèle Nicolet continuum de chez ThermoFisher Scientific comportant un détecteur XL array refroidi à l'azote liquide. Cet appareil nous a été gentiment mis à disposition par Véronique Rouchon du Muséum National d'Histoire Naturel de Paris au sein de l'équipe du CNRS du Centre de Recherche sur la Conservation des Collections. Au lieu d'avoir un seul détecteur et d'acquérir une image de l'échantillon point par point, cet appareil possède 32 détecteurs montés en série sur deux barrettes (figure 32).

Cet appareil est fourni avec le logiciel d'acquisition OMNIC version 7.3. Une fois la cartographie délimitée, les détecteurs sélectionnés, il faut s'assurer que les paramètres sont corrects. Nous utilisons un objectif 15X qui doit être sélectionné dans *Atlas/system config/video*, une fenêtre de 15 μ m, une résolution de 8, une vitesse de 1,678 et un balayage de 64. Dans l'onglet *config experience* il faut absolument décocher le mode prévisualisation très gourmand en espace mémoire et qui ralentit l'acquisition des grosses cartographies. De plus, il est important de vérifier que l'option *none* est dans *linear array setup*, et il faut décocher l'*oversampling* pour les détecteurs.

Une fois ces vérifications effectuées, le background défini (un rectangle correspondant aux nombres de détecteurs sélectionnés sur les barettes), la cartographie peut être lancée par l'option *collect map*.

Méthodes d'analyses de données

1- Méthodes de classification non supervisées

La classification est une branche de l'analyse des données. La classification regroupe des techniques de synthèse qui permettent de traiter des grands volumes de données. Pour l'essentiel, les techniques de classification font appel à une démarche algorithmique et non à des techniques mathématiques complexes : les résultats sont obtenus au terme d'une série d'opérations simples et répétitives. Autre avantage, la classification conduit à des résultats souvent faciles à décrire et à caractériser : les classes.

Analyse en Composante Principale

1- Principe

L'ACP sert à mettre en évidence des similarités ou des oppositions entre variables et à repérer les variables les plus corrélées entre elles.

L'algorithme consiste à remplacer une famille de variables par de nouvelles variables de variance maximale, non corrélées deux à deux et qui sont des combinaisons linéaires des variables d'origine. Ces nouvelles variables, appelées composantes principales, définissent des plans factoriels qui servent de base à une représentation graphique plane des variables initiales. L'interprétation des résultats se restreint généralement aux deux premiers plans factoriels, sous réserve que ceux-ci expliquent la majeure partie de la variance du nuage des variables initiales.

2- Logiciels utilisés

Dans notre étude, les ACP ont été réalisées soit avec le logiciel Unscrambler version 9.7 en utilisant la fonction *Task/PCA* et la méthode de validation *cross validation*, soit en utilisant un utilitaire codé en langage statistique R version 2.8 qui calcule les vecteurs propres et les valeurs propres à partir de la matrice de corrélation. Les fonctions R utilisées sont *eigenvector* (), *eigenvalue* () et *corr* (). De plus, la fonction *princomp* () du logiciel SAS version 9.1 a aussi permis de calculer des ACP.

Clustering hiérarchique

1- Principe

Le clustering hiérarchique est une famille de techniques qui génèrent des suites de partitions emboîtées les unes dans les autres, et allant depuis la partition triviale à une seule classe (contenant toutes les observations) jusqu'à la partition où chaque observation est une classe. Entre ces deux extrêmes figurent de nombreuses partitions plus réalistes.

Les classes rencontrées dans les applications ont souvent des distributions unimodales c'est – à – dire qu'à partir d'un noyau central, la densité des observations décroît de façon monotone dans toutes les directions de l'espace. Beaucoup de techniques de classification non supervisée s'appuient sur cette image, et portent une attention particulière aux ensembles d'observations ayant entre elles de faibles distances (régions de forte densité).

Dans cette étude nous avons utilisé la méthode de clustering hiérarchique qui calcule les distances entre individus pour construire les classes et produire un arbre hiérarchique appelé dendrogramme.

Dans un nuage de n points, il faut donc mesurer les distances interindividuelles (calcul des distances selon une métrique), déterminer la plus petite d'entre elles (calcul du minimum), regrouper ces deux individus entre eux (calcul du barycentre), recalculer les distances interindividuelles sur $n-2$ individus plus 1 groupe, et ainsi de suite. Cependant, il n'existe pas de partition globalement optimale : à chaque pas on devrait remettre en cause les regroupements précédents, ce qui empêcherait l'emboîtement des partitions, et donc la notion d'arbre hiérarchique.

La distance utilisée dans l'algorithme de Ward est la suivante :

$$\delta^2(x, y) = \frac{m_x m_y}{m_x + m_y} \|x - y\|^2$$

Les $\mathcal{D}(x, y)$ s'appellent aussi indice de niveau. Les x et y désignent les centres de gravité de deux classes (qui, à une étape donnée, peuvent ne comporter qu'un élément) et m_x , m_y la somme des poids des éléments de chaque classe (qui, à une étape donnée, peut ne comporter qu'un élément). De plus, $\mathcal{D}(x, y)$ mesure l'augmentation de l'inertie intra suite au regroupement des éléments x et y . On choisit donc à chaque pas le regroupement de classes qui augmente le moins l'inertie intra. Cela conduit à regrouper :

- les classes proches, telles que $d^2(x, y)$ soit faible;
- les classes de faible poids

2- Logiciel utilisé

L'ensemble des clustering hiérarchiques a été réalisé en langage statistique R version 2.8. Les fonctions *dist()*, *hclust()* et *plclust()* permettent de calculer, en utilisant la distance Ward, et d'afficher le dendrogramme. La fonction *cutree()* permet de découper le dendrogramme en sous-groupes (nombre de groupes choisi par l'utilisateur) et d'affecter un

indice à chacun de ces sous-groupes. Cet indice peut ensuite être représenté sous forme de graphique grâce à la fonction *plot* ().

2- Modélisation et test statistique

Modèle linéaire généralisé

Le modèle linéaire⁴ classique sous sa forme générale s'écrit :

$$Y = X\theta + \varepsilon$$

$$\varepsilon \sim N(0, V)$$

Les résidus ont pour matrice de variance-covariance $\text{var}(\varepsilon) = V$ de dimension $n \times n$, mais on choisit souvent l'hypothèse iid pour le résidu de chaque observation : pour toutes les composantes $i, \{\varepsilon_i\} \text{ iid } \sim N(0, \sigma^2)$, ce qui ajoute un seul paramètre σ . On va rechercher d'autres constructions, un peu moins parcimonieuses mais plus réalistes pour la loi des résidus. Notons que sous l'hypothèse générale où V est connue à une constante près, $V = \sigma^2 H$.

D'un certain point de vue, on peut considérer que l'appellation linéaire du modèle linéaire sous sa forme générale 1 est doublement justifiée : en effet, les paramètres inconnus θ et σ^2 interviennent de façon linéaire, plus exactement en facteur à la fois pour l'espérance, et aussi pour la variance.

Le logiciel SAS 9.1 licence AgroParisTech est le logiciel statistique utilisé lors du calcul du modèle linéaire (procédure *glm* ()).

Modèle mixte

Ces modèles sont dits mixtes car ils combinent des effets dit fixes, ceux du modèle linéaire standard, et des effets aléatoires, traduisant la ressemblance entre certaines mesures sur des unités statistiques.

Le modèle linéaire mixte est le modèle statistique classique pour l'étude des dispositifs agronomiques en parcelles subdivisées (*Split Plot*). En effet, l'étude des vitesses de croissance effectuée dans cette thèse sur des boîtes de culture différentes peut être assimilée à un problème en champs contenant des parcelles soumises à des traitements différents.

Le logiciel SAS 9.1 licence AgroParisTech est le logiciel statistique utilisé lors du calcul du modèle linéaire (procédure *mixed* ()) avec les options *lsmeans*, *contrast* et *REML*).

Test de Student

Le test de Student est un test paramétrique qui compare la moyenne observée d'un échantillon statistique à une valeur fixée, ou encore la probabilité observée d'un caractère à une probabilité théorique. Il permet aussi de comparer les moyennes de deux échantillons statistiques (on parle alors de test de conformité). Il tire son nom de la loi où on lit l'écart critique.

La loi de Student intervient dans les tests de comparaison de deux espérances en raison de la propriété fondamentale suivante : si X_1, \dots, X_n sont des variables aléatoires normales indépendantes de même espérance m et de même variance, si

⁴ http://group.monolix.org/documents/Cours_MM.pdf

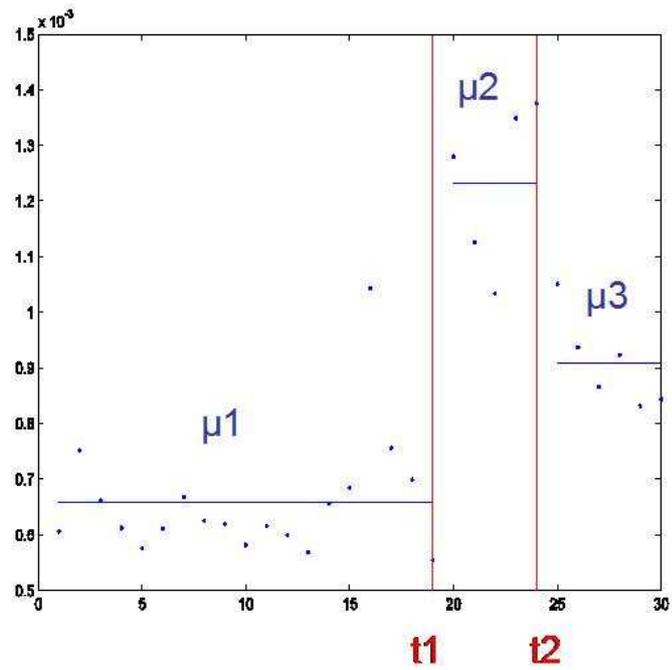


Figure 33 : Exemple de segmentation sur un NO donné. En abscisse sont représentées les différentes position (ou temps) le long de l'axe d'élongation racinaire et en ordonnée sont représentées valeurs des absorbances. Ce NO est segmenté en 3 segments homogènes (μ_1 , μ_2 et μ_3) qui sont délimités par 2 changements brusques notés t_1 et t_2 .

$$M_n = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

est la variable aléatoire qui estime l'espérance et si

$$S_n^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - M_n)^2$$

est la variable aléatoire "estimateur débiaisé" de la variance, alors

$$\frac{M_n - m}{\frac{S_n}{\sqrt{n}}}$$

suit une loi de Student à (n-1) degrés de liberté.

Les tests de Student, utilisés dans ces travaux, ont été entièrement codés dans le langage statistique R version 2.8. La fonction *t.test* () n'a pas été utilisée.

3- Segmentation de processus

Le but des méthodes de segmentation est de détecter des changements brusques pouvant apparaître dans les caractéristiques du signal étudié. Ces méthodes sont étudiées depuis plus de 50 ans. Leur succès tient dans le fait que les applications sont nombreuses et peuvent être utilisées dans des domaines très variés.

Le problème de détection de ruptures peut être formulé *on-line* ou *off-line*. La détection *on-line* est très utilisée pour le contrôle qualité, les données issues de *monitoring* ou la détection de crises financières (Basseville and Nikiforov, 1993). L'analyse du signal est effectuée au fur et à mesure que les observations apparaissent, ce qui permet, par exemple, d'anticiper les problèmes de fabrication dans l'industrie.

Dans cette étude, nous considérerons l'autre approche, qui est la détection *off-line*, et qui consistera à détecter les ruptures sur toutes les données simultanément. De plus, nous nous intéresserons à un modèle de segmentation particulier qui est le modèle de détection de ruptures dans la moyenne d'un signal gaussien. Pour ce modèle, nous rappellerons la démarche d'estimation, puis l'algorithme utilisé. Dans notre cadre d'étude, un signal correspondra aux absorbances obtenues le long de l'axe d'élongation racinaire pour un NO donné (figure 33). Les absorbances varient au cours du temps (axe d'élongation) et nous chercherons à voir s'il existe des changements brusques dans ces absorbances et si ces changements sont reliés aux différentes étapes de la croissance cellulaire.

Ce qui nous intéressera plus particulièrement, c'est d'étudier l'ensemble des signaux en même temps, puisqu'un spectre IR est acquis pour une gamme de NO, soit 265 signaux. On pourra supposer, en effet, que la croissance est la même pour tous les NO. Ainsi, pour une racine donnée, nous chercherons à segmenter les signaux en même temps le long de l'axe d'élongation en supposant que les ruptures soient communes, c'est – à – dire, que les instants de ruptures seront les mêmes pour tous les NO. C'est ce que l'on appelle de la segmentation simultanée. Nous présenterons ici le modèle, la démarche d'estimation et l'algorithme utilisé, qui correspondront à une généralisation dans ce cas multivarié du cas univarié.

Pour la détection *off-line*, deux approches peuvent être envisagées : une approche bayésienne (Lavielle and Lebarbier, 2001; Dobigeon et al., 2007) et une approche fréquentiste que nous avons adopté ici (Picard et al., 2005).

Segmentation d'un seul signal

1- Modèle de détection de ruptures dans la moyenne d'un signal gaussien

On observe $\{y_t\}, t=1, \dots, n$ les valeurs des absorbances d'un spectre IR pour un NO donné. Les observations sont supposées être des réalisations de n variables aléatoires indépendantes, notées Y_t telles que :

$$Y_t = \mu_k + \varepsilon_t \text{ avec } t \in I^k = [t_{k-1} + 1, t_k]$$

où les erreurs $\{\varepsilon_t\}$ sont supposées indépendantes et identiquement distribuées (iid) selon une gaussienne centrée de variance σ^2 . Les instants de ruptures sont les $t_1 < \dots < t_{K-1}$ avec la convention $t_0 = 1$ et $t_K = n$ où K est le nombre de segments.

Les paramètres de ce modèle sont : les K moyennes, les $K-1$ instants de ruptures, la variance et K le nombre de segments, qui bien sûr en pratique est inconnu.

L'estimation de ces paramètres se fait en 2 étapes : pour un nombre de segments fixé, on estime les moyennes, la variance et les instants de ruptures par la méthode du maximum de vraisemblance, puis on estime le nombre de segments par des critères de sélection de modèles (critère de vraisemblance pénalisée).

2- Procédure d'estimation des paramètres lorsque le nombre de segments K est fixé

Pour cette étape d'estimation, le nombre de segments K est fixé. L'estimation des ruptures peut être alors vu comme un problème de partitionnement où le but est de trouver la meilleure partition du signal en K segments.

Puisque les données sont supposées indépendantes, la vraisemblance s'écrit :

$$L(y, \mu_K, T_K, \sigma^2) = \prod_{t=1}^n f(y_t) = \prod_{t=1}^n \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp \frac{-(y_t - \mu_k)^2}{2\sigma^2}$$

$$L(y, \mu_K, T_K, \sigma^2) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \right)^n \exp \frac{-\sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t - \mu_k)^2}{2\sigma^2}$$

où μ_K désigne le vecteur des moyennes, et T_K le vecteur des ruptures et la log – vraisemblance s'écrit :

$$V(y; \mu_K, T_K, \sigma^2) = -\frac{n}{2} \log(2\pi\sigma^2) - \frac{1}{2\sigma^2} \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t - \mu_k)^2$$

- Si les ruptures $T_K = \{t_1, \dots, t_{K-1}\}$ sont connues, les estimations des moyennes et de la variance sont :

$$\hat{\mu}_k = \bar{y}_k = \frac{1}{n^k} \sum_{t \in I^k} y_t$$

et

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t - \bar{y}_k)^2$$

- Cependant la position des ruptures est aussi inconnue. Pour les estimer, on va, de la même façon, chercher celles qui maximisent la vraisemblance suivante :

$$\begin{aligned} \hat{T}_K &= \arg \max \{ \log V(y; \hat{\mu}_K, T_K, \hat{\sigma}^2) = -\frac{n}{2} \log(2\pi\hat{\sigma}^2) - \frac{1}{2\hat{\sigma}^2} \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t - \hat{\mu}_k)^2 \\ &\Leftrightarrow \hat{T}_K = \arg \min \left\{ \log \left[\frac{1}{n} \left(\sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t - \hat{\mu}_k)^2 \right) \right] \right\} \end{aligned} \quad (1)$$

Comme on n'a aucune idée *a priori* des positions des ruptures, on effectue une recherche exhaustive en considérant toutes les partitions possibles du signal en K segments. Cependant, le nombre de partitions possibles est C_{n-1}^{K-1} et la complexité algorithmique d'une telle recherche est de l'ordre de $O(n^K)$ et est donc impossible en pratique. La solution est d'utiliser un algorithme de programmation dynamique, décrite dans la partie suivante, qui va permettre de réduire considérablement sa complexité algorithmique. Cet algorithme peut être utilisé ici car la quantité à minimiser est additive en le nombre de segments.

3- La programmation dynamique

Cet algorithme est une approche récursive fondé sur le principe d'optimalité de Bellman (Bellman and Dreyfus, 1962). Les applications de ce concept au contexte de la segmentation globale apparaissent vers la fin des années 80 (Auger and Lawrence, 1989).

L'estimation des instants de ruptures passe par la minimisation de l'équation (1), ou encore du terme suivant noté J_K :

$$J_K = \left(\sum_{k=1}^K \sum_{t=t_{k-1}+1}^{t_k} (y_t - \hat{\mu}_k)^2 \right)$$

Cette quantité, qui représente le coût de la meilleure partition en K segments, est la somme du critère des moindres carrés calculé en son minimum sur chaque segment. Le problème de minimisation peut être vu comme un problème de plus court chemin où l'on cherche celui reliant le point 1 au point n en $K - 1$ étapes. Notons $J_k(i, j)$ le coût d'un chemin reliant le point i au point j en k étapes, l'algorithme s'écrit comme suit :

$$\begin{aligned} \forall 0 \leq i \leq j, J_1(i, j) &= \sum_{t=i+1}^j (y_t - \bar{y}_{ij})^2, \\ \forall 1 \leq k \leq K-1, J_{k+1}(1, j) &= \min_{1 \leq h \leq j} \{ J_k(1, h) + J_1(h+1, j) \} \end{aligned}$$

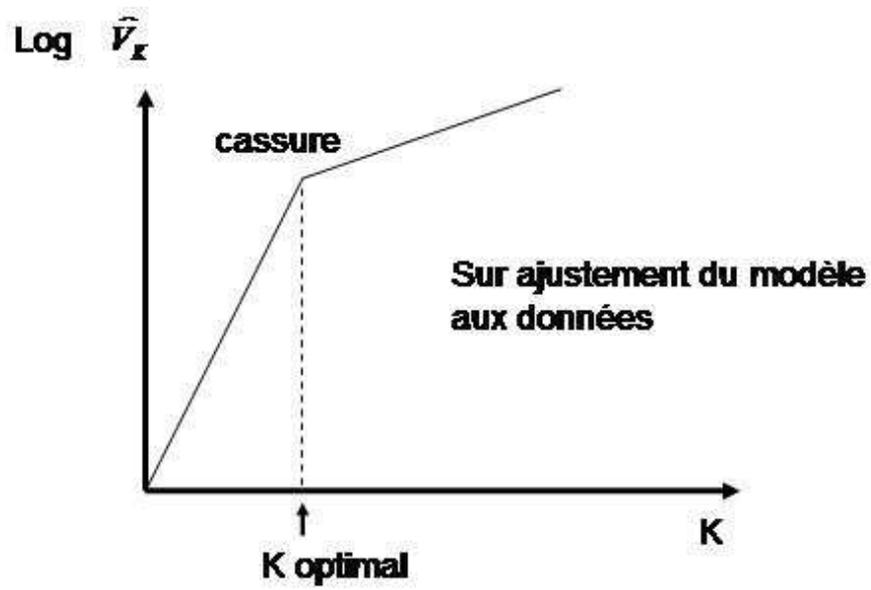


Figure 34 : Choix du nombre de segments K par le critère de vraisemblance pénalisée.

Avec cet algorithme, la complexité est réduite de $O(n^K)$ à $O(Kn^2)$.

4- Choix du nombre K de segments par critère de vraisemblance pénalisée

La procédure précédente permet d'obtenir la meilleure partition des données K segments au sens du maximum de vraisemblance. Mais le nombre de segments est inconnu en pratique et il faut donc l'estimer. La difficulté se place dans le cadre d'un problème de sélection de modèle et consiste à choisir le nombre de segments en maximisant un critère de vraisemblance pénalisée, écrit sous la forme générale suivante :

$$\hat{K} = \arg \max V(y; \hat{\mu}_K, \hat{T}_K, \hat{\sigma}^2) - \text{pen}(K)$$

Le premier terme, qui correspond à la log-vraisemblance pris en son maximum, mesure l'ajustement du modèle aux données. Ce terme augmente avec la valeur de K. Le deuxième terme est la pénalité et mesure la complexité d'un modèle à K segments, elle est proportionnelle au nombre de paramètres à estimer et augmente aussi avec K. Ces critères consistent donc à choisir le nombre de segments comme étant celui qui fait le meilleur compromis entre avoir un bon ajustement du modèle aux données et pas trop de paramètres à estimer.

Plusieurs critères existent dans le cadre particulier de la détection de ruptures dans la moyenne, (Lebarbier, 2005) et notamment le critère de Marc Lavielle (Lavielle, 2005) utilisé par Frank Picard (Picard et al., 2005) dans le cadre particulier de l'application de ce modèle à l'analyse de données de puces CGH (Picard et al., 2007). Ici, nous avons aussi utilisé ce critère qui s'écrit :

$$\hat{K} = \arg \max V(y; \hat{\mu}_K, \hat{T}_K, \hat{\sigma}^2) - \beta(K + 1)$$

où β est une constante à calibrer. Le terme de pénalité est donc proportionnel au nombre de paramètres à estimer pour une partition à K segments, i.e. K moyennes et une variance. Pour la calibration de β , l'idée de l'heuristique proposée par M. Lavielle consiste à choisir la constante, et donc le K, pour lequel le critère d'ajustement cesse d'augmenter « significativement » (figure 34).

5- Applications de la segmentation à des données biologiques

Les processus constants par morceaux sont nombreux en biologie et les méthodes de segmentation sont utilisées de plus en plus fréquemment dans ce domaine. Cette méthode a été par exemple appliquée dans le cadre de l'analyse des données de puces CGH (Picard et al., 2007) et pour l'étude de la croissance des arbres (Guedon et al., 2007)

Dans notre étude, nous avons utilisé cette méthode de segmentation sur les valeurs d'absorbances pour un NO donné afin de vérifier si les données IR, reflétant la qualité de la paroi primaire chez la racine d'*Arabidopsis*, pouvait nous permettre de retrouver les différentes étapes de la croissance cellulaire et ainsi déterminer les caractéristiques chimiques et structurales de la paroi pour chacune de ces étapes.

Segmentation simultanée de plusieurs signaux

1- Le modèle

Notre objectif ici est d'analyser simultanément plusieurs signaux en supposant que les ruptures sont communes. En effet, l'acquisition de nos spectres IR ne se fait pas sur un seul NO, mais sur une gamme U de NO de 1820 cm^{-1} à 800 cm^{-1} , ce qui correspond à 265 NO. Ce modèle est une généralisation du modèle précédent qui s'écrit :

$$\forall t \in I^k, Y_t^u = \mu_k^u + \varepsilon_t^u \text{ où } \{\varepsilon_t^u\} \text{ iid } \sim N(0, \sigma^2) \text{ et } u \text{ est le } u^{\text{ème}} \text{ NO}$$

$$\text{où } I^k = [t_{k-1} + 1, t_k]$$

La Log-vraisemblance s'écrit :

$$V(y^U; \mu_K^U, T_K, \sigma^2) = -\frac{n^*U}{2} \text{Log}(2\pi\sigma^2) - \frac{1}{2\sigma^2} \sum_{u=1}^U \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t^u - \mu_k^u)^2$$

2- Estimation des paramètres pour un nombre de segments K fixés

La démarche d'estimation est la même que dans le cadre de la segmentation d'un signal.

- A ruptures fixées, on obtient :

$$\hat{\mu}_k^u = \bar{y}_k^u = \frac{1}{n^k} \sum_{t \in I^k} y_t^u$$

et

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n^*U} \sum_{u=1}^U \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t^u - \bar{y}_k^u)^2$$

- Pour estimer les instants de ruptures, il faut minimiser le log de $\hat{\sigma}^2$:

$$\hat{T}_K = \text{argmax} \left(-\frac{n^*U}{2} \text{Log}(2\pi\hat{\sigma}^2) - \frac{1}{2\hat{\sigma}^2} \sum_{u=1}^U \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t^u - \hat{\mu}_k^u)^2 \right) = \text{argmin} \left\{ \log \left[\frac{1}{n^*U} \left(\sum_{u=1}^U \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t^u - \hat{\mu}_k^u)^2 \right) \right] \right\}$$

ou encore :

$$J_K = \left(\sum_{u=1}^U \sum_{k=1}^K \sum_{t \in I^k} (y_t^u - \hat{\mu}_k^u)^2 \right)$$

La quantité à minimiser est là encore additive en le nombre de segments et nous pouvons donc utiliser la programmation dynamique :

$$\forall 0 \leq i \leq j, J_1(i, j) = \sum_{u=1}^U \sum_{t=i+1}^j (y_t^u - \bar{y}_{ij}^u)^2,$$

$$\forall 1 \leq k \leq K-1, J_{k+1}(1, j) = \min_{1 \leq h \leq j} \{J_k(1, h) + J_1(h+1, j)\}$$

3. Estimation du nombre de segments

Pour estimer le nombre de segments, on adapte le critère utilisé dans le cadre de la segmentation d'un signal :

$$\hat{K} = \arg \max V(y^U; \hat{\mu}_K^U, \hat{T}_K, \hat{\sigma}^2) - \beta(UK + 1)$$

Variabilité de l'élongation de la racine

Introduction

La racine d'*Arabidopsis thaliana* est un organe bien décrit dans la littérature. Son organisation tissulaire, le développement des racines latérales et des poils racinaires, les processus de croissance à partir du méristème et l'action d'agents chimiques sont des phénomènes connus de la communauté scientifique. Cependant, les relations entre la croissance et les modifications de la structure et de la composition de la paroi ne sont pas encore caractérisées.

En effet, il est actuellement admis que la racine est organisée en zones homogènes le long de l'axe d'élongation, mais cette idée est le plus souvent présentée de façon informelle : le nombre de zones, les limites entre les zones et les fonctions des zones ne sont pas bien définis et dépendent des technologies utilisées pour définir ces compartiments. La racine est un continuum le long de l'axe d'élongation, et sa composition, ainsi que sa structure, varient de façon continue avec peut-être des paliers. La question de savoir, si on peut représenter cette évolution par une courbe en escalier avec des marches franches ou si les transitions entre zones sont plus douces, est une question ouverte. Il est clair que le « modèle » de zones homogènes est un modèle commode pour identifier des sous-objets et des fonctions différentes dans la racine, mais il n'y a pas de consensus établi sur le fait que ce soit une approximation suffisamment précise de la réalité pour être réellement utile pour la compréhension de la croissance de la racine. Si, dans la réalité, la continuité de la composition et de la structure le long de l'axe d'élongation l'emporte sur les ruptures nettes, alors la notion de zone homogène sera plus une source de confusion pour les chercheurs qu'un modèle utile pour avancer.

Par exemple en 2004, l'équipe de Jean-Pierre Verbelen à Anvers a étudié la corrélation entre la position le long de l'axe d'élongation et la composition chimique de la paroi racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. Les zones sont déterminées par l'observation de marqueurs le long de l'axe d'élongation de la racine. Ainsi, la zone méristématique est limitée à 200 μM à partir de la pointe racinaire au vu des résultats obtenus par des marqueurs de division comme la cycline B1 (Hauser and Bauer, 2000). Par ailleurs, des zones de transition et d'élongation ont été proposées et délimitées en observant la taille des cellules ou par des analyses FTIR (De Cnodder, 2005), mais la distinction de ces deux zones n'est pas toujours évidente. En effet, il faudrait pouvoir mesurer l'ensemble des cellules d'une racine avant de l'analyser par spectroscopie IR ou inversement. Or ces deux techniques ne sont pas compatibles.

De plus, les tailles des zones de croissance, ne sont pas constantes : elles varient notamment en fonction des écotypes et des conditions de croissance. Par exemple, la taille de la zone méristématique est modulée par la teneur en saccharose du milieu de culture, mais elle peut dépendre aussi de la teneur en auxine ou en cytokinine (Beemster and Baskin, 2000). De même, la zone d'élongation rapide peut être ajustée par l'éthylène ou un stress environnemental. Pour comprendre les modifications pariétales lors de la croissance, il est impératif de pouvoir distinguer avec précision les différentes étapes de cette croissance le long de l'axe d'élongation.

Un des objectifs de ce travail de thèse est d'apporter des éléments supplémentaires pour instruire le dossier sur l'existence de zones homogènes, sur le nombre de ces zones, sur la définition plus précise de leurs constituants et sur les positions des limites entre les zones.

Ce qui fait la nouveauté de ce travail, c'est l'utilisation de la technique de spectroscopie Infra-Rouge comme une alternative aux méthodes basées sur la taille des cellules, les mesures de vitesses locales ou les marqueurs histologiques.

Il s'appuie sur les travaux précédents effectués par l'équipe de Jean-pierre Verbelen en collaboration avec le laboratoire de biologie cellulaire de Versailles, et propose de définir les zones des différentes étapes du développement racinaire en fonction de la composition/structure pariétale.

Etude de la reproductibilité des expériences sur racines

La variabilité entre racines, c'est à dire la faible répétabilité des expériences est un des obstacles les plus importants dans l'étude des zones homogènes le long de l'axe d'élongation. En effet, la longueur des racines et la vitesse de croissance peuvent varier considérablement d'une racine à une autre, alors que les conditions expérimentales semblent identiques. Il est donc vital de s'assurer que les principaux facteurs de variations de ces caractéristiques racinaires sont sous contrôle. Si la répétabilité est mauvaise, les tests statistiques auront une puissance très faible et ne permettront pas de mettre en évidence des phénomènes réels, comme par exemple l'existence de zones homogènes, même si elles existent réellement. De plus, la régularité interne d'une zone homogène sera cachée par le bruit apporté par la variabilité expérimentale. La variabilité des vitesses de croissance induit des différences entre 2 racines sur la position de la rupture entre 2 zones homogènes, ce qui fait qu'on ne pourra pas définir un consensus sur une position unique de cette rupture.

Nous avons donc commencé par une étude permettant d'identifier les facteurs principaux agissant sur la vitesse de croissance afin d'estimer la reproductibilité de cette vitesse.

1- Etude de la reproductibilité de la Vitesse de Croissance

Les facteurs de variation

Pour éliminer une source évidente de variabilité, un seul écotype d'*Arabidopsis* est choisi pour cette étude (écotype *Columbia*).

1- Les milieux de culture

Le milieu de base est celui de (Estelle and Somerville, 1987) auquel on doit ajouter un gélifiant. Plusieurs gélifiants ont été testés comme le Phytoblend, le Gelrite ou l'Agar Biomar ou Litex, mais se sont des extraits d'algues purifiés qui comportent souvent une substance additive comme les nitrates et les phosphates et qui ont un effet notable sur la croissance racinaire. Il est donc important de travailler avec le gélifiant le plus pur possible comme l'agarose. Ainsi, deux types de milieux sont produits : un milieu sans saccharose (noté A0) et un milieu contenant 2% de saccharose (noté A2). La présence de sucre dans le milieu A2 doit augmenter fortement la vitesse de croissance des racines (Freixes et al., 2002). La différence de vitesse de croissance des racines sur milieu A0 ou A2 est un bon indicateur des conditions

de croissance des plantules. Le calcul des vitesses de croissance est effectué sur des racines de 5 jours après germination, temps nécessaire supposé pour gommer les différences de date de germination entre les plantules.

2- Les dates d'expérience et de mesure

Comme souvent en expérimentation il y a un effet date de l'expérience. Nous avons donc fait ces expériences à 6 dates différentes. Par ailleurs nous avons mesuré la variable réponse (vitesse de croissance) à deux moments de la journée, le matin et l'après-midi.

3- La boîte de Pétri

Les racines sont cultivées dans une boîte de Pétri (10 racines par boîte) et plusieurs boîtes ont été utilisées, ce qui peut avoir un effet.

Le plan d'expériences

Chaque boîte de Pétri contient entre 5 et 16 racines. Pour un même milieu, il y a 6 dates. Il y a 2 milieux et 6 dates, entre 1 et 3 boîtes de Pétri pour une combinaison date*milieu, soit au total 16 boîtes de Pétri, 135 racines et 270 vitesses puisque la vitesse de croissance est mesurée 2 fois (matin et après-midi).

Analyse Statistique des résultats

Soit Y la vitesse de croissance au temps t , le modèle statistique est le modèle mixte suivant :

$$Y_{dijkt} = \mu + B_d + \alpha_i + C_{i(d)} + D_{j(di)} + F_{k(dij)} + \beta_t + (\alpha\beta)_{it} + \varepsilon_{dijkt}$$

Où k est le numéro de la racine, j la boîte de Pétri, d la date de l'expérience, i le milieu, et t le temps de mesure dans la journée (matin ou après midi).

B est l'effet aléatoire de la date, C , l'effet aléatoire de l'interaction date*milieu, D l'effet aléatoire de la boîte de Pétri, F l'effet aléatoire de la racine, α l'effet fixe du milieu, β l'effet du moment dans la journée de la mesure de la vitesse et $(\alpha\beta)$ l'interaction entre ces 2 effets fixes.

Ce modèle permet donc de savoir s'il existe des artefacts expérimentaux, comme un effet jour, une interaction entre le milieu et le jour, un effet boîte de Pétri. De plus, cette analyse permet de quantifier et de hiérarchiser l'importance des différentes sources de variabilité.

1- Variance des effets aléatoires

Les variances sont données dans la table 1 suivante :

Estimation des paramètres				
Variance	Estimation	Ecart-type	Valeur Z	Pr Z
Date	491.89	425.96	1.15	0.1241
date*milieu	0	.	.	.
boite(date*milieu)	91.81	103.51	0.89	0.1875
racine(date*milieu*boite)	795.95	155.14	5.13	<.0001
Residual	704.23	86.353	8.16	<.0001

Table 1: Estimation des paramètres de variances/covariances pour les effets aléatoires du modèle mixte

Les résultats de la table 1 montrent que le terme de plus forte variance est celui associé à la variabilité individuelle entre les racines, suivi de la variabilité entre les 2 prises de mesure dans la même journée, puis la variabilité entre les dates et enfin entre les boîtes pour une même date et un même milieu. Les 2 dernières variances sont non significativement différentes de 0, de même que la variance due à l'interaction date*milieu qui est estimée à 0.

Par contre, **nous constatons que la reproductibilité de la mesure de la vitesse de croissance entre les racines d'une même boîte est assez mauvaise** (écart-type de 28, estimation de l'effet « racine »), **ainsi que la reproductibilité des 2 mesures faites au cours de la journée sur la même racine** (écart-type de 26.5, estimation de la résiduelle).

2- Analyse des effets milieu et temps

Ce sont les effets fixes du modèle mixte donnés dans la table 2.

Effet	Num DF	Den DDL	Valeur F	Pr > F
milieu	1	4	718.97	<.0001
temps	1	133	1.42	0.2351
milieu*temps	1	133	15.41	0.0001

Table 2 : Estimation des effets fixes du modèle mixte

Les résultats montrent un effet du milieu et une interaction entre le milieu et le temps. **Il existe bien une différence de vitesse de croissance entre les milieux A0 et A2, mais les résultats suggèrent aussi que la vitesse semble varier au cours de la journée.**

Pour mieux analyser cette interaction nous avons calculé les moyennes ajustées pour les 4 cas, qui sont données dans la table 3.

Effet	milieu	temps	Estimation	Ecart-type
milieu*temps	A0	1	94.91	11.69
milieu*temps	A0	2	103.79	11.69
milieu*temps	A2	1	312.36	11.49
milieu*temps	A2	2	295.73	11.49

Table 3 : Calcul des moyennes ajustées pour l'ensemble des cas possibles de l'interaction milieu*temps (option *lsmeans* de la procédure *glm* de SAS 9.1)

Comme attendu, la vitesse de croissance sur le milieu A2 est trois fois plus grande que sur le milieu A0.

Les différences entre les moyennes sont données dans la table 4.

Effet	milieu	temps	milieu	temps	Estimation	Ecart- type	DDL	Valeur du test t	Pr > t
milieu*temps	A0	1	A0	2	-8.8769	4.6550	133	-1.91	0.0587
milieu*temps	A0	1	A2	1	-217.44	8.2966	133	-26.21	<.0001
milieu*temps	A0	1	A2	2	-200.82	8.2959	133	-24.21	<.0001
milieu*temps	A0	2	A2	1	-208.57	8.2966	133	-25.14	<.0001
milieu*temps	A0	2	A2	2	-191.94	8.2959	133	-23.14	<.0001
milieu*temps	A2	1	A2	2	16.6262	4.5318	133	3.67	0.0004

Table 4 : Etude de la différence des moyennes des moindres carrés (option *contrast* de la procédure *glm* de SAS 9.1)

Les résultats montrent que **le milieu A2 et le milieu A0 sont significativement différents. De plus, dans le milieu A2, la vitesse de croissance diminue significativement entre le matin et l'après-midi.**

Conclusions

Il y a une forte variabilité individuelle entre les racines et même entre les vitesses à des moments différents de la même journée sur la même racine. Les effets jours et boîte de Pétri semblent moins importants.

Par ailleurs sur un milieu riche en sucre la vitesse de croissance augmente fortement par rapport à des vitesses obtenues sur des milieux sans saccharose. De plus, il semble que cette vitesse de croissance décline au cours de la journée pour des racines cultivées sur des milieux contenant 2% de saccharose. Or ce phénomène n'était pas du tout attendu, les racines étant constamment approvisionnées en saccharose. Elles ne devraient pas puiser de réserve dans les cotylédons (source d'amidon). Ce phénomène est sûrement dû aux cycles diurnes de la plantule. En effet, la nuit la plantule utilise les réserves en amidon pour se fournir en sucre et le jour, la plante puise le sucre présent dans le sol pour la photosynthèse et la reconstitution des stocks épuisés pendant la nuit. Les plantes sont dans une chambre de culture où la nuit artificielle est maintenue de 23h à 7h. La première vitesse de croissance est calculée à 9h donc proche de la phase de « réveil » de la plantule et la seconde vitesse à 14h dans une période constante de la journée.

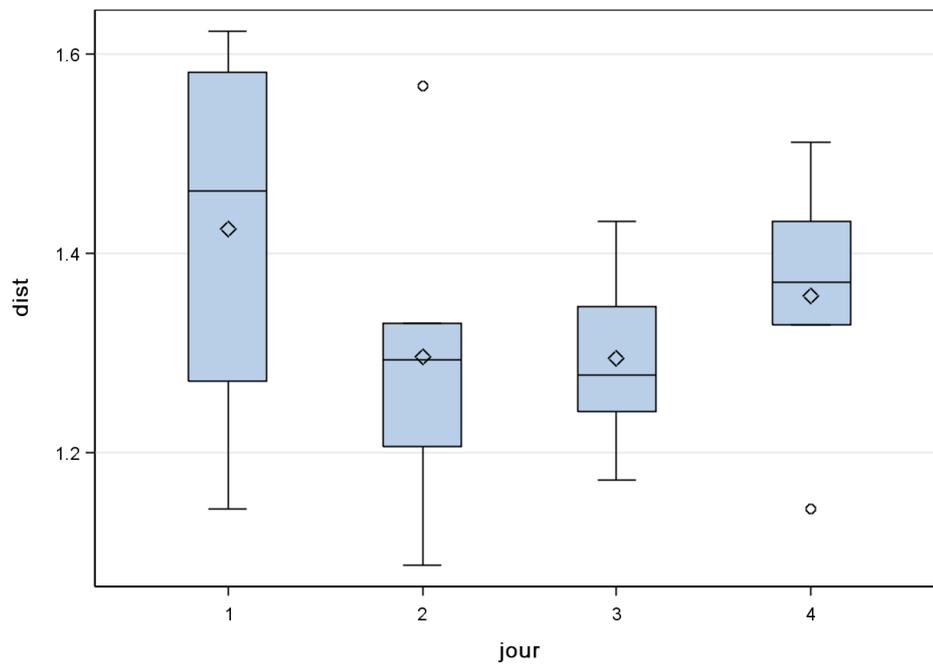


Figure 35 : Représentation de la distance pointe – premier poil racinaire (en millimètre) par des boxplots en fonction des jours. Les « ° » représentent des individus extrêmes. Nous disposons de 6 mesures par jours.

2- Etude de la reproductibilité de la distance entre la pointe et le premier poil racinaire

Notre analyse porte sur la composition et la structure des parois des cellules en croissance dans la racine. Donc seules les cellules comprises entre la pointe racinaire et l'apparition du premier poil, qui marque la différenciation cellulaire, sont concernées. Les racines sont supposées être synchronisées 5 jours après germination pour des plantules cultivées dans des conditions identiques et sur des milieux contenant du sucre. Nous appellerons donc « racines contrôles », les racines des plantules ayant poussées pendant 5 jours sur milieux A2 (cf. conditions expérimentales dans Matériels et Méthodes) et n'ayant subies aucun traitement ou transfert dans une autre boîte de Pétri.

Ainsi, il est naturel de faire l'hypothèse que la distance entre la coiffe et le premier poil racinaire devrait être une distance constante pour des racines cultivées sur une même boîte à un temps donné.

Afin d'analyser la reproductibilité de cette distance nous avons mesuré 6 racines contrôles lors de 4 répétitions effectuées lors de 4 jours différents (le 2, 3 et 4 avril 2007 et le 10 avril 2007). La distance est mesurée à la même heure de la journée (10h du matin). La figure 35 donne les Boxplots correspondants.

Analyse de la variance

Une analyse de variance sur cette distance avec un effet jour indique que ce dernier n'est pas significatif (voir Table 5).

Source	DF	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Model	3	0.0628	0.0209	0.86	0.4828
Error	17	0.4159	0.0244		
Corrected Total	20	0.4787			

Table 5 : Recherche d'un effet jour sur la distance pointe – premier poil racinaire par analyse de la variance.

En fait la variabilité entre les racines est forte et il y a peu de répétitions, ce qui fait que le test est peu puissant. L'effet jour existe peut-être mais il est nettement plus faible que l'effet racine. Ceci est confirmé par l'analyse des mêmes données avec un modèle mixte et un effet jour aléatoire. Les valeurs pour les variances des effets jours et racines sont reportées dans la table 6 suivante :

Covariance Parameter Estimates				
Parm cov	Estimation	Ecart type	Valeur Z	Pr Z
jour	0	.	.	.
Racines	0.02394	0.007569	3.16	0.0008

Table 6 : Estimation des paramètres du modèle mixte

Les résultats obtenus permettent de conclure que **la source majeure de variabilité est celle entre les racines avec un écart-type de reproductibilité égal à 155 μ m et que l'effet**

jour semble négligeable. Cette variabilité de 155 μm équivaut à une taille de cellule épidermique en fin d'élongation. Ainsi, la différence sur la distance pointe – premier poil entre deux racines est généralement due à une différence portant, en moyenne, sur une cellule.

Test de Bartlett

Afin de comparer les variances entre les jours, nous pourrions effectuer des tests de Fisher 2 à 2. Or, les données ne sont pas suffisantes et les tests manqueraient de puissance. De plus, nous aurions à faire face à des problèmes de tests multiples sur des petits jeux de données. Il est donc préférable d'utiliser un test de Bartlett qui permet de comparer les variances en fonction des jours. Les résultats du test sont fournis dans la table 7 suivante :

Khi 2	DF	Pr > Khi 2
1.6724	3	0.6431

Table 7 : Résultats du test de Bartlett sur la comparaison des variances en fonction des jours

Ils montrent que **les variances ne sont pas statistiquement différentes d'un jour à l'autre.**

Les distances sont calculées aux mêmes moments de la journée afin que les vitesses de croissance soient les plus harmonisées possibles. Et effet, nous avons démontré que les vitesses de croissance sont variables pour des plantules cultivées dans une même boîte, mais aussi au cours de la journée. Malgré ces précautions, il s'avère que la distance pointe – premier poil est également variable pour des racines cultivées sur une même boîte.

Par exemple, deux pointes racinaires contiguës peuvent avoir des différences de taille de 400 μm (cas extrême, en moyenne nous avons des variations de 155 μm). Ces variations sont sans doute dues à des différences dans les états des plantules et peut-être aussi à des facteurs environnementaux locaux. Ces phénomènes externes ne sont pas contrôlables mais ils ont un impact sur la croissance des racines.

3- Conclusions sur l'étude de la reproductibilité

Il y a une grande variabilité de la vitesse de croissance et de la distance entre la pointe et le premier poil pour des racines pourtant placées dans des conditions de cultures identiques.

Ces résultats sont en phase avec des travaux récents : différentes équipes travaillant sur la racine ont montré chez *Arabidopsis* ou chez le maïs et le riz, que la croissance de la pointe racinaire dépendait aussi de la germination de la graine, du développement des parties aériennes et du milieu de culture. Chaque plantule est indépendante et, en l'état actuel des connaissances et des moyens expérimentaux, il est utopique de vouloir synchroniser parfaitement la croissance des racines. Par contre, il est possible et nécessaire de contrôler les sources de variabilité que nous avons identifiées dans cette partie de la thèse.

Pour atteindre une reproductibilité raisonnable, il faut suivre les règles suivantes :

1. il faut travailler avec le même lot de graines,

2. utiliser un milieu et des conditions de température, d'hygrométrie et de lumière propices à la culture en boîte verticale,
3. respecter des horaires précis pour les mesures de vitesses de croissance

Malgré ces précautions, la variabilité entre racines est élevée. Dans ce cas la théorie statistique dit qu'on est obligé d'avoir de très nombreuses répétitions pour atteindre une puissance des tests statistiques qui soit correcte.

Peut-on définir les différentes étapes de la croissance racinaire à partir de données IR ?

Au cours de ce travail, plusieurs appareils de FTIR ont été mis à notre disposition. En effet, les technologies IR sont en plein essor ces dernières années et les générations d'appareils se succèdent très rapidement avec des améliorations très significatives d'une génération à la suivante. Le problème des chercheurs est donc de disposer de la dernière génération à un coût raisonnable. Cela pose une difficulté de fond pour les expérimentations et les analyses statistiques. Il faut tout recommencer à chaque fois, et les résultats précédents deviennent très vite obsolètes et impubliables parce que les nouveaux sont meilleurs. Pour ne pas masquer toutes les étapes de ce processus qui consomme beaucoup de temps, nous avons choisi de faire une présentation chronologique des résultats et des problèmes rencontrés à chaque étape. Certains d'entre eux ont été résolus ou améliorés à l'étape suivante, mais l'ensemble de la démarche de ce travail a été très formateur.

1- Segmentation des données IR

Une fois la distance entre la pointe et le premier poil déterminé, les racines sont écrasées entre deux lames, rincées et séchées afin d'être analysées par microspectroscopie FTIR selon le protocole établi par Mouille *et al* en 2003. Le but de cette analyse est ensuite d'utiliser les données IR pour déterminer des zones le long de l'axe d'élongation racinaire en utilisant une technique de détection de ruptures dans un signal, nommée segmentation de processus. Le nombre de spectres IR collectés dépend de la longueur de la pointe racinaire, et, en général, les racines ne possèdent donc pas le même nombre de spectres.

Première approche : Single scan

Dans un premier temps, les expériences ont été réalisées avec l'appareil disponible au laboratoire, un Nexus Nicolet continuum de chez ThermoFisher Scientific. Les principaux échantillons utilisés sont des hypocotyles étiolés d'*Arabidopsis thaliana*. Sur une lame de BaF₂, 5 hypocotyles sont déposés, et l'utilisateur collecte un spectre correspondant au matériel biologique présent sur une surface de 30x30 µm. Le spectre obtenu en moins d'une minute, correspond à la moyenne de 64 spectres à une résolution 8 cm⁻¹ sur chaque échantillon (Mouille et al., 2003).

Les premiers essais sur racine ont été effectués par Tinne De Cnodder en 2004 dans le cadre de sa thèse et en collaboration avec le laboratoire de biologie cellulaire de Versailles. Tinne a permis de mettre en place les protocoles de préparation des échantillons et d'acquisitions des spectres présentés dans la partie « Matériel et Méthode ».

Structure des données

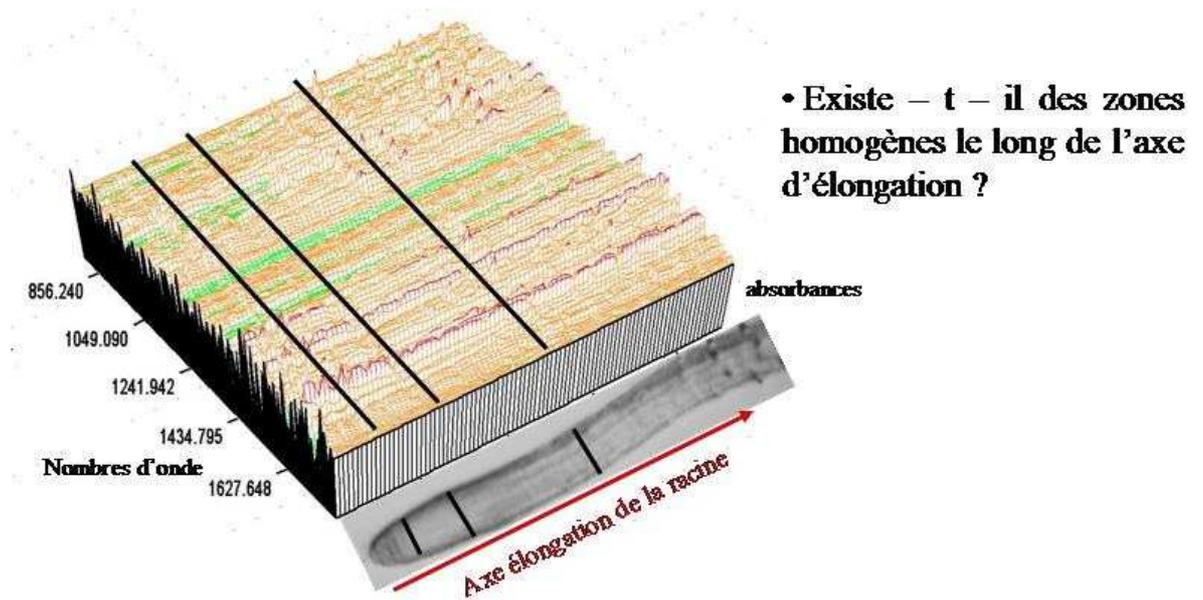


Figure 36 : Représentation de la structure des données. Pour chaque position le long de l'axe d'élongation de la racine, nous disposons d'un spectre IR composé d'absorbances pour 265 NO compris entre 1800 et 820 cm^{-1} .

Pour l'acquisition de nos données, nous avons conservé les techniques de préparations des échantillons et d'acquisition des spectres en mode *single scan*, ainsi que la normalisation des données selon le protocole décrit dans Mouille *et al* (2003), mais nous n'avons pas utilisés le même milieu de culture. La préparation des échantillons et les acquisitions ont été réalisées sur 2 mois : les 10, 24 et 25 avril 2007 et les 25 et 26 juin 2007.

Nous disposons ainsi de 23 racines contrôles (12 en avril et 11 en juin) : ces racines sont âgées de 5 jours après germination et ont été cultivées sur milieux A2 (2% saccharose). Elles n'ont subi aucun traitement. Les données sont nettoyées en utilisant des Analyses en Composantes Principales (ACP), ce qui permet d'éliminer les racines comportant trop de spectres défectueux.

1- Segmentation préliminaire des données

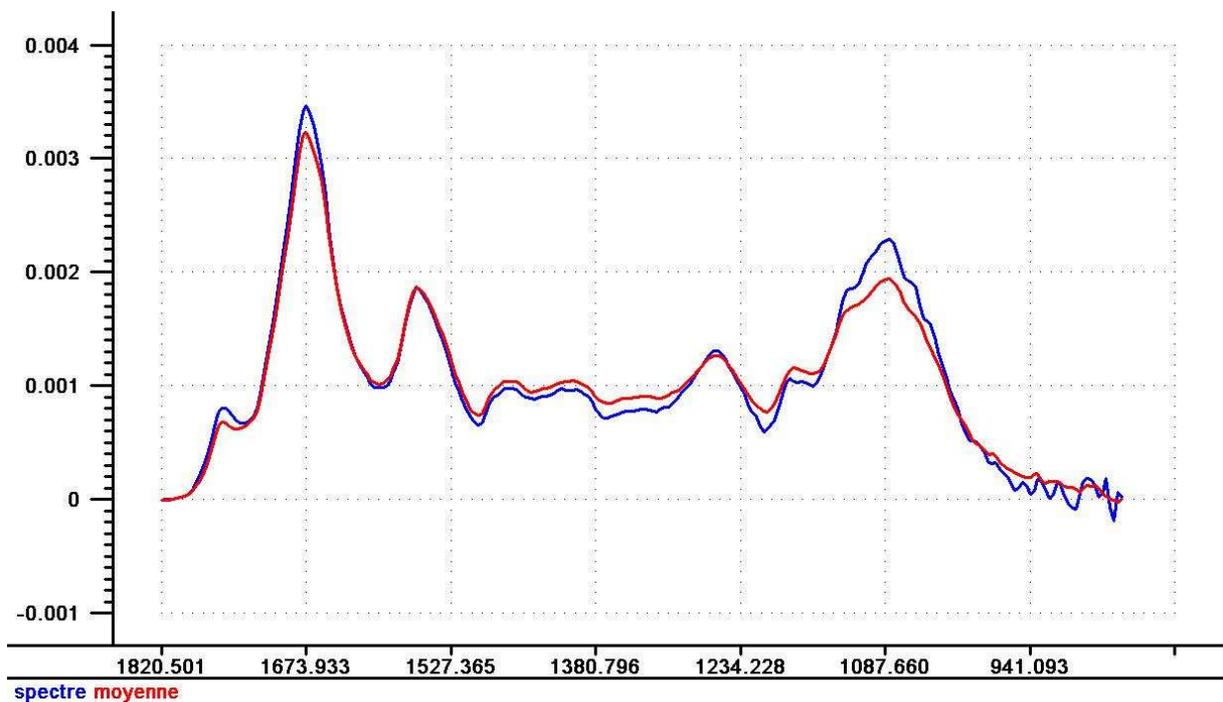
Les premiers tests de segmentation, dont la méthode est décrite dans le chapitre « Matériels et Méthodes », ont été effectués sur racines individuelles. Chaque racine a été segmentée selon l'axe d'élongation qui correspond aux différentes étapes de la croissance (division, expansion, élongation).

Le jeu de données comporte 23 racines possédant relativement la même distance entre la pointe et le premier poil racinaire (entre 50 et 52 spectres par racine, soit une différence maximale de 60 μm), car les racines possédant une distance s'écartant trop de la moyenne ont été retirées de l'étude. La structure des données est rappelée dans la figure 36.

Le nombre de segments détectés et leurs positions le long de l'axe d'élongation sont fournis dans le tableau 1 :

Numéro de la racine	Segmentation
1	0 – 10 – 28 – 33 – 46 – 50 – 52
2	0 – 1 – 11 – 12 – 22 – 38 – 42 – 48 – 51
3	0 – 1 – 13 – 30 – 33 – 39 – 44 – 47 – 50
4	0 – 6 – 23 – 30 – 37 – 44 – 50
5	0 – 5 – 39 – 41 – 47 – 52
6	0 – 3 – 6 – 9 – 26 – 36 – 41 – 51
7	0 – 1 – 9 – 11 – 13 – 22 – 52
8	0 – 3 – 24 – 50
9	0 – 5 – 29 – 31 – 48 – 52
10	0 – 1 – 7 – 14 – 30 – 33 – 34 – 43 – 46 – 52
11	0 – 5 – 12 – 20 – 38 – 42 – 52
12	0 – 3 – 18 – 22 – 40 – 51
13	0 – 5 – 12 – 20 – 45 – 52
14	0 – 4 – 11 – 19 – 25 – 38 – 52
15	0 – 5 – 37 – 50
16	0 – 4 – 13 – 38 – 45 – 51
17	0 – 5 – 14 – 22 – 34 – 52
18	0 – 1 – 17 – 22 – 38 – 52
19	0 – 36 – 52
20	0 – 5 – 39 – 46 – 48 – 52
21	0 – 1 – 5 – 14 – 22 – 38 – 43 – 46 – 52
22	0 – 12 – 38 – 50
23	0 – 5 – 13 – 20 – 36 – 52

Tableau 1 : Résultats de la segmentation sur racines individuelles



spectre moyenne
 Figure 37 : Comparaison du spectre 12 de la racine 6 avec le spectre 12 de la racine moyenne. L'axe des abscisses représente les NO, et l'axe des ordonnées représente les absorbances relatives. Les changements les plus importants sont visibles vers la fin du spectre pour les NO à partir de 950 cm^{-1} : le spectre individuel présente beaucoup de bruit tandis que le spectre moyen a été lissé.

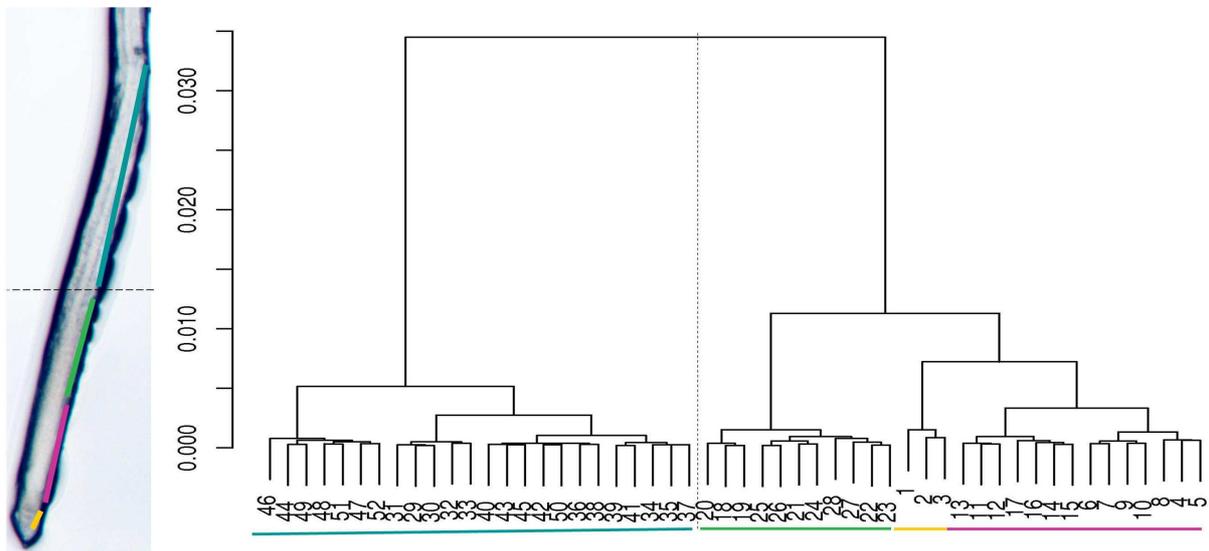


Figure 38 : Représentation du dendrogramme obtenu par clustering hiérarchique sur la moyenne des 23 racines.

Le nombre de segments détectés et leurs positions le long de l'axe d'élongation est très variable d'une racine à l'autre.

Cette variabilité peut avoir plusieurs origines. Chaque racine a un mode d'élongation unique, ce qui explique les différences entre les tailles de pointe racinaire. Mais, il se peut aussi que le protocole d'acquisition des données génère trop de bruit et que la qualité des spectres ne soit pas suffisante pour appliquer des traitements statistiques. Il faut donc plusieurs spectres pour chaque position afin de lisser les données.

2- Segmentation de la moyenne

Comme la segmentation en zones homogènes sur racines individuelles n'était pas reproductible, nous avons procédé à une segmentation sur la moyenne des 23 racines. En effet, le fait de faire la moyenne des données va permettre de lisser l'ensemble des variabilités individuelles (figure 37). La racine moyenne sera toujours plus stable que les racines individuelles, mais il faut garder en tête que nous risquons de perdre des informations. La racine moyenne finale comporte 52 spectres soit une distance pointe – premier poil de 1,560 mm.

Dans un premier temps, il est important de vérifier que les spectres reflètent bien un processus ordonné le long de l'axe d'élongation et qu'ils sont donc bien reconnus comme étant des états successifs les uns des autres. L'utilisation de la méthode de clustering hiérarchique permet de voir si les groupes formés sont bien composés de spectres successifs.

En effet, cette méthode a pour objectif de former des groupes d'individus qui se ressemblent, mais elle ne pose aucune contrainte spatiale. La figure 38 présente le dendrogramme obtenu sur la racine moyenne.

Les 4 clusters définis, à partir du dendrogramme, montrent que les données sont bien reconnues comme étant des positions successives dans le temps.

Les clusters formés pourraient être interprétés de la façon suivante : la coiffe (cluster jaune), une zone de division en rose et en vert et la zone d'élongation rapide en bleu. Ainsi, sur les 1560 μm que représente la distance coiffe – premier poil, 840 μm serait dédié selon les clusters à la zone de division et de transition et 720 μm pour la zone d'élongation rapide. Cette première zone serait découpée en 3, la coiffe (90 μm), la zone de division comportant le méristème (420 μm) et une zone de transition (330 μm).

L'utilisation de l'algorithme de segmentation est alors justifiée dans ce cas, car en plus de faire des groupes, cet algorithme a pour contrainte de définir ces groupes en prenant les spectres de manière séquentielle. La contrainte temporelle est forte et particulièrement adaptée à nos données qui représentent des états cellulaires successifs dans le temps.

L'algorithme de segmentation donne la partition suivante :

Segment	1	2	3	4
Position sur axe d'élongation en partant de la coiffe	1-3	4-17	18-31	32-52
Distance en μm	90	390	390	600

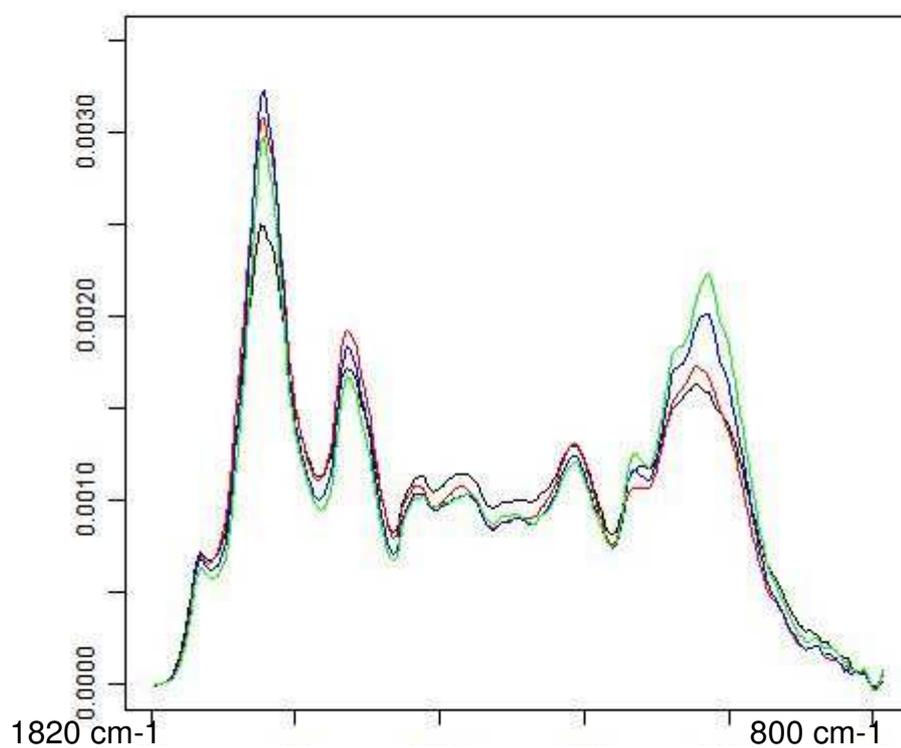


Figure 39 : Visualisation des spectres moyennés par segment. En abscisse sont représentés les NO de 1820 à 800 cm^{-1} (zone de fingerprint des molécules organiques). En ordonnée sont représentées les absorbances. Segment 1 en noir, segment 2 en rouge, segment 3 en bleu et segment 4 en vert.

Les segments peuvent être interprétés de la façon suivante : les 3 premiers spectres représentent la coiffe puis le segment 2 la zone méristématique, le segment 3 la zone de transition comprenant l'expansion cellulaire et le segment 4 la zone d'élongation rapide. **Les résultats sont donc comparables entre les 2 méthodes, les ruptures sont définies pratiquement aux mêmes endroits.** Cependant, les segments obtenus par la méthode de segmentation sont considérés plus robustes que ceux obtenus par clustering car la méthode de segmentation utilise les contraintes temporelles nécessaires.

Afin de comparer les segments entre eux et de définir quels sont les NO responsables de ces différences, les 4 segments sont moyennés et les 4 spectres moyens obtenus sont observés sur un même graphique (figure 39).

Ainsi, la figure 39 montre **que les 4 segments définis sont bien différents les uns des autres en terme de structure et de composition.**

Dans la zone des spectres concernant l'empreinte des polysaccharides ($1200-800\text{ cm}^{-1}$), on remarque que les épaulements sont de plus en plus marqués du segment 1 vers le segment 4 et que la quantité de polysaccharides augmente le long de l'axe d'élongation. Par contre, dans la zone des esters et amides ($1750-1500\text{ cm}^{-1}$), nous observons le phénomène inverse : une diminution des absorbances correspondants aux esters et amides (le long de l'axe d'élongation).

3- Conclusion

Ces premiers résultats montrent que **la segmentation de données est une méthode qui peut être utilisée dans le cadre de la détection de zone le long de l'axe d'élongation de la racine.** Cependant, la segmentation sur racine individuelle s'est avérée impossible avec le type de données que nous avons actuellement. Dès l'acquisition des spectres IR, certaines difficultés sont apparues. L'utilisation d'une fenêtre d'acquisition de $30\text{ }\mu\text{m}$ n'est pas toujours possible selon les échantillons car des phénomènes de diffraction apparaissent faisant dériver la ligne de base et rendant les spectres inexploitable. De plus, pointer les spectres à la main est une source d'erreur importante. Il est impossible de vérifier que le spectre 3 d'une racine A est exactement à la même position que le spectre 3 d'une racine B. Ces problèmes d'échelle peuvent être une source d'erreur supplémentaire lors du calcul de la racine moyenne.

Malgré ces difficultés, les résultats obtenus sur la racine moyenne montrent que l'obtention de zones distinctes le long de l'axe d'élongation peut être définis, mais que l'attribution de marqueurs IR est encore difficile à mettre en œuvre. De plus, le fait de travailler sur une moyenne lissant les données et gommant toutes les sources de variabilité peut nous induire en erreur. En effet, ces différences de vitesses de croissance et de distances entre la pointe et le premier poil peuvent suggérer qu'il existe peut-être des modes d'élongation distincts entre les racines. Il est donc crucial de pouvoir revenir sur une étude fondée sur les racines individuelles.

L'accès à un nouveau système d'acquisition IR va nous permettre d'améliorer la qualité des données et de ne plus travailler sur des moyennes de racines, mais sur des racines individuelles.

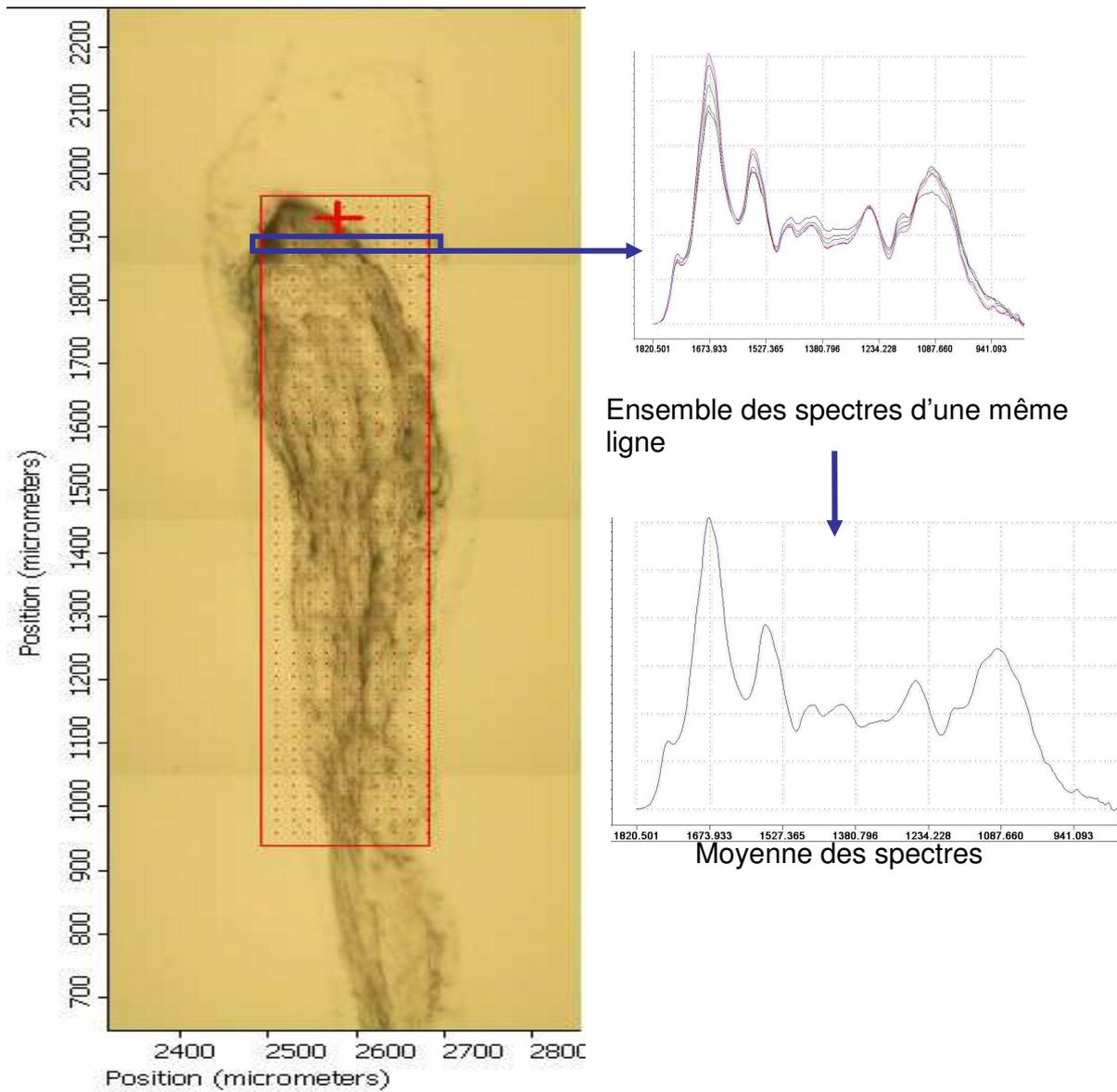


Figure 40 : Réduction d'une cartographie 2D en cartographie 1D en moyennant les spectres.

Seconde approche : Mapping

Cette nouvelle approche utilise un multidétecteur IR (XL-Array Imaging Nicolet 6700 de chez ThermoFisher Scientific) pour faire de la cartographie plus rapidement et automatiquement. Au lieu de faire du point par point, ce nouveau détecteur peut collecter jusqu'à 32 spectres en même temps. Ce détecteur est constitué de 2 barrettes séparées de 90 μm qui se déplace le long de l'échantillon. De plus, ce système permet de descendre en résolution et d'obtenir des points tous les 15 μm de meilleure qualité.

Ainsi, le nombre de spectres obtenus le long de l'axe d'élongation est augmenté, et il n'y a plus un point unique par position mais entre 5 et 9 points. Le nombre de points dépend de l'épaisseur de l'échantillon après écrasement sur la lame. Ainsi, en moyennant les spectres d'une même position, nous pouvons lisser les variabilités et améliorer encore la qualité des spectres.

1- Premiers clustering

4 jours d'expérimentation (4, 5, 12 et 13 février 2008) ont permis d'acquérir 14 cartographies de racines contrôles. Afin de diminuer la variabilité pour chaque position le long de l'axe d'élongation, les spectres sont moyennés en ligne (c'est à dire dans le sens transversal de la racine) (figure 40). La cartographie 2D réalisée est ainsi réduite à une cartographie 1D : un spectre moyenné par positions le long de l'axe d'élongation. La taille des racines varie entre 79 et 91 spectres par racines. Les spectres sont ensuite normalisés avec la méthode proposée par Mouille *et al* (2003) et un clustering hiérarchique est réalisé sur chaque racine (figure 41).

Le nombre de clusters est choisi en fonction de l'homogénéité des clusters formés. Nous cherchons à partitionner les spectres avec un nombre maximum de clusters. Si les clusters formés regroupent plus de $\frac{1}{4}$ de spectres discontinus, alors ils sont considérés non viables.

Utilisant ce critère de sélection, les résultats obtenus pour le calcul des clusters ne sont pas ceux attendus. En effet, **les regroupements formés ne contiennent pas toujours de positions qui se suivent dans le temps, et ils ne sont pas reproductibles entre les racines.**

Le nombre de spectres par racines et le nombre de points moyennés par position étant variables d'une racine à l'autre, il se peut que ces critères jouent un rôle particulier pour l'analyse des cartes. De plus, la normalisation des spectres acquis sur hypocotyles utilisée pour la normalisation des spectres acquis sur racines, est controversée par certains spectroscopistes et n'est peut-être pas adaptée à nos travaux.

En effet, plusieurs équipes INRA travaillent sur des données IR et chaque équipe utilise une méthode particulière de normalisation et d'analyse. Nous avons donc testé une autre façon de normaliser les données en calculant les dérivées secondes (Luo *et al.*, 2005). La figure 42 montre les résultats du clustering hiérarchique effectué sur les mêmes racines normalisées par le calcul des dérivées secondes.

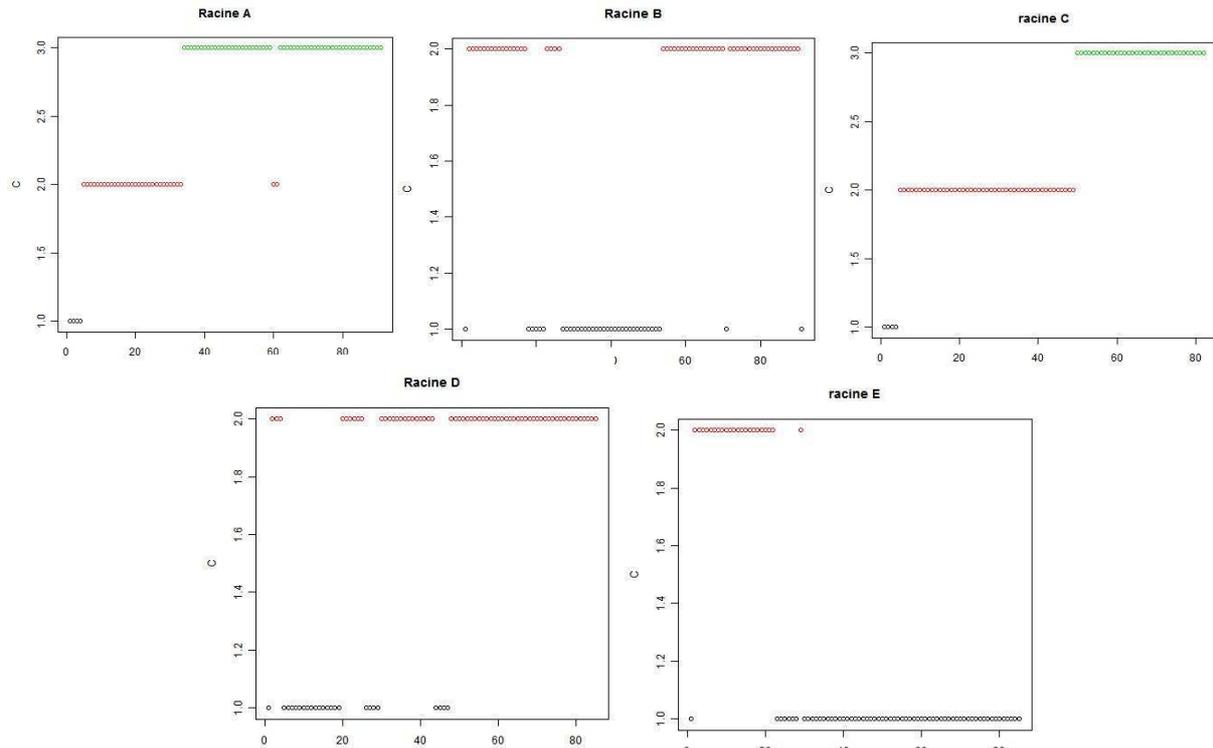


Figure 41 : Clustering hiérarchique présenté sur 5 racines individuelles dont les spectres sont normalisés selon la méthode de Mouille *et al* (2003). En ordonnée, le nombre de clusters et en abscisse, le nombre de spectres entre la pointe et le premier poil racinaire.

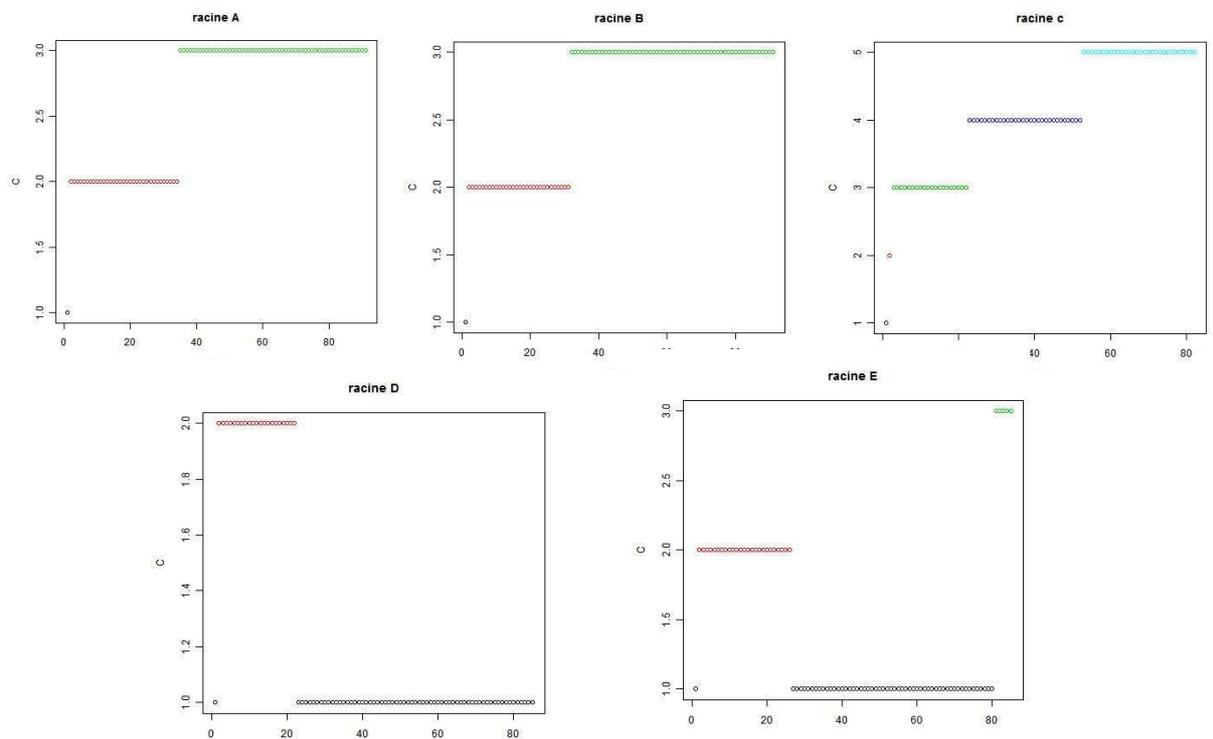


Figure 42 : Clustering hiérarchique présenté sur 5 racines individuelles dont les spectres sont normalisés par le calcul de la dérivée seconde. En ordonnée, le nombre de clusters et en abscisse, le nombre de spectres entre la pointe et le premier poil racinaire.

Cependant, un spectre dérivé et un spectre normalisé selon la méthode de Mouille *et al* (2003) ne vont pas donner les mêmes informations. Les spectroscopistes considèrent que le calcul de la dérivée seconde lisse les données et surtout ne donne plus que des informations qualitatives sur l'échantillon étudié. Seuls les shifts (changements dans les épaulements, donc dans la structure de l'échantillon) seraient parfaitement lisibles. Quant aux spectres ne contenant que des absorbances classiques, ils donnent des informations quantitatives. Les hauteurs des pics d'absorbances renseignent sur la quantité de matériel présent dans l'échantillon et donc de l'évolution de cette quantité au cours de l'élongation cellulaire.

Pourtant, il serait surprenant que les changements de quantité d'un produit (par exemple un doublement de la quantité) n'affecte pas la structure de l'échantillon. Ainsi, pour l'étude de la paroi, des changements importants dans la quantité de cellulose change la rigidité, donc l'interaction entre les différents composés et donc la structure de l'échantillon.

Ainsi, l'étude de la segmentation sur les dérivées secondes et l'observation des spectres «classiques» devrait nous permettre de voir les changements qualitatifs mais aussi quantitatifs des composés pariétaux.

2- Segmentation de dérivées secondes

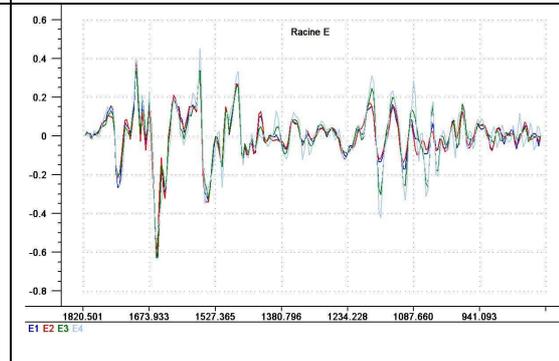
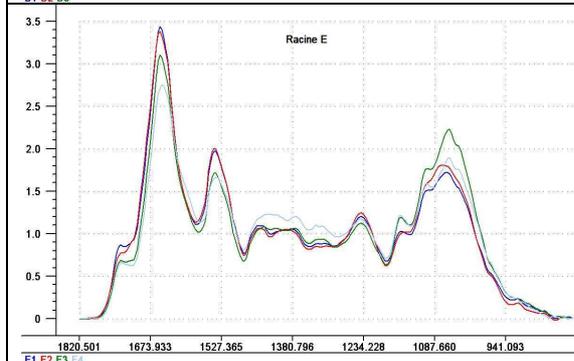
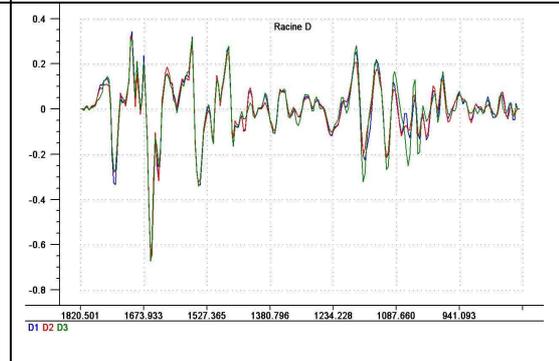
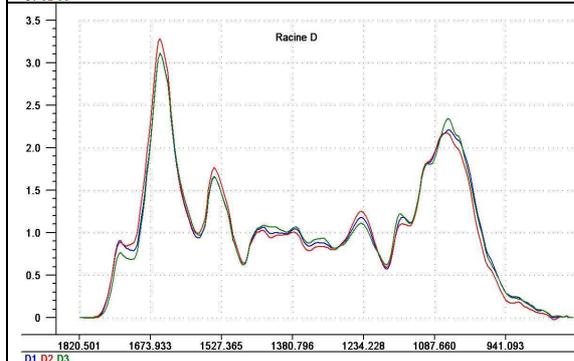
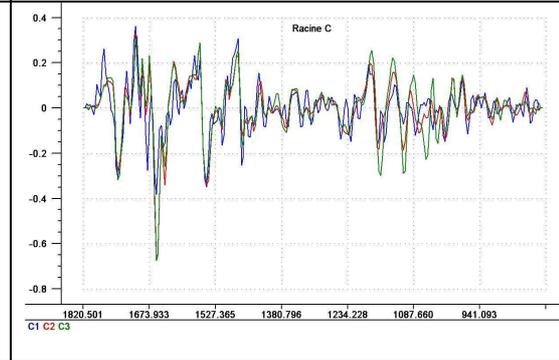
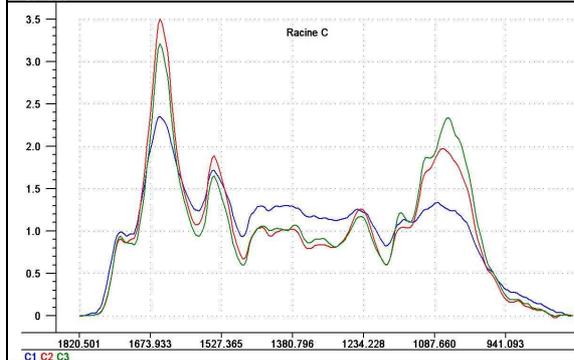
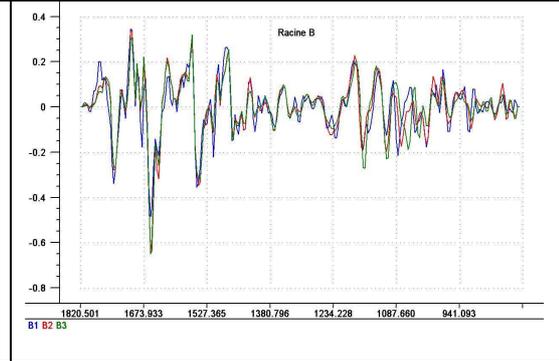
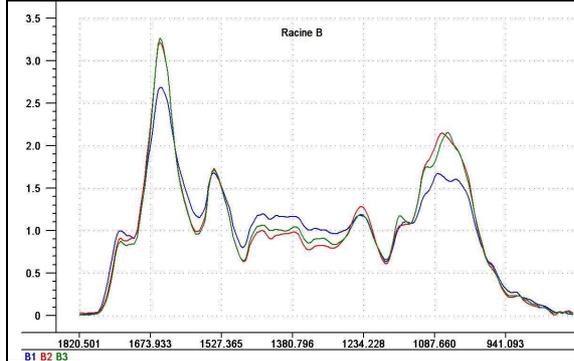
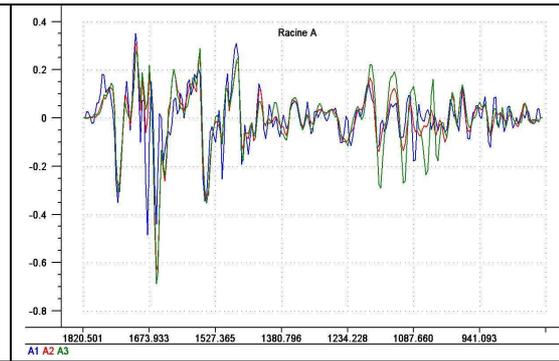
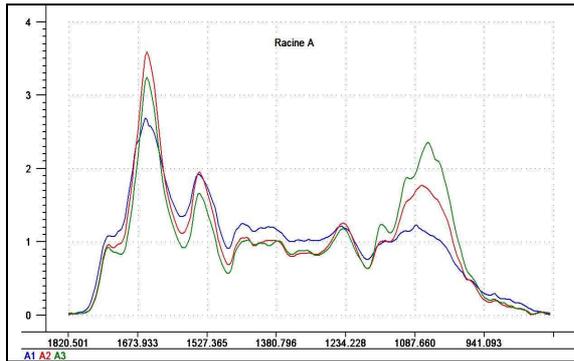
Le calcul des dérivées secondes sur les spectres bruts des cartographies a mis en lumière quelques anomalies de saturation dans 4 cartographies de racines non visibles sur les spectres normés. Elles sont donc éliminées de l'analyse.

Les données obtenues pour les racines conservées sont les suivantes (Tableau 2):

Identifiant racine	Nombre de points par ligne	Nombre de spectres	Segmentation	Clusters
A	9	91	0-1-5-32- 91	0-1-35-91
B	9	91	0-1-31-91	0-1-31-91
C	9	82	0-1-2-39-82	0-1-2-52-82
D	7	85	0-23-85	0-23-85
E	5	85	0-26-80-85	0-27-80-85
F	6	85	0-3-36-85	0-19-60-85
G	7	84	0-4-23-72-84	0-6-23-75-78-85
H	7	91	0-26-64-91	0-1-27-91
I	7	79	0-4-30-79	0-5-31-79
J	6	91	0-21-65-91	0-21-65-91

Tableau 2 : Résultats de la segmentation et du clustering hiérarchique sur les dérivées secondes.

Le nombre de segments trouvés varie de 2 à 4, et ce nombre ne dépend pas du nombre de spectres acquis sur de la racine. En effet, la racine A et B ont chacune 91 spectres et pourtant la racine A est segmentée en 4 segments tandis que la racine B est segmentée en 3 segments. De plus, deux racines de même longueur ayant la même partition n'ont pas les mêmes segments. Les racines E et F ont chacune 85 spectres et 3 segments, mais les points de ruptures ne sont pas placés au même endroit : la racine E possède un premier segment de 390 μm (26 spectres tout les 15 μm), puis un segment 2 de 795 μm et un segment 3 de 75 μm , la racine F a un segment 1 de 45 μm , un segment 2 de 495 μm et un segment 3 de 780 μm .



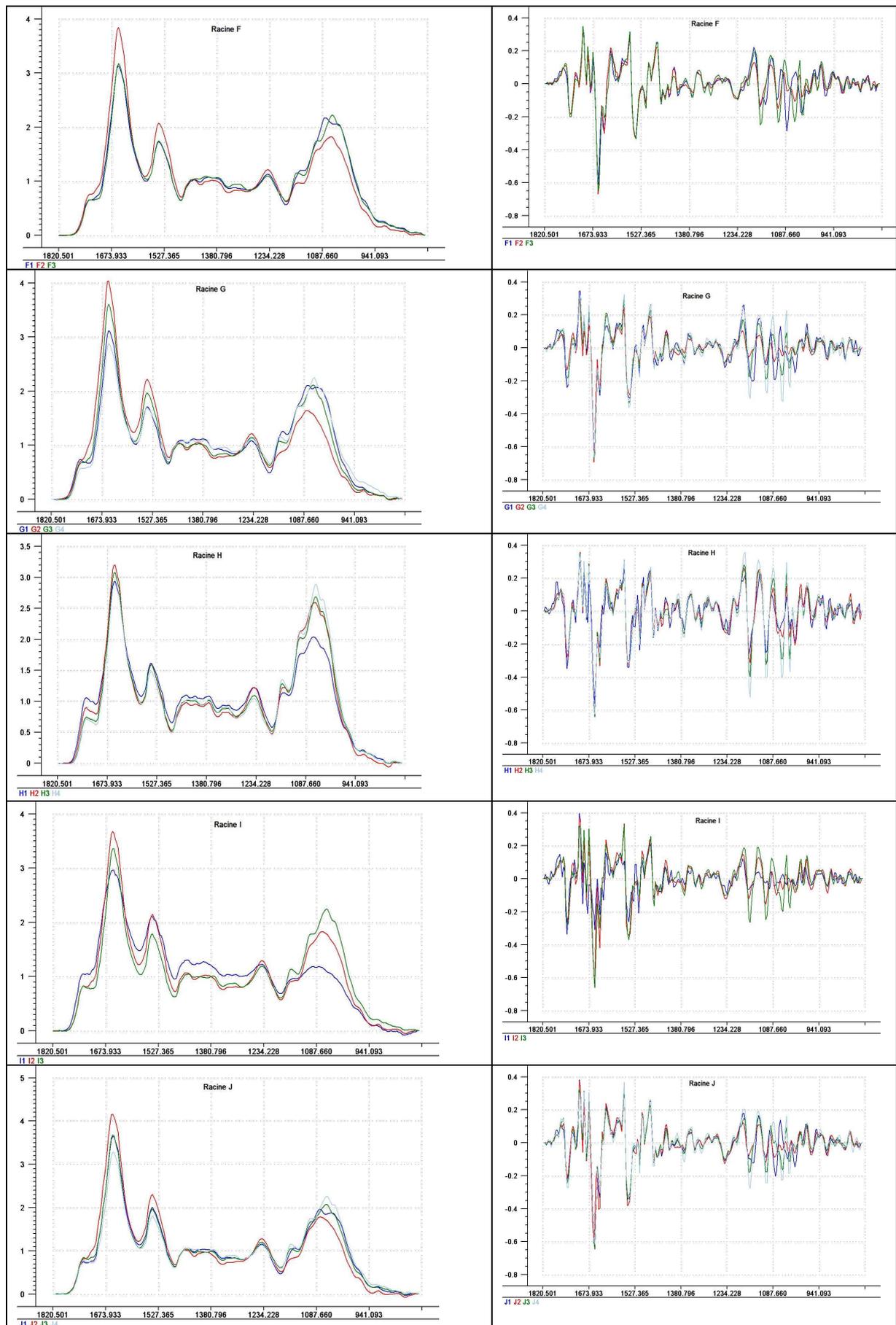


Figure 43 : à gauche, représentations des segments (spectres moyens normalisés selon la technique de Mouille *et al* (2003)) pour chaque racine contrôle, et à droite, les segments sont représentés pour des spectres moyens dérivés.

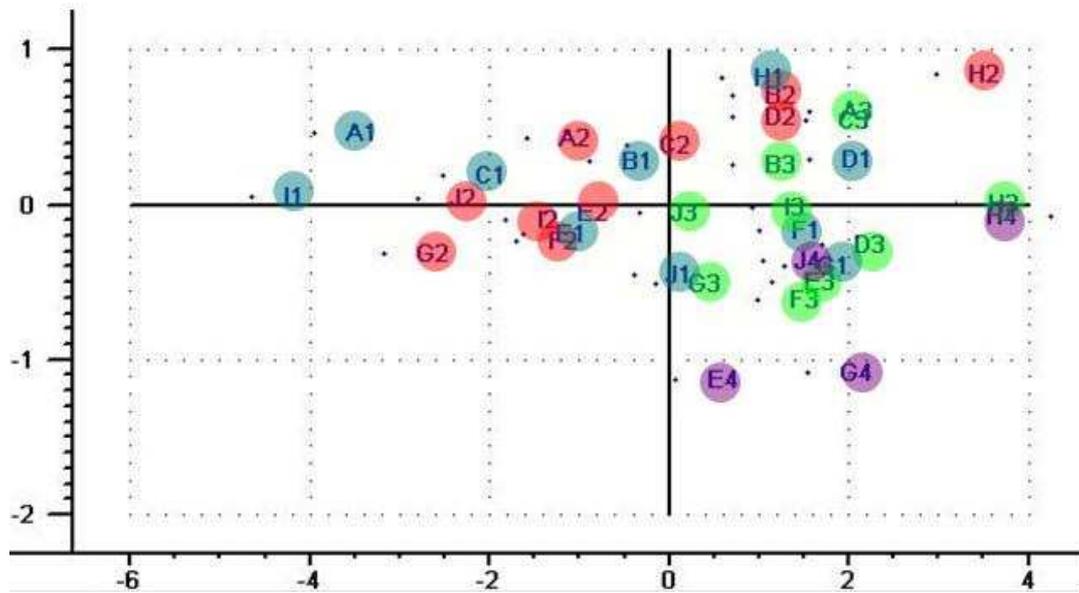


Figure 44 : Analyse en Composantes Principales de l'ensemble des segments (spectres moyennés et normés selon la technique de Mouille *et al* (2003)). 63% d'inertie sur l'axe 1 et 4% sur l'axe 3.

L'observation de la segmentation sur des spectres dérivés suggère que certaines racines ont perdu leur coiffe lors de la préparation des échantillons ou que cette coiffe n'est pas correctement détectée. Les racines D, E, H et J n'ont aucun segment en début de racine montrant la présence de cette coiffe. Nous supposons que les 5 premiers spectres correspondent aux spectres de la coiffe et qu'ils constitueront le segment 1.

Les spectres sont moyennés par segments pour voir les spécificités des segments des uns par rapport aux autres, et vérifier que la segmentation faite sur une même racine donne des zones distinctes en composition et/ou en structure (Figure 43).

L'étude des dérivées secondes ne permet de conclure que sur des aspects qualitatifs des résultats, l'étude des spectres bruts normalisés en parallèle est donc indispensable pour avoir un aspect quantitatif.

Les segments définis par l'algorithme pour chaque racine sont tous différents, aussi bien quantitativement que qualitativement. Cependant, les segments 1 et 2 des racines D, E et H se ressemblent. Notre système de coiffe artificielle dans le cas de ces 3 racines n'était pas approprié. Il semble donc que ces échantillons aient perdu leur coiffe pendant la préparation. Par contre, le segment 1 de la racine J est différent du segment 2, la coiffe n'avait pas été bien détectée.

La segmentation a donc bien produit des zones homogènes et distinctes le long de l'axe d'élongation.

Cependant d'un point de vue biologique, certains segments sont insolites. Par exemple, la segmentation de la racine F semble beaucoup plus logique que la segmentation de la racine E ou la racine G. En effet, on s'attend à ce que la taille des zones obtenues soit proportionnelle à la taille des cellules en croissance. Plus les cellules s'allongent, plus les zones sont grandes. La coupure en position 80 de la racine E, formant le segment 4, semble donc peu appropriée, or elle apparaît aussi lors du clustering hiérarchique et ce segment ressemble beaucoup au segment 3. Nous pouvons supposer que soit la zone d'élongation cellulaire a été dépassée, la distance d'étude a peut-être été modifiée lors de la préparation de l'échantillon, ou soit certaines cellules en fin d'élongation sont polarisées et présentes des caractéristiques différentes. En effet, une cellule en fin d'élongation fait environ 150 μm de longueur, donc un segment de 75 μm en fin de racine pourrait correspondre à une polarisation cellulaire, ou un défaut dans l'échantillon.

Il semble difficile au vue de l'observation des spectres moyennés et normés selon la technique de Mouille et al (2003) d'attribuer une composition et une structure spécifique à chaque zone. Les racines individuelles semblent avoir des zones et des tailles de zones différentes et l'ACP sur l'ensemble des segments ne permet pas de les séparer en fonction des zones attribuées (Figure 44).

La segmentation sur des spectres moyennés et normés selon la technique de Mouille et al (2003) n'est pas une méthode pertinente pour définir des zones homogènes le long de l'axe d'élongation de la racine. Certains segments se ressemblent et se retrouvent donc proches comme par exemple F3, J4 et G1, mais leur position le long de l'axe d'élongation racinaire n'est pas identique.

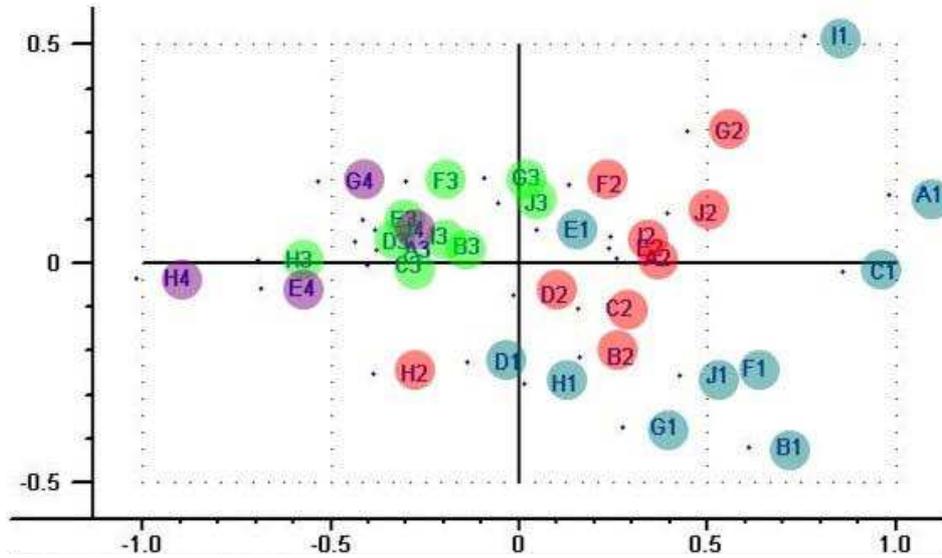


Figure 45 : Analyse en Composantes Principales de l'ensemble des segments (dérivées des spectres moyennés sur les racines contrôles). 49% d'inertie sur l'axe 1 et 9% sur l'axe 3.

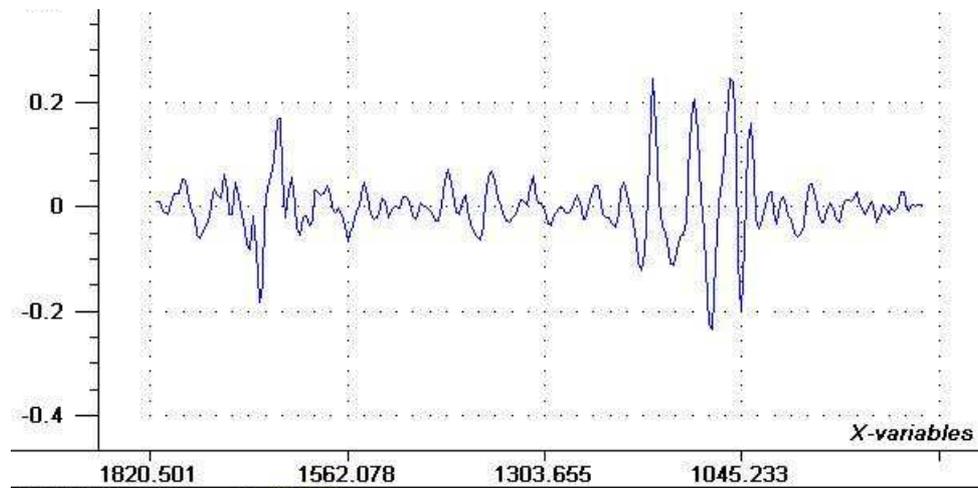


Figure 46 : Loadings obtenus sur la première composante de l'ACP effectuée sur la moyenne des segments des spectres dérivés. 49% d'inertie sur l'axe 1.

Cependant, l'ACP sur les dérivées des spectres moyens par segment pour toutes les racines permet de les distinguer assez nettement (Figure 45).

Les résultats de l'ACP montrent que les différents segments peuvent être séparés sur la première composante. **La segmentation sur les spectres normalisés par le calcul des dérivées secondes est donc une méthode pertinente pour définir des zones homogènes le long de l'axe d'élongation de la racine.**

Les segments 1 peuvent être identifiés, sauf les segments D1, E1, et H1 qui sont plus proches des segments 2 (résultats attendus), et les segments 3 sont particulièrement similaires. Bien que les 4 segments 4 soient proches des segments 3, ils semblent avoir des caractéristiques communes assez fortes entre eux, et pourraient être traités séparément.

Les loadings (Figure 46) de cet ACP montrent que les NO responsables de ces différences sont 1677 et 1650 cm^{-1} pour les amides et 1160 , 1106 , 1083 , 1056 et 1045 cm^{-1} pour les polysaccharides.

Bien qu'on ne puisse pas résumer les spectres normés selon Mouille *et al* (2003) à des données quantitatives et les spectres dérivés à des données qualitatives, les résultats montrent que seuls les changements « qualitatifs » semblent reproductibles entre les racines. Or les changements de structure s'accompagnent sûrement de changements dans la quantité des différents composés de la paroi, bien que ces quantités ne semblent pas identiques le long de l'axe d'élongation de la racine mais aussi entre les racines elles-même pour une même zone.

Ainsi, la variabilité, que l'on avait observée sur les vitesses de croissance et la distance pointe – premier poil, est retrouvée ici et pose des difficultés pour interpréter les spectres d'un point de vue quantitatif, mais pas d'un point de vue qualitatif. Nous pouvons alors nous demander ce qui est exactement représenté dans le calcul des dérivées secondes et qui semble si reproductible comparé aux quantités relatives des intensités d'absorbance qui varient entre les racines. La distance pointe – premier poil ne paraît pas, à notre avis, être responsable de cette variabilité, mais il existe sûrement un rapport avec la vitesse de croissance. **Les changements dans la vitesse de croissance peuvent être liés à des modes d'élongation différents jouant sur la quantité des composés pariétaux.** Malheureusement, nous ne disposons pas des vitesses de croissance des racines avant leur préparation pour les acquisitions IR.

De plus, la normalisation des spectres utilisée dans Mouille *et al* (2003), et les analyses des mutants qui ont été effectuées, n'ont pas été mis au point sur la racine, mais sur des hypocotyles. La taille des cellules dans les hypocotyles est beaucoup plus grande (1mm), les cellules sont non polarisées, et les spectres sont acquis sur deux types cellulaires avec peu ou pas de parois transversales. La préparation des échantillons et le nombre de répétitions sont donc appropriés aux hypocotyles mais peut-être pas aux racines. De même que le grand nombre de répétitions a permis d'appliquer des techniques de sélection de variables permettant ainsi de cibler les NO les plus informatifs et de ne pas conserver l'ensemble des spectres.

5- Conclusion

L'utilisation d'un nouvel appareil IR permettant une cartographie rapide et précise nous a permis d'améliorer la qualité des spectres et de travailler sur racine individuelle. La segmentation, validée grâce au clustering hiérarchique, s'est révélée être une méthode robuste

pour l'analyse de nos données. 3 segments permettent de décrire les changements de composition et de structure de la paroi le long de l'axe d'élongation. Ces changements chimiques sont difficilement identifiables, mais semblent exprimer des différences de quantité et de qualité dans les polysaccharides. Les NO portant la variabilité ne permettent pas de définir des polysaccharides précis. En effet, les méthodes IR sont surtout utilisées dans le contrôle de la qualité de produits de composition connue. Les principaux utilisateurs sont les fabricants de molécules comme les laboratoires pharmaceutiques. Ils possèdent donc des spectres de références de l'ensemble des composés utilisés et vérifient les proportions de chacun. Nous avons adopté une démarche bien différente. En effet, nous ne connaissons pas la composition exacte de la paroi végétale, et nous ne possédons pas de spectres de référence. Quelques données sont disponibles comme par exemple des spectres de pectines purifiées. Cependant, il faut se méfier de ces données car nous ne connaissons pas la quantité de chaque composé pariétal, ni comment ils interagissent avec les composés voisins, ni quels types de modifications ils subissent au cours de la croissance.

Finalement nous rejoignons la conclusion obtenue dans l'étude de reproductibilité de la vitesse de croissance et la distance entre la coiffe et le premier poil : l'étude de racines individuelles montre la variabilité naturelle qui existe entre les racines. Les zones définies ne sont pas de la même taille et pour chaque zone, la composition et la structure de la paroi ne semblent pas identiques.

Existe-t-il une variabilité histologique ?

Afin de pouvoir améliorer la compréhension de la composition de ces 3 segments putatifs, on peut utiliser des anticorps spécifiques contre des épitopes de la paroi. L'acquisition de spectres IR oblige à la destruction des échantillons, ils ne peuvent donc pas être utilisés pour l'analyse anticorps, et *vice et versa*. Comme les racines sont écrasées pour permettre l'acquisition des spectres, les différents tissus se retrouvent surperposés, or la composition de la paroi pourrait être tissu spécifique.

Les polysaccharides pectiques sont structurellement complexes et les anticorps utilisés déterminent la distribution et l'organisation de domaines pectiques à l'intérieur de la matrice de la paroi primaire (Knox et al., 1991).

Un grand nombre d'anticorps ont été produit contre des épitopes de pectines, notamment les séries JIM, LM et PAM du laboratoire de Paul Knox (www.bmb.leeds.ac.uk/staff/jpk). Deux Anticorps, marquant les chaînes latérales apparaissant dans les RGI, seront utilisés lors de ces travaux. LM5 est dirigé contre les (1,4) β -D-galactanes et marque les petites cellules, LM6 reconnaît les (1,5) α -L-arabinanes et marque la coiffe et les cellules en expansion.

1- Marquages anticorps de surface

L'objectif de ces marquages est de vérifier l'hypothèse suivante : puisque la segmentation détecte des zones de taille différente pour chaque racine le long de l'axe d'élongation, le marquage anticorps LM5/LM6 en surface de la pointe racinaire ne devrait pas être identique d'une racine à l'autre.

Malgré de nombreuses répétitions, les photos prises n'ont pas permis de quantifier les différences entre les marquages. Les différences sont visibles, mais faire des mesures précises et correctes, s'est révélé une tâche impossible.

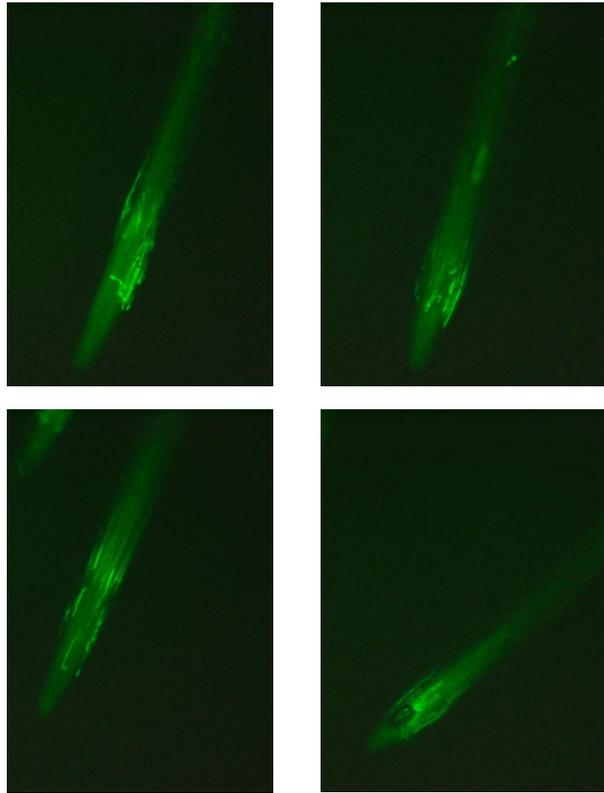


Figure 47 : Marquage de surface avec l'anticorps LM5 de racines d'*Arabidopsis* âgées de 5 jours après germination. Photos objectif 0.5X grossissement 6X

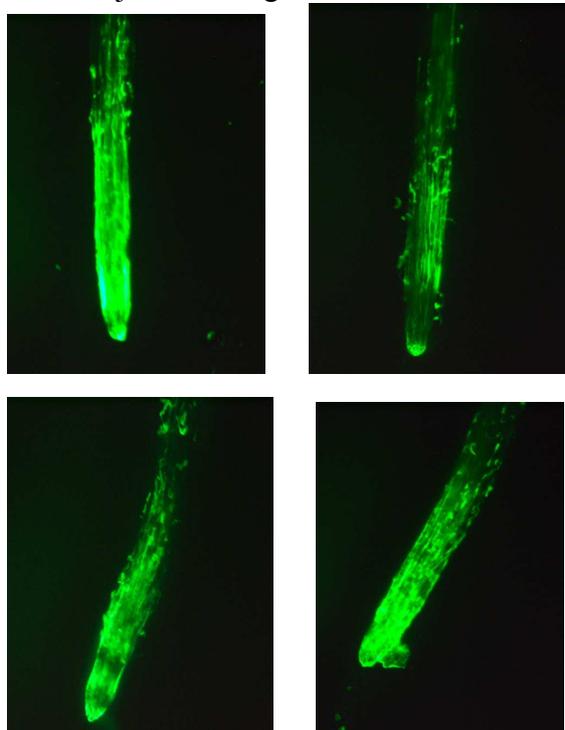


Figure 48 : Marquage de surface avec l'anticorps LM6 de racines d'*Arabidopsis* âgées de 5 jours après germination. Objectif 0.5X grossissement 6X

LM5

Cet anticorps est connu pour ne pas marquer les cellules de la coiffe, mais les petites cellules en division. La figure 47 montre les différents marquages obtenus sur différentes racines. Nous pouvons constater que **les différentes zones marquées ne sont pas de la même taille, notamment la distance entre la pointe et les premières cellules épidermiques marquées.**

LM6

Contrairement à LM5, l'anticorps LM6 marque spécifiquement la coiffe puis une zone suivant la zone de division, comprenant les cellules en expansion, et qu'on appelle le plus généralement la zone de transition. Les zones de division et de transition sont la plupart du temps réunies en une seule zone.

La figure 48 montre que **les marquages LM6 de surface de racines d'*Arabidopsis* présentent des profils différents.** En effet, sur les différents clichés, nous pouvons voir qu'il existe des racines dont la pointe est entièrement marquée, d'autres où la zone de division n'est pas marquée, et encore plus étonnant des racines comportant deux zones non marquées au niveau de la zone de division. Ce dernier type de marquage « alterné » au niveau de la pointe n'a pas vraiment d'explication biologique, mais c'est un phénomène que nous avons observé à de nombreuses reprises

2- Coupes immunologiques

Les marquages de surfaces présentant des différences d'une racine à l'autre, il est intéressant de voir comment se répartissent les anticorps au sein de coupes transversales et longitudinales de pointes racinaires.

LM5

Le marquage par LM5 montre bien une répartition différentielle des RGI entre les tissus (figure 49). Sur les coupes transversales, les cellules du cortex et du péricycle ne sont pas marquées, tandis que l'on voit clairement entre les deux tissus, les cellules de l'endoderme. Sur les coupes longitudinales, le cortex est visiblement éteint et la coloration au dapi permet de vérifier que les cellules sont bien présentes. Cependant, il est plus difficile de distinguer les cellules du péricycle sur ce type de coupe, mais le zoom effectué dans cette région suggère que le marquage est beaucoup plus faible entre l'endoderme et les vaisseaux.

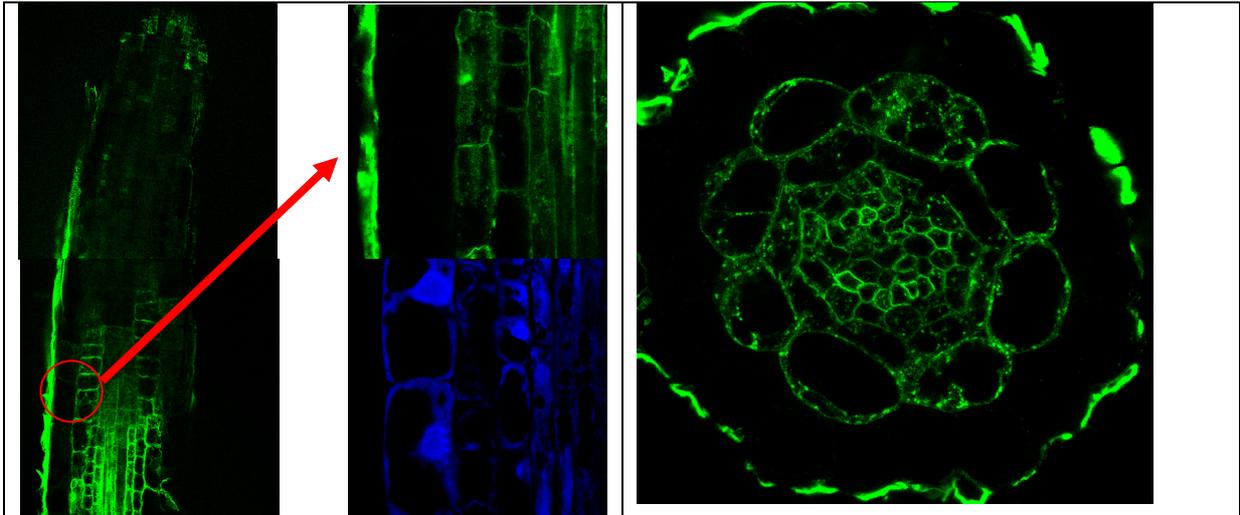


Figure 49 : Marquages LM5 sur des coupes de racines d'*Arabidopsis*. A gauche, coupe longitudinale, à droite coupe transversale. objectif 40X

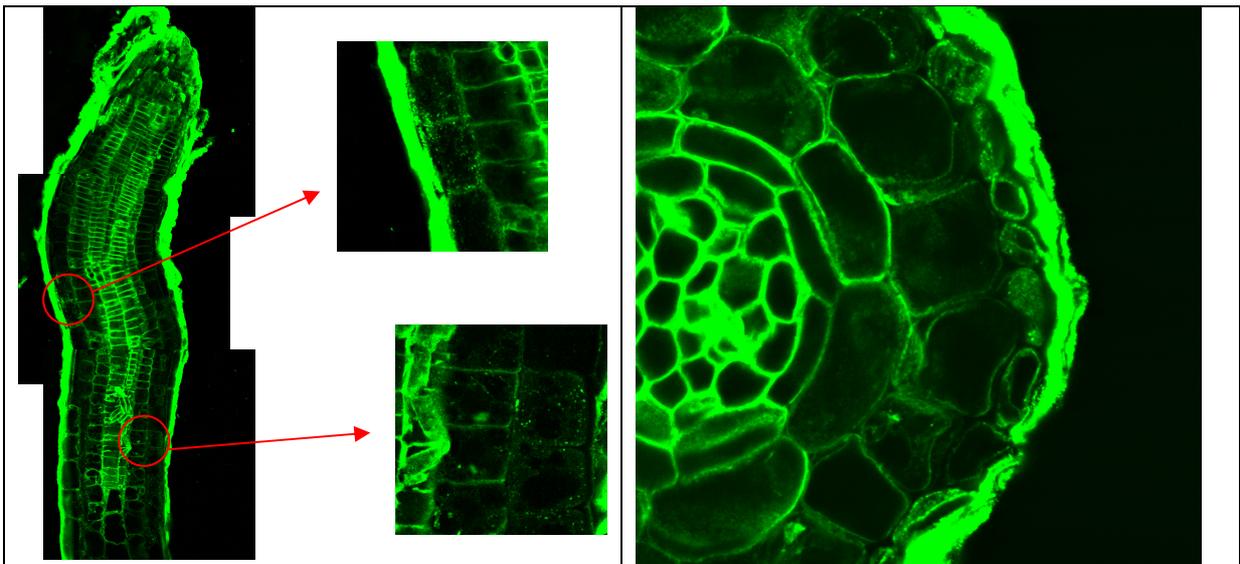


Figure 50 : Marquages LM6 sur des coupes de racines d'*Arabidopsis*. A gauche, coupe longitudinale, à droite coupe transversale. Objectif 40X

LM6

Le marquage de coupes longitudinales et transversales par LM6 ne semble pas mettre en évidence de différence entre les tissus (figure 50). LM6 marque les cellules de la coiffe qui remonte haut le long de l'épiderme. Les cellules du cortex, qui se situent juste en dessous de l'épiderme, présentent beaucoup moins de marquage que les autres tissus, et de nombreux spots verts sont visibles dans certaines cellules corticales pouvant suggérer un stockage vésiculaire dans le cytoplasme de molécules de RGI.

3- Conclusion

Ces différents résultats confirment **qu'il existe une variabilité histologique intra et inter racine de la composition et/ou de la structure de la paroi primaire**. Les zones de l'épiderme marquées par LM5 et LM6 varient selon la racine étudiée, et les différents tissus ne présentent pas le même marquage, donc une composition différente, sur une même section représentant un stade d'élongation.

Ces données permettent de comprendre pourquoi les segments décrits en IR ne sont pas réguliers pour chaque racine, car la préparation des échantillons ne nous permet pas de différencier les différents tissus. Ainsi, pour un spectre à une position *i* donné le long de l'axe d'élongation, nous superposons des parois de compositions différentes, et les racines n'étant pas synchronisée, ce spectre sera différent d'une racine à l'autre à la même position.

Existe-t-il une variabilité transcriptionnelle ?

Les puces à ADN et notamment les microarrays sont les techniques les plus répandues pour l'étude des gènes et de leurs transcrits. L'identification de nouveaux marqueurs GFP a permis à l'équipe de Philip Benfey d'utiliser cette technologie pour démontrer que les gènes sont différemment exprimés dans les tissus racinaires pour plusieurs stades de développement (Birnbaum et al., 2003; Brady et al., 2007). La méthode mise au point s'appelle le *digital in situ*. Les résultats publiés portent essentiellement sur l'étude des facteurs de transcription ou la répartition des hormones comme l'auxine et les gibberellines.

Les résultats supplémentaires sont accessibles sur Internet et nous avons essayé de mettre en évidence la répartition transcriptionnelle des gènes relatifs à la paroi primaire.

1- Découpage de la pointe racinaire en 15 zones

Les premières puces sont réalisées avec 5 marqueurs GFP (la stèle, l'endoderme, l'endoderme-cortex, l'épiderme et la coiffe latéral) dont la répartition est étudiée pour 3 stades de développement (le méristème et la coiffe, zone de division et la zone d'élongation) (Birnbaum et al., 2003) (figures 24 et 25). Ils mettent en évidence 8 profils moyens qui expliquent 85% de la variation des 5717 gènes restant dans les analyses (figure 51).

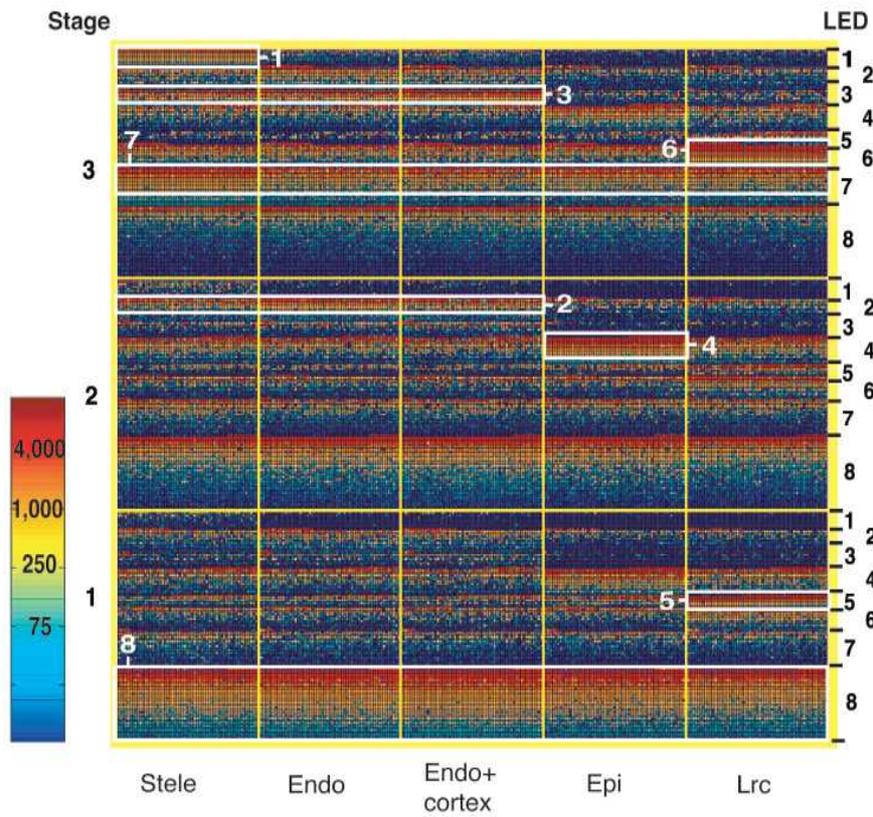


Figure 51 : Cartographie de l'expression globale des profils pour l'activité des gènes dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*.

Le fichier de supplément de ce papier donne le taux de transcrits des gènes pour chaque marqueur dans chaque stade de développement. **Parmi les 5717 gènes restant, 138 gènes, soit 2,4%, sont référencés comme des enzymes agissant sur des composés de la paroi primaire.**

Ainsi, nous disposons de 3 gènes de CESA, 2 pour les expansines, 19 pour les PME, 13 pour les XET, 23 pour les hydrolases, et 78 pour les glucanases dont 22 pour les (1,4) β endoglucanases et 38 pour les (1,3)- β -glucanases. Ces gènes, détectés significativement par la procédure, sont pour la plupart des gènes dont la fonction est putative et reste à être validée. De plus, seuls 61 des 138 gènes ont été attribués à l'un des 8 profils détectés par le *digital in situ*.

Les 3 transcrits des CESA sont majoritairement exprimés dans la stèle dans la zone d'élongation (profil 1). Une expansine est majoritaire dans le profil 1 avec les CESA, et l'autre dans la stèle, l'endoderme et le cortex dans la zone de division. Seules 42% des glucanases sont attribuées à un profil : 36% des (1,4)- β -endoglucanases sont dans le profil 1, et 1% dans le profil 6. Les (1,3)- β -glucanases sont 18% dans le profil 8 et 13% dans le profil 7 (ubiquitée tissulaire dans la zone d'élongation et dans la zone méristématique). Seuls 5 transcrits sont attribués à un profil compris dans la zone de division (nommé stade 2). Pour les PME, 26% des gènes sont assignés et ils se trouvent dans les zones de division ou d'élongation (profils 2, 3 et 7). Enfin, 43% des hydrolases sont attribuées à un profil, et elles sont retrouvées dans tous les tissus et dans les 3 stades de développement.

Ces résultats fournissent quelques indications sur la position des gènes relatifs à la paroi primaire. Cependant, trop peu de gènes sont représentés et il faudrait une analyse plus fine pour définir l'expression exacte des gènes. **Cette étude met en évidence une expression différentielle des transcrits pour les différents stades de développement de la pointe racinaire.**

2- Découpage de la pointe racinaire en 228 zones

5 ans après ces premières puces à ADN, l'équipe de P. Benfey dispose de 19 marqueurs. Ils décident donc de découper la racine en 12 tranches dont la taille est proportionnelle à la taille des cellules (Brady et al., 2007). Plus les cellules s'allongent, plus la section est grande. Les profils transcriptionnels sont étudiés le long de l'axe d'élongation (profil longitudinal, noté PL) ou au sein d'une section pour définir la répartition en fonction des tissus (profil radial, noté PR).

Dans cette étude les résultats sont ciblés sur le comportement de l'auxine, mais les données sont récupérables sur Internet. Là encore, nous ne disposons pas de l'ensemble des gènes mais uniquement les gènes annotés « PRIMARY CELL WALL » par l'équipe de P. Benfey et dont le programme de *digital in situ* a reconnu un PR et/ou un PL. Au-delà de la section 8, les profils obtenus ne nous intéressent plus car les transcrits se situent en dehors de la zone d'élongation, la section 9 étant définie à partir du premier poil racinaire (figure 27).

Une centaine de profils le long de l'axe d'élongation ont été définis ainsi qu'une cinquantaine de profils au sein d'une section. Cependant, les PL et PR des transcrits d'intérêts peuvent être regroupés en 3 PL majeurs et 3 PR majeurs (figures 52 et 53). Seuls 32 gènes ont été référencés comme ayant une action sur la paroi primaire. L'ensemble de ces gènes ne sera pas commenté car les fonctions sont très hétérogènes et ne comportent souvent qu'un seul représentant. Cependant, 7 gènes de CESA, 3 PME et 1 gène codant une (1,4)- β -D endoglucanase se distinguent de ce groupe de transcrits.

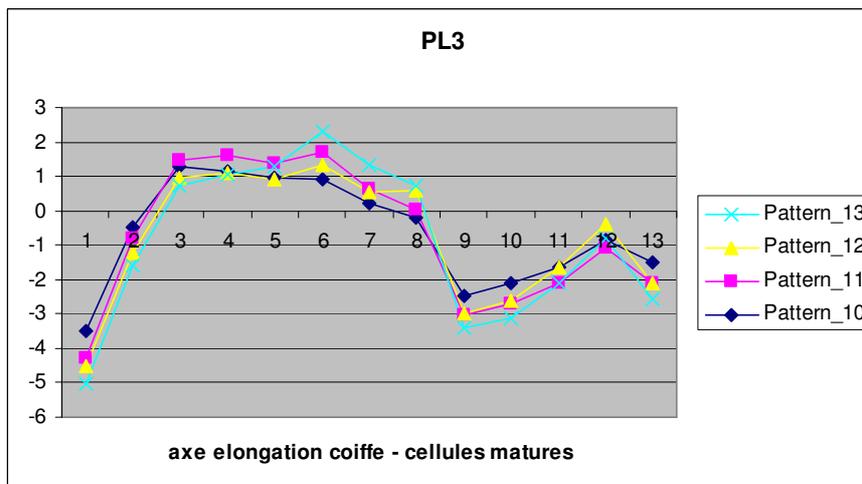
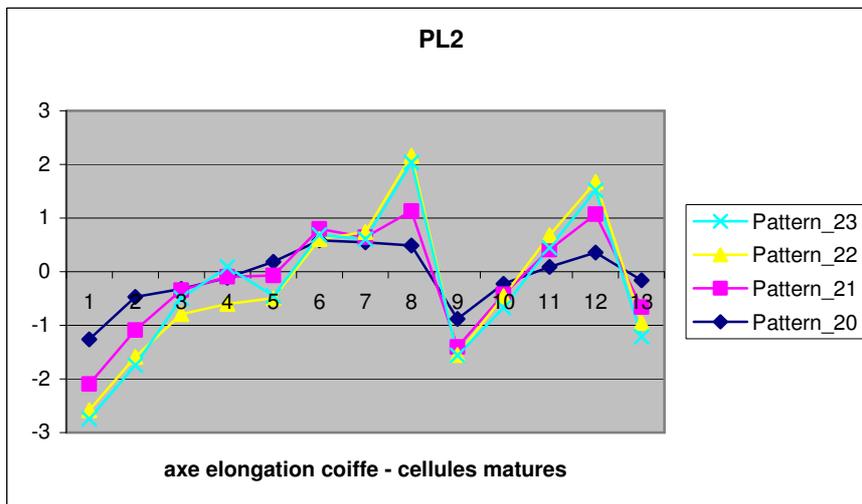
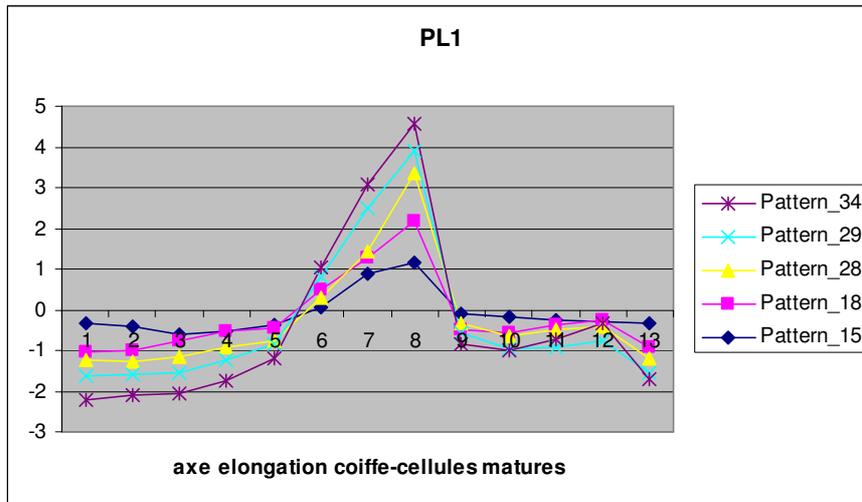


Figure 52 : Taux de transcrits le long de l'axe d'élongation pour 3 profils longitudinaux (PL) (Brady et al., 2007)

L'évolution du transcrit de la glucanase au cours du développement suit le PL1, et sa répartition spatiale suit le PR2. Ce transcrit est majoritairement présent dans le xylème méristématique et surtout dans le xylème mature. Le PL1 montre que ce transcrit n'est pas présent dans la coiffe et commence à apparaître à la fin de la zone méristématique (section 6), puis sa concentration augmente fortement dans la zone d'élongation. Cette glucanase est donc plus spécifique de l'élongation pariétale que de la division pariétale des cellules de xylème.

Les 3 transcrits de PME ne sont pas associés à un PR, ceci suggère qu'ils sont présents dans tous les tissus de façon identique. Leur comportement le long de l'axe d'élongation racinaire suit le PL3. Ils ne sont pas présents dans la section 1 correspondant au centre quiescent, et ils apparaissent à partir de la section 2. Le taux de transcrits augmente fortement dans cette section 2 pour atteindre un plateau qui sera maintenu dans toute la zone méristématique. La concentration en PME va décliner dans la zone d'élongation jusqu'à disparaître juste avant d'entrer dans la zone de différenciation. Nous pouvons donc conclure que les PME ne sont pas des tissus spécifiques et qu'elles sont très actives dans la zone méristématique.

Enfin concernant les 7 transcrits de CESA, les résultats obtenus sont plus difficiles à interpréter. Seules les sous-unités CESA6, CESA1 et CESA3 ont été identifiées. Pour CESA6, 2 transcrits suivent le PL1. Ces transcrits sont fortement exprimés dans la zone d'élongation dans tous les tissus. En outre, un gène de CESA6 est défini par le PL3 et le PR3. Il est donc très actif dans la zone méristématique, puis déclinant au cours de l'élongation cellulaire. Il est plutôt localisé dans le cortex et les cellules du xylème. Pour le transcrit associé à CESA3, il se comporte comme un transcrit de CESA1, selon le PL2. Ils sont présents dans tous les tissus et s'expriment dans la phase d'élongation. L'expression de ces transcrits s'effectue en 2 étapes. En effet, deux pics de croissance successifs sont observés avant une chute brutale du taux de transcrits dans la zone de différenciation. L'autre transcrit de CESA1 a un comportement différent et suit le PL1, c'est – à – dire que CESA1 a une augmentation linéaire de son taux de transcrits dans la zone d'élongation avant une chute brutale dès le début de la zone de différenciation cellulaire.

3- Conclusion

Ces études transcriptionnelles, fondées sur la technologie des puces à ADN, apportent des réponses sur le comportement des gènes lors du développement de la pointe racinaire. Cependant, les informations sont difficiles à analyser et l'ensemble des gènes ne peut pas être interprété.

A peine 2% des gènes étudiés avaient des fonctions qui pouvaient modifier la paroi primaire, mais leur analyse a permis de démontrer que **certains gènes sont transcrits préférentiellement dans certains tissus à un stade précis du développement.**

Conclusion générale

Bien que la racine soit un organe de structure simple et largement étudié, tout n'est pas si évident qu'il n'y paraît. Il y a une dizaine d'années, les scientifiques commençaient à s'apercevoir que les racines étaient très sensibles à des micro-variations environnementales (Beemster and Baskin, 1998). L'évolution des appareils de mesure et l'apparition de

nouvelles technologies comme les microarrays et la FTIR ont permis de montrer que malgré une organisation identique, les racines se développent et croissent de manière individuelle.

L'analyse des vitesses permet de mettre ce phénomène individuel en lumière. Bien que les racines ne soient cultivées que dans des conditions identiques, et que leur vitesse de croissance n'est pas significativement différente, la longueur de la zone entre la coiffe et le premier poil racinaire est propre à chaque individu. Il s'ensuit que les racines ne sont pas du tout synchronisées. Les études IR montrent que les différents segments représentant les différentes étapes du développement ne sont pas de taille identique entre les racines. Combinés à des études allemandes sur les zones de croissance maximale (Walter et al., 2002; Walter and Schurr, 2005) et les phénomènes oscillatoires de l'auxine et du pH le long de l'axe d'élongation (Grieneisen et al., 2007), ces résultats suggèrent que les racines se développent par à coup. Elles choisiraient de privilégier certaines actions par rapport à d'autres, une alternance entre élongation et division cellulaire par exemple. N'étant pas synchronisées et très influencées par leur environnement immédiat, les racines auraient ainsi une croissance individuelle.

De plus, les résultats de microarrays démontrent parfaitement que selon les étapes du développement, les tissus n'expriment pas les mêmes gènes. Les études IR ne prennent pas en compte cette diversité, car les racines sont écrasées afin que l'analyse pariétale soit possible. L'utilisation de coupe n'est pas envisageable car il n'y aurait pas assez de matériel pour obtenir un spectre correct. L'arrivée d'un dissecteur laser sur la plate-forme de cytologie et d'imagerie végétale du site de Versailles va peut-être permettre de prendre en compte l'aspect tissulaire en IR. En effet, cet appareil permet de découper les différentes cellules de petits échantillons. Une concentration suffisante de cellules d'un seul type cellulaire pourrait permettre d'envisager l'étude de la qualité de la paroi pour un stade précis du développement et pour un tissu défini.

Effets des herbicides DCB et Isoxaben sur la croissance racinaire

Introduction

Les pesticides que nous utilisons aujourd'hui n'existaient pas avant la seconde guerre mondiale. En effet, la plupart des pesticides utilisés couramment dans l'agriculture intensive, ont été développés pendant la seconde guerre mondiale lors de la mise en place des attaques chimiques. Les insecticides à base de phosphates organiques ont été développés à partir des gaz neurotoxiques, et les herbicides phénoxy ont été créés pour éradiquer les cultures de riz japonaises. Plus tard, ils ont été utilisés comme composants dans la fabrication de l'agent orange permettant de déforester de larges portions de la jungle japonaise (Sanborn et al., 2004).

A partir des années 1970, ces agents chimiques ont été introduits comme herbicides et pesticides dans la production alimentaire agricole et dans les jardins individuels. Il servent aussi d'insecticide dans l'éradication des moustiques (Sanborn et al., 2004). De nombreuses études ont alors été effectuées pour évaluer leur impact sur la santé humaine et sur l'environnement. Certains liens causals entre des formes de cancer et l'utilisation de certains pesticides, seront mis en évidence dans les années 90, mais globalement malgré la pollution engendrée et les dangers sur la santé, ces produits seront utilisés à forte dose pour augmenter la production alimentaire des pays industrialisés (Sanborn et al., 2004).

1- L'Isoxaben

Introduit en France en 1984, l'Isoxaben est un herbicide de la famille des benzamides. Il est principalement utilisé pour éliminer ou limiter la croissance des plantes parasites dans les gazons, les plantes ornementales ou les petites céréales. Il perturbe le développement de la tige et de la racine lors de la germination des graines, mais aussi lors de la croissance des plantes. Ce produit est persistant dans le sol, soluble dans l'alcool et potentiellement carcinogène. Bien qu'il soit classé comme un toxique du développement et de la reproduction végétale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ne considère pas l'Isoxaben comme un risque pour la santé humaine dans des « conditions normales » d'utilisation.

Dès la fin des années 80, les scientifiques cherchent à connaître l'action exacte de ce pesticide sur le développement des plantes. Des semis d'*Arabidopsis* sur des milieux *in vitro* comportant de l'Isoxaben meurent avant le stade feuille et ne développent pas leur système racinaire. Comparé à d'autres herbicides, l'Isoxaben, utilisé dans de très faibles concentrations de l'ordre du nanomolaire, inhibe l'incorporation de glucose dans les parois végétales (Heim et al., 1990). Les résultats de cette étude montrent que parmi l'ensemble des herbicides testés, seul l'Isoxaben est un inhibiteur puissant et spécifique de la biosynthèse de la paroi cellulaire. Cependant, le mode d'action de l'Isoxaben est encore indéterminé et seule l'étude de mutants résistants permettra d'élucider les cibles exactes de cet herbicide. A ce jour, deux types de mutants résistants sont connus. Le mutant *ixr1* possède 2 allèles liés au marqueur *lutescens* sur le chromosome 5 (Heim et al., 1989). Ces deux mutations, semi dominantes, situées au même locus diffèrent dans le degré de résistance des plantes d'*Arabidopsis* à l'herbicide. Le mutant *ixr2* possède un allèle muté

également sur le chromosome 5, mais ce locus est lié au marqueur *yi* (Heim et al., 1990). Les 2 mutants possèdent des phénotypes avec absence d'aberration visible sur la croissance. Ces différents mutants ne sont donc ni distinguables entre eux, ni identifiables par rapport au phénotype sauvage. Les mutations homozygotes confèrent une résistance plus grande à l'herbicide que les mutations hétérozygotes. Par contre, le double mutant *ixr1/ixr2* n'est pas plus résistant, ce qui suggère que les 2 loci affectent les mêmes étapes métaboliques (Heim et al., 1990).

Dans les années 2000, d'autres études ont permis de confirmer que l'Isoxaben est un inhibiteur de la synthèse de la paroi, et plus précisément de la biosynthèse de la cellulose chez les plantes supérieures (Scheible et al., 2001; Desprez et al., 2002). En effet, il a été démontré que le gène *ixr1* code une sous-unité catalytique de la cellulose synthase, CESA3, et que la mutation de ce gène confère à la plante une résistance à l'Isoxaben (Scheible et al., 2001). De même, le gène *ixr2* code la sous-unité CESA6 de la cellulose synthase et sa mutation permet à la plante de survivre en présence de l'herbicide (Desprez et al., 2002). Ces travaux récents ont permis de déterminer les cibles des mutations permettant aux plantes de résister à l'Isoxaben. De plus, ces expériences ont mis en lumière la structure de la cellulose synthase. Les chercheurs pensaient que les sous-unités CESA3 et CESA6 étaient des fonctions redondantes. Or il s'avère que dans des mutants cellulose déficients comme *procuste*, la perte de fonction de CESA6 n'est pas compensée par CESA3 (Desprez et al., 2002). Les sous-unités agissent donc sous forme de complexe protéique non redondant. Ainsi, les mutations dans les sous-unités des CESA suggèrent que le mode d'action de l'Isoxaben est de se lier directement à ces sous-unités pour bloquer la synthèse de la cellulose et engendrer des défauts de croissance et de développement (Desprez et al., 2002).

2- Le 2,6 dichlorobenzonitrile (DCB)

Cet herbicide est principalement utilisé dans la lutte biologique. Il est toxique chez les plantes, mais aussi chez les humains. En effet, ce produit, soluble dans les solvants organiques, peut être métabolisé dans le foie, sa présence sous forme de poussières et ses produits de combustion sont dangereux (Sanborn et al., 2004). Il est irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires.

Bien que son mode d'action ne soit pas encore bien connu, les effets du DCB sur la croissance des plantes sont identifiés (Delmer et al., 1987). Les plantes cultivées sur un milieu contenant du DCB ont un problème de croissance et une altération de la composition de leur paroi (Fry and Edelman, 1992). En effet, on observe une diminution du réseau xyloglucanes/cellulose et une augmentation des pectines (70% des polymères). Les parois sont plus rigides et les polymères sont agencés différemment (Shedletzky et al., 1992). Une baisse de la porosité pariétale est également observée et un changement dans les composés phénoliques (Shedletzky et al., 1992). De plus, le DCB inhibe les CESA pour la production de cellulose et le nombre de CESA présents à la membrane plasmique (Sabba and Vaughn, 1999; Peng et al., 2002).

Les études menées laissent penser que les microfibrilles de cellulose définissent la direction de l'expansion cellulaire. La perte de croissance anisotrope peut être générée en utilisant des inhibiteurs de la biosynthèse de cellulose comme les herbicides DCB qui diminuent la quantité de cellulose et génèrent des pertes rapides de croissance anisotrope (Sabba and Vaughn, 1999).

Dans les cellules en élongation rapide, les microtubules et les microfibrilles de cellulose doivent être orientés selon l'axe principal d'élongation. L'hypothèse courante est

que les microtubules contrôlent la direction des microfibrilles de cellulose en guidant les CESA sur la membrane plasmique (Heath, 1974; Robinson and Quader, 1981; Giddings and Staehelin, 1991). Cependant, les microfibrilles de cellulose et les microtubules ne sont pas toujours orientés de la même manière (Baskin et al., 2004; Chan et al., 2007).

Pour comprendre comment sont contrôlés ses alignements et quelles sont les relations existantes avec les microtubules, les scientifiques regardent comment sont organisées ces microfibrilles de cellulose pendant la désorganisation des microtubules (Himmelspach et al., 2003). L'étude du mutant thermosensible *mor1.1* montre que la température désorganise les microtubules corticaux, mais que le réseau de microfibrilles de cellulose n'est pas touché (Himmelspach et al., 2003). L'étude inverse est aussi réalisée : un traitement des plantules au DCB, inhibiteur de synthèse de cellulose, dérègle l'organisation du réseau de microfibrilles et des microtubules corticaux (Himmelspach et al., 2003). Les scientifiques ayant mené cette étude concluent que les microfibrilles de cellulose influenceraient l'organisation des microtubules corticaux. De plus, le traitement au DCB agit sur l'assemblage des microtubules, suggérant que leur orientation serait influencée par l'organisation des microfibrilles de cellulose.

Des relations étroites, entre ces deux réseaux, ont été établies et chez le peuplier, une équipe suédoise a montré que la protéine MAP20, qui joue un rôle dans la biosynthèse de cellulose et dans l'organisation des microtubules, se lie de façon spécifique au DCB (Rajangam et al., 2008).

Les deux herbicides Isoxaben et DCB, par des modes d'action différents, ont des effets similaires sur la croissance des plantes. Ils sont tous les deux des inhibiteurs de biosynthèse de cellulose, la quantité de cellulose est fortement diminuée dans les cellules des parois et la croissance est désorganisée. De plus, ils ont un effet sur l'activité XET et la taille moléculaire des xyloglucans (Alonso-Simon et al., 2007). Cette diminution de la cellulose et des xyloglucanes induirait un attachement des xyloglucanes aux microfibrilles plus important que la normale en augmentant leur capacité à lier la cellulose et permettant de rigidifier la paroi (Alonso-Simon et al., 2007).

Changements phénotypiques des racines traitées

Les plantules âgées de 5 jours après germination sont transférées pendant 3h sur différents milieux (milieu identique, milieu contenant de l'Isoxaben ou contenant du DCB). Afin d'évaluer les effets visibles de ces herbicides, nous déterminons les vitesses de croissance et les distances pointe – premier poil.

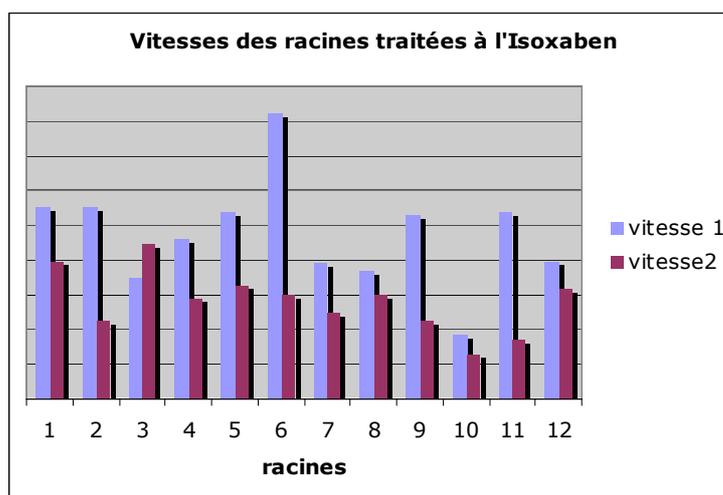
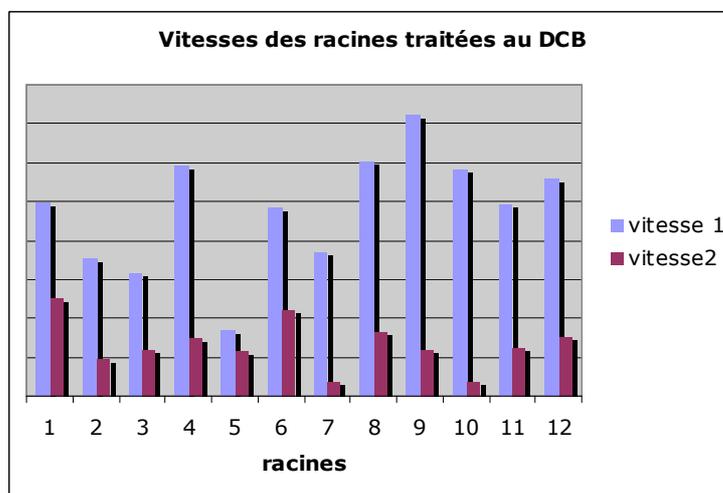
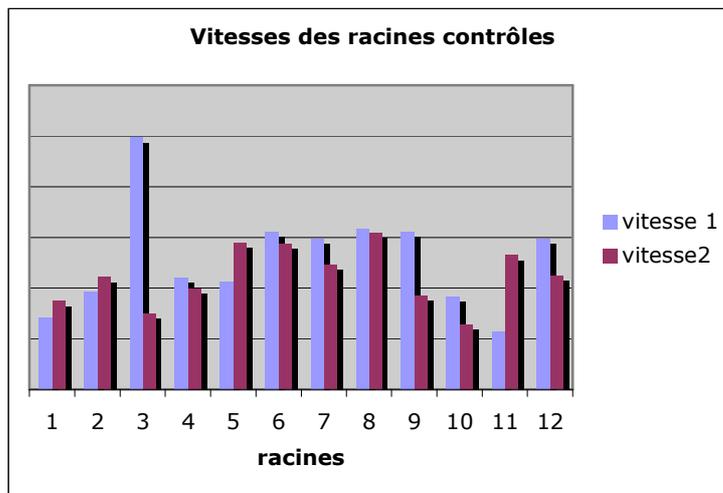


Figure 54 : Evaluation des vitesses de croissance 1h (vitesse 1) puis 3h (vitesse 2) après le transfert des racines des milieux contenant du DCB ou de l'Isioxaben.

1- Vitesse de croissance

Plan d'expériences

36 plantules âgées de 5 jours après germination sont transférées sur différents milieux : 12 racines sont transférées sur le même milieu de culture (racines contrôles), 12 sur un milieu contenant de l'Isoxaben et 12 sur un milieu contenant du DCB.

Une fois les plantes transférées sur un nouveau milieu, nous évaluons la vitesse de croissance 1h après le début du traitement (Vitesse 1) puis 3H après le début du traitement (Vitesse 2) (figure 54).

Analyse des résultats

En moyenne, les racines contrôles poussent à une vitesse de 516 $\mu\text{m}/\text{heure}$. Comme démontré dans la partie précédente, le graphique de la figure 52 montre bien que les vitesses ne sont pas homogènes selon les racines. En moyenne les vitesses sont passées de 516 à 446 $\mu\text{m}/\text{heure}$ en 3 heures. Cette diminution peut être due à plusieurs facteurs : nous avons démontré précédemment que la vitesse de croissance sur 2% de saccharose diminuait naturellement au cours de la journée, et le transfert des plantes dans une autre boîte de Pétri peu induire un stress qui ralentit la croissance.

Par contre dans le cadre des traitements herbicides, la croissance est très fortement ralentie. Les résultats des vitesses moyennes en $\mu\text{m}/\text{heure}$ sont résumés dans la table 8 suivante.

Traitements	vitesse	moyenne	Identifiant
Contrôle	1	515.5555	1
Contrôle	2	446.1805	2
DCB	1	478.1481	3
DCB	2	131.7129	4
Isoxaben	1	472.0370	5
Isoxaben	2	280.3240	6

Table 8 : Vitesses moyennes de croissance après 1h (vitesse 1) et 3h (vitesse 2) de transfert pour les racines cultivées sur différents milieux (12 racines par milieu).

Comme attendu, les résultats montrent que la croissance de l'ensemble des racines traitées avec un herbicide est fortement réprimée au bout de 3h. Les racines traitées avec le DCB ont une croissance 3,6 fois plus lente que la normale, et celles traitées par Isoxaben ont une croissance 1,7 fois plus lente que la normale.

Nous avons analysé les données avec un modèle d'analyse de la variance à 2 facteurs avec interaction : la variable réponse est la vitesse de croissance et les 2 facteurs sont le traitement et la durée de ce dernier (table 9).

Source	DF	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
durée du traitement	1	738168.751	738168.7511	38.30	<.0001
traitement	2	375920.312	187960.1563	9.75	0.0002
traitement*durée du traitement	2	231335.778	115667.8894	6.00	0.0040

Table 9 : Table d'analyse de la variance des effets traitements et durée de traitement.

L'analyse de la variance permet d'affirmer que l'effet des traitements herbicides est statistiquement significatif et que cet effet traitement dépend de sa durée.

La table 10 donne les détails des comparaisons.

i/j	Cont1h	Cont3h	DCB1h	DCB3h	Iso1h	Iso3h
Cont1h		0.2253	0.5115	<.0001	0.4453	<.0001
Cont3h	0.2253		0.5746	<.0001	0.6497	0.0047
DCB1h	0.5115	0.5746		<.0001	0.9145	0.0009
DCB3h	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	0.0108
Iso1h	0.4453	0.6497	0.9145	<.0001		0.0012
Iso3h	<.0001	0.0047	0.0009	0.0108	0.0012	

Table 10 : P_Values des comparaisons 2 à 2 des vitesses moyennes selon le traitement et sa durée

Les résultats de cette analyse montrent que le **ralentissement de la vitesse de croissance observé pour les racines contrôles est non significatif de même que les ralentissements de la vitesse de croissance pour les deux herbicides au bout d'une heure de transfert** (P-values en vert). Il faut donc attendre 3h de transfert pour que la croissance ralentisse significativement sur les milieux DCB et Isoxaben (P-values en rouge).

2- Distance pointe – poil

Pour chacune des racines, nous disposons de sa vitesse de croissance 3h après traitement, et de la distance de sa pointe racinaire entre la coiffe et le premier poil. Nous cherchons alors à savoir si cette distance est corrélée avec la vitesse de croissance. En effet, si on regarde les moyennes des distances par traitement, nous constatons que les racines DCB qui poussent le plus lentement, sont également les racines qui possèdent la plus petite distance pointe – premier poil (tableau 3).

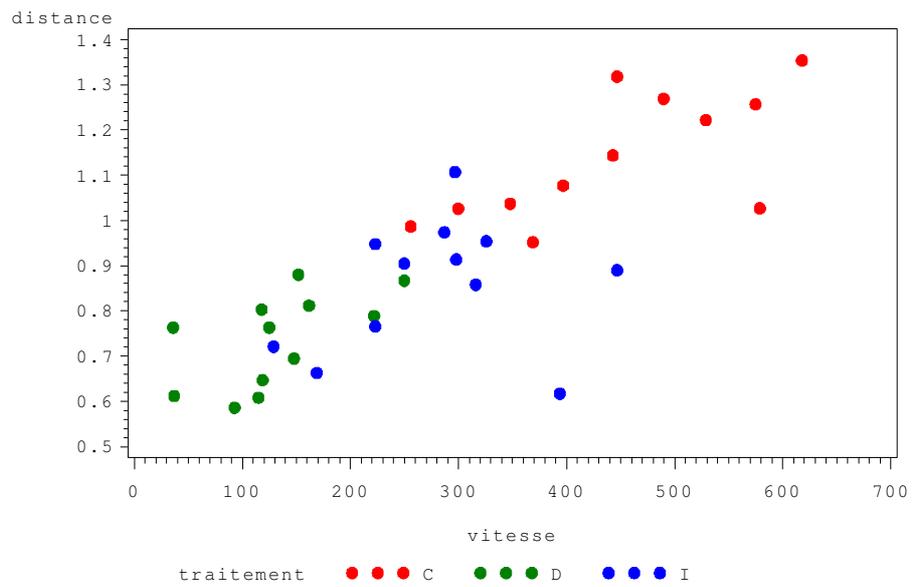


Figure 55 : Représentation des racines selon la vitesse de croissance (en abscisse) et la distance entre la pointe et le premier poil (en ordonnée). En rouge les racines contrôles, en vert les racines traitées au DCB et en bleu les racines traitées à l'Isoxaben.

Milieu	Distance pointe – premier poil
Contrôle	1139
DCB	735
Isoxaben	859

Tableau 3 : Distance moyenne entre la pointe et le premier poil pour les racines cultivées sur des milieux différents. La moyenne est calculée sur 12 racines par milieu et la distance est exprimée en μm .

Nous venons de démontrer que le traitement a un effet significatif sur la vitesse de croissance. Nous allons maintenant tester si la corrélation entre la vitesse et la distance dépend du traitement. Pour cela nous utiliserons un modèle d'analyse de la covariance. La variable réponse est la distance entre la pointe et le premier poil. Il y a un facteur qualitatif, le traitement et une covariable, la vitesse de croissance après 3h de traitement.

Le résultat de l'analyse de la variance est donné dans la table 11.

Source	DF	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
vitesse	1	0.10977214	0.10977	8.22	0.0075
traitement	2	0.02333603	0.01166	0.87	0.4277
vitesse*traitement	2	0.01690845	0.00845	0.63	0.5378

Table 11 : Table d'analyse de la variance du modèle de covariance

Il existe un effet significatif de la vitesse de croissance sur la distance pointe – premier poil et il n'y a pas d'effet du traitement lorsque l'on prend en compte la vitesse de croissance. Deplus, la pente de la droite reliant vitesse et distance ne dépend pas du traitement.

Nous pouvons donc conclure que la vitesse de croissance et la distance sont corrélées et que cette corrélation ne dépend pas de la nature du traitement (figure 55). La valeur du R^2 est de 0.74

Quelques racines ont un comportement non conforme, comme par exemple la racine bleue la plus basse sur la figure 55, cultivées sur milieu Isoxaben. Elle a une vitesse de croissance aussi rapide qu'une racine contrôle, mais une distance pointe–poil fortement réduite. Malheureusement, les racines ayant fait l'objet de cette étude n'ont pas encore été analysées par IR. Nous ne pouvons donc pas relier les résultats sur la vitesse à des données sur la composition et la structure des racines.

3 - Conclusion

Les traitements herbicides ralentissent fortement la croissance de la racine d'*Arabidopsis* dans un délai assez court de 3H. Les études statistiques menées montrent

Segmentation des racines traitées à l'Isoxaben

-7 racines étudiées

-2 profils de segmentation



Segment 1 **Segment 2** **Segment 3** **Segment 4**

Figure 56 : Sur l'ensemble des profils de segmentation observés, nous pouvons dégager 2 tendances. Sur les 7 racines, 4 possèdent 3 segments et les 3 autres possèdent 4 segments. Les différents segments sont représentés par des rectangles de couleurs, selon la légende décrites, et la taille des rectangles est proportionnelle à la longueur des segments.

que la distance pointe – premier poil, représentant la zone de croissance de la racine, est raccourcie par un ralentissement de la vitesse dû aux traitements. La vitesse de croissance et la zone d'élongation sont deux variables bien corrélées qui mesurent le même phénomène de croissance.

Changements qualitatifs des racines traitées

Les travaux présentés dans la première partie de ce manuscrit et menés uniquement sur des racines contrôles, ont montré qu'il était possible d'utiliser l'algorithme de segmentation pour définir des zones homogènes dans la croissance. Nous souhaitons maintenant voir quels sont les effets de traitements herbicides sur le nombre de zones, la taille de ces zones, et leur qualité.

1- Identification des zones

Nos résultats se fondent uniquement sur l'étude des cartographies IR normalisées par le calcul de la dérivée seconde. Nous disposons de 10 cartographies pour les racines contrôles, 7 cartographies pour les traitements à l'Isoxaben, et 8 pour les traitements au DCB.

Clustering hiérarchique et segmentation

1-Racines ayant reçues un traitement Isoxaben.

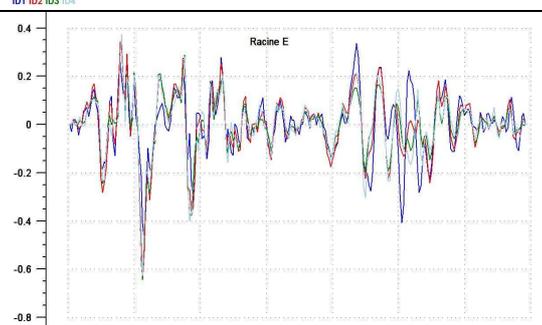
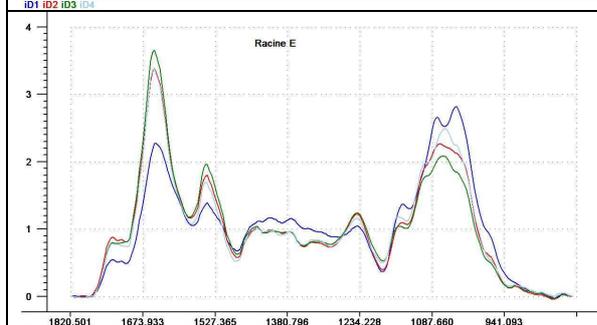
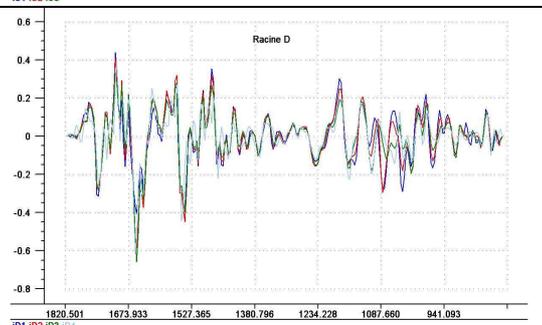
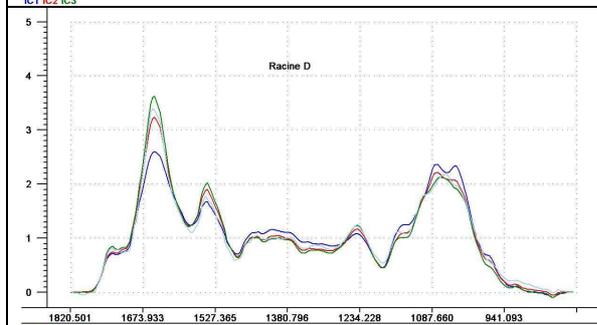
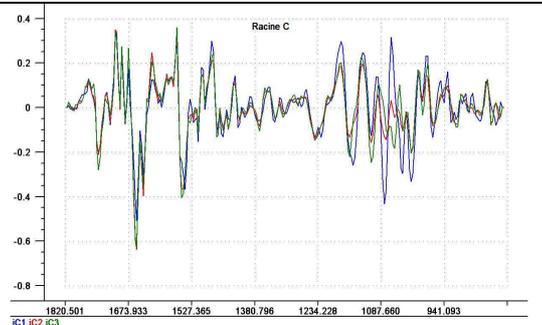
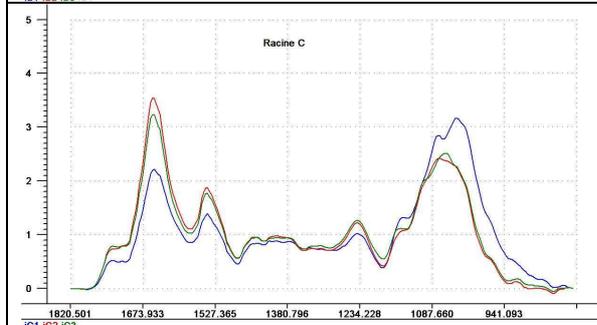
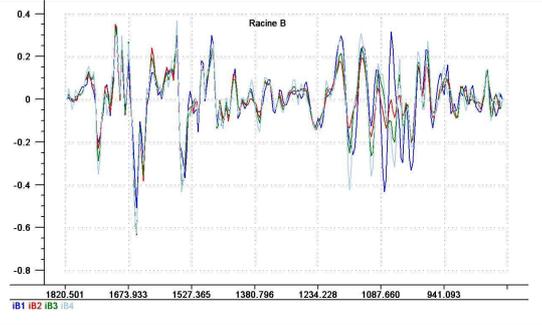
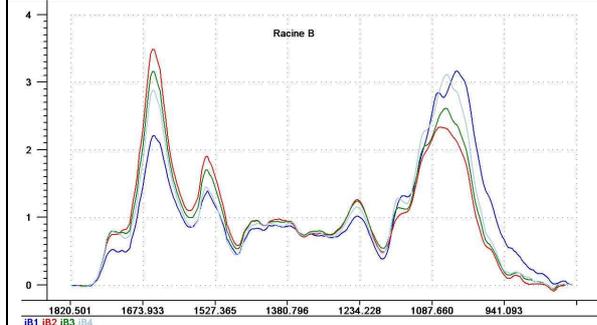
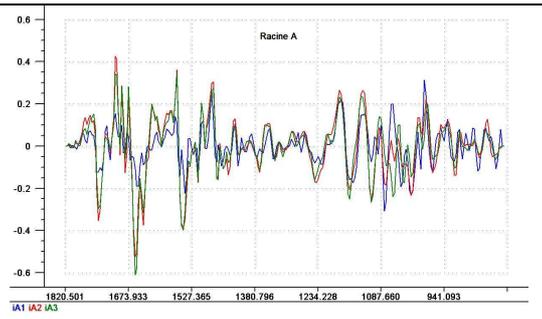
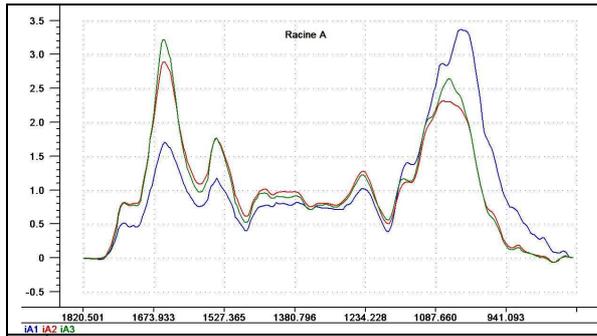
Le tableau 4 et la figure 56 présente les résultats de la segmentation et du clustering hiérarchique obtenus sur les racines traitées à l'Isoxaben.

Identifiant racine	Nombre de points par ligne	Nombre de spectres	Segmentation	Clusters
A	8	67	0-4-6-27- 67	0-5-7-28-67
B	9	64	0-4-32-53-64	0-5-48-64
C	8	55	0-6-20-55	0-6-20-55
D	8	53	0-9-34-53	0-1-27-53
E	11	55	0-6-22-36-55	0-6-25-55
F	9	46	0-4-31-46	0-5-33-46
G	12	55	0-5-29-55	0-4-13-36-55

Tableau 4 : Résultats de la segmentation et du clustering hiérarchique sur les racines traitées à l'Isoxaben.

Contrairement à ce que nous avons pour les racines contrôles, **le segment 1 a été détecté sur l'ensemble des racines**. Nous pouvons remarquer que les 5 premiers spectres sont généralement regroupés (sauf pour la racine D).

Afin de repérer les différences de composition et de structure qui permettent l'identification de ces segments, nous moyennons l'ensemble des spectres d'un même segment et regardons son profil (figure 57).



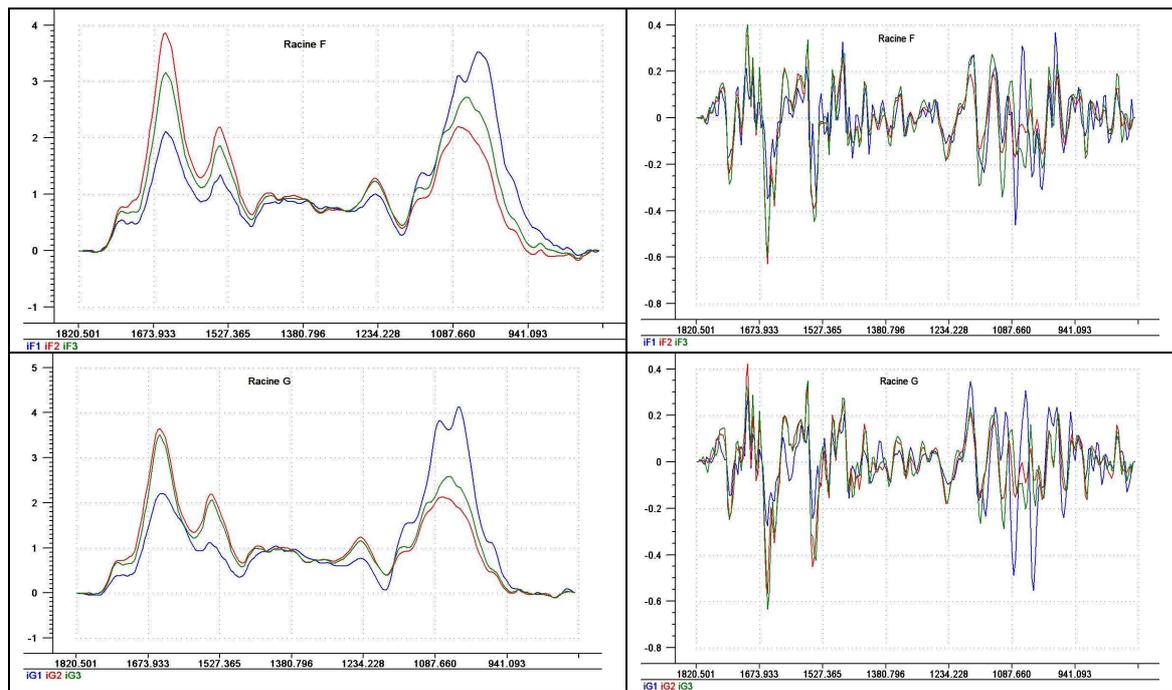


Figure 57 : Observation des moyennes des spectres par segment pour chaque racine traitée à l'Isoxaben. A gauche : spectres normalisés par la technique de Mouille *et al* (2003) et à droite : dérivées secondes des spectres. En bleu : le segment 1, en rouge le segment 2 et en vert le segment 3.

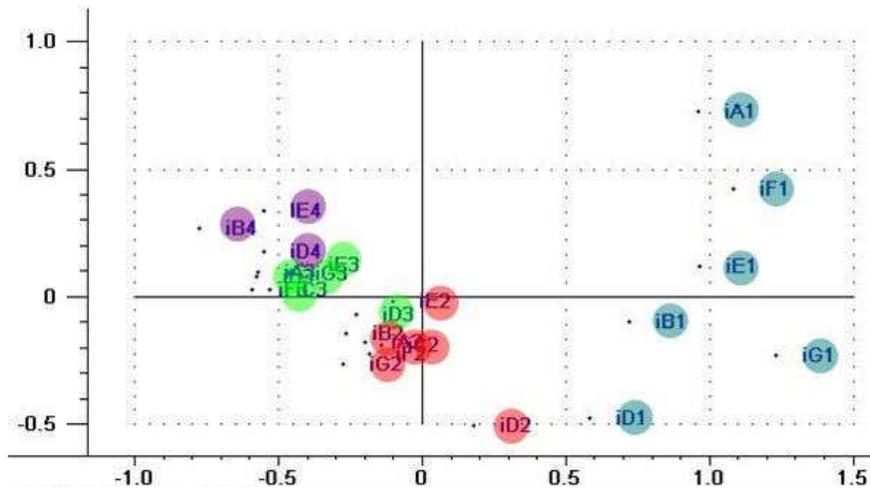


Figure 58 : ACP sur l'ensemble des segments des racines traitées à l'Isioxaben. En bleu, le segment 1, en rouge le segment 2, en vert le segment 3, et en violet le segment 4. 54% d'inertie sur l'axe 1 et 10% sur l'axe 3.

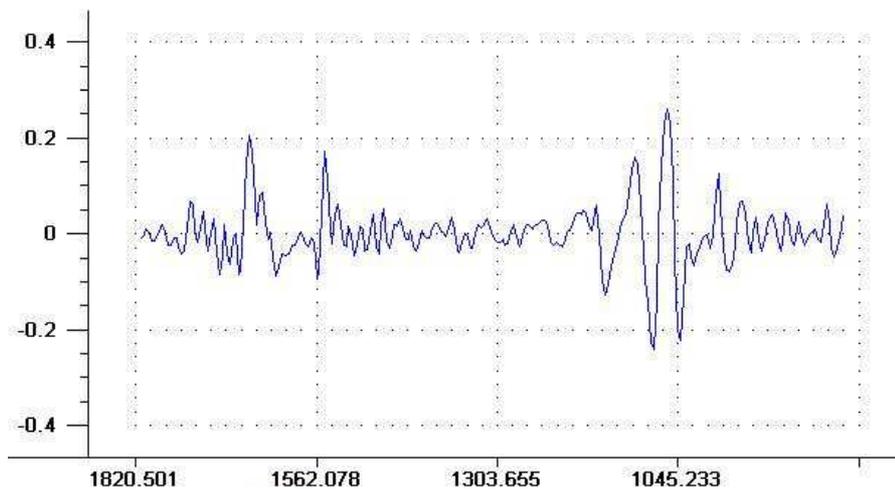


Figure 59 : Loadings représentant les NO responsables de la variabilité sur le premier axe de l'ACP effectuée sur les segments des racines traitées à l'Isioxaben. 54% d'inertie sur l'axe 1.

Segmentation des racines traitées au DCB

-8 racines étudiées

-3 profils de segmentation



Segment 1 Segment 2 Segment 3 Segment 4

Figure 60 : Sur l'ensemble des profils de segmentation observés, nous pouvons dégager 3 tendances. Sur les 8 racines, 5 possèdent 4 segments et les 3 autres possèdent 3 segments. Les différents segments sont représentés par des rectangles de couleurs, selon la légende décrites, et la taille des rectangles est proportionnelle à la longueur des segments.

Le segment 1, en bleu, est facilement identifiable car il présente deux pics, caractéristiques de la cellulose à 1041 et 1060 cm^{-1} (Mouille et al., 2003), non retrouvés dans les autres segments. **Les absorbances du segment 1 dans la zone de l’empreinte polysaccharides sont plus intenses que pour les autres segments.**

Nous avons fait une ACP sur les données suivantes : les individus sont les segments des racines traitées à l’Isoxaben et les variables sont les NO (figure 58).

Cette ACP montre que les segments sont bien séparés et identifiables, notamment le segment 1 qui forme un nuage très éloigné des autres. **La segmentation est une méthode pertinente pour définir des zones homogènes aussi bien sur les racines traitées à l’Isoxaben que sur les racines contrôles.**

Les NO les plus importants sur le premier axe de l’ACP sont des NO références de la cellulose 1041, 1060 et 1157 cm^{-1} et des NO dans la zone des protéines et des amides 1658 et 1550 cm^{-1} (figure 59).

2- Racines ayant reçues un traitement DCB

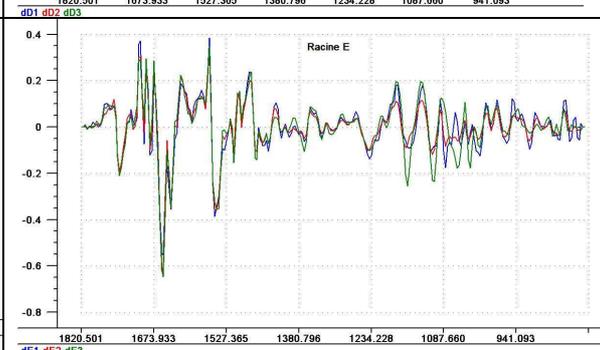
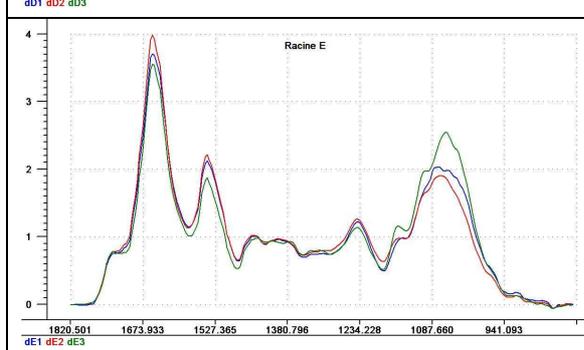
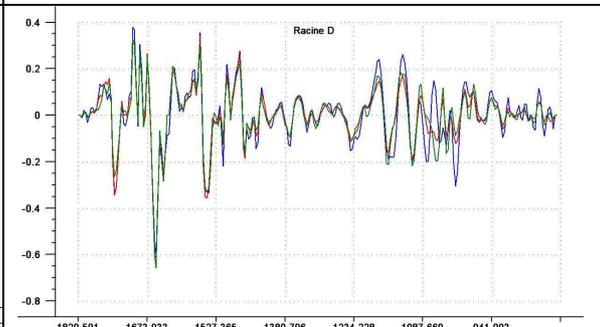
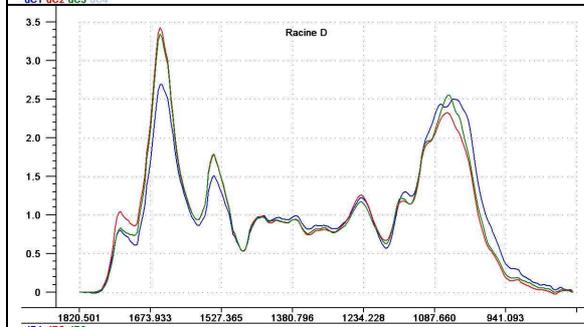
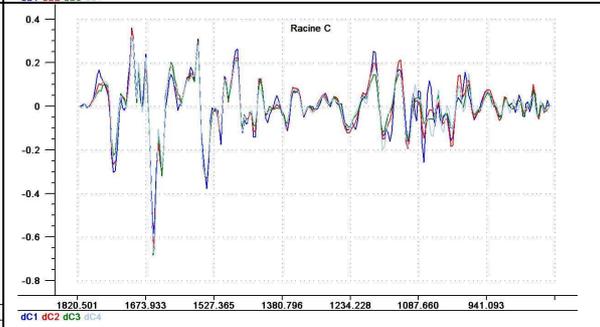
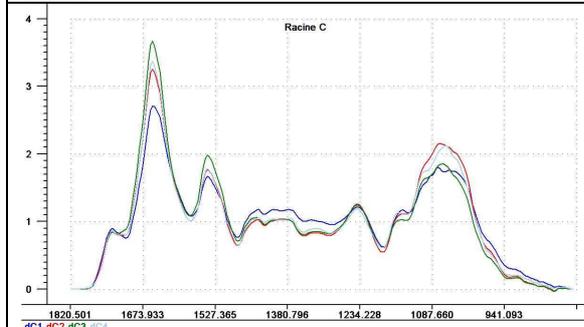
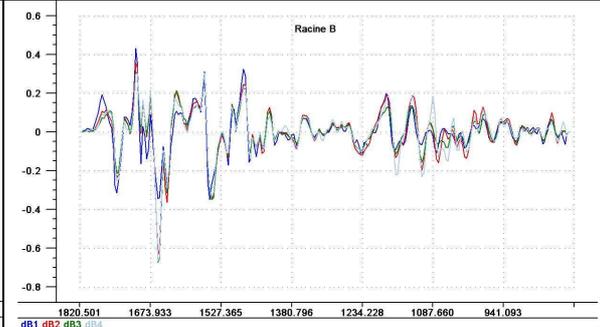
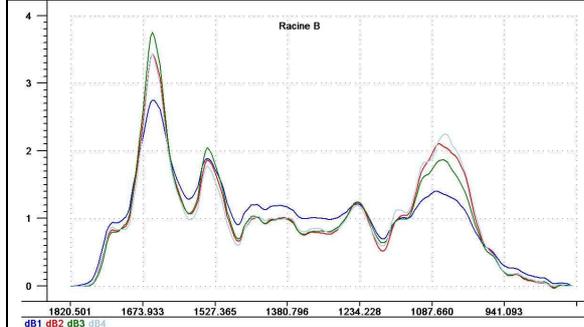
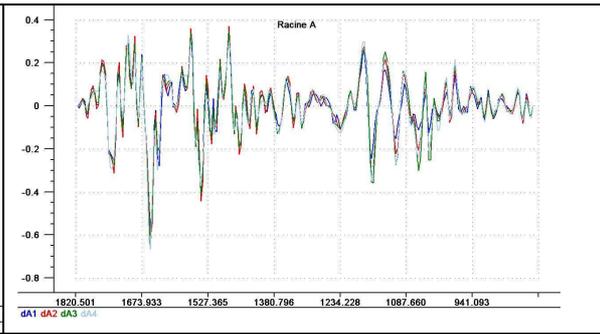
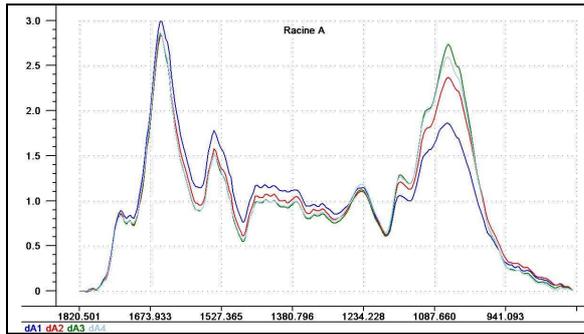
Le tableau 5 et la figure 60 présente les résultats de la segmentation et du clustering hiérarchique obtenus sur les racines traitées au DCB.

Identifiant racine	Nombre de points par ligne	Nombre de spectres	Segmentation	Clusters
A	13	64	0-4-21-44-64	0-38-54-64
B	11	55	0-3-20-43-55	0-4-44-55
C	10	61	0-3-18-33-61	0-5-34-61
D	6	67	0-6-38-67	0-8-39-67
E	6	67	0-3-35-67	0-4-35-67
F	11	70	0-6-27-70	0-3-8-28-70
G	8	55	0-4-13-41-55	0-13-41-55
H	10	46	0-4-14-25-46	0-25-46

Tableau 5 : Résultats de la segmentation et du clustering hiérarchique sur les racines traitées au DCB.

Contrairement à ce que nous avons pour les racines contrôles, **le segment 1 a été détecté sur l’ensemble des racines.** Les clusters sont moins comparables au segment que pour les 2 autres types de segmentation déjà effectuées.

Les profils des différents segments par racines traitées au DCB sont fournis dans la figure 61.



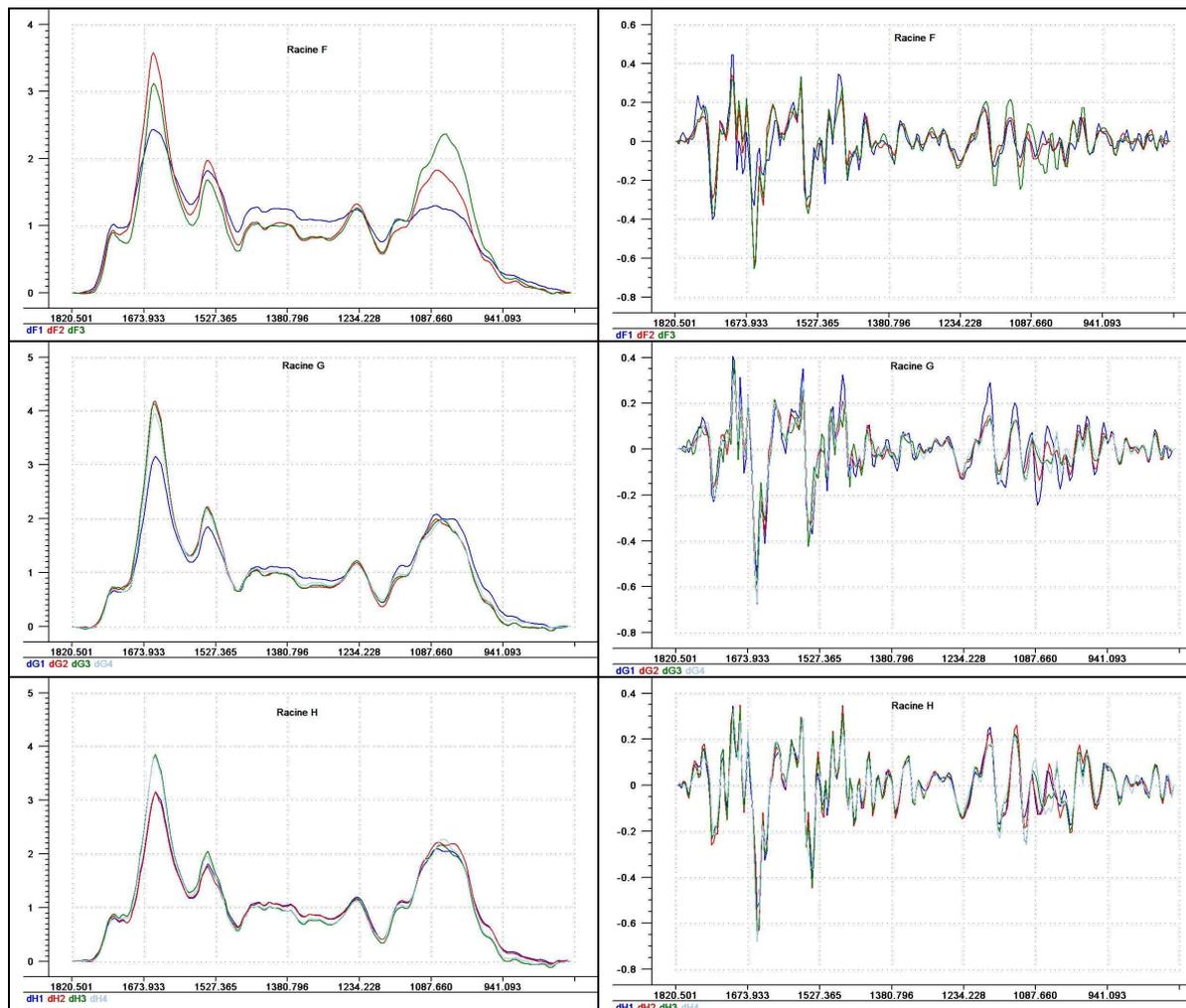


Figure 61 : Observation des moyennes des spectres par segment pour chaque racine traitée au DCB. A gauche : spectres normalisés par la technique de Mouille *et al* (2003) et à droite : spectres dérivés.

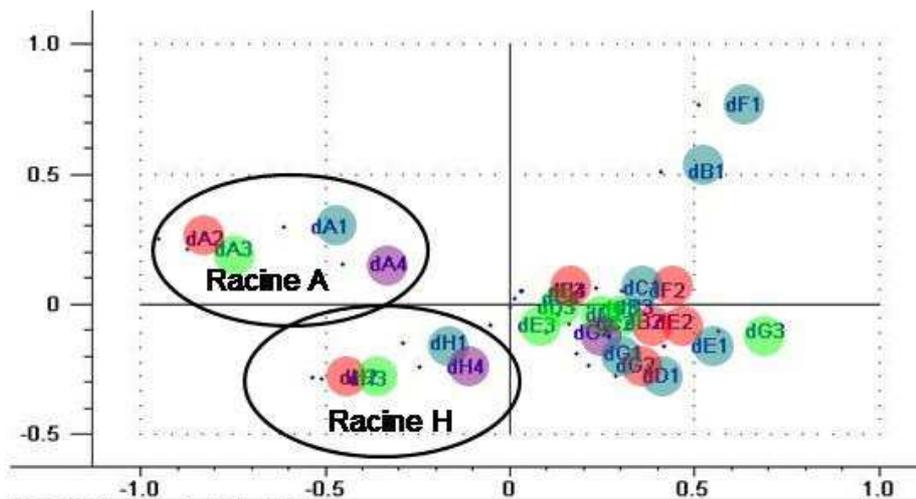


Figure 62 : ACP sur l'ensemble des segments des racines traitées au DCB. En bleu, le segment 1, en rouge le segment 2, en vert le segment 3, et en violet le segment 4. 36% d'inertie sur l'axe 1 et 13% sur l'axe 2.

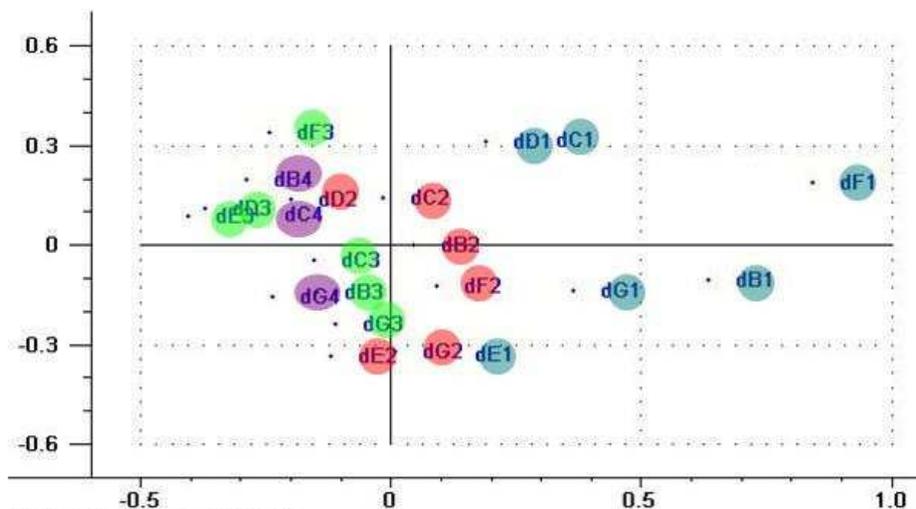


Figure 63 : ACP sur l'ensemble des segments des racines traitées au DCB. En bleu, le segment 1, en rouge le segment 2, en vert le segment 3, et en violet le segment 4. 34% d'inertie sur l'axe 1 et 15% sur l'axe 2.

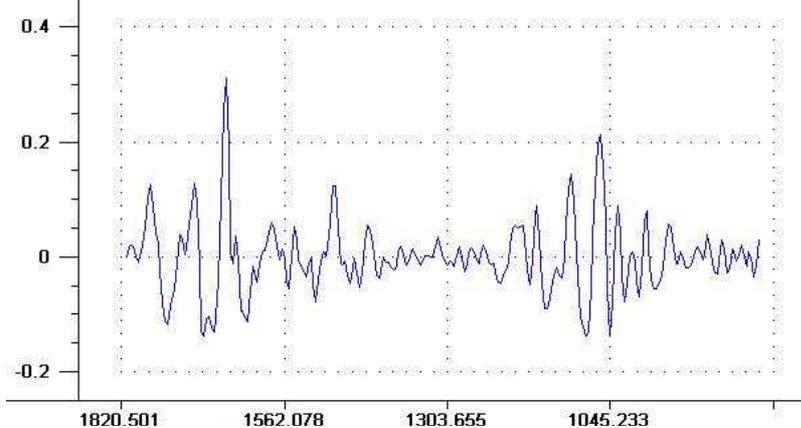


Figure 64 : Loadings représentant les NO responsables de la variabilité sur le premier axe de l'ACP effectuée sur les segments des racines traitées au DCB.

Les résultats sur l'observation des spectres ne sont pas facilement interprétables. **Les segments sont beaucoup plus homogènes au sein d'une racine, qu'entre les racines.**

Nous avons fait une ACP sur les données suivantes : les individus sont les segments des racines traitées au DCB et les variables sont les NO (figure 62).

Comme attendu, au vue des profils figure 57, les segments ne se séparent pas bien sur les axes de l'ACP. Les racines A et H sont très isolées des autres, alors que l'observation des profils de leurs segments ne permet pas de les distinguer.

L'ACP est donc refaite sans les racines A et H pour vérifier que les segments définis par l'algorithme de segmentation sont bien distinguables (figure 63).

Cette ACP montre, que finalement, les segments peuvent être séparés et identifiés. **La segmentation est donc une méthode pertinente pour définir des zones homogènes aussi bien sur les racines traitées au DCB que sur les racines contrôles.**

Les NO les plus porteurs de la variabilité sont les NO 1778, 1704 correspondant aux esters, et les NO 1654, 1481, 1106, 987 et 1060 cm-1. Seul le NO 1060 cm-1 est associé à la cellulose (figure 64).

3- Conclusion

Nous avons pu définir des zones homogènes le long de l'axe d'élongation des racines traitées au DCB et à l'Isoxaben. Sur l'ensemble des racines traitées, l'algorithme de segmentation a détecté le segment 1, et les racines traitées à l'Isoxaben possèdent un segment 1 de qualité particulière. De plus, les NO responsables de la variabilité pour chaque traitement sont différents.

Différences entre les contrôles et les traitements herbicides

1- Le nombre de segment

Le nombre de segments entre les racines contrôles et les racines traitées aux herbicides est identique. Ce nombre varie entre 3 et 4 selon les racines. Il semble cependant que le segment 1 soit plus stable dans les racines traitées aux herbicides que dans les racines contrôles.

2- La taille des segments

Nous avons artificiellement supposés que les 5 premiers spectres étaient au segment 1. Le segment 4 n'étant pas très bien défini et non présent sur l'ensemble des racines, nous ne tiendrons pas compte de sa longueur (souvent assez courte d'ailleurs, 5 spectres). La variabilité dans la taille des segments est donc portée par les 2 autres (tableau 6).

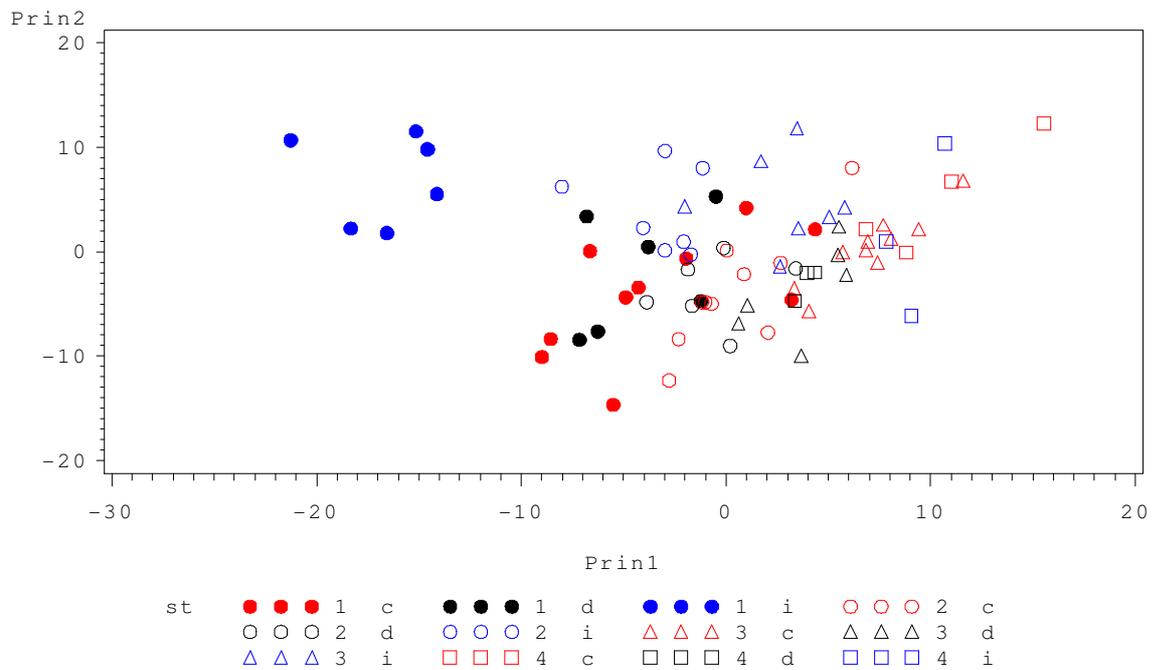


Figure 65: ACP globale sur l'ensemble des segments pour les 3 conditions de culture. En rouge les contrôles, en bleu les racines traitées à l'Isoxaben et en noir les racines traitées au DCB. Les segments sont représentés par des symboles : un rond pour le segment 1, un triangle pour le segment 2, un carré pour le segment 3 et un losange pour le segment 4. Le pourcentage d'inertie sur le premier axe (PRIN1) est de 20% et le pourcentage d'inertie sur le deuxième axe (PRIN 2) est de 14%.

Segment 2			Segment 3		
Contrôle	DCB	Isoxaben	Contrôle	DCB	Isoxaben
29	25	28	59	27	24

Tableau 6 : Taille moyenne en nombre de spectres des segments 2 et 3 pour l'ensemble des cartographies étudiées (10 contrôles, 8 DCB et 7 Isoxaben). 1 spectre équivaut à 15 μm .

Ces résultats confirment donc l'ensemble des observations faites sur les distances pointe – premier poil et les vitesses de croissance. **La diminution de la vitesse entraîne une réduction de la zone de croissance de la racine par une action ciblée majoritairement sur le segment 3.**

3- Analyse qualitative entre les segments

Nous avons fait une ACP sur les données suivantes : les individus sont les segments de toutes les racines et les variables sont les moyennes des NO (figure 65).

Les segments 1 des racines traitées à l'Isoxaben sont facilement identifiables (ronds bleus). De plus on observe une tendance le long de l'axe 1, qui va du segment 1 vers le segment 4 (cercles pleins, puis cercles vides puis triangles puis carrés). Les racines contrôles et traitées au DCB semblent peu dispersées, ce qui signifie que les différents segments des racines DCB sont peu différents (tout au moins sur les 2 premiers axes).

- Etude sur la première composante de l'ACP

Les NO importants sur le premier axe, et donc responsables de la variabilité, sont donnés dans la table 12 suivante.

	NO	PC 1		NO	PC 1
1	1658	-0.10075	13	1064	-0.11269
2	1319	-0.11193	14	1060	-0.12511
3	1145	0.10238	15	1056	-0.12977
4	1141	0.11114	16	1052	-0.12713
5	1137	0.11988	17	1049	-0.10316
6	1106	-0.11130	18	1045	0.10759
7	1103	-0.11747	19	1041	0.12749
8	1099	-0.12123	20	1037	0.11081
9	1087	0.10710	21	971	0.10366
10	1083	0.10305	22	968	0.11385
11	1079	0.11982	23	964	0.10983
12	1076	0.12110	24	952	-0.11525
			25	948	-0.11245

Table 12 : NO responsables de la variabilité sur la première composante (PC 1) de l'ACP effectuée sur l'ensemble des segments. En rouge, les NO identifiés pour la cellulose.

La plupart des NO sont situés dans la zone de « l’empreinte polysaccharides » des spectres IR, ce qui suggère des différences dans la composition en sucre entre les segments et notamment de la cellulose.

Afin de voir quelles sont les différences significatives entre les segments, nous procédons à une analyse de la variance, la variable réponse est la première composante de l’ACP et les deux variables explicatives sont les segments et les traitements. Les résultats sont présentés dans la table 13 suivante.

Source	DF	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
segment	3	2480.193381	826.731127	96.06	<.0001
traitement	2	388.470452	194.235226	22.57	<.0001
segment*traitement	6	458.056176	76.342696	8.87	<.0001

Table 13 : Analyse de la variance à deux facteurs sur l’axe 1 de l’ACP.

Nous avons bien un effet segment et un effet traitement, ainsi qu’une interaction entre les segments et les traitements sur la première composante principale de l’ACP.

Nous faisons alors une procédure de comparaison multiple de Ryan-Einot-Gabriel-Welch (Hsu, J. C. (1996). *Multiple Comparisons: Theory and Methods*, Chapman and Hall) pour identifier les groupes homogènes, et voir s’il existe des différences significatives entre les segments ou les traitements (table 14 et table 15).

Les tables se lisent de la façon suivante : les variables proches, et donc appartenant au même groupe, portent la même lettre.

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas différentes.			
REGWQ Groupement	Moyenne	Nb	segment
A	8.1532	10	4
B	4.9355	23	3
C	-0.9913	23	2
D	-7.4891	23	1

Table 14: Comparaison des segments

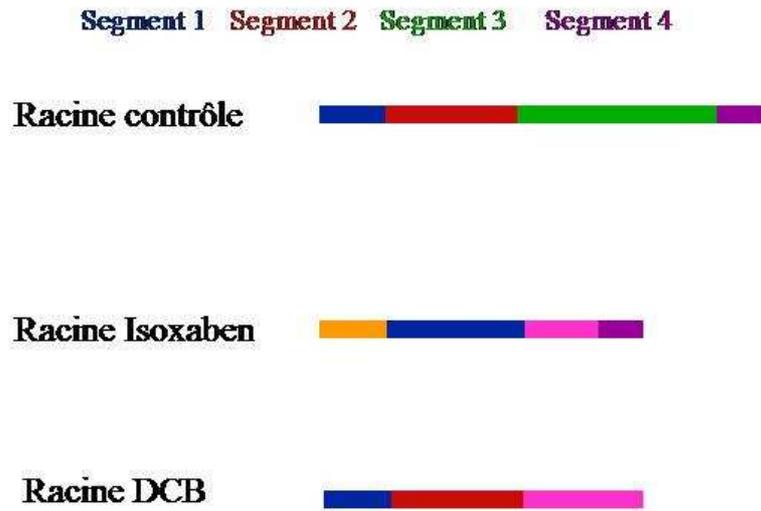


Figure 66 : Interprétation des comparaisons multiples présentées dans la table 16. Les quatre couleurs sont affectées aux 4 segments des racines contrôles selon la légende. La table 16 montre que le segment 1 des racines traitées à l'isoxaben est unique (en jaune), et que les herbicides agissent sur le segment 3 des racines traitées à l'isoxaben et les segments 3 et 4 des racines traitées au DCB (en rose). Les segments de la même couleur possèdent une qualité de paroi et de structure équivalente.

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas différentes.			
REGWQ Groupement	Moyenne	Nb	traitement
A	2.5026	34	contrôle
B	0.2134	21	DCB
C	-3.7320	24	Isoxaben

Table 15 : Comparaison des traitements

Chaque segment et chaque traitement appartient à un groupe différent, ils sont donc statistiquement différents sur l'axe 1 de l'ACP.

On s'intéresse maintenant à la comparaison des moyennes par segment et par traitement pour affiner les résultats (table 16).

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas très différentes.				
REGWQ	Groupement	Moyenne	Nb	st
	A	10.556	4	Contrôle Segment 4
	A	9.197	3	Isoxaben Segment 4
B	A	7.109	10	Contrôle segment 3
B				
B	C	3.906	3	DCB segment 4
B	C	3.705	6	DCB segment 3
B	C	2.885	7	Isoxaben segment 3
	C			
D	C	0.391	10	Contrôle Segment 2
D				
D	C	-0.637	6	DCB segment 2
D				
D		-3.213	10	Contrôle segment 1
D		-3.269	7	Isoxaben segment 2
D		-4.275	6	DCB segment 1
	E	-16.353	7	Isoxaben segment 1

Table 16 : Comparaison multiple des moyennes par segment et par traitement

Comme attendu, le segment 1 des racines traitées à l'Isoxaben est isolé (groupe E), la qualité de la paroi de ce segment est donc unique. Les segments 3 et 4 des racines traitées au DCB et le segment 3 des racines traitées à l'Isoxaben (interaction groupe B et C) ne sont pas associés à un segment contrôle. Nous pouvons donc conclure que **les traitements herbicides agissent sur la qualité de la paroi des segments 3 et 4 pour le DCB et sur le segment 3 pour l'Isoxaben** (figure 66). En comparaison, le segment 4 des racines traitées à l'Isoxaben

ressemble aux segments 3 et 4 des contrôles (groupe A), ce qui signifie que l'herbicide ne semble pas affecté la qualité de la paroi pour ce segment.

- Etude sur la deuxième composante de l'ACP

Dans un premier temps, nous pouvons constater que les NO responsables de la variabilité sont très différents sur le deuxième axe (table 17).

Obs	NO	PC2			
1	1716	-0.12306	16	1172	0.14234
2	1689	0.10156	17	1168	0.12835
3	1388	0.10123	18	1157	-0.11349
4	1384	0.13063	19	1153	-0.13451
5	1380	0.12311	20	1149	-0.10685
6	1373	-0.13502	21	1133	0.10683
7	1369	-0.12490	22	1130	0.14042
8	1346	0.13583	23	1126	0.14984
9	1342	0.12952	24	1122	0.14187
10	1292	0.10021	25	1118	0.13491
11	1226	-0.10837	26	1014	-0.10469
12	1187	0.10564	27	1010	-0.11506
13	1184	0.12792	28	979	0.10889
14	1180	0.13253	29	975	0.10323
15	1176	0.14083	30	933	0.11515

Table 17 : NO responsables de la variabilité sur la deuxième composante (PC 2) de l'ACP effectuée sur l'ensemble des segments. En rouge, les NO identifiés pour la cellulose.

Comme sur l'axe 1, la majorité des NO se trouve dans la zone de « l'empreinte polysaccharides », et 10 d'entre eux sont situés dans la zone des méthylesters et des amides. **Il y aurait donc des modifications au niveau des sucres et des protéines sur l'axe 2 de l'ACP.**

Posons cette fois l'axe 2 de l'ACP comme variable réponse et les segments et les traitements comme variables explicatives. L'analyse de la variance donne les résultats suivants (table 18).

Source	DF	Type III SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
segment	3	59.6237732	19.8745911	0.86	0.4674
traitement	2	589.7122210	294.8561105	12.73	<.0001
segment*traitement	6	332.5180531	55.4196755	2.39	0.0374

Table 18 : Analyse de la variance à deux facteurs sur l'axe 2 de l'ACP.

Les résultats ne sont pas du tout identiques à ceux obtenus sur l'axe 1. En effet, **il existe un effet du traitement et une légère interaction entre les traitements et les segments, mais l'effet segment est ici non significatif.**

Les comparaisons multiples des traitements sont représentées dans la table 19.

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas très différentes.			
REGWQ Groupement	Moyenne	Nb	traitement
A	4.870	24	Isoxaben
B	-1.552	34	Contrôle
B			
B	-3.052	21	DCB

Table 19 : Comparaison des traitements

Les racines traitées à l'Isoxaben sont significativement différentes des racines traitées au DCB et des contrôles sur l'axe 2 de l'ACP.

L'étude des interactions va nous permettre d'approfondir ces résultats (table 20).

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas différentes.				
REGWQ	Groupement	Moyenne	Nb	st
	A	7.332	7	Isoxaben segment 1
	A			
B	A	5.279	4	Contrôle segment 4
B	A	4.765	7	Isoxaben segment 3
B	A	3.858	7	Isoxaben segment 2
B	A	1.729	3	Isoxaben segment 4
B	A	0.382	10	Contrôle segment 3
B	A	-1.938	6	DCB segment 1
B				
B		-2.894	3	DCB segment 4
B		-3.646	6	DCB segment 3
B		-3.650	6	DCB segment 2
B		-3.807	10	Contrôle segment 2
B		-3.964	10	Contrôle segment 1

Table 20 : Comparaison multiple des moyennes par segment et par traitement

Les interactions mettent en évidence que le segment 1 est significativement différent de tous les autres segments.

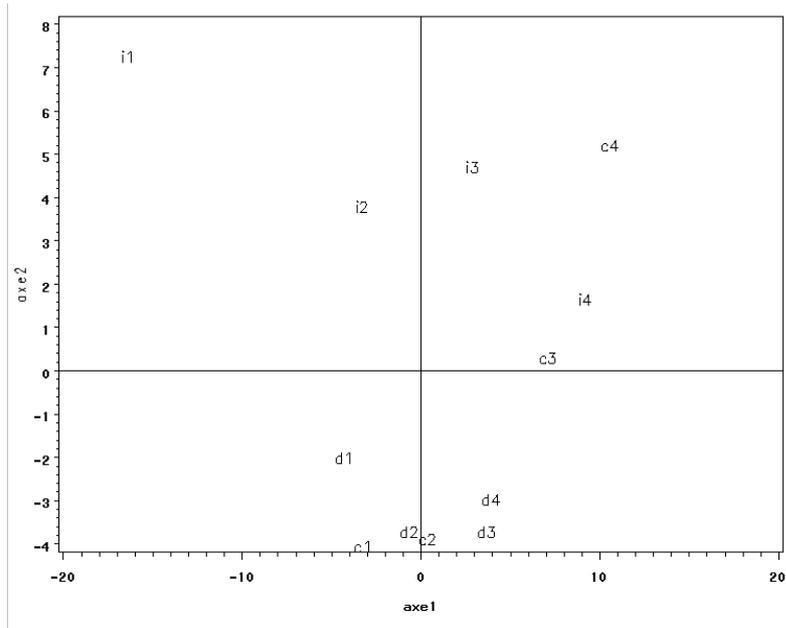


Figure 67 : Représentation graphique des interactions en fonction des moyennes des moindres carrés sur l'axe 1 et l'axe 2 de l'ACP.

3- En résumé

La figure 67 permet de visualiser les interactions dans un espace en 2 dimensions en fonction des moyennes des moindres carrés pour l'axe 1 et l'axe 2 de l'ACP.

Nous pouvons donner une interprétation synthétique des résultats :

1. sur l'axe 1 les segments sont orientés de 1 vers 4. On a donc une évolution le long de l'axe d'élongation de la racine.
2. les segments Isoxaben sont dans la partie supérieure du graphique,
3. les segments DCB sont peu dispersés et situés dans la partie inférieure, et les segments contrôles sont en diagonale du bas vers le haut.

2- Conclusion

Nous avons démontré que la segmentation était une méthode efficace pour définir des zones homogènes aussi bien sur les racines contrôles que sur les racines traitées. Globalement, nous avons trouvé le même nombre de segments quelque soit la condition de culture, mais les différences résident dans la qualité de ces segments.

L'axe 1 de l'ACP permet de mettre en évidence les différences de qualité entre les racines contrôles et les racines traitées aux herbicides. Les NO responsables de la variabilité sont situés dans la zone de l'empreinte polysaccharide ($1200-800 \text{ cm}^{-1}$). L'effet majeur des herbicides est concentré sur le segment 3. L'Isoxaben a un effet particulier sur le segment 1 et le DCB agit également sur le segment 4.

En revanche, l'axe 2 de l'ACP sépare les racines traitées à l'Isoxaben des racines traitées au DCB. Les NO responsables de la variabilité sur cet axe sont donc spécifiques de cette différence et correspondent aux polysaccharides et aux protéines.

La segmentation nous a donc permis de mettre en évidence des différences qualitatives entre les racines traitées au DCB et les racines traitées à l'Isoxaben. Les segments 1 et 2 des racines traitées au DCB ne semblent pas modifiés. Le DCB agit donc sur les segments 3 et 4. Les racines traitées à l'Isoxaben ont un segment 1 unique, et un segment 3 ressemblant aux racines traitées au DCB.

Bien que ces herbicides soient tous les deux des inhibiteurs de synthèse de cellulose, de récentes études ont démontré qu'ils n'avaient pas le même mode d'action. Nos travaux permettent de confirmer ces études et de dire que leurs cibles sont probablement différentes pour les deux inhibiteurs. Même s'ils agissent tous les 2 sur le segment 3, l'Isoxaben agit fortement sur le segment 1 et pas le DCB, qui agit sur le segment 4. De plus, nous avons montré que ces inhibiteurs n'engendrent pas les mêmes changements dans la qualité de la paroi primaire.

Discussion

Variation de la composition et de la structure le long de l'axe d'élongation racinaire

Ces travaux portaient sur l'étude des changements de la composition et de la structure de la paroi primaire au cours de la croissance cellulaire. Nous avons démontré qu'il était possible de définir des zones homogènes, en composition et en structure, le long de l'axe d'élongation racinaire grâce à l'imagerie FT-IR. Ces différentes zones n'ont pas pu être corrélées de façon précise avec les zones classiques (division, transition, élongation) décrites dans la littérature.

Actuellement, deux hypothèses sont admises : la composition et la structure de la paroi sont uniques pour chaque stade de la croissance et permettent de les différencier (cas discontinu), ou ces changements sont progressifs le long de l'axe d'élongation (cas continu) et donc plus difficiles à observer ou encore plus probablement un équilibre entre changements continus et discontinus.

Nous avons fait le *postula* que la paroi subissait des modifications abruptes au cours de l'élongation et que ces modifications pourraient représenter les différentes étapes de la croissance. Les résultats obtenus, avec l'utilisation de l'algorithme de segmentation constante par morceaux et simultanée sur l'ensemble des NO, ont montré que l'hypothèse d'une croissance discontinue était tout à fait envisageable. Les zones homogènes, définies sur une racine, présentent bien des caractéristiques en structure et en composition différentes, et certaines zones sont similaires entre les racines.

Cependant, nous avons conscience que traiter les NO de façon indépendante et identique ne reflète pas la réalité. L'étude particulière, de certains NO, identifiés lors de la thèse de Tinne De Cnodder (De Cnodder, 2005), a montré que ces NO évoluent de façon continue le long de l'axe d'élongation de la racine. L'application de modèles de régression linéaire, nous a permis de vérifier que ces profils correspondent bien à des droites. En moyenne, le R^2 est de 0.85. Il est donc fortement probable que certains composés de la paroi évoluent de façon continue tandis que d'autres évoluent de façon discontinue durant la croissance. Une variante de la segmentation peut alors être utilisée pour détecter ces signaux continus : la segmentation affine par morceaux. Cet algorithme permet de trouver, non pas des zones homogènes, mais des zones de croissance continue. Quelques essais ont été réalisés sur des racines contrôles, mais les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles. De plus, la segmentation affine par morceaux est réalisée également simultanément sur l'ensemble des NO.

Une troisième hypothèse sur la croissance est en train de percer : une croissance liée à des phénomènes oscillatoires. Il se pourrait que les vagues d'auxine observées (Grieneisen et al., 2007) et les changements de pH, entraînent des modifications pariétales suivant des oscillations et pas de façon progressive ou abrupte. Ces changements pourraient être détectés en IR (par exemple des déméthylations de pectines), malgré la rapidité des phénomènes oscillatoires, s'ils ne sont pas trop localisés (zone supérieure à un spectre). Actuellement, je ne sais pas comment nous pourrions détecter ces oscillations par des méthodes statistiques.

Extraction des NO informatifs

Ce qui ressort de ces analyses, c'est que traiter l'ensemble des NO de manière indépendante et identique, permet d'obtenir des résultats intéressants, mais la difficulté d'interprétation de ces résultats vient du fait que, justement, nous utilisons l'ensemble des NO. Nous savons que les NO n'ont pas le même comportement le long de l'axe d'élongation et qu'ils ne sont pas tous informatifs. Le problème posé est donc d'extraire les NO permettant d'obtenir les résultats les plus précis possibles.

L'extraction de NO informatifs peut se faire de plusieurs manières :

- Etude des spectres déconvolués et soustractions spectrales pour obtenir les NO différentiels (Wilson et al., 2000; Kacurakova et al., 2002).
- Etude des spectres dérivés par ACP et analyse des loadings (Coimbra et al., 1999; Philippe et al., 2003).
- Etude mixant les dérivés, les soustractions, les comparaisons de courbes et la déconvolution (Ferraty and Vieu, 2002; Ferraty et al., 2007).

Les travaux menés dans l'équipe d'Herman Höfte, sur les mutants *Arabidopsis* cellulose déficients (Mouille et al., 2003), ont mis en place une méthode innovante pour le traitement des spectres IR. En effet, l'extraction des NO informatifs se fait par sélection de variables (Robin et al., 2003). Ces NO sont ensuite utilisés pour faire du clustering hiérarchique. Il a été démontré que la sélection de variables est l'algorithme le plus puissant pour l'extraction des NO. Des comparaisons ont été faites avec, par exemple, la régression PLS ou l'analyse factorielle discriminante. Cette sélection de variables permet de s'affranchir de l'ensemble des corrélations existantes entre les NO et de sélectionner des variables ayant le même poids dans l'analyse.

Cependant, cette méthode statistique n'a pas pu être appliquée pour plusieurs raisons. La culture *in vitro* d'hypocotyles à l'obscurité est beaucoup plus reproductible que la culture *in vitro* des racines en lumière. Les plantules sont beaucoup plus sensibles lorsqu'elles subissent des cycles jours/nuits. Nous avons démontré que les racines ont une vitesse de croissance liée à ces cycles. Les néons, présents dans les salles de cultures, vieillissent, et la lumière n'est donc pas constante. De plus, les expérimentations effectuées sur les hypocotyles ont permis le calcul d'un effet jour, d'un effet boîte et d'un effet hypocotyle, permettant la mise en place d'un plan d'expérience. Malheureusement, notre effet racine est trop complexe pour être pris en compte. C'est pourquoi nous avons finalement traité nos spectres IR en utilisant le calcul des dérivés et en faisant des analyses par ACP et analyse de la variance sur la première composante. Cependant, nous avons testé plusieurs segmentations de racines en n'utilisant qu'une partie des NO : les NO sélectionnés sur les hypocotyles, les NO identifiés pour la cellulose, les pectines ou certaines fonctions chimiques comme les amides. Les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants, les clusters définis ne comportaient pas de spectres contigus le long de l'axe d'élongation, et la segmentation sur racine individuelle était très hétérogène (nombre de segments).

Mais finalement, nous avons pu mettre en évidence une trentaine de NO spécifiques de la racine, ainsi que des NO spécifiques sur les racines traitées aux herbicides. Par manque de temps, nous n'avons pas pu refaire une segmentation sur l'ensemble des cartographies en utilisant uniquement ces variables. Il serait cependant intéressant de voir comment évolueraient les résultats.

Corrélation entre les NO

Nous avons pu identifier les NO les plus informatifs, mais un problème majeur demeure : ils ne sont pas indépendants mais corrélés. La corrélation des NO n'est pas connue.

Toutefois, nous pouvons faire l'hypothèse que 2 NO consécutifs peuvent être corrélés (ils appartiennent à un même pic) et il a été démontré qu'un composé peut être absorbé à plusieurs endroits du spectre, créant ainsi une corrélation entre NO lointains (corrélation entre pics).

Nous avons choisi, dans notre modèle de segmentation, de ne pas tenir compte de cette dépendance. De plus, nous avons considéré que tous les NO avaient la même variance, ce qui est aussi une approximation forte. Il est possible de construire un modèle de segmentation simultanée de processus qui prennent en compte des variances différentes pour chaque NO. Le modèle s'écrirait de la façon suivante :

Sachant que les observations sont supposées être des réalisations de n variables aléatoires indépendantes, notées Y_t telles que

$$\forall t \in I^k, Y_t^u = \mu_k^u + \varepsilon_t^u \quad \text{où } u \text{ est le } u^{\text{ème}} \text{ NO}$$
$$\text{où } I^k = [t_{k-1} + 1, t_k]$$

et où les erreurs $\{\varepsilon_t\}$ sont distribuées selon une loi normale multidimensionnelle de matrice de variance Σ avec des variances dépendantes des NO et des corrélations modélisées par un processus autorégressif. Les instants de ruptures sont les $t_1 < \dots < t_{K-1}$ avec la convention $t_0 = 1$ et $t_K = n$ où K est le nombre de segments.

Ce modèle qui généralise le modèle standard, pourrait sans doute être appliqué dans de nombreux domaines (la médecine, la bioclimatologie, ou la croissance des plantes). Il nécessite de mettre au point une méthode spécifique d'estimation des paramètres. Il n'a pu être ni développé, ni *a fortiori* utilisé, par manque de temps.

Un autre point important à ne pas négliger, est le nombre de NO qui peut être corrélé. La quantité de NO corrélés est dépendante des composés étudiés et les NO informatifs sont dépendants des changements qualitatifs ou quantitatifs de ces composés. Donc, entre deux positions le long de l'axe d'élongation, nous souhaiterions identifier les changements pariétaux. Si les NO sont corrélés et informatifs à la position 1, et que la quantité du composé double à la position 2, l'intensité du pic ou des pics doublerait et nous retrouverions les mêmes NO. Il est également possible qu'un seul des pics double d'intensité car le changement de quantité s'accompagnerait d'un changement de qualité. Les NO à la position 2 seraient alors différents et corrélés d'une autre façon. Je ne sais pas à quels points les modèles statistiques que nous pourrions mettre en place peuvent prendre en compte ce genre de changements.

Variabilité radiale des racines

Il est vrai que les études IR, menées au laboratoire sur les mutants hypocotyles, ont été très concluantes, et il semblait logique d'élargir ces travaux à un autre organe de la plante. Cependant, la racine est un organe, en forme de cylindres imbriqués, beaucoup plus complexe que l'hypocotyle. Elle comporte beaucoup plus de tissus différents et la littérature la présente comme un organe très réactif aux changements environnementaux. Nous avons démontré au cours de cette thèse qu'il existe plusieurs sources de variabilité.

Une variabilité inter-racines qui n'a pas pu être éradiquée, malgré nos efforts dans le maintien de conditions expérimentales, les plus homogènes possibles. Par exemple, les résultats d'ACP sur les racines traitées au DCB montrent que les racines A et H sont très différentes des autres. Il existe également une variabilité intra-racines présente à plusieurs niveaux.

Des études récentes d'analyse de puces à ADN (Birnbaum et al., 2003; Brady et al., 2007) ont montré que l'expression des gènes, au sein d'une cellule racinaire, était fonction de sa position le long de l'axe d'élongation (profil longitudinal) et du tissu où elle se trouve (profil radial). Ces travaux coûteux ont été menés sur 2 racines indépendantes mettant en évidence que le profil d'expression des gènes est différent. Cette variabilité longitudinale et radiale est confirmée sur l'étude de marquages anticorps LM5/LM6 effectués sur l'épiderme de surface ou sur des coupes longitudinales et transversales de racines.

Cette variabilité radiale est un facteur que nous n'avons pas pris en compte dans nos études IR. Lors de la préparation des racines pour l'acquisition des données, nous les écrasons. Ce traitement ne posait pas de problème pour les hypocotyles. Or, la taille des cellules des hypocotyles (1 mm en fin d'élongation) et celles des racines (5 μm à 150 μm) ne sont pas comparables. Le nombre de tissus mis en jeu est également différent. L'écrasement des échantillons « mélange » les tissus racinaires en les superposant.

Nous pouvons envisager un autre mode de préparation des échantillons qui prendrait en compte la complexité tissulaire des racines. L'utilisation d'un microdissecteur laser pourrait ainsi nous permettre d'isoler les différents tissus de la racine pour une position donnée le long de l'axe d'élongation, voire une cellule. Nous cherchons cependant à étudier les parois et bien que la microdissection soit une technologie de pointe, elle présente des limites. Une image vidéo lors de la dissection est réalisée, ce qui présente un énorme avantage *a posteriori* pour pouvoir définir la taille des cellules, leur volume et leur forme. Nous pouvons de même envisager de « peler » la racine ou de la desquamer.

Outre la préparation des échantillons, la taille des cellules dans la zone méristématique pose un problème. Globalement, ces cellules peuvent être comparées à des parallélépipèdes de 5 μm de côté. Le faisceau IR utilisé pour l'acquisition des cartographies est de 15 μm , il couvre donc plusieurs cellules, ce qui ne sera plus le cas au fur et à mesure que le faisceau remonte le long de l'axe d'élongation. En effet, il faut une dizaine de spectres environ pour couvrir une cellule en fin d'élongation. La taille du faisceau est donc importante. L'avancée des technologies IR nous permet de descendre en résolution. Le laboratoire vient d'acquérir le dernier spectromètre IR dédié à l'imagerie de chez ThermoFisher Scientific, l'IN10, qui pourra nous permettre de faire des spectres tout les 10 μm et plus rapidement. Quant à la ligne SMIS du synchrotron Soleil de Saclay, elle permet d'acquérir des spectres tous les microns. Réduire la taille du faisceau permettrait donc de s'affranchir des problèmes posés par la taille des cellules.

En ce qui concerne la variabilité radiale des racines, les informations sont présentes dans les cartographies que nous avons acquises, mais elles n'ont pas pu être analysées. Nous avons choisi de moyenniser les spectres d'une même position, afin de lisser les données, or il aurait été judicieux de conserver chaque spectre individuellement. Nous aurions alors pu évaluer la variabilité radiale pour chaque position le long de l'axe d'élongation. Par contre, le nombre de spectres n'aurait pas été suffisant pour faire des tests statistiques puissants (de 4 à 12 spectres par positions). Vient s'ajouter à ce faible nombre de données, les problèmes de segmentations dans plusieurs dimensions. Si nous conservons ces données, nous devons traiter des cartographies en 3D : l'axe d'élongation en x , l'axe radial en y et les NO en z . C'est dans ce contexte que la sélection de NO entre en jeu. Nous pourrions utiliser les NO identifiés

par l'étude des loadings pour passer de cartographies 3D à des cartographies 2D en traitant les NO un par un. Nous pourrions ensuite appliquer l'algorithme de segmentation selon l'axe d'élongation, puis pour chaque zone identifiée, segmenter selon l'axe radial. Nous avons tenté ce type de segmentation 2D sur nos cartographies en segmentant dans un premier temps que les NO puis pour chaque segment selon l'axe d'élongation de la racine. Les résultats avaient montré que pour chaque groupe de NO, la segmentation le long de l'axe d'élongation était différente. Les groupes de NO formés n'étant pas très pertinents à cause des corrélations inter-NO, nous n'avons pas poussé plus loin nos investigations.

Références

- Aeschbacher, R.A., Hauser, M.T., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N.** (1995). The SABRE gene is required for normal cell expansion in Arabidopsis. *Genes Dev* **9**, 330-340.
- Al-Qsous, S., Carpentier, E., Klein-Eude, D., Burel, C., Mareck, A., Dauchel, H., Gomord, V., and Balange, A.P.** (2004). Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta* **219**, 369-378.
- Alonso-Simon, A., Garcia-Angulo, P., Encina, A.E., Alvarez, J.M., Acebes, J.L., and Hayashi, T.** (2007). Increase in XET activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cells habituated to dichlobenil. *Planta* **226**, 765-771.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., and Williamson, R.E.** (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Science* **279**, 717-720.
- Auger, I., and Lawrence, C.** (1989). Algorithms for the optimal identification of segments neighborhoods. *Bull. Math. Biol.* **51**, 39-54.
- Baskin, T.I., Beemster, G.T., Judy-March, J.E., and Marga, F.** (2004). Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 2279-2290.
- Basseville, N., and Nikiforov, I.** (1993). Detection of abrupt changes. Theory and application. Prentice Hall Information and system sciences series.
- Baumann, M., Eklof, J., Michel, G., Kallas, A., Teeri, T., Czjzek, M., and Brumer, A.** (2007). Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: Biological implications for cell wall metabolism. *Plant Cell* **19**, 1947-1963.
- Beemster, G.T., and Baskin, T.I.** (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **116**, 1515-1526.
- Beemster, G.T., and Baskin, T.I.** (2000). Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**, 1718-1727.
- Bellman, R., and Dreyfus, S.** (1962). Applied dynamic programming. Princeton University Press.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., and Aeschbacher, R.A.** (1993). Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57-70.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W., and Benfey, P.N.** (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science* **302**, 1956-1960.
- Bosch, M., and Hepler, P.** (2005). Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tube. *Plant Cell* **17**, 3219-3226.
- Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M.T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Hofte, H., and Truong, H.N.** (2002). QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2577-2590.

- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U., and Benfey, P.N.** (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**, 801-806.
- Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Kova, J., and Imberty, A.** (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* **16**, 29-37.
- Carol, R., and Dolan, L.** (2006). The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot* **57**, 1828-1834.
- Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**, 1-30.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S., and Lloyd, C.** (2007). Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. *Nat Cell Biol* **9**, 171-175.
- Chanliaud, E., Burrows, K.M., Jeronimidis, G., and Gidley, M.J.** (2002). Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta* **215**, 989-996.
- Cho, H.T., and Cosgrove, D.J.** (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 3237-3253.
- Clarke, A., Anderson, R., and Stone, B.** (1979). Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* **18**, 521-540.
- Clowes, F.** (1954). The promeristem and minimal construction centre in grass roots. *New Phytol.* **52**, 48-57.
- Coimbra, M., Barros, A., Rutledge, D., and Delgadillo, I.** (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate research* **317**, 145-154.
- Cosgrove, D.** (2000). Loosening of plant cell wall by expansins. *Nature* **47**, 321-326.
- Cui, H., Levesque, M.P., Vernoux, T., Jung, J.W., Paquette, A.J., Gallagher, K.L., Wang, J.Y., Blilou, I., Scheres, B., and Benfey, P.N.** (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* **316**, 421-425.
- Davies, G., Hiller, S., and Bruce, D.** (1998). A membrane model for elastic deflexion of individual plant cell walls. *J Texture Stud* **29**, 645-667.
- De Cnodder, T.** (2005). Ethylene controls cell elongation in the *Arabidopsis thaliana* root at level of the cell wall. PhD manuscript, antwerpen universiteit.
- Delmer, D.P., Read, S.M., and Cooper, G.** (1987). Identification of a Receptor Protein in Cotton Fibers for the Herbicide 2,6-Dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol* **84**, 415-420.
- Desnos, T., Orbovic, V., Bellini, C., Kronenberger, J., Caboche, M., Traas, J., and Hofte, H.** (1996). Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedlings. *Development* **122**, 683-693.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refrégier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S., and Hofte, H.** (2002). Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform of CESA6. *Plant Physiol* **128**, 482-490.
- Dobigeon, N., Tourneret, J., and Davy, M.** (2007). Joint segmentation of piecewise constant autoregressive processes by using a hierarchical model and a bayesian sampling approach. HAL-CCSD.
- Doblin, M., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., and Delmer, D.** (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *plant Cell Physiol* **43**, 1407-1420.

- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71-84.
- Edwards, M., Dickson, C., Chengappa, S., Sidebottom, C., Gidley, M., and Reid, J.** (1999). Molecular characterization of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *plant J* **19**, 691-697.
- Erikson, R., and Sax, K.** (1956). Experimental growth rate of primary root of *Zea mays*. *Proceedings of the Am. Phys. Society* **100**, 487-498.
- Estelle, M., and Somerville, C.** (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 200-206.
- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., McCann, M., Rayon, C., Vernhettes, S., and Hofte, H.** (2000). PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2409-2424.
- Faik, A., Price, N., Raikhel, N., and Keegstra, K.** (2002). An *Arabidopsis* gene encoding an alpha xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *PNAS* **99**, 7797-7802.
- Fan, L., and Neumann, P.** (2004). The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profile of proton flux and cell wall pH. *Plant Physiol* **135**, 2291-2300.
- Ferraty, F., and Vieu, P.** (2002). The fonctionnal nonparametric model and application to spectrometric data. *Computational Statistics* **17**, 545-564.
- Ferraty, F., Vieu, P., and Viguier-Pla, V.** (2007). Factor-based comparison of groups of curves. *Computational Statistics & Data Analysis* **51**, 4903-4910.
- Fleming, A., McQueen-Mason, S., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (1997). Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science* **276**, 1415-1418.
- Freixes, S., Thibaud, M.-C., Tardieu, F., and Muller, B.** (2002). Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1357-1366.
- Fry, S., and Edelman, H.** (1992). Effect of cellulose synthesis inhibition on growth and the integration of xyloglucan into Pea internode cell walls. *Plant Physiol* **100**, 993-997.
- Fry, S., York, W., and Albersheim, P.** (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* **89**, 1-3.
- Giddings, T., and Staehelin, L.** (1991). Microtubule mediated-control of microfibril deposition; a re-examination of the hypothesis. In *The Cytoskeletal basis of plant growth and form* (Lloyd, C.W. ed.) San Diego, CA. Academic Press **85-99**.
- Goodwin, R., and Stepka, W.** (1945). Growth and differentiation in the root tip of *phleum pratense*. *American Journal of Botany* **32**, 36-46.
- Green, P., and Cummins, R.** (1974). Growth rate and turgor pressure - Auxin effects studies with automated apparatus for single Coleoptile. *Plant Physiol* **54**, 863-869.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Maree, A.F., Hogeweg, P., and Scheres, B.** (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013.
- Guedon, Y., Caraglio, Y., Heuret, P., Lebarbier, E., and Meredieu, C.** (2007). Analyzing growth components in trees. *J Theor Biol* **248**, 418-447.
- Hasunuma, T., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.** (2004). Expression of fungal pectin methylesterase in transgenic tobacco leads to alteration in cell wall metabolism and a dwarf phenotype. *J Biotechnol* **111**, 241-251.

- Hauser, M., and Bauer, E.** (2000). Histochemical analysis of root meristem activity in *Arabidopsis thaliana* using a cyclin:GUS (β -glucuronidase) marker line. *Plant and soil* **226**, 1-10.
- Hauser, M.T., Morikami, A., and Benfey, P.N.** (1995). Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development* **121**, 1237-1252.
- Heath, I.** (1974). A unified hypothesis for the role of membrane-bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. *J. Theor. Biol.* **48**, 445-449.
- Heim, D.R., Roberts, J.L., Pike, P.D., and Larrinua, I.M.** (1989). Mutation of a Locus of *Arabidopsis thaliana* Confers Resistance to the Herbicide Isoxaben. *Plant Physiol* **90**, 146-150.
- Heim, D.R., Skomp, J., Tschabold, E., and Larrinua, I.M.** (1990). Isoxaben Inhibits the Synthesis of Acid Insoluble Cell Wall Materials In *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **93**, 0695-0700.
- Heim, D.R., Roberts, J.L., Pike, P.D., and Larrinua, I.M.** (1990). A Second Locus, *Ixr B1* in *Arabidopsis thaliana*, that Confers Resistance to the Herbicide Isoxaben. *Plant Physiol* **92**, 858-861.
- Henrissat, B., Coutinho, P., and Davies, G.** (2001). A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **47**, 55-72.
- Herman, E., and Lamb, C.** (1992). Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiol* **98**, 264-272.
- Himmelspach, R., Williamson, R.E., and Wasteneys, G.O.** (2003). Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganization. *Plant J* **36**, 565-575.
- Kacurakova, M., Smith, A.C., Gidley, M.J., and Wilson, R.H.** (2002). Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Res* **337**, 1145-1153.
- Kelly, G.** (1999). Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. *Altern Med Rev.* **2**, 96-103.
- Knight, M.R.** (2007). New ideas on root hair growth appear from the flanks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20649-20650.
- Knox, J.P., Linstead, P., King, J., Cooper, C., and Roberts, K.** (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* **181**, 512-521.
- Knox, J.P., Linstead, P., Peart, J., Cooper, C., and Roberts, K.** (1991). Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J* **1**, 317-326.
- Kobayashi, M., Matoch, T., and Azuma, J.** (1996). Two chains of rhamnogalacturonan II are cross linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol* **110**, 1017-1020.
- Lavielle, M.** (2005). Using penalized contrast for the change-point problem. *Signal processing* **85**, 1501-1510.
- Lavielle, M., and Lebarbier, E.** (2001). An application of MCMC methods for the multiple change-points problem. *Signal processing* **81**, 39-53.
- Lebarbier, E.** (2005). Detecting Multiple Change-Points in the Mean of Gaussian Process by Model Selection. *Signal processing* **85**, 717-736.
- Lerouxel, O., Choo, T., Séveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., and Pauly, M.** (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol* **1754-1763**.

- Levesque, M.P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J.Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J.U., Scheres, B., and Benfey, P.N.** (2006). Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis. *PLoS Biol* **4**, e143.
- Li, Y., Jones, L., and McQueen-Mason, S.** (2003). Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 1-8.
- Liners, F., Thibault, J., and Van Cutsem, P.** (1992). Influence of the degree of polymerisation of oligogalacturonates and esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiol* **99**, 1099-1104.
- Luo, J., Ying, K., and Bai, J.** (2005). Stavisky-Golay smoothing and differentiation filter for even number data. *Signal processing* **85**, 1429-1434.
- Ma, Z., Baskin, T.I., Brown, K.M., and Lynch, J.P.** (2003). Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol* **131**, 1381-1390.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., and Bennett, M.** (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *Embo J* **18**, 2066-2073.
- Matsumoto, B.** (1993). Cell biological applications of confocal microscopy. Academic Press, San-Diego.
- McCann, M., Wells, B., and Roberts, K.** (1992). Complexity in the spatial localization and length distribution of plant cell wall matrix polysaccharides. *J. Microsc.* **166**, 123-136.
- McCann, M., Chen, L., Roberts, K., Kemsley, E., Sene, C., Carpita, N.C., Stacey, N., and Wilson, R.H.** (1997). Infrared microspectroscopy: sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiol Plant* **100**, 729-738.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D., and Cosgrove, D.** (1992). Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *Plant Cell* **4**, 1425-1433.
- Micheli, F.** (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci* **6**, 414-419.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C., and Gilroy, S.** (2007). Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20996-21001.
- Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S., and Hofte, H.** (2003). Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J* **35**, 393-404.
- Moustacas, M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., and Ricard, J.** (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. *Biochem J* **279**, 351-354.
- Ng, A., Harvey, A., Parker, M., Smith, A., and Waldron, K.** (1998). Effect of oxidative coupling on the thermal stability of texture and cell wall chemistry of beet root (*Beta vulgaris*). *J Agric Food Chem* **46**, 3365-3370.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., and Hofte, H.** (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. *Embo J* **17**, 5563-5576.
- Nothnagel, E.A.** (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol* **174**, 195-291.
- O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A.G.** (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods in plant biochemistry* **2**, 415-441.
- O'Neill, M., S., E., Albersheim, P., and Darvill, A.G.** (2001). Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science* **294**, 846-849.

- Pagant, S., Bichet, A., Sugimoto, K., Lerouxel, O., Aletti, E., Desprez, T., McCann, M., Lerouge, P., Vernhettes, S., and Hofte, H.** (2002). KOBITO 1 encodes a novel plasma membrane necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2001-2013.
- Pahlavanian, A., and Silk, W.** (1988). Effect of temperature on spatial and temporal aspects of root growth in the primary maize root. *Plant Physiol* **87**, 529-532.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A.G., and York, W.** (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell of higher plants. *Plant J* **20**, 629-639.
- Pawley, J.** (1990). *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, NY.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., and Mellerowicz, E.J.** (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci* **12**, 267-277.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., and Delmer, D.** (2002). Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* **295**, 147-150.
- Pennell, R., Janniche, L., Kjellbom, P., Scofield, G., Peart, J., and Roberts, K.** (1991). Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell* **3**, 1317-1326.
- Perrin, R., DeRocher, A., Bar Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellana, A., Raikhel, N., and Keegstra, K.** (1999). Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* **284**, 1976-1979.
- Philippe, S., Robert, P., Barron, C., Saulnier, L., and Guillon, F.** (2003). Deposition of cell wall polysaccharides in wheat endosperm during grain development: Fourier Transform-Infrared Microscopy study. *J Agric Food Chem* **54**, 2303-2308.
- Picard, F., Robin, S., Lebarbier, E., and Daudin, J.J.** (2007). A segmentation/clustering model for the analysis of array CGH data. *Biometrics* **63**, 758-766.
- Picard, F., Robin, S., Lavielle, M., Vaisse, C., and Daudin, J.J.** (2005). A Statistical approach for array CGH data analysis. *BMC Bioinformatics*, 6:27.
- Pilling, J., Willmitzer, L., Bucking, H., and Fisahn, J.** (2004). Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta* **219**, 32-40.
- Pritchard, J.** (1994). The control of cell expansion in roots. *New Phytol.* **127**, 3-26.
- Rajangam, A.S., Kumar, M., Aspeborg, H., Guerriero, G., Arvestad, L., Pansri, P., Brown, C.J., Hober, S., Blomqvist, K., Divne, C., Ezcurra, I., Mellerowicz, E., Sundberg, B., Bulone, V., and Teeri, T.T.** (2008). MAP20, a microtubule-associated protein in the secondary cell walls of hybrid aspen, is a target of the cellulose synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol* **148**, 1283-1294.
- Reiter, W.D., Chapple, C., and Somerville, C.R.** (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J* **12**, 335-345.
- Robin, S., Lecomte, M., Höfte, H., and Mouille, G.** (2003). A procedure for the clustering of cell wall mutants in the model plant *Arabidopsis* based on Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy. *J. App. Stat.* **30**, 669-681.
- Robinson, D.G., and Quader, H.** (1981). Structure, synthesis, and orientation of microfibrils. IX. A freeze-fracture investigation of the *Oocystis* plasma membrane after inhibitor treatments. *Eur J Cell Biol* **25**, 278-288.
- Rose, J., Braam, J., Fry, S., and Nishitani, K.** (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* **43**, 1421-1435.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B.** (1999). An auxin-

- dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sabba, R., and Vaughn, K.** (1999). Herbicides that inhibit cellulose biosynthesis. *Weed Sci.* **47**, 757-753.
- Sachs, J.** (1887). *Vorlesung über Pflanz-Physiologie*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Sanborn, M., Cole, D., Kerr, K., Vakil, C., Sanin, L., and Bassil, K.** (2004). Systematic Review of Pesticide Human Health Effects. *Pesticides Literature Review*.
- Sato, S., Kato, T., Kakegawa, K., Ishii, T., Liu, Y., Awano, T., Takabe, K., Nishiyama, Y., Kuga, S., and Nakamura, Y.** (2001). Role of the putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **42**, 251-263.
- Scheible, W.R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., and Somerville, C.** (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in Arabidopsis Ixr1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10079-10084.
- Scheres, B., Benfey, P., and Dolan, L.** (2002). *The Arabidopsis Book - Root Development*. American Society of Plant Biologists.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek, P.** (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* **120**, 2475-2487.
- Scheres, B., DiLaurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M., Janmaat, K., Weisbeek, P., and Benfey, P.** (1995). Mutations affecting the radial organisation of Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53-62.
- Sene, C., McCann, M.C., Wilson, R.H., and Grinter, R.** (1994). Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plant Cell Walls and Their Components). *Plant Physiol* **106**, 1623-1631.
- Shedletzky, E., Shmuel, M., Trainin, T., Kalman, S., and Delmer, D.** (1992). Cell Wall Structure in Cells Adapted to Growth on the Cellulose-Synthesis Inhibitor 2,6-Dichlorobenzonitrile: A Comparison between Two Dicotyledonous Plants and a Gramineous Monocot. *Plant Physiol* **100**, 120-130.
- Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8827-8832.
- Showalter, A.** (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1399-1417.
- Silverstein, Basler, and Morill.** (1991). *Identification spectrométrique de composés organiques*. De Boeck Université Ed., 91-164.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H.** (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**, 2206-2211.
- Sommer-Knudsen, J., Bacic, A., and Clarke, A.** (1998). Hydroxyprolin-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* **47**, 483-497.
- Stevens, J., Mills, L., and Trogadis, J.** (1994). *3D confocal microscopy: volume investigation of biological systems*. Academic Press, London.
- Taylor, N., Laurie, S., and Turner, S.** (2000). Multiple cellulose synthase catalytic subunit are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 2529-2539.

- Thibault, J., Renard, C., Axelos, M., Roger, P., and Crepeau, M.** (1993). Studies of the length of homogalacturonic region in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydr Res* **238**, 271-286.
- Thompson, J., and Fry, S.** (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* **211**, 275-286.
- Torres, M., Jones, J., and Dangel, J.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**, 373-378.
- Van-Buren, J.** (1979). The Chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Text Stud* **10**, 1-23.
- Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N.V., Keegstra, K., and Reiter, W.D.** (2002). The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3340-3345.
- Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen, R.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G., and Visser, R.G.** (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**, 1781-1789.
- Vocadlo, D., Davies, G., Laine, R., and Withers, S.** (2001). Catalysis by hen egg-white lysosyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**, 835-838.
- Walter, A., and Schurr, U.** (2005). Dynamics of leaf and root growth: endogenous control versus environmental impact. *Ann Bot (Lond)* **95**, 891-900.
- Walter, A., Spies, H., Terjung, S., Kusters, R., Kirchgessner, N., and Schurr, U.** (2002). Spatio-temporal dynamics of expansion growth in roots: automatic quantification of diurnal course and temperature response by digital image sequence processing. *J Exp Bot* **53**, 689-698.
- Whitney, S., Gidley, M., and McQueen-Mason, S.** (2000). Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *plant J* **22**, 327-334.
- Whitney, S., Brigham, J., Darke, A., Reid, J., and Gidley, M.** (1995). In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks. Ultrastructural and molecular aspects. *Plant J* **8**, 491-504.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., and Knox, J.P.** (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**, 9-27.
- Wilson, R.H., Smith, A.C., Kacurakova, M., Saunders, P.K., Wellner, N., and Waldron, K.W.** (2000). The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiol* **124**, 397-405.
- Yariv, J., Rapport, M.M., and Graf, L.** (1962). The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem J* **85**, 383-388.
- Zablackis, E., Huang, J., Muller, B., Darvill, A.G., and Albersheim, P.** (1995). Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol* **107**, 1129-1138.
- Zablackis, E., York, W.S., Pauly, M., Hantus, S., Reiter, W.D., Chapple, C.C., Albersheim, P., and Darvill, A.** (1996). Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*. *Science* **272**, 1808-1810.

Résumé

Lors de travaux précédents, nous avons montré que la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est un outil puissant pour la détection de modifications de la paroi cellulaire dans différents fonds mutants chez *Arabidopsis thaliana*.

Le but de ce projet est de mieux définir les modifications pariétales qui apparaissent au cours de l'élongation cellulaire dans un organe en croissance comme la racine. Nous acquérons des spectres infrarouges le long de l'axe d'élongation entre la coiffe (pointe racinaire) et le premier poil racinaire. Nous avons utilisé une méthode statistique d'analyse innovante par segmentation simultanée de processus multiples qui nous permet d'identifier des zones homogènes dans la racine à partir des différences entre spectres infrarouges. Cette méthode permet donc de définir des nombres d'ondes diagnostiques spécifiques de différents stades cellulaires dans la racine.

L'effet de traitements herbicides a été étudié via cette approche. Il nous a paru possible de voir un parallèle entre les modes d'action spécifiques de ces molécules et les changements dans la segmentation de la racine. Notre approche a permis de développer un nouvel outil permettant d'appréhender les modifications structurales de la paroi au cours de la croissance de la racine.

Abstract

Previous studies in our laboratory established that Fourier transform infrared spectroscopy is a powerful tool for the detection of primary cell wall modifications in different cell wall mutants of *Arabidopsis thaliana*.

Our project goal is to better define cell wall modifications that appear during cell elongation in growing organs such as the root. We acquire infrared spectra along the root elongation axis from the root tip to the first root hair. We used an innovative statistical algorithm implementing a simultaneous multiple change-point method that allows us to identify homogenous zones in the root from infrared spectra. This method permits the identification of wavenumbers specific for different developmental stages in the root.

Using this approach, the effect of herbicide treatments were studied. We were able to establish a relationship between the specific action of these compounds and changes in the position of zones in the root. Our method allowed the development of a new tool that sheds light on structural modifications of the cell wall occurring during growth of the root.