

Année de l'AAP : 2007

Projet N° 07047 Achevé

Titre du projet : Croissance foliaire et déficit hydrique chez <i>A. thaliana</i> et chez le pommier : les trois dimensions
--

Unité responsable du projet : LEPSE (Laboratoire d'Écophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux) (Inra, SupAgro)

Porteur de projet : Christine Granier (granier(a)supagro.inra.fr)

Pays associé au projet : Royaume Uni

Unités de recherche du réseau scientifique d'Agropolis Fondation associés : AGAP

Sous-axes thématiques : BIP-1 : Génétique et génomique, amélioration des plantes, écophysiologie

Objectifs :

La biomasse foliaire totale d'une plante est une intégration de variables dépendant de processus élémentaires comme la production foliaire, la durée et le taux d'expansion de chaque feuille, son épaisseur, ainsi que la production et l'expansion cellulaires. Un préalable indispensable à toute approche de modélisation de la croissance d'ensemble de la plante est de comprendre comment les différentes variables de la croissance foliaire sont reliées entre elles. Jusqu'à présent, les liens causaux ou fonctionnels existant entre ces variables n'ont pas été clairement identifiés. En outre, l'échelle et le tissu au niveau desquels s'opère le contrôle de la croissance ne sont pas clairement établis.

La contribution des différents processus potentiellement impliqués dans les réponses de la croissance foliaire d'*A. thaliana* aux stress environnementaux (principalement à la sécheresse) est en cours d'évaluation au sein de l'unité de recherche LEPSE. Une plateforme de phénotypage automatisé (PHENOPSIS) a été mise en place pour cultiver les plantes dans des conditions environnementales reproductibles, en particulier dans des conditions optimales et dans un contexte de stress hydrique bien documenté.

Jusqu'à présent, la croissance n'a été considérée que comme une expansion de la surface foliaire, ensuite décomposée en un ensemble de variables sous-jacentes comme le taux et la durée d'expansion des feuilles ou le nombre et la taille des cellules épidermiques. Des relations reproductibles entre ces variables et les conditions micro-météorologiques ont pu être établies. Les feuilles croissent pourtant en trois dimensions.

Les objectifs de ce projet consistent à :

- analyser les relations entre les variables de la croissance cellulaire des feuilles ;
- identifier les liens fonctionnels qui existent entre elles ;
- évaluer leur contribution à la plasticité de la croissance foliaire en réponse à la sécheresse. À cette fin, une approche écophysiologique sera combinée avec une modélisation statistique, à la fois chez le pommier, l'un des arbres fruitiers les plus importants dans le monde sur un plan économique, et chez *A. thaliana*, plante modèle.

Des protocoles seront établis afin d'analyser de façon reproductible la superficie cellulaire, le nombre de cellules et leur volume dans les différentes couches de tissus chez les deux espèces. Des procédures d'analyse automatique de l'image seront développées pour améliorer le rendement de ces expériences. Ensuite, la croissance foliaire sera altérée par des perturbations d'ordre à la fois génétique et environnemental, en tirant profit des nombreuses ressources génétiques

disponibles pour les deux groupes (*A. thaliana* et pommier), et de la capacité du LEPSE à soumettre les plantes à des traitements de sécheresse reproductibles. Tout au long du projet, une approche de modélisation statistique sera développée afin d'analyser et d'interpréter la masse des données collectées aux différentes échelles.

L'analyse des interactions entre la plasticité de la surface foliaire et l'épaisseur des feuilles manque dans les deux études (sur *A. thaliana* et sur le pommier). Combiner l'expertise des différents partenaires en matière de croissance foliaire des dicotylédones et de modélisation statistique et fonctionnelle permettra d'élaborer un modèle de la croissance foliaire en 3D.

Actions menées et résultats obtenus :

Contexte : La croissance des feuilles peut être analysée à différentes échelles, au niveau cellulaire, des feuilles individuelles ou de la plante entière. Les études sur la croissance foliaire (que ce soit pour analyser l'effet de l'environnement sur la croissance ou pour comparer des génotypes) ont majoritairement été réalisées en collectant des données sur la surface de la feuille, le nombre et la surface des cellules épidermiques. L'épaisseur de la feuille et l'épaisseur des tissus palissadiques et mésophylliens ont rarement été considérés malgré le fait que ces tissus jouent un rôle important dans la régulation de la photosynthèse, et que leur organisation cellulaire affecte la transpiration et l'accumulation de photosynthétats. Le nombre très limité d'analyses de croissance foliaire en considérant les tissus sous-épidermiques relève certainement de verrous méthodologiques importants. Du coup, il y a très peu de connaissance sur la coordination du développement des différents tissus lors du développement d'une feuille et comment les conditions environnementales, telles le déficit hydrique du sol, affectent la mise en place de ces différents tissus.

Objectifs: Le premier objectif de ce projet était de mettre au point un protocole permettant d'analyser la croissance foliaire au niveau cellulaire, en 3 dimensions, à la fois pour des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* et de pommiers, deux espèces avec des organisations cellulaires différentes. Dans un deuxième temps, ce protocole devait être utilisé pour analyser la croissance des feuilles de ces deux espèces en réponse à une contrainte hydrique du sol et en comparant différents fonds génétiques.

Actions et résultats: Le protocole pour l'imagerie cellulaire de la feuille en 3 dimensions et l'analyse des images en résultant a été établi et éprouvé à la fois dans les feuilles d'*Arabidopsis* et de pommier. Ce protocole a d'ores et déjà été partagé avec de nombreux autres laboratoires et a donné lieu à une publication méthodologique dans une revue internationale à comité de lecture [Plant Methods, 2010, 6: 17]. Il comprend trois phases : (1) une procédure pour fixer et préparer l'échantillon, (2) l'imagerie de cet échantillon au bi-photon et (3) l'analyse des images produites. Le protocole ainsi établi permet d'analyser de nombreux échantillons pour faire face au débit croissant des analyses de phénotypage (Phenopsis, Lepse, INRA Montpellier) [<http://bioweb.supagro.inra.fr/phenopsis/>].

Le protocole, une fois mis au point et validé, a été utilisé pour analyser la croissance des feuilles d'*Arabidopsis* et de pommiers de leur émergence jusqu'à la fin de l'expansion en prenant en compte les gradients spatiaux de développement (de la pointe à la base de la feuille, entre les différents tissus etc.). Les données collectées comportent des données de proportions de tissus, de densité cellulaire dans chaque tissu, de volume de cellules etc. Cette étude a été menée dans différentes conditions environnementales pour évaluer l'impact d'une contrainte hydrique du sol et de la durée du jour sur toutes ces variables. Dans un deuxième temps, chez *Arabidopsis thaliana*, des mutants affectés dans le métabolisme carboné ou la transpiration ont été rajoutés à ce type d'analyses.

Les expérimentations ainsi que la préparation des échantillons ont été réalisées sur le campus INRA- SUPAGRO dans les locaux du LEPSE ou de DAP. L'imagerie a été réalisée sur le microscope multiphoton (Zeiss LSM 510 Meta NLO équipé d'un Chameleon femtosecond laser) de la plateforme Montpellier RIO Imaging, au plateau PHIV du CIRAD. Les reconstructions 3D de feuilles à partir des images réalisées sur le plateau PHIV ont été réalisées grâce aux outils développés par l'équipe VIRTUAL PLANT, MedINRIA ImageViewer software (Asclepios Resaerch project, INRIA Sophia Antipolis) [<http://www-sop.inria.fr/asclepios/>]

Articles :

Wuyts N, Palauqui JC, Conejero G, Verdeil JL, Granier C and Massonnet C (2010) High-contrast three-dimensional imaging of the Arabidopsis leaf enables the analysis of cell dimensions in the epidermis and mesophyll. *Plant Methods*, 6-17

Fabre J, Dauzat M, Nègre V, Wuyts N, Tireau A, Gennari E, Neveu P, Tisé S, Massonnet C, Hummel I & Granier C (2011) PHENOPSIS DB: an Information System for Arabidopsis thaliana phenotypic data in an environmental context. *BMC Plant Biology* 11:77.

Perspectives :

Les quantités d'images produites et d'échantillons analysés dépassent largement les possibilités d'analyses et de modélisation qui ont pu être menées dans le cadre de ce projet. Les équipes engagées dans ce projet cherchent actuellement des possibilités de financement pour continuer le projet afin d'aller plus loin dans les aspects analyses et modélisation sachant que de gros jeux de données et d'images existent .

Financement total par Agropolis Fondation : 117 943 € (salaire pour un post-doctorant, frais de déplacement, frais de fonctionnement)

Catégorie(s) de soutien : allocation post-doctorale

Durée du projet : 15 mars 2008 – 1^{er} décembre 2010

Mots clés : *Arabidopsis* – pommier – croissance des feuilles – modélisation – sécheresse – stress