UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Faculté des Sciences et Technologies,
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
En Biologie Végétale et Forestière

Par **Adeline Rigal**

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des racines adventives du Peuplier : rôle du facteur de transcription PtAIL1

Membres du Jury :

Rapporteurs :
Annabelle Déjardin, CR, HDR, INRA d'Orléans
Jacqueline Grima-Pettenati, DR, CNRS, Toulouse

Examinateurs :
Catherine Bellini, Professeur, UPSC, Suède
Nicolas Rouhier, Professeur, Nancy Université
Annegret Kohler, IR, INRA de Nancy (Co-directrice de thèse)
Valérie Legué, MdC, HDR, Nancy Université, (Co-directrice de thèse)

Unité Mixte de recherche 1136 INRA/UHP Interactions Arbres - Microorganismes
Centre INRA de Nancy - 54280 Champenoux

Parce que le peuplier …

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Annabelle Déjardin, Jacqueline Grima-Pettenati, Catherine Bellini, Professeur, Nicolas Rouhier, qui me font l'honneur de juger ce travail.

J'aimerais également remercier Pascale Frey-Klett de m'avoir accueillie au sein de l'unité. C'est grâce à vous que je suis arrivée à Nancy, merci !

Francis, merci de m'avoir permis d'intégrer ton équipe et de m'avoir fait confiance pour cette thèse. Je tiens également à te remercier pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde merveilleux du peuplier.

Annegret et Valérie, mes deux co-directrices ! Le Girl Power ! Merci pour ces trois années de thèse, pour votre patience et vos encouragements. Vous avez été tout le temps disponible pour toutes mes questions. Avec vous deux, j'ai tout appris sur le peuplier et tout particulièrement sur la transcriptomique et la microscopie. Je ne sais pas trop quoi dire, ni comment vous remercier pour tout, les mots me manquent… (Le temps aussi…). Une dédicace particulière à Valérie pour « la microscopie c'est pas seulement jolie », et surtout pour notre phrase magique «parce que le peuplier, c'est compliqué ! ».

Un grand merci à tous les membres de l'UPSC, pour leur accueil, particulièrement à Rishi Bhalerao, Anna Karlberg et Catherine Bellini pour m'avoir permis de travailler avec vous, sur vos plantes et pour nos passionnantes discussions. Je remercie aussi Victor Busov et Yordan Yordanov pour m'avoir donnés vos lignées d'intérêts et pour votre disponibilité.

Sébastien, Christine, Claude et Claire, que serais-je devenue sans vos conseils en qPCR ?? Grâce à vous, ce monde m'est devenu moins obscur.

Patrice, j'ai adoré nos nombreuses heures passées dans les serres. Tu as toujours trouvé du temps pour m'aider dans mes expérimentations. Je pense que je n'oublierai jamais tes phrases fantastiques, «Mais, c'est normal Adeline, c'est la nature» et « rien ne se perd, tout se réutilise ».

Jean-Pierre, ton aide m'a été précieuse. Je te remercie d'avoir bien voulu m'aider. Maintenant c'est bon, je coloniserai plus ta chambre de culture…

Adeline, pour ton aide précieuse dans notre folle épopée contre la nature en Serre.

Christine, ma Môman du labo, merci pour ton aide au quotidien. Surtout, j'ai drôlement apprécié la journée perdue rue Lionnois avec Pépette et les jolis pompiers.

Nicole et Agnès, encore merci pour votre aide administrative. Une spéciale «Cassedédi »à Agnès pour avoir remplie la boîte à mots prohibés, d'avoir relu une partie de ce manuscrit et pour ton soutien quotidien.

Je remercie aussi Stéphane Manue et Seb pour votre écoute et pour avoir toujours laissé la porte ouverte. Seb, un grand merci pour le concours de coiffure.

Je voudrais aussi remercier l'équipe de l'EEF, Rémi, Irène, David, Marie Béa pour vos conseils et les réunions « root-club ». Un grand merci à Irène et Marie-Béa pour vos conseils et pour la préparation de l'oral… Rémi tu vas pas encore me battre au microtome !!

Judith et Johnny-Johnny, merci pour votre aide dès mon premier jour. La culture du peuplier n'a plus de secret…

Alice, Mlle Pépette, merci pour ta bonne humeur partagée dans notre bureau de filles, pour ton aide et ton soutien jusqu'à la fin des fins. Et ta merveilleuse organisation en plus de la mienne ont eu raison de Mlle la championne de Tennis. Vincent, hé non je ne t'oublie pas. Merci pour tes sales blagues, pour ce que tu es en train de faire à l'instant présent… Je me rappellerai du BBQ avec les canards ! J'espère bien que je vous reverrai.

Manue et Emilie, un grand merci pour votre aide en Bio-info.
Emilie, je suis ravie d'avoir partagé ces moments sous le balcon, merci de m'avoir soutenue et encouragée. Mille mercis.

Iréné, on s'est trouvées à Umea, the love city… Je suis heureuse de travailler avec toi et de partager le monde merveilleux de la racine adventive.

Je tiens également à remercier tous les membres du Labo pour leur accueil et leur bonne humeur.

Le BEF, Émeline merci pour ta joie de vivre et particulièrement le rire de 7h50 dans le bus.
Fabrice, mille mercis pour ton aide en statistique, d'avoir pris le temps à chaque fois (pas que pour la stat d'ailleurs). Je n'oublierai pas tes explications très imagées. Tu m'amènes au Bénin, hein ?PJ, pour nos discussions interminables sur tout ! DJ agrégat ou Nico, je te dois quelques analyses aussi et la découverte de EndNote un peu tard comme tu dirais. Merci à vous d'avoir été là tout court.

Enfin, un merci tout particulier à Sara et Jaimito, sans qui ces trois ans n'auraient pas été ce qu'ils ont été. Le mots me manquent aussi pour vous et un merci ne suffit pas. En plus de nos formidables épopées et de m'avoir fait découvrir la musique Rock (oui, la vraie papito), mille fois merci d'avoir été toujours présents et de m'avoir soutenue.

Pour finir, mes parents, Olivier et princesse sans qui je n'en serais pas là.

En espérant n'avoir oublié personne ….

Table des matières

Avant propos 3

Analyse bibliographique 5

1. Le Peuplier 6

1.1. Classification du genre *Populus* 6

1.2. Place de la populiculture en France 7

1.3. Les utilisations du Peuplier en industrie classique 8

1.4. Le bois énergie 9

1.5. Le peuplier, un arbre modèle pour la recherche 10

1.5.1. Pourquoi le peuplier ? 10

1.5.2. *Populus trichocarpa* et les ressources disponibles 11

2. Formation des racines adventives 13

2.1. Les étapes de formation des racines adventives 13

2.2. Régulation de la formation de la racine adventive 14

2.2.1. La régulation hormonale 14

2.2.2. Identification de gènes candidats dans la formation des racines adventives 17

2.2.3. Importance des facteurs de transcription dans la formation des racines adventives 19

3. La famille AP2/ERF, implications dans les différents organes de la plante 20

3.1. Présentation de la famille AP2 (APETALA2)/ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR) 20

3.2. Implication du groupe AINTEGUMENTA dans le développement des plantes 22

3.3. Implication des membres du groupe AINTEGUMENTA/AINTEGUMENTA LIKE dans le développement racinaire 23

Objectifs de la thèse 25

Chapitre 1 : Etude des capacités à l'enracinement de quelques génotypes de Peuplier 28

1. Matériels et Méthodes 31

1.1. Matériel utilisé et conditions de culture 31

1.1.1. Culture en condition *in vitro* 31

1.1.2. Culture en système hydroponique 31

1.2. Analyses statistiques 32

2. Résultats 33

2.1. Cinétique d'enracinement de *P. tremula* x *P. alba* et *P. tremula* x *P. tremuloides* 33

2.2. Capacité à enraciner des clones hybrides *P. deltoides* x *P. trichocarpa* 33

2.3. Capacité à enraciner des clones hybrides *P. deltoides* x *P. nigra* 34

3. Discussion 35

4. Conclusion 37

Chapitre 2 : Implication du facteur de transcription dupeuplier *AINTEGUMENTA Like 1 (PtAIL1)* dans la formation des racines adventives 38

1. Importance du facteur de transcription *PtAIL1* dans le contrôle de la formation de la racine adventive du peuplier 40

2. Etude de la fonction de PtAIL1 54

2.1. Matériels et methodes 54

2.1.1. Acclimatation des lignées *P. tremula* x *P. alba* 54

2.1.2. Analyse de la capacité à enraciner des boutures non dormantes 54

2.1.3. Formation des racines latérales des lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* 55

2.1.4. Observation de la coloration GUS 55

2.1.5. Immunolocalisation de la protéine PtAIL1 56

2.2. Résultats ... 57
2.2.1. Phénotype et capacité d'enracinement des boutures non dormantes des lignées *35S::PtaAIL1* ... 57
2.2.2. Formation des racines latérales des lignées *35S::PtaAIL1* ... 58
2.2.3. Localisation de l'expression de *PtAIL1* et localisation de la protéine PtAIL1 ... 58
2.3. Discussion ... 59
3. Conclusion ... 61

Chapitre 3 : Régulation des gènes intervenant dans les voies auxiniques au cours de la formation de la racine adventive ... 62
1. Matériels et méthodes ... 65
2. Résultats et discussion ... 65
2.1. L'auxine comme signal de l'initiation des racines adventives du peuplier ? ... 65
2.2. Régulation des gènes des voies de l'auxine au cours de l'organisation et de la
3. Conclusion ... 71

Annexes ... 72

Conclusions et perspectives ... 73
1. Fonction de PtAIL1 dans la formation de la racine adventive ... 74
2. L'implication de l'auxine dans la formation de la racine adventive du peuplier ... 76

Références bibliographiques ... 78

Avant propos

Ma thèse a été réalisée au sein de l'UMR INRA/Nancy Université « Interactions Arbres/Micro-organismes », dans le cadre du projet européen EnergyPoplar (2008-2012). Mon projet de thèse a ainsi bénéficié de l'apport de matériel et des données obtenues par les membres du consortium. Parallèlement, des collaborations ont été mises en place avec l'équipe de R. Bhalerao et de C. Bellini (Umeä Plant Science Center, UPSC, Suède) ainsi qu'avec l'équipe de V. Busov (MichiganTech University, Etats Unis).

Le cœur de mon projet de thèse est d'identifier et de décrypter l'implication d'un facteur de transcription de la famille AP2 (Apetala2)/ERF (Ethylene Response Factor), PtAIL1, dans la rhizogénèse adventive du peuplier. Les connaissances acquises sur les voies de régulation impliquées dans la rhizogénèse adventive seront présentées dans la partie « analyse bibliographique », ainsi que l'implication des membres de la famille AP2/ERF dans la croissance et le développement de la plante.

Les expériences menées ainsi que les résultats obtenus seront présentés sous la forme de trois chapitres :
Le chapitre 1 concerne une première étude de la capacité à enraciner de quelques génotypes et a permis de caractériser la cinétique d'enracinement de nos espèces modèles.
Le chapitre 2 présente l'identification et l'implication de PtAIL1 dans la rhizogénèse adventive. L'article (actuellement soumis) est complété par des expériences, qui ont permis d'approfondir la régulation de l'expression de ce gène.
A partir des données transcriptomiques obtenus, nous avons identifié la régulation d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'homéostasie auxinique. Le chapitre 3 ressemble des données obtenues et servira de base pour nos futures recherches sur la rhizogénèse adventive.

Les résultats donnent lieu à des discussions qui seront exposées à la fin de chaque chapitre et me permettront de proposer des perspectives de recherche.

Analyse bibliographique

Tableau 1 : Classification botanique et origines des espèces connues de peuplier (Barrès, 2006 selon Eckenwalder, 1996). Les 29 espèces sont réparties en 6 sections.

Section	Espèce	Origine
Abaso	*P. mexicana* Wesmael	Mexique
Turanga	*P. euphratica* Olivier	Eurasie, Afrique
	P. ilicifolia Rouleau	Afrique
	P. pruinosa Schrenk	Asie
Leucoides	*P. lasiocarpa* Olivier	Chine
	P. glauca Haines	Asie
	P. heterophylla L.	Amérique du Nord
Aigeiros	*P. fremontii* S. Watson	Amérique du Nord
	P. deltoides Marshall	Amérique du Nord
	P. nigra L.	Eurasie
Tacamahaca	*P. angustifolia* James	Amérique du Nord
	P. balsamifera L.	Amérique du Nord
	P. ciliata Royle	Himalaya
	P. laurifolia Ledebour	Eurasie
	P. simonii Carrière	Chine
	P. suavolens Fisher	Asie
	P. szechuanica Schneider	Chine
	P. trichocarpa Torr. & Gray	Amérique du Nord
	P. yunnanensis Dode	Chine
Populus	*P. adenopoda* Maximovicz	Chine
	P. alba L.	Eurasie
	P. gamblei Haines	Himalaya
	P. grandidentata Michaux	Amérique du Nord
	P. guzmanantlensis Vasquez & Cuevas	Mexique
	P. monticola Brandegee	Mexique
	P. sieboldii Miquel	Asie
	P. simaroa Rzedowski	Mexique
	P. tremula L.	Eurasie
	P. tremuloides Michaux	Amérique du Nord

1. Le Peuplier

1.1. Classification du genre *Populus*

Le genre *Populus* appartient à la famille des Salicaceae et comprend environ 300 espèces, dont les plus répandues sont *Salix* (saule) et *Populus* (tremble et peuplier). Les peupliers sont caractérisés par une croissance rapide, par un feuillage caduc constitué de feuilles simples. Ce sont des espèces dioïques, avec des fleurs groupées en chatons. La floraison débute après 4 à 5 ans de croissance. Les graines sont entourées de filaments, appelés «coton», facilitant leur transport par le vent (Chardenon, 1982 ; Rameau e*t al.*, 2005).

Basée sur les caractères morphologiques, écologiques et d'hybridation entre les espèces, la classification du genre *Populus L*. a évolué au cours du temps. Toutefois la classification d'Eckenwalder (1996), reste actuellement la plus utilisée et la plus citée. Selon cette classification, le genre *Populus L.* regroupe 29 espèces de peuplier, classées dans 6 sections : *Abaso*, *Turanga, Leuce, Aigeiros, Tacamahaca et Leucoïdes* (Tableau1). Parmi ces espèces, seulement trois sont des espèces endémiques européennes et sont présentes en France, *P. tremula* (tremble), *P. alba* (peuplier blanc) et *P. nigra* (peuplier noir). Le peuplier tremble est une essence présente dans la plupart de nos massifs forestiers alors que le peuplier blanc est particulièrement présent dans les vallées méditerranéennes et que le peuplier noir est une espèce de ripisylve. Parmi les autres espèces, douze sont originaires d'Amérique du nord dont *P. trichocarpa*,

Ils sont communément appelés poplars ou plus spécifiquement aspens pour les peupliers trembles et cottonwoods pour les baumiers et les liards qui ont des graines cotonneuses. Baumiers et liard sont deux termes utilisés en France pour désigner les espèces de peupliers qui produisent des résines aromatiques avec lesquelles sont fabriquées des baumes et celles dont les jeunes tiges sont utilisées en vanneries (Dowkiw, 2003). Les autres espèces sont originaires d'Afrique du Nord et d'Asie (Table1).

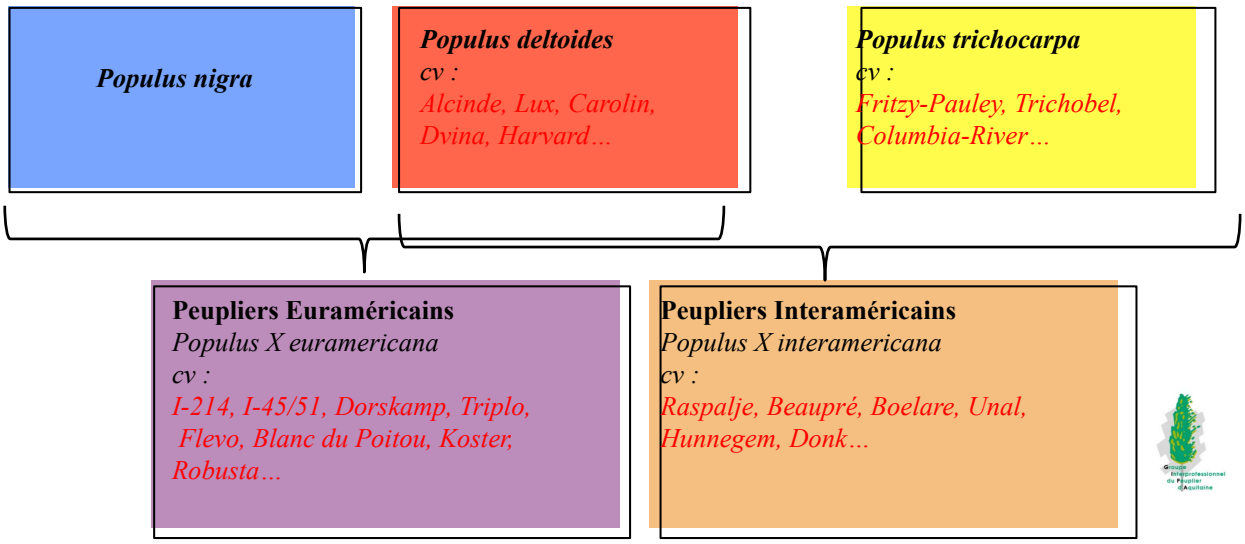


Figure 1 : Origine des différents cultivars, utilisés en France (GIPA, communication Lemaire H.)

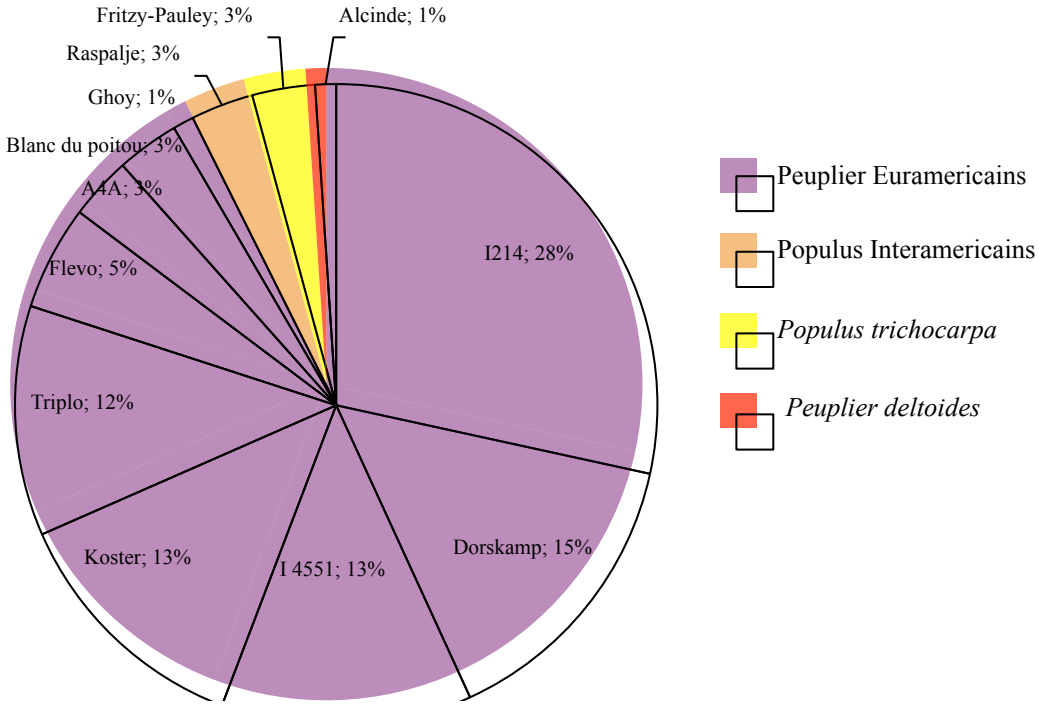


Figure 2 : Répartition par cultivar des ventes de plants de peuplier en France en 2006-2007 (DRAF/SERFOB Aquitaine 2008, Communication Lemaire H.).

1.2. Place de la populiculture en France

Le peuplier est la deuxième essence feuillue récoltée en France après le chêne. La récolte en bois d'œuvre (volume des tiges jusqu'à un diamètre minimal de 20 cm) a connu un maximum historique en 1990 de 3 millions de m^3. Cette année là, la récolte de grumes de peuplier a clairement dépassé celle du hêtre et du chêne. Depuis, ce prélèvement annuel a diminué jusqu'à atteindre les 1,5 millions de m^3 en 2003. Toutefois, le peuplier étant une essence à cycle court, les volumes de production proportionnels aux surfaces plantées ont toujours été fluctuants (Berthelot et Chantre, 2004), notamment dans les années 90 et en décembre 1999. En 2008, la France se situe au 5^{ieme} rang mondial de la surface de peuplement de peupliers naturels dans le monde avec 39800 hectares. Elle est la seconde productrice avec 236000 hectares destinés à la production, juste derrière la Chine.

La populiculture française est basée sur l'utilisation de variétés hybrides entre le peuplier noir européen (*Populus nigra L.*) et deux espèces nord-américaines, *P. deltoïdes* et *P. trichocarpa.* Plus récemment, des variétés issues du croisement interspécifiques entre *P. deltoïdes* et *P. trichocarpa* ont connu un grand succès en Europe de l'Ouest jusqu'à ces dernières années (Berthelot et Chantre, 2004) (Figure 1). En revanche, la plus grande partie des cultivars vendus entre 2006 et 2007 sont issus de croisement entre *P. nigra* et *P. deltoïdes*, appelés Euraméricains (Figure 2).

Les peupleraies françaises sont situées principalement en Picardie, Pays de la Loire, région Centre, le grand Sud-Ouest ainsi que la Bourgogne (Figure 3). La plus grande surface de peupliers de production de bois, se trouve dans les grandes vallées alluviales du Nord de la France, en Picardie avec 23900 ha et Champagne-Ardenne avec 21100 ha en 2006 (source, SCEES teruti Lucas 2006). Cette production s'est ensuite développée dans l'Ouest de la France, notamment en région Aquitaine, Centre, et Pays de la Loire. En 2006-2007, le pourcentage des ventes de peuplier est le plus important dans la région « grand Sud-Ouest », suivi par la Picardie.

Les conditions pédologiques en France étant favorables à la culture de peuplier, la production peut atteindre les 20m3/ha/an, soit 4 à 5 fois plus que les autres feuillus indigènes. Ce contraste entre la faible surface populicole et la quantité potentielle de bois qui peut être produite, s'explique par la rapidité de croissance de cette essence entrainant un temps de révolution relativement court des plantations (15-20 ans soit 1/4 de moins

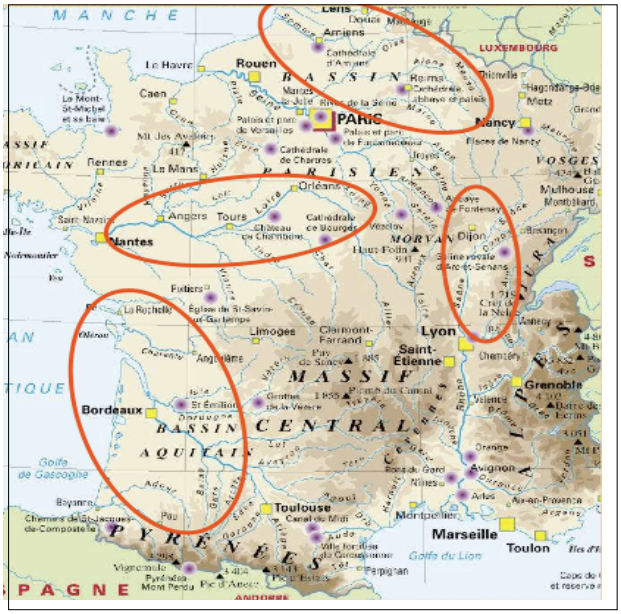


Figure 3 : Les grands bassins populicoles en France (FOGEFOR Dordogne Novembre 2009, communication Lemaire)

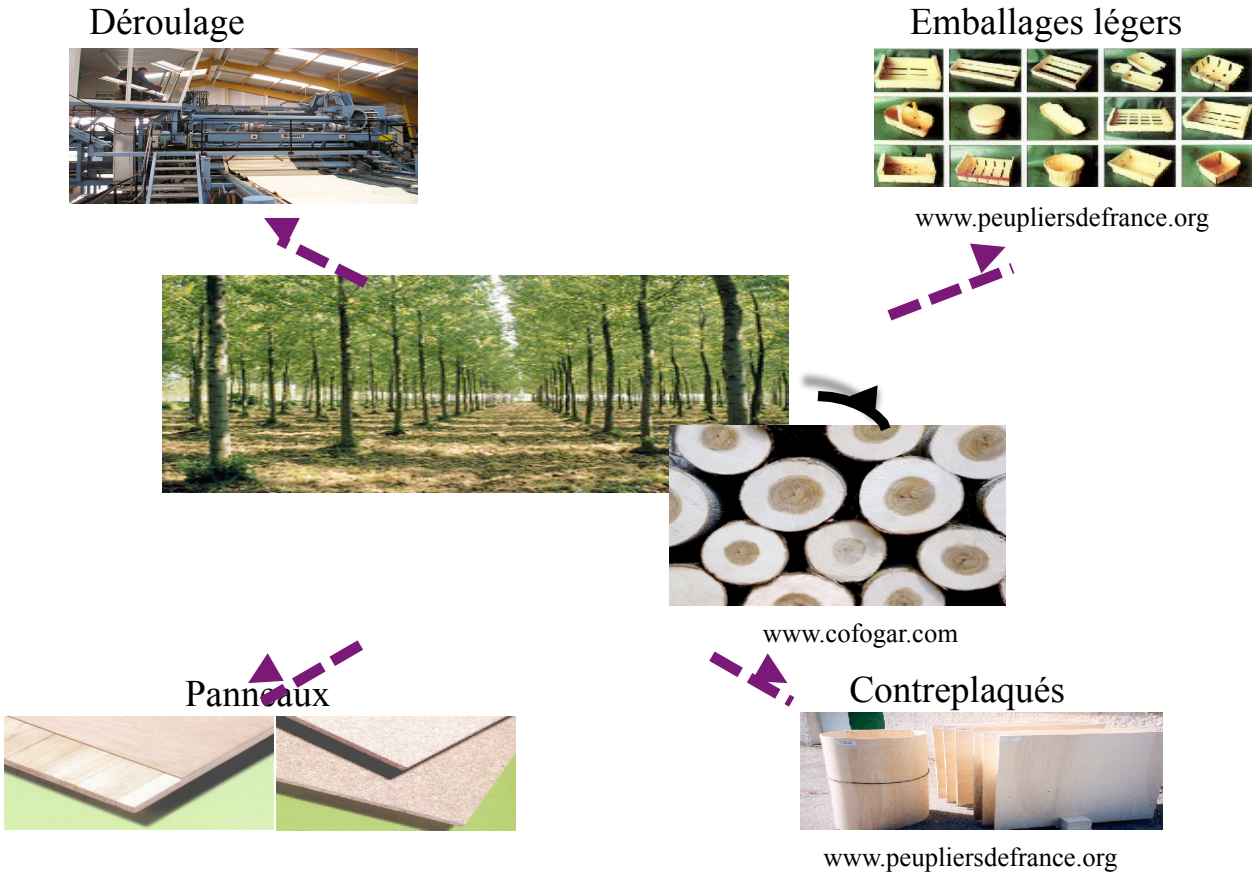


Figure 4 : Quelques utilisations du peuplier

que celle nécessaire pour le chêne) et par l'utilisation de techniques productivistes (plantations monoclonales, régulières, fort intrants techniques) à la frontière entre agriculture et sylviculture (Dowkiw, 2003).

1.3. Les utilisations du Peuplier en industrie classique

Plusieurs filières d'exploitation du peuplier « de façon » permettent d'utiliser au mieux et au maximum ce bois (Figure 4).

Le bois de peuplier, étant facile à dérouler sans étuvage, est parfait pour confectionner des emballages légers de forme et de capacités très diverse ainsi que des panneaux de contreplaqués. Plus de la moitié du bois rond est utilisée par ce processus. Cette filière sert à produire des emballages légers, des panneaux de contreplaqués, tiges et boîtes d'allumettes. Au sein de l'industrie de l'emballage léger en bois se regroupent les fabricants de cagettes, caissettes, barquettes, les bourriches à huître et les boîtes à fromages. En France, en 2001, on estime que 600000 m^3 de grumes de peuplier ont été transformées en emballages légers, constituant ainsi une activité très importante. Les panneaux de contreplaqués fabriqués à partir de peuplier offrent une résistance intéressante due au croisement des fibres. Facile d'utilisation, le contreplaqué est utilisé dans l'industrie, l'agencement, la menuiserie et le meuble.

La filière du sciage sert principalement à la construction de sommiers, de menuiserie d'intérieur, panneaux lattés, moulures, charpentes, caisses, emballages, fonds de meubles et cotés de tiroirs. Au début du siècle, le peuplier était fortement utilisé dans la charpente. Depuis, il a été remplacé par les résineux qui ont investi massivement le marché de la construction, de par leur plus grande performance mécanique et leur prix plus bas. Cette concurrence se fait également sentir dans l'industrie de caisserie. De plus, il a été estimé trop tendre pour être exposé au choc. Le peuplier est donc essentiellement utilisé pour les intérieurs de meubles dans cette filière. Toutefois, il revient aujourd'hui sur le marché de la construction via le BTM (Bois Thermiquement Modifié) et l'aménagement d'intérieur (parquet, lambris, contreplaqué, etc…)

Le peuplier est aussi utilisé par les usines de panneaux ou de pâtes à papier, comme bois de trituration. Différents types se distinguent tels que les panneaux de fibres dures, les panneaux agglomérés et les panneaux de particules. Même si les résineux sont préférés dans le procédé de la pâte à papier, de part la longueur et la largeur de leurs

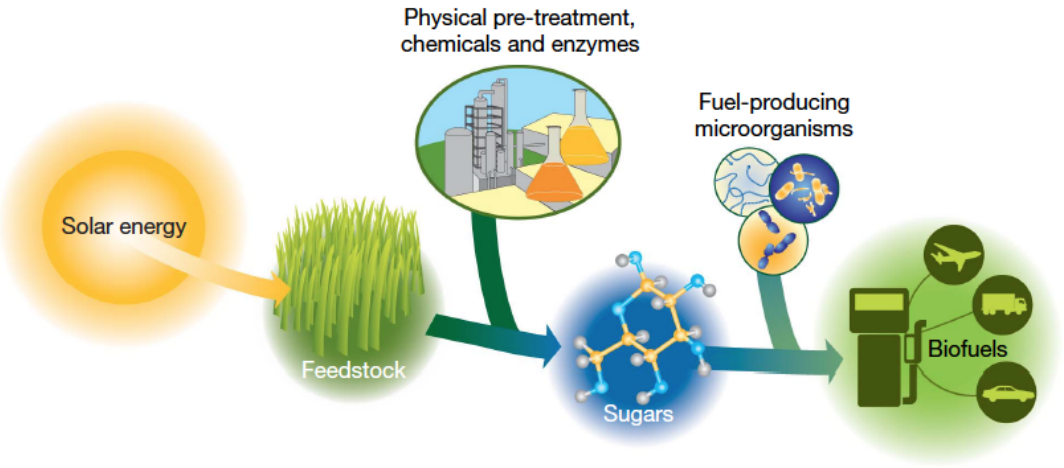


Figure 5 : La production de biocarburants implique des étapes complexe : à partir de la biomasse récoltée, les composants des parois cellulaires (riches en carbone) sont extraits puis sont transformés en sucres (essentiellement du glucose) par des pré-traitements physico-chimique et par le processus de saccharification. Les sucres obtenus sont ensuite convertis en biocarburants par fermentation microbienne (Rubin *et al.*, 2010)

fibres plus importantes, les feuillus sont également utilisées dans ce processus. Le peuplier est également utilisé dans ce processus dans une proportion de 20 à 30%, pour donner de la souplesse, de l'opacité et pour améliorer son état de surface.

1.4. Le bois énergie

Le premier choc pétrolier (1973) ainsi que la prise de conscience des problèmes environnementaux et économiques ont conduit à mettre en avant l'utilisation de la bioénergie. Parmi les sources de bioénergies disponibles, la production de biomasse a une place non négligeable. Le bois est alors apparu comme une source d'énergie abondante, renouvelable et qui pourrait être utilisée comme alternative au pétrole.

Le groupement « Forêt Cellulose Bois Ameublement » (FCBA) a débuté les premières études sur la production de biomasse à partir de peuplier (Bonduelle, 1989). L'Union Européenne, cherchant également à diminuer sa dépendance au reste du monde dans l'importation d'énergie, a fortement investi dans le développement des énergies renouvelables (Bastien *et al.*, 2011). Ainsi, une augmentation de la demande de production de ligneux à croissance rapide tels que les peupliers, est apparue depuis un certain nombre d'années. Cette demande tend donc vers une utilisation des ligneux dans la production de biocarburant, de chaleur ou d'électricité, ainsi que dans la production de papier (Zhou *et al.*, 2011).

Les systèmes dédiés à la production de bois énergie à partir de peuplier sont les taillis à courte ou très courte rotation (appelés TCR ou TTCR). En Europe, cette stratégie de culture est réalisée principalement en Italie avec environ 6000 ha (Bastien *et al.*, 2011). Une fois ramené à la tonne sèche, le pouvoir calorifique du peuplier est identique à celui des autres feuillus. Le bois de trituration du peuplier étant moins prisé que les feuillus durs ou que les résineux, plus de ressources sont disponibles. La combustion du bois générant un bilan carbone neutre, les progrès sur le bois énergie sont en croissance depuis un certain nombre d'années (www.peupliersdefrance.org). Roy et ses collaborateurs (2007) ont démontré qu'un hectare de taillis de Peuplier (ou de Saule), produisant chaque année 12 tonnes de biomasse sèche, fournit une quantité d'énergie de 5 TEP (Tonne Equivalent Pétrole) sous forme de bois de feu correspondant à 58MWh par an. Le biocarburant est obtenu après une série de réactions complexes (Figure 5) impliquant le processus de saccharification qui conduit à la formation en sucres de la cellulose,

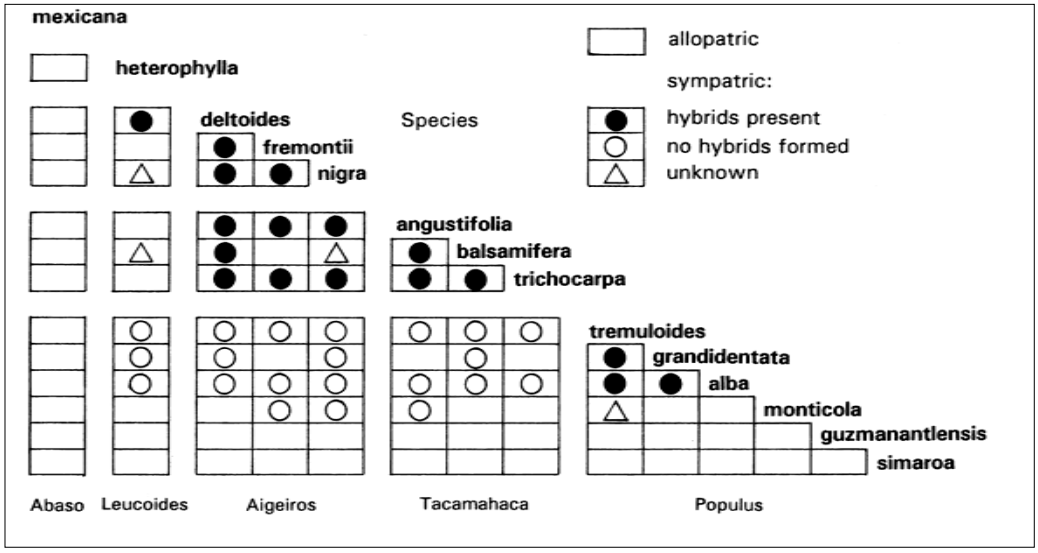


Figure 6 : Hybridations naturelles entre les différentes espèces de peupliers (D'après Eckenwalder, 1996).

préalablement extraite des parois végétales. Le biocarburant est finalement obtenu après fermentation (Rubin et al., 2008).

Le peuplier offrant ainsi une possibilité de bois énergies, un certain nombre de projets scientifiques ont vu le jour depuis quelques années (Herr, 2011). L'objectif de ces projets est de sélectionner et/ou de générer des clones dont la teneur en cellulose est importante et parallèlement, d'améliorer le processus de saccharification pour la transformation de la cellulose en bioéthanol.

1.5. Le peuplier, un arbre modèle pour la recherche

1.5.1. Pourquoi le peuplier ?

De par son importance économique et son utilisation en bioénergie, les recherches sur le peuplier se sont beaucoup développées. Depuis plusieurs années, des croisements génétiques ont été réalisés de façon à obtenir des individus plus aptes à être domestiqués et largement exploitables par l'industrie. Pour cela, la connaissance des mécanismes impliqués dans la formation et la qualité du bois, l'adaptation à son environnement, dans les processus de résistance aux divers stress (biotiques et abiotiques) ainsi que dans les mécanismes de propagation clonale est devenue cruciale.

La croissance rapide du peuplier avec une floraison après 4-6 ans sous des conditions appropriées (Tuskan et al., 2006), permet de réaliser des croisements génétiques donnant des résultats à court terme. De façon générale, quand deux espèces se trouvent sur le même espace naturel (en partie ou en totalité), il est très possible de voir des hybrides dans cette zone de sympatrie. Toutefois, toutes les espèces ne peuvent pas s'hybrider (Figure 6). Les espèces de la section *Populus* ne s'hybrident pas avec des espèces des sections *Aigerios*, *Tacamahaca* et *Leucoides*, avec lesquelles elles partagent le même espace naturel en Amérique du Nord. De plus, certaines hybridations sont unidirectionnelles. Par exemple, entre *P. nigra* et *P.deltoides*, l'hybridation n'est possible qu'entre un *P. nigra* mâle et *P. deltoides* femelle.

L'hybridation classique exige des périodes d'attente relativement longues, des études de transgénèse ont été alors menées. Le peuplier a été la première espèce ligneuse génétiquement modifiée (Parson *et al*., 1986). Uniquement quelques hybrides de peupliers sont manipulables génétiquement par agrotransformation et qui peuvent être

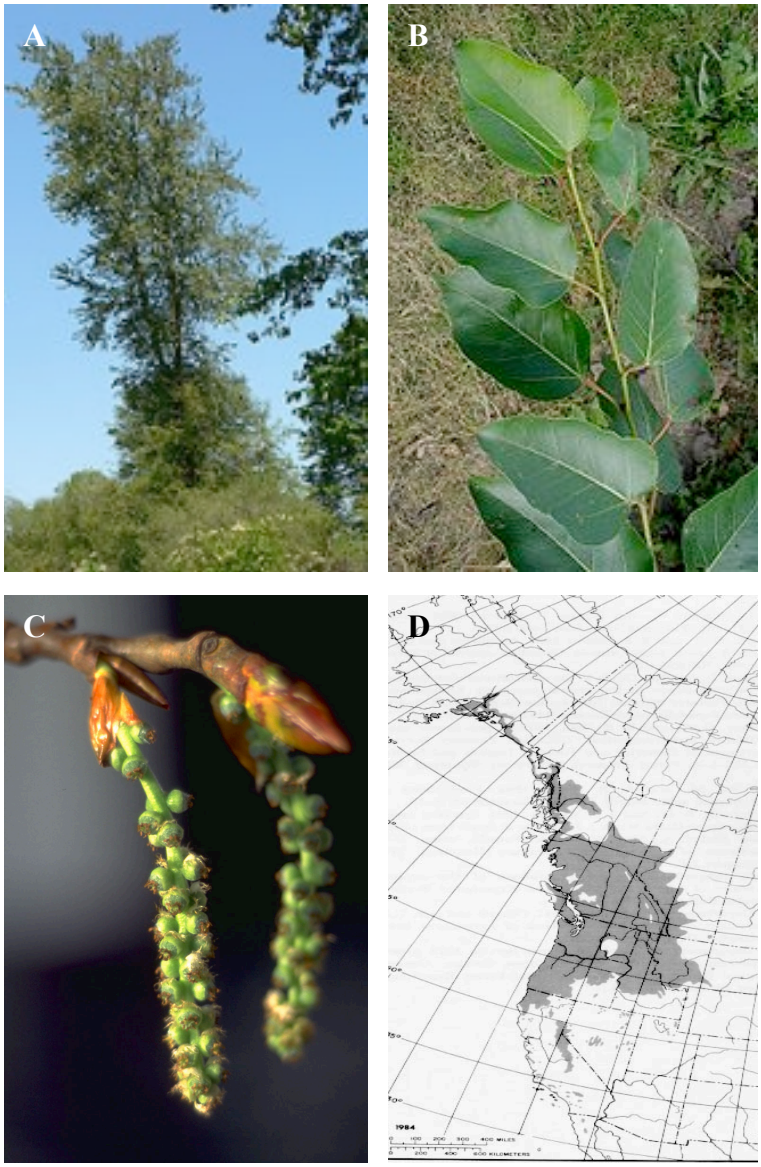


Figure 7 : A, vue d'ensemble de *Populus trichocarpa* (www.absoluteastronomy.com) ; B, ses feuilles (http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1321211) et C, ses chatons (http://academic.reed.edu/biology/courses/bio332/lacamas.html).
D, aire géographique naturelle de *P. trichocarpa* (www.na.fs.fed.us/pubs/silvics_manual/volume_2/populus/trichocarpa.htm).

micro-propagés *in vitro*. La possibilité de transformation du peuplier a été rapportée pour plusieurs espèces, appartenant majoritairement à la section *Populus* (Confalonieri *et al.*, 2003, Busov *et al*., 2010). Ainsi, plusieurs protocoles ont été mis en place pour *P. alba*, *P. tremula*, *P. tremuloides* ainsi que pour les hybrides, *P. tremula* x *P. alba*, *P. tremula* x *P. tremuloides*, *P. canescens* x *P. grandidentada* et *P. tremuloides* x *P. davidiana* (Busov *et al*., 2010). D'autres études (Ma *et al*., 2004 ; Song *et al*., 2006) ont montré la possibilité de transformer d'autres espèces appartenant à la section Aigeiros (*P. deltoides*) et Tacamahaca (*P. trichocarpa* Nisqually-1). Toutefois, l'hybride le plus utilisé pour la transformation est l'hybride entre *P. tremula* et *P. alba*, nommé clone INRA 717-1B4 (Leplé *et al*., 1992). Les modifications génétiques peuvent impliquer une augmentation ou une perte de fonction de gènes. Cette transformation étant relativement stable dans le temps, de nombreuses études sur la fonction des gènes ont été mises en place grâce à cette technique (Busov et al, 2010).

Le peuplier a la capacité de se multiplier végétativement par drageonnages ou bouturage, conduisant à la production naturelle de copies conformes, ou clones et peut être utilisé pour le maintien d'un matériel d'intérêt. De plus, cette capacité est utilisée *via* la multiplication végétative en condition *in vitro* pour certains hybrides interspécifiques de peuplier dont *P. tremula* x *P. alba* et *P. tremula* x *P. tremuloides* et ainsi permet la régénération des plants.

Ainsi, le peuplier a été et est très étudié ces dernières décennies, il est ainsi devenu un arbre modèle pour les ligneux tout comme *Arabidopsis* pour les herbacées d'un point de vue génomique et biotechnologique.

1.5.2. *Populus trichocarpa* et les ressources disponibles

P. trichocarpa a été sélectionné comme espèce forestière modèle grâce à sa croissance rapide et son génome modeste. *P. trichocarpa* (Torr. & Gray ex Hook.), ou black cottonwood, est un peuplier appartenant à la section des Tacamahaca. Il est très semblable au peuplier baumier avec lequel il s'hybride aisément quand leurs aires se chevauchent. Il est également appelé peuplier baumier de l'Ouest, peuplier occidental et peuplier à fruits velus. Il est originaire se l'ouest de l'Amérique du Nord : de la Californie

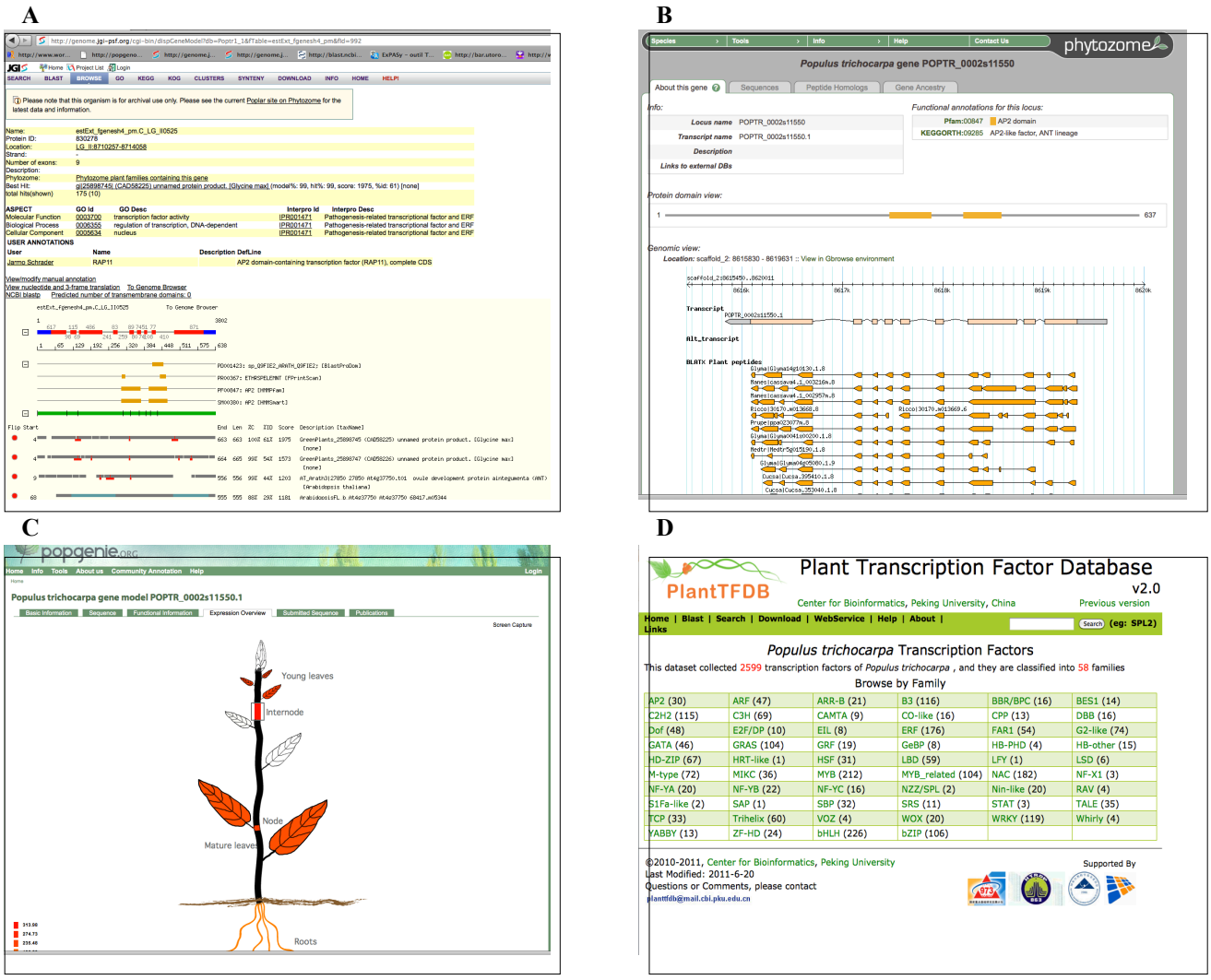


Figure 8 : Quelques outils bioinformatiques disponibles sur *P. trichocarpa.* A, JGI vs1.1; B, phytozome V7.0; C, Popgenie et D, Plant TFDB

à l'Alaska et de la côte aux Rocheuses (Figure 7). Toutefois, depuis les années 1971, il a été planté en France dans l'étage collinéen.

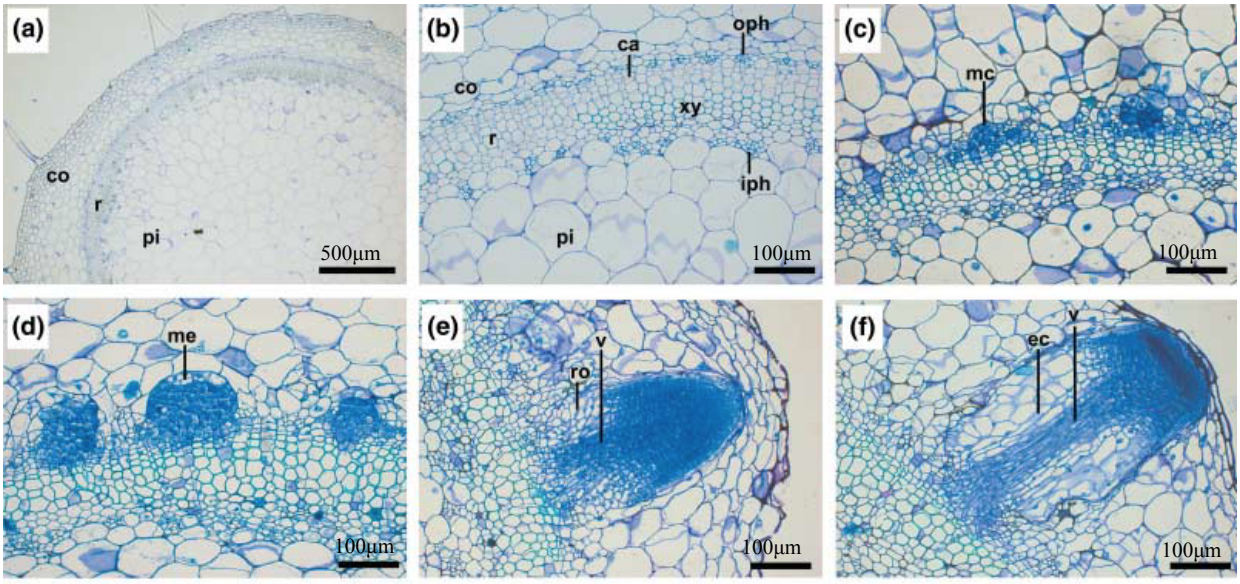
Le génome du peuplier est composé de 38 chromosomes (19 paires) dont 480 millions de paires de bases. Il est quatre fois plus important que celui de l'*Arabidopsis thaliana* mais 40 fois inferieur à celui du pin, justifiant ainsi le choix pour le séquençage complet de son génome. Le génome de peuplier séquencé appartient à un peuplier baumier, *P. trichocarpa* Torr & Gray génotype « Nisqually 1 » (Tuskan *et al.,* 2006). Afin de permettre à la communauté une utilisation rapide et large, cette version a été mise en ligne sur le site internet du JGI (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html). Cette version annotée v1.1 (Figure 8A) inclut au total 45555 gènes modèles. Afin de faciliter la comparaison des génomes, un nouveau site internet Phytozome (http://www.phytozome.net/) a été mis en place. Tout d'abord, la première version disponible pour le peuplier a été la version **Phytozome v5.0 (**correspondant à une version anticipée de la version 2.0.) Cette version a ensuite évolué et est régulièrement mise à jour. Actuellement la version disponible est **Phytozome v7.0** (Figure 8B)**.** Pour chaque gène, la version Pfam, KEGGORTH et une description est disponible. Ce site regroupe aussi la séquence génomique, la séquence du transcrit, du CDS et la séquence peptidique de chaque gène. Il est également mis à disposition les peptides homologues présents dans d'autres espèces.

D'autres sites permettent de compiler des informations sur le peuplier d'un point de vue génomique. Le site PogGenIE (http://www.popgenie.org/) (Figure 8C) a été crée en complément de Phytozome avec une intention d'appuyer sur la fonction des gènes. Le site Plant TFDB (Plant Transcription Factor Database) (Figure 8D) disponible sur http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/, regroupe par famille, l'ensemble des facteurs de transcription. Ce site est une mise à jour avec la version phytozome de la version DPTF (Database of Poplar Transcription Factors), toujours disponible sur le web (http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/).

Un pool d'information assez large est donc disponible et donne ainsi accès aux informations nécessaires pour une analyse plus fine des gènes.



Figure 9 : Les trois types de racines. A, racines adventives formées à partir d'une bouture de *P. trichocarpa*, cultivée en condition hydroponique. B, racines latérales (pointes de flèche) de *P. tremula* x *P. alba*, cultivé en condition *in vitro*. C, racine embryonnaire de *Pisum sativum* (www.sciencephoto.com)



Mise en place des primordia racinaires

Différenciation des primordia racinaires

Emergence de la racine adventive

Figure 10 : Etapes successives de la formation des racines adventives à partir des boutures de tiges de Pétunia (*Petunia hybrida*). A et B, anatomie de la tige au moment de l'excision. cortex (co), le parenchyme (pi) et les tissus conducteurs (r) avec le phloème externe (oph), le cambium (ca), le xylème (xy) et le phloème interne (iph). C, les premières cellules (mc) du futur méristème racinaire sont visibles après 3 j ; D, les premiers méristèmes racinaires (me) sont identifiés après 4 j ; E, les primordia racinaires se différencient avec la mise en place du cortex racinaire (ro) et des vaisseaux vasculaires (v) après 6 j ; F, après 8 j, la racine adventive émerge progressivement. Les vaisseaux vasculaires centraux (v) sont formés et sont entourés par des cellules allongées de la zone (Ahkami *et al.*, 2009).

2. Formation des racines adventives

L'importance de la formation des racines adventives (RAs) dans la réussite de la propagation végétative et dans le déploiement des forêts et des cultures ornementales est reconnue depuis des siècles.

La racine adventive se définit et se distingue des racines primaires et latérales par le fait qu'elle se développe à partir de n'importe quel organe de la plante, excepté les racines (Figure 9). La formation des RAs se réalise naturellement, dans la majorité des espèces monocotylédones, pour qui les RAs constituent le système racinaire principal, ainsi que pour les espèces eudicotylédones qui se multiplient végétativement. Lors d'un bouturage, ce processus peut être induit artificiellement en réponse à une blessure ou/et à une application d'hormones sur les boutures (revue, Geiss *et al*., 2010).

Dans le contexte de la thèse, nous nous intéresserons uniquement à la formation des racines adventives (notée RA).

2.1. Les étapes de formation des racines adventives

Les évènements anatomiques conduisant à la formation des RAs ont été analysés dans différentes espèces et mettent en évidence des mécanismes cellulaires complexes (revue, Geiss *et al.*, 2010 ; Figure 10). La formation des RAs débute par une étape d'induction, suivie de l'initiation. Au cours de ces étapes précoces, des cellules, incapables de former des RAs *in planta*, deviennent compétentes après immersion dans l'eau ou/et après application d'inducteurs spécifiques de rhizogénèse à la base des boutures. Chez certaines espèces, la rhizogènèse adventive nécessite l'acquisition d'une compétence des cellules à se diviser, ce qui implique dans la majorité des cas, une étape de dédifférenciation (Ozawa *et al.*, 1998). Ce groupe de cellules devient méristématique et constitue les cellules initiales des RAs. Les initiales peuvent être localisées dans différents tissus de la tige en fonction des espèces. Par exemple, dans les espèces herbacées, les initiales des RAs sont situées entre les faisceaux des tissus conducteurs. Dans le cas de boutures de *Pinus strobus*, les rayons peuvent être à l'origine des cellules initiales des RAs. Chez *Petunia hybrida* (Ahkami *et al.*, 2009), les RAs sont initiées à partir du cambium. La réactivation du cycle cellulaire des initiales conduit

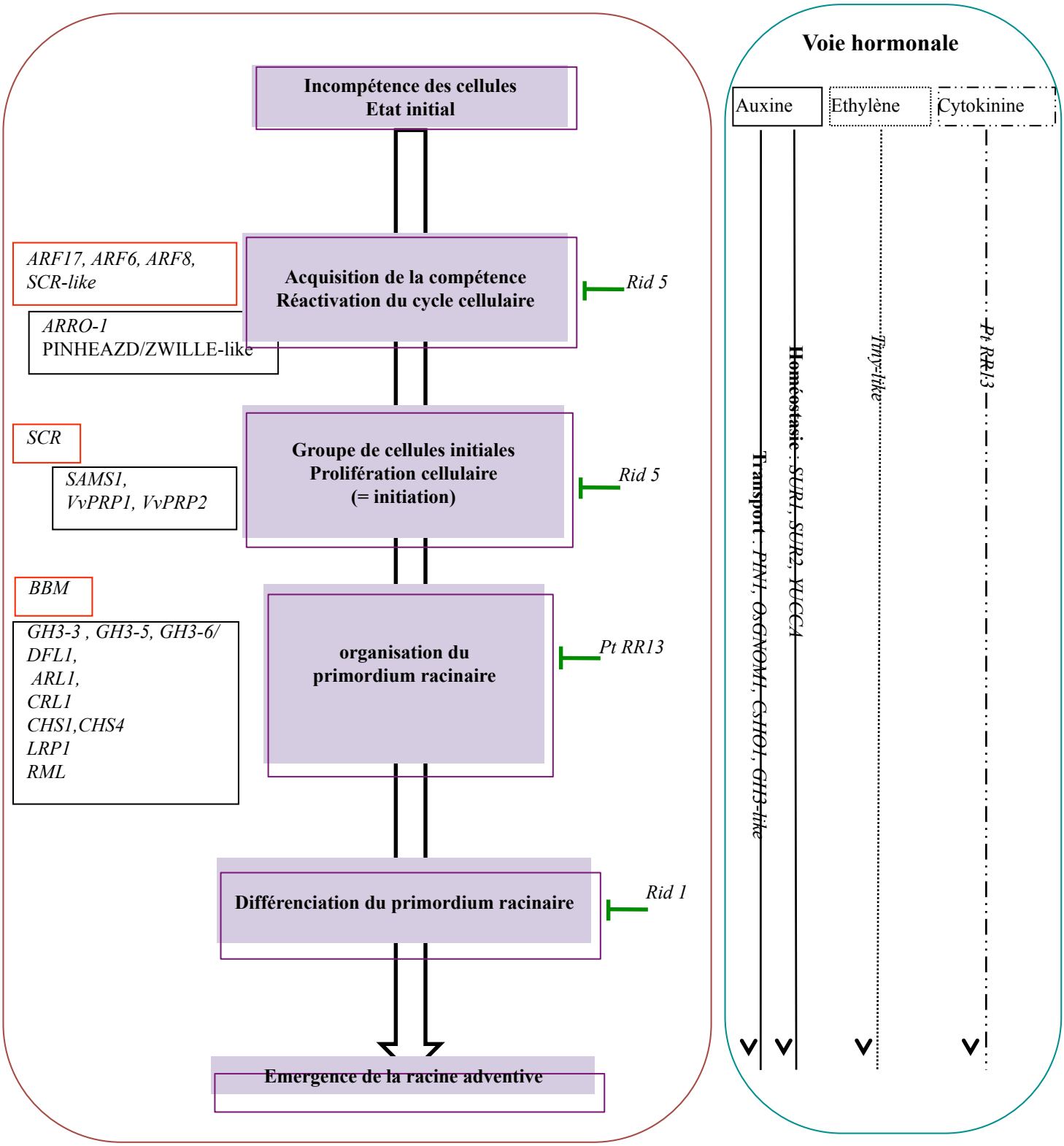


Figure 11 : Schéma synthétique résumant l'implication des différents gènes et des hormones dans les étapes de la formation des racines adventives. Les facteurs de transcription sont représentés par des rectangles rouges. Les gènes exprimés durant chaque étape sont listés à gauche et à droite de chacun des stades.

progressivement à l'organisation d'un primordium. Au sein de ce primordium s'organise progressivement un méristème ainsi qu'une différenciation cellulaire conduisant à la formation de la RA. A ce stade, des connections vasculaires s'établissent avec les vaisseaux conducteurs pré-existants situés à l'intérieur de l'organe-parent. L'élongation de la jeune racine conduit à son émergence à travers les tissus de la plante-parent.

2.2. Régulation de la formation de la racine adventive

Le développement des RAs est un mécanisme complexe qui peut être affecté par des multiples facteurs endogènes et de l'environnement (Li *et al.*, 2009). Récemment, il a été mis en évidence un effet important des différents éléments minéraux tels que le calcium, la source azotée sur le nombre de racines néo-formées à partir des boutures d'*Eucalyptus globulus* (Schwambach *et al.*, 2005). D'autres facteurs tels que les hormones, les sucres et les composés phénoliques contrôlent aussi les différentes étapes de la rhizogénèse adventive (revue, Geiss *et al.*, 2010).

2.2.1. La régulation hormonale

Une part importante des recherches a concerné l'implication des hormones dans ce processus et particulièrement l'auxine (Figure 11). Cette phytohormone a une place centrale dans le développement des organes végétaux et peut interagir avec d'autres facteurs endogènes (Pagnussat *et al*., 2003). L'acide indole-3-acetique (IAA ou AIA) est la forme endogène de l'auxine la plus abondante, l'acide indole-3-butirique (IBA) est aussi présent chez beaucoup d'espèces. Comme l'AIA et en fonction des espèces, IBA serait aussi un inducteur dans la formation des racines (Li *et al*., 2009). Il a été montré qu'une application en auxine endogène ou exogène augmente la formation des RAs (Torrey, 1976 ; Sitbon *et al.*, 1992 ; Boerjan *et al.*, 1995). Chez de nombreuses espèces dont le peuplier, une accumulation d'auxine à la base des boutures précède la formation des RAs (Hausmann *et al.*, 1995 ; Guerrero *et al.*, 1999). De plus, il est maintenant bien établi que l'auxine peut initier les divisions cellulaires et la formation du primordium racinaire (Doerner, 2000 ; Berleth et Sachs, 2001 ; Casimiro *et al.*, 2001) suggérant ainsi un effet positif dans la formation des RAs.

Des mutants affectés dans les mécanismes de signalisation ou d'homéostasie auxiniques sont aussi affectés dans la formation des RAs. Par exemple, des mutants *d'A*.

thaliana surproducteurs d'auxine dont les mutants *superroot* nommés *SUR1* et *SUR2* (Boerjan *et al.*, 1995 ; Delarue *et al.*, 1998) ou *YUCCA* (Zhao *et al.*, 2001) produisent spontanément des RAs en présence de lumière à partir des hypocotyles de jeunes germinations. Les gènes *SUR1*, *SUR2* et *YUCCA* codent des protéines impliquées dans les voies de biosynthèse de l'AIA, suggérant un rôle important de l'homéostasie auxinique dans la formation des RAs. Une mutation affectant le transport de d'auxine, (*OsPIN1* ou *OsGNOM1*) modifie l'émergence des RAs ainsi que le tallage du riz (Xu *et al.*, 2005), suggérant que le transport de l'auxine est impliqué dans la formation des RAs.

Des analyses moléculaires ont permis de dévoiler des gènes impliqués dans les voies de signalisation et de régulation de l'auxine. Pendant la formation du primordium racinaire, la concentration des transcrits des gènes impliqués dans le transport de l'auxine est fortement augmentée. L'analyse protéomique de mutants affectés dans la formation des RAs a conduit à l'identification de 11 protéines dont l'abondance est corrélée avec la teneur en auxine et le développement des RAs (Sorin *et al.*, 2006). Parmi ces protéines, trois sont des protéines inductibles par l'auxine et impliquées dans la conjugaison de l'auxine, les GH3-like (AtGH3-3, AtGH3-5 et AtGH3-6/DFL1).

Un gène nommé *ARL1* (pour *Adventitious rootless1*) a été identifié comme régulateur de l'initiation des primordia des RAs du riz (Liu *et al.*, 2005). Ce gène code une protéine nucléaire ayant un domaine LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES), impliquée dans les mécanismes de signalisation en réponse à l'auxine et l'éthylène. Parallèlement, Inukai et ses collaborateurs (2005) ont identifié le gène *CRL1* (*CROWN ROOTLESS1*) comme régulateur positif et nécessaire dans l'initiation des primordia racinaires. Le gène *CRL1* code aussi une protéine de la famille LOB et contient deux « auxin response éléments » (AuxREs) dans la région promotrice ; cette région interagissant avec les AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) en réponse à l'auxine. Ainsi, CRL1/ARL1 répond à l'auxine, et peut être considéré comme un régulateur positif de la formation des primordia des RAs du riz.

Il a été aussi montré que le transport basipétal de l'auxine a un rôle dans la rhizogénèse adventive. Ce transport induirait une augmentation de monoxide de carbone, synthétisé par l'hème oxygénase (HO), dans la région basale de l'hypocotyle de concombre. Ce monoxide de carbone déclenche des évènements conduisant à la formation de la racine adventive (Xuan *et al*, 2008. Li *et al.* 2011) ont également souligné

que *CsHO1* (gene *HO-1* du concombre), induit par l'auxine, pourrait être impliqué dans la formation de la racine adventive de concombre, confortant le rôle de hème oxygénase dans la formation des RAs (Figure 11).

Des études ont aussi mise en évidence une implication contradictoire de l'éthylène dans la formation des RAs. L'ethylène peut induire ou inhiber la formation des RAs, selon les espèces et le mode de culture. L'ethylène aurait un effet positif sur la formation des RAs de tomate (Zimmerman et Hitchcock, 1948 ; Roy *et al.*, 1972 ; Phatak *et al.*, 1981) ou un effet négatif (Coleman *et al.*, 1980). Des mutants de tomates insensibles à l'éthylène *never ripe* (NR) produisent plus de RAs souterraines mais moins de RAs aériennes (Clark *et al.*, 1999). Une réduction du nombre de RAs a été également observée sur des plants de Pétunia insensibles à l'éthylène (revue, Geiss *et al.*, 2010), suggérant un rôle positif de cette hormone dans la rhizogénèse adventive. Plus récemment, il a été mis en évidence une interaction éthylène-auxine à travers le transport de l'auxine (Negi *et al.* 2009). Il a également été mis en évidence une interaction complexe entre l'éthylène, l'acide abscissique (ABA) et l'acide gibbérellique (AG) dans la formation des RAs chez le riz (Steffens *et al.*, 2006).

Les cytokinines sont également des hormones impliquées dans la formation de la RA. Cette hormone aurait un effet inhibiteur dans la formation des RAs à partir d'hypocotyles ou de tige chez le pin (Smith et Thorpe, 1975), la rose (Dubois *et al.*, 1988) ou le pois (Bollmark et Eliasson, 1986). Des plants de tabac sur-exprimant une des cytokinines oxydases et donc présentant une teneur en cytokinine plus faible, développent plus de RAs (Werner *et al.*, 2001 et 2003). La quantification des cytokinines et de l'auxine dans diverses espèces à la base des boutures révèle que les concentrations de ces deux groupes d'hormones présentent des « patterns » opposés, suggérant un effet opposé de ces deux hormones.

Récemment, l'équipe de Davis (Ramirez-Carvajal *et al.*, 2009 et 2010) suggère que le bouturage des tiges non dormantes du peuplier *P. tremula x P. alba* (clone INRA 717-1B4) perturbe la balance hormonale en stimulant les voies de l'auxine et de l'éthylène, et en diminuant ainsi le rapport cytokinine/auxine. A partir d'une analyse transcriptomique, ils ont mis en évidence le rôle négatif d'un régulateur de réponse aux cytokinines, PtRR13 (cytokinine type-B Response Regulator) dans la rhizogénèse adventive du peuplier. PtRR13 interférerait le transport de l'auxine et, parallèlement, inhiberait la

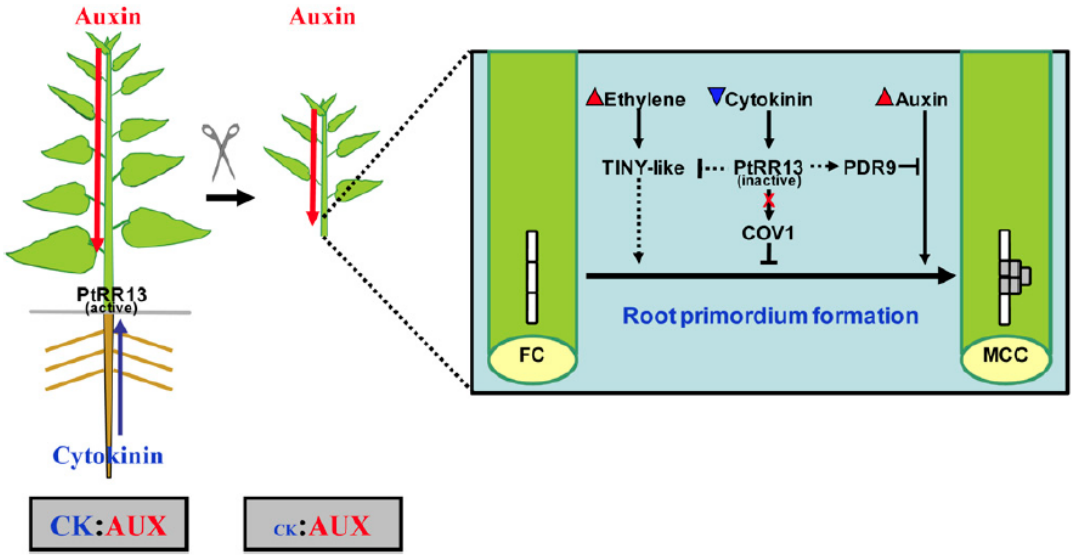


Figure 12 : Fonctions potentielles de PtRR13 dans le développement des racines adventives de peuplier, *P. tremula* x *P. alba* (Ramirez-Carvajal *et al*., 2010). L'équilibre du rapport cytokinine/auxine régule la croissance et le développement des plantes. L'excision perturberait cette balance hormonale en stimulant les voies de signalisation de l'auxine, en diminuant ainsi le rapport cytokinine/auxine. La formation des primordia des racines adventives implique la formation d'un groupe de cellules méristématiques (MCC) à partir des cellules initiales, devenues compétentes (FC). PtRR13 aurait un rôle central : (1) son induction activerait la transcription de *COV1,* régulateur négatif de la vascularisation. (2) Parallèlement la présence de PtRR13 perturberait la formation des primordia en interférant le gradient auxinique *via* la stimulation de la transcription de *PDR9*, codant une protéine de l'efflux d'auxine, et (3) *via* l'inhibition de l'expression du facteur de transcription *TINY-like* induit par l'éthylène et/ou le stress.

transcription de facteurs de transcription de la famille *AP2/ERF* (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) (Figure 11 et 12).

2.2.2. Identification de gènes candidats dans la formation des racines adventives

L'analyse et le phénotypage de diverses lignées transgéniques ont permis de souligner un certain nombre de gènes potentiellement impliqués dans la formation des RAs. Parallèlement, plusieurs groupes ont réalisé des analyses transcriptomiques et protéomiques à différents stades de la formation des RAs de boutures d'hypocotyles de *Pinus contorta* (Brinker *et al.*, 2004), *Pinus taeda* (Busov *et al*, 2004), du peuplier (*P. trichocarpa* X *P.deltoïdes* ; Kohler et Martin, communication personnelle) ou d'*A. thaliana* (Sorin *et al.*, 2006) dans le but d'identifier des gènes candidats associés à la rhizogénèse adventive. Ces différentes analyses ont permis de souligner un certain nombre de gènes qui peuvent être associés à la formation de la RA et/ou qui contrôlent ce processus (Figure 11).

De manière intéressante, bien que les profils de gènes régulés lors de la formation des RAs du pin ne suivent pas une cinétique identique à ceux observés lors de la rhizogénèse adventive du peuplier (Kohler et Martin, communication personnelle), les gènes impliqués dans la division cellulaire, dans la synthèse et le remodelage de la paroi sont régulés. L'hybridation de micro-arrays contenant 2178 ADNc de *Pinus taeda* (Brinker *et al.*, 2004) a mis en évidence un changement significatif de l'expression de 220 gènes au cours de la formation des RAs du pin. Pendant la phase d'initiation, les gènes impliqués dans la division cellulaire et le remodelage de la paroi ainsi qu'un transcrit codant une protéine PINHEAD/ZWILLE-like, sont fortement exprimés. En revanche, les gènes codant des protéines impliquées dans la photosynthèse, le transport de l'auxine et la synthèse de la paroi sont faiblement exprimés. L'expression de gènes impliqués dans le transport de l'eau est aussi modulée.

L'identification de mutants d'*A. thaliana* sensibles à la température ou à la lumière a permis de mettre en évidence le rôle d'une série de gènes dans les différents stades de formation des RAs dont la famille *RRD* (pour *Root Redifferenciation*), le gène *RID5* (pour *root initiation défective*). *RID5* a été identifié comme étant le gène *Microtubule Organisation/GEMini pollen1* (*MOR1/GEM1*) codant une protéine associée aux

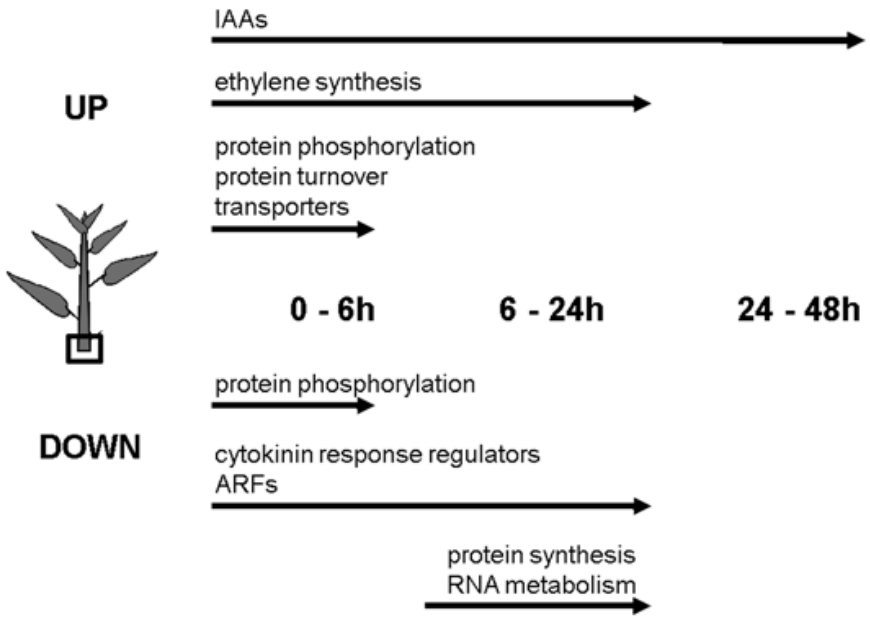


Figure 13 : Familles de gènes régulés significativement dans les étapes précoces de la formation des racines adventives du peuplier, *P. tremula* x *P. alba* (Ramirez-Carvajal *et al*., 2010)

microtubules (Konishi et Sugiyama, 2003). Le gène *ARRO-1,* codant une Dioxigenase 2-oxoacid-dependent, est également impliqué dans la formation de la racine adventive de microbouture de pommier (*Malus domestiqua* ; Sedira *et al.*, 2005). Préalablement, ce gène avait été décrit comme répondant à l'auxine durant la rhizogénèse (Van der Krieken *et al.*, 1992), mais Serida et ses collaborateurs (2005) ont montré que ce gène était spécifique de l'enracinement plutôt que dépendant de l'auxine. Le gène *OsSIZ1*, codant une des principales SUMO (Small Ubiquitin related modifier), est connu pour jouer un rôle dans la régulation de la croissance et du développement, interviendrait aussi dans la rhizogénèse adventive. Les mutants *OSSIZ1* du riz présentent des changements significatifs dans la croissance et de développement de la plante, notamment dans le nombre de racines adventives (Wang *et al.*, 2011). Chez le noyer, deux gènes de chalcone synthase (*CHS1 et CHS4*) et un « homologue » de *LRP-1* (*Lateral Root Primordium*) de *chez A. thaliana (Smith DL et Federoff, 1995) sont exprimés durant les stades précoces* de la formation du primordia précédant le développement du méristème (Ermel *et al.*, 2000). D'autre part, deux gènes codant des protéines riches en proline VvPRP1 et VvPRP2 sont induits durant l'enracinement. Ces deux protéines, pouvant être rattachées aux protéines des parois cellulaires, jouent un rôle important dans l'initiation de nouvelles racines à partir de boutures de vigne (*Vitis vinifera L.*). Elles pourraient être impliquées dans l'altération des propriétés des parois cellulaires permettant l'émergence des racines (Thomas *et al.*, 2003). Des mutants d'*Arabidopsis* dont la mise en place des méristèmes est perturbée (mutants nommés *rml*) sont caractérisés par un arrêt de la croissance racinaire. Les gènes *RML* sont des gènes considérés comme des marqueurs du développement de la racine adventive et latérale et de l'émergence du primordium racinaire chez *Arabidopsis*. Deux gènes codant des S-adenosylmethionine synthétase (SAMS) 1 et 2 présentent différentes fonctions dans la formation et la croissance de RAs du pin (*Pinus contorta*). SAMS2 interviendrait dans la croissance de la plante en général alors que SAMS1 serait spécifique de la formation et de la croissance de la RA (Lindroth *et al.*, 2001).

L'analyse du transcriptome du peuplier *P. tremula x P. alba* (clone INRA 717-1B4) dans les premières heures suivant le bouturage (Ramirez-Carvajal *et al.*, 2009 et 2010) révèle un remodelage du transcriptome durant la rhizogénèse adventive du peuplier (Figure 13). Ainsi, 6 h après le bouturage, 27% des gènes prédits sont significativement

régulés, 36% après 24 h et seulement 4% après 48 h. L'analyse des gènes régulés indique que durant les 6 premières heures après l'excision, les trois grandes classes de gènes régulés codent des protéines « amino-acide ligase », des protéines de transport et des protéines de phosphorylation. Dans la classe des « amino-acide ligase », le gène le plus régulé code un orthologue d'*Arabidopsis* U-box E3 ubiquitin ligase PUB22, connu pour être impliqué dans la réponse à la sécheresse (Cho *et al.,* 2008). Parmi les gènes codant pour des protéines de transport, les plus régulés interviennent dans le transport du potassium, du sodium, du calcium des sucres, des acides aminés et de l'eau. Pour les protéines de phosphorylation, le transcrit le plus régulé code pour une protéine MAPKs appelée MAPK3 chez *Arabidopsis*. Cette protéine est impliquée dans la phosphorylation du facteur de transcription EIN3 (Ethylen Insensitive-3) en présence d'éthylène (Ramirez-Carvajal et Davis, 2010). Selon ces auteurs, ces régulations sont importantes pour l'adaptation de la plante aux manques d'eau et de nutriments apportés par le système racinaire. Entre 6 et 24 h, les gènes les plus régulés appartiennent à des classes de gènes codant une activité de structure et pour des hélicases ATP dépendantes. Ceci suggère une forte demande au niveau de la machinerie traductionnelle. De plus, au cours des 24 premières heures suivant l'excision, des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, dans la voie de signalisation de l'auxine ou des cyokinines, sont significativement régulés.

2.2.3. Importance des facteurs de transcription dans la formation des racines adventives

Les analyses transcriptomiques ont également permis de mettre en évidence la régulation de facteurs de transcription impliqués au cours de la formation des RAs (Figure 11).

Il a été observé une augmentation de l'expression de *SCARECROW-LIKE* (*SCR-LIKE*) durant le premier jour du processus d'enracinement des espèces forestières (*Pinus radiata* et *Castanea sativa* ; Sanchez *et al.*, 2006). Cette augmentation indique que ce gène est impliqué au cours de l'étape de réactivation du cycle cellulaire, précédant la formation des primordia. *SCARECROW* (*SCR*) est un facteur de transcription impliqué dans le l'identité du centre quiescent (Sabatini *et al.*, 2003 ; Sbabou *et al.*, 2010).

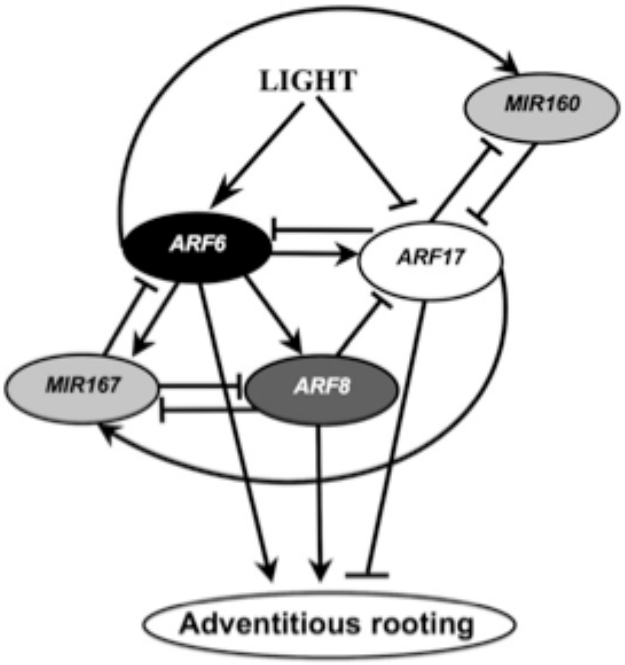


Figure 14 : Modèle intégrant les boucles de régulation des *ARF* et *miRNA* impliquées dans le contrôle de la racine adventive d'*A. thaliana*. L'initiation des racines adventives est contrôlée par une balance entre les transcrits des gènes *ARF* (*ARF6*, *ARF8* et *ARF17*), ayant des rôles d'activateur et/ou de d'inhibiteur. Les niveaux des transcrits des *ARFs* sont modulés par la présence de *MIR160* et *MIR170* (Gutierez *et al.*, 2009).

De manière intéressante, une lignée d'*A. thaliana* surexprimant *ARF17* (*Auxin Response Factor17*) développe peu de RAs, suggérant un rôle de régulateur négatif de ce gène dans le développement des RAs en réponse à l'auxine (Sorin *et al.*, 2006). La sur-expression de *AtARF17* est corrélée avec une diminution de l'expression des membres de la famille *AtGH3*. Plus récemment, l'équipe de C. Bellini (Gutierrez *et al.*, 2009) a démontré que l'initiation des racines adventives est contrôlée par une balance de l'abondance de transcrits des *ARF*. Certains de ces ARF seraient des activateurs (*ARF6* et *ARF8*) et d'autres des répresseurs (*ARF17*) (Figure 14). En effet, une lignée d'*A. thaliana* surexprimant *ARF17* développe peu de RAs (Sorin *et al.*, 2005). Le maintien de l'homéostasie de ces 3 ARF nécessite une régulation à des niveaux post-transcriptionnels. Les auteurs ont montré le rôle important des microARN (dont *MIR167*) dans cette homéostasie .Ainsi, l'initiation de RA serait régulée par des réseaux de gènes complexes impliquant des mécanismes de feedback (Gutierrez *et al.*, 2009).

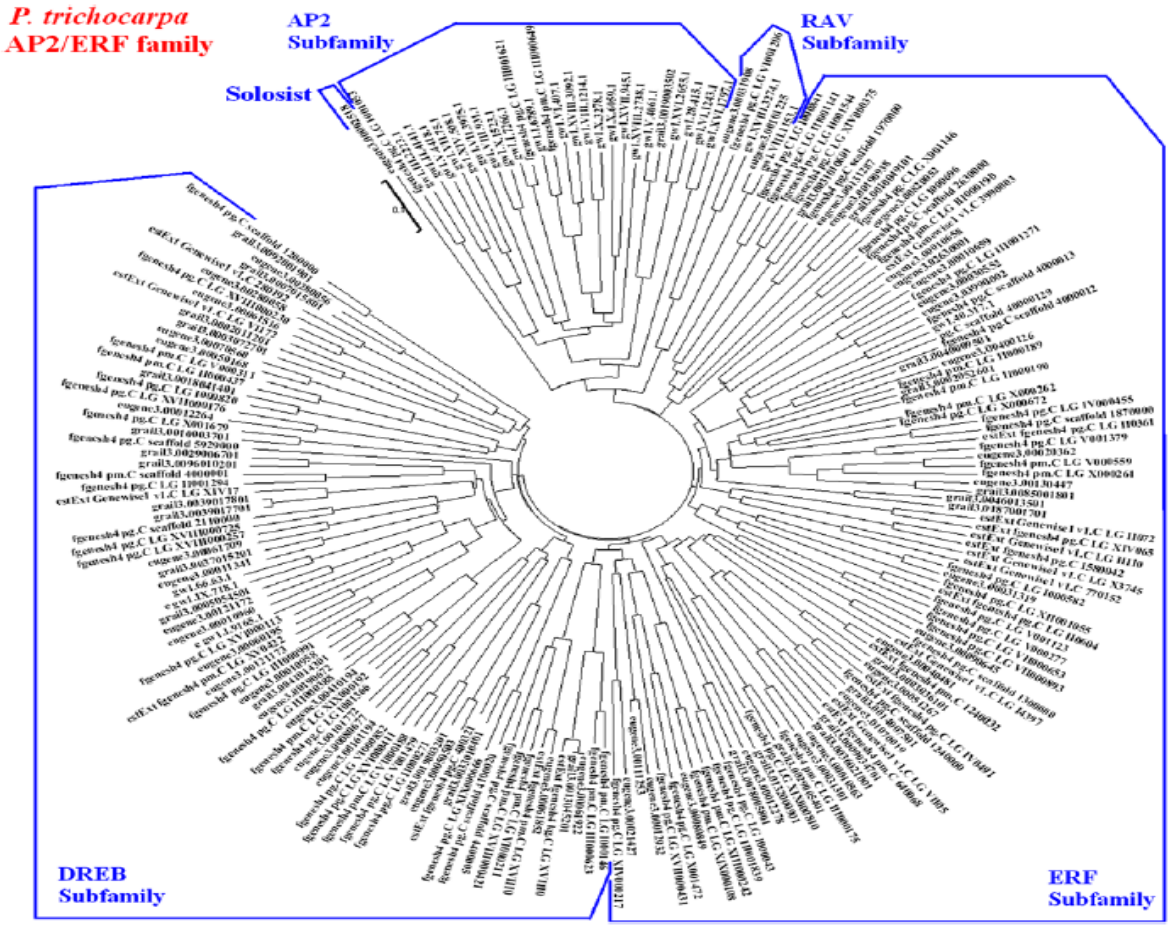
3. La famille AP2/ERF, implications dans les différents organes de la plante

3.1. Présentation de la famille AP2 (APETALA2)/ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR)

La famille AP2/ERF est une des grandes familles de facteur de transcription, appelée aussi AP2/EREBP. Les membres de cette famille sont connus pour être impliqués dans le développement des plantes et dans l'identité cellulaire. L'expression des membres de cette famille peut être influencée par de nombreux facteurs environnementaux, dont les stress hydrique, salin, thermique ainsi qu'en réponse à des attaques pathogènes.

L'ensemble des membres de cette famille est caractérisé par la présence d'au moins un domaine AP2. Ce domaine AP2 a été longtemps considéré comme spécifique des végétaux (Riechmann et Meyerowitz, 1998). Toutefois, des analyses en bioinformatique ont montré que des homologues de ce domaine sont présents chez la cyanobactérie *Trichodesmium erythraeum*, chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* et chez les virus *Enterobacteries phage Rb49* et le *bactériophage Felix 01* (Magnani *et al.*, 2004 ; Wuitschick *et al.*, 2004 ; Wessler, 2005). Les protéines contenant le domaine AP2 mais n'appartenant pas aux lignées végétales sont supposées avoir une fonction de HNH

A



B

Summary of the AP2/ERF family between *P. trichocarpa* and *A. thaliana*

Plant		*P. trichocarpa*		*A. thaliana*	
Classification	Group	Number	Percent	Number	Percent
DREB subfamily	A1	6	3.00	6	4.14
	A2	18	9.00	8	5.52
	A3	2	1.00	1	0.70
	A4	26	13.00	16	11.03
	A5	14	7.00	16	11.03
	A6	11	5.50	9	6.21
	Total	77	38.50	56	38.63
ERF subfamily	B1	19	9.50	15	10.34
	B2	6	3.00	5	3.44
	B3	35	17.5	18	12.41
	B4	7	3.50	7	4.83
	B5	8	4.00	8	5.52
	B6	16	8.00	12	8.28
	Total	91	45.50	65	44.82
Ap2 subfamily		26	13.00	17	11.71
RAV subfamily		5	2.50	6	4.14
Solosist		1	0.50	1	0.70
Total		200		145	

The number of AP2/ERF family from *A. thaliana* was according to Sakuma et al. [18].

C

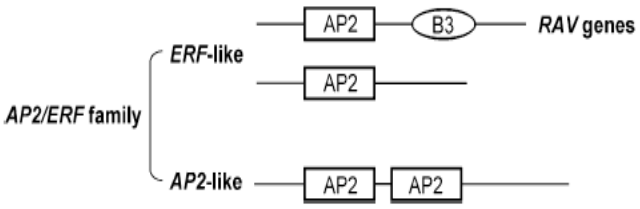


Figure 15 : La famille AP2(APETALA)/ERF(ETHYLENE RESPONSE FACTOR). A, arbre phylogénétique de la famille AP2/ERF pour *Populus trichocarpa ;* B, comparaison des groupes composant la famille AP2/ERF chez *A. thaliana* et chez *P. trichocarpa* (Zhuang *et al*. 2008). C, structure des différents groupes de la sous famille *AP2/ERF* (Kim *et al*. 2006).

endonuclease (H pour histidine et N pour asparagine). Magnani *et al.* (2004) suggèrent que la présence de ce domaine AP2/ERF chez les végétaux pourrait provenir d'un transfert horizontal d'endonucléase HNH-AP2 des bactéries vers les végétaux.

Cette grande famille comprend 145 membres chez *A. thaliana* et 200 chez *Populus trichocarpa* (Zhuang *et al.,* 2008 ; Figure 15A). Selon ces auteurs, elle se divise en quatre sous familles, nommées AP2, ERF, DREB et RAV, plus un solosist, Cette répartition est basée à la fois sur les homologies de séquences et sur le nombre de domaines AP2/ERF (Nakano *et al.*, 2006) (Figure 15A, B et C). Le domaine AP2/ERF est un domaine d'attachement à l'ADN composé de soixante-dix acides aminés dont la région cœur comprend dix-huit acides aminés, orgnanisés en forme d'hélice α amphipathique (Kim *et al*., 2006). Ces domaines sont essentiels pour la fonction AP2 (Jofuku *et al.*, 1994).

Les membres de la sous famille RAV comportent un domaine AP2/ERF et un autre domaine d'attachement à l'ADN, nommé le domaine B3. La sous-famille ERF code des protéines qui ne comportent qu'un seul domaine AP2/ERF. Selon les auteurs, cette sous-famille ERF est parfois divisée en deux groupes, le groupe ERF et le groupe DREB (Sakuma *et al.*, 2002). Au contraire, les protéines de la sous famille AP2 sont composées de deux domaines AP2/ERF.

Les études portant sur les fonctions des membres de cette famille ont montré qu'ils intervenaient dans des mécanismes divers au cours de la vie des plantes. Les membres de la sous famille RAV sont impliqués dans les mécanismes de réponse hormonale dont l'éthylène (Alonso *et al.*, 2003), les brassinostéroides (Hu *et al.*, 2004), et en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Sohn *et al.*, 2006). Les membres de la sous famille DREB joueraient un rôle important dans la réponse au stress abiotique en reconnaissant les « éléments de réponse à la déshydratation » portant le motif A/GCCGAC (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994 ; Thomashow, 1999). Les protéines de la sous famille ERF, participeraient essentiellement en réponse à des stress biotiques comme les attaques pathogènes, en reconnaissant la boîte GCC (Hao *et al.*, 1998). Les protéines AP2 sont considérées comme régulateurs importants du développement de la plante (Elliott *et al.*, 1996 ; Boutilier *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2005). En effet, l'expression des gènes codant les protéines AP2 sont régulés au cours du développement de la plante (Okamuro *et al.*, 1997).

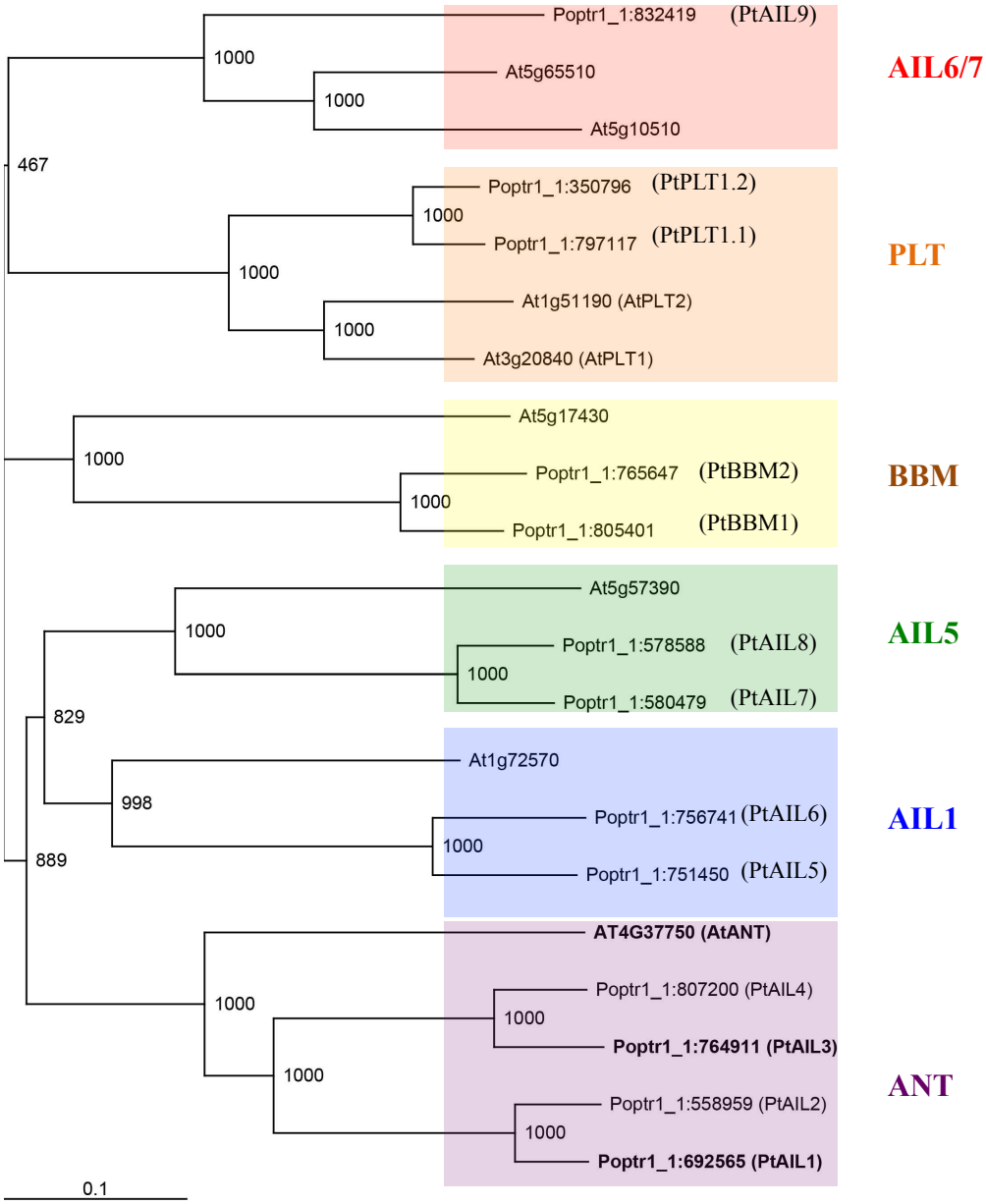


Figure 16 : Arbre phylogénétique des membres du groupe AINTEGUMENTA, réalisé à partir des séquences protéiques d'*Arabidopsis thaliana* (notées At) et de *P. trichocarpa* (notées Poptr 1_1:…et Pt). Selon Kalberg *et al*., 2009

Depuis quelques années, un intérêt particulier est porté à l'étude à la sous famille AP2 et plus particulièrement à un de ses groupes, appelé Aintegumenta (ANT).

3.2. Implication du groupe AINTEGUMENTA dans le développement des plantes

Le groupe Aintegumenta d'*A. thaliana* comprend huit membres : un gène nommé *AtANT* et sept gènes *AINTEGUMENTA-like*, nommés *AtAIL1*, *AtAIL5*, *AtAIL6*, *AtAIL7*, *AtPLT1*, *AtPLT2* (pour *PLETHORA 1* et *2*) et *AtBBM* (*BABY BOOM*). L'analyse cette famille chez le peuplier a été publié récemment (Karlberg *et al*., 2011 ; Figure 16) a mis en évidence la présence de :

* 4 orthologues de *AtANT*, nommés *PtAIL1*, *PtAIL2*, *PtAIL3* et *PtAIL4*
* 2 orthologues de *AtPLT1*/*AtPLT2*, nommés *PtPLT1.1 et PtPLT1.2*
* 2 orthologues de *AtBBM*, nommés *PtBBM1* et *PtBBM2*
* 2 orthologues de *AtAIL1*, nommés *PtAIL5* et *PtAIL6*
* 2 orthologues de *AtAIL5*, nommés *PtAIL5* et *PtAIL8*
* 1 orthologue de *AtAIL5*, nommé *PtAIL9*

Les études ont montré que le groupe AINTEGUMENTA-like (AtAIL) joue un rôle important dans le développement des différents tissus et dans les différents stades de développement d'*A. thaliana*. Mizukami et Fischer (2000) ont mis en évidence l'implication de AtANT dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans la croissance des organes. Ces auteurs suggèrent que ce gène interviendrait dans le maintien de la compétence des cellules souches au cours de l'organogénèse. Le profil expression du gène *BABY BOOM* (*BBM*) et le phénotype des lignées dans lesquelles l'expression de BBM est perturbée, suggèrent que ce gène joue un rôle dans la prolifération cellulaire lors de la embryogénèse (Boutilier *et al.*, 2002).

L'analyse de l'expression des membres du groupe AINTEGUMENTA dans les organes d'*A. thaliana* (Nole-Wilson *et al.*, 2005 ; Figure 17) révèle que ces gènes sont transcrits dans de nombreux organes et indique une très forte expression du gène *AtANT*, dans les jeunes germinations, les racines et les inflorescences. Ces études ont aussi montré que les gènes *AtANT*, *AtAIL6* et *AtBBM* sont impliqués dans le développement et la formation des organes floraux (Nole-Wilson *et al.*, 2005). Des simples mutants *AtANT*,

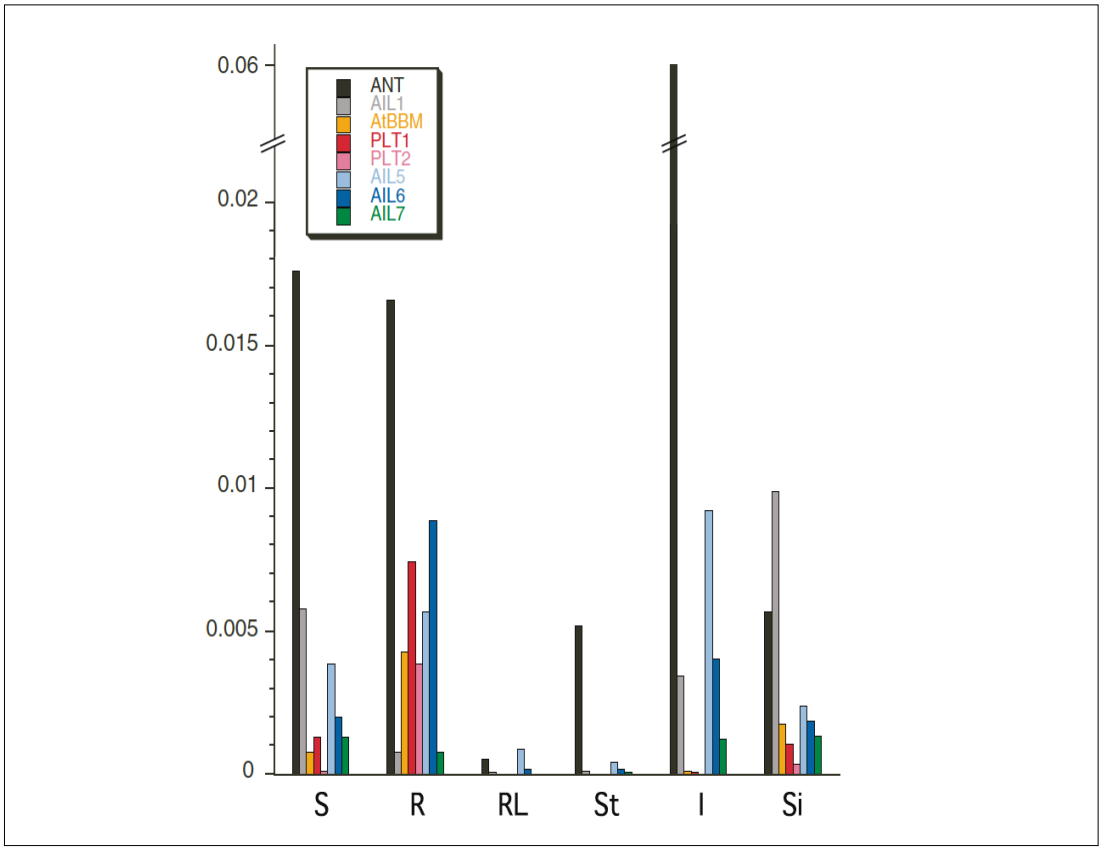


Figure 17 : Profil d'expression des différents membres du groupe AINTEGUMENTA chez *Arabidopsis thaliana*. Les valeurs d'expression ont été normalisées par la valeur d'expression de UBQ10 à chaque expérimentation. S, jeune germination ; R, racines ; RL, racines latérales ; St, tige; I, inflorescences et Si, siliques. D'après Nole-Wilson *et al.* (2005).

AtAIL5 et *AtAIL6* ne présentent pas de phénotypes dans l'initiation des organes floraux (Elliott *et al.*, 1996 ; Klucher *et al.*, 1996 ; Nole-Wilson *et al.*, 2005 ; Krizek, 2009). Des doubles mutants d'*A. thaliana ANT-AIL6* présentent des défauts au niveau du positionnement, de l'identité, du nombre et de la croissance de l'organe floral suggérant que AtAIL6 et AtANT sont des régulateurs importants de la croissance et l'organisation des organes floraux (Krizek, 2009). Ces deux gènes interviendraient aussi dans l'initiation de l'organisation de l'organe floral et dans l'organisation de la formation du gynécée (Krizek, 2011). Les mutants *AtANT* montrent aussi des perturbations au niveau du gynécée, le nombre d'ovules est réduit (Elliott *et al.*, 1996 ; Klucher *et al.*, 1996) et l'organisation du système vasculaire est perturbée (Nole-Wilson *et al.*, 2010).

Selon Krizek (2011), les membres AtAIL et AtPLT sont aussi d'importants régulateurs intervenant dans le développement des jeunes plantes et des racines.

3.3. Implication des membres du groupe AINTEGUMENTA/AINTEGUMENTA LIKE dans le développement racinaire

Le maintien et l'organisation racinaires sont sous le contrôle des cellules souches (cellules du centre quiescent et des cellules initiales). Les données récentes indiquent que le fonctionnement des cellules souches racinaires est régulé par des facteurs de transcription (Terpstra, 2009 ; revue, Luijten et Heidstra, 2010), notamment des membres de la famille de facteurs de transcription AP2, les *PLETHORA* (*PLT*).

Chez *Medicago truncatula*, les membres de cette famille, PLETHORA 1 et 2 et BABYBOOM auraient un rôle dans le maintien des cellules souches des racines (Imin, *et al.*, 2007). Aida *et al.*, (2004) ont montré l'importance de cette famille dans la régulation du maintien du méristème des racines latérales chez *A. thaliana*. Les gènes *PLT* ont un rôle dans l'organisation de la pointe racinaire. Chez les doubles mutants *plt1/plt2*, le nombre de racines latérales est augmenté. Galinha et ses collaborateurs (2007) ont mis en évidence le rôle de deux gènes supplémentaires appartenant à cette famille, le gène *AIL6*/*PLT3* et *BABY BOOM* (*BBM*). Ces deux gènes agissent, en association avec *PLT*1 et *PLT2*, dans le développement embryonnaire des racines et le maintien des cellules souches (revue, Luijten et Heidstra, 2010). Cette étude met en évidence le rôle clé des *PLT* en tant que régulateur du développement des racines. Le gradient d'expression des

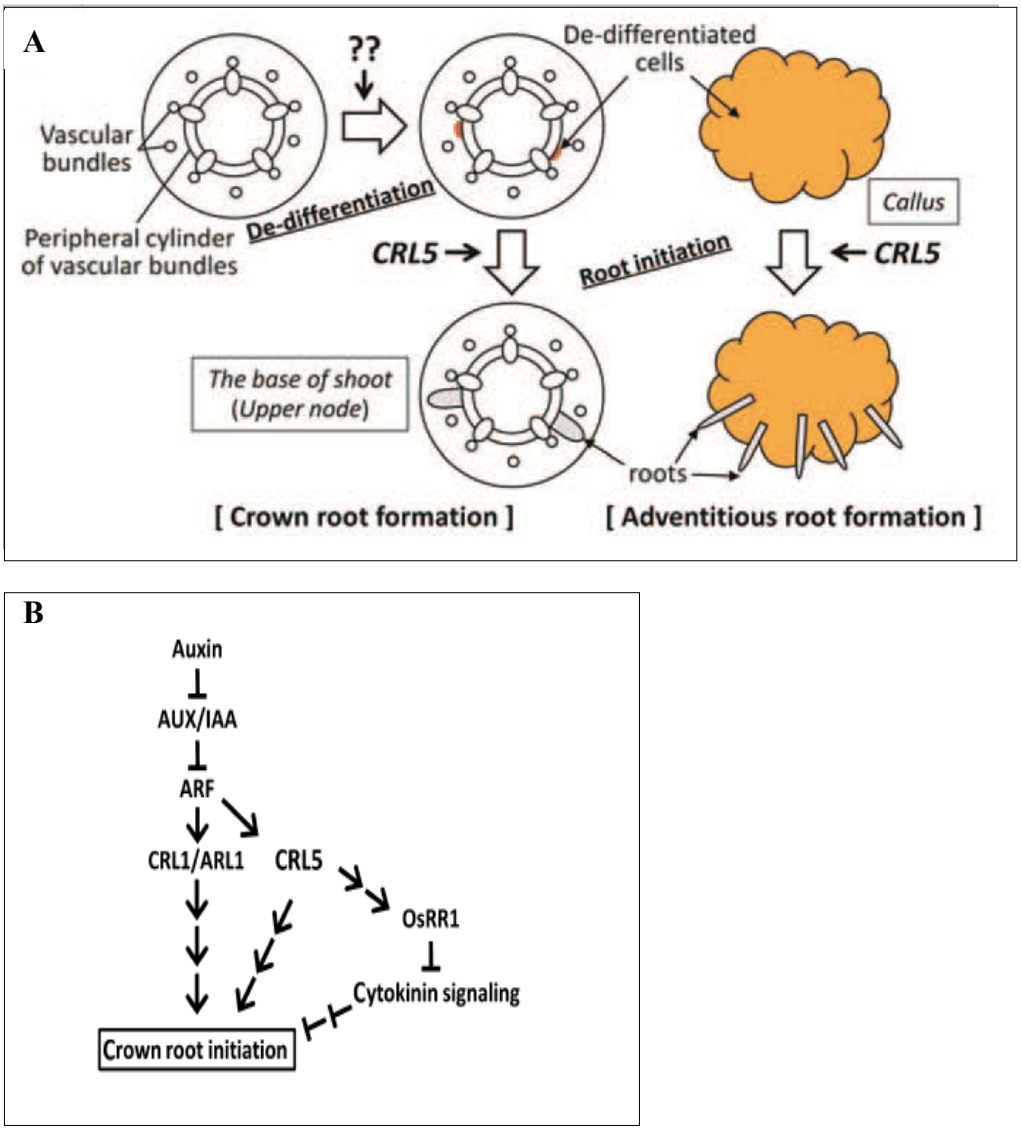


Figure 18 : A, Représentation schématique de la formation de la racine adventive du riz. La protéine CLR5 aurait un rôle dans les cellules en différentiation et induirait l'initiation des racines adventives (Kitomi Y. *et al.*, 2011b). B, Réseau de gènes dans lequel intervient CLR5, conduisant à l'initiation des racines adventives (Kitomi Y. *et al.*, 2011a)

PLT, lors de la croissance du primordium racinaire, interviendrait dans la programmation des cellules souches, dans l'activité mitotique et dans l'état final de la différentiation cellulaire (Galinha *et al.*, 2007). De même, chez *M. truncatula,* les membres de cette famille PLT1 et PLT2 et BBM1 auraient un rôle dans la formation des cellules initiales des racines. Les auteurs suggèrent également que BBM intervienne dans la formation des primordia racinaires (Imin *et al.*,2007).

Très récemment, Kitomi *et al*. (2011a et b) ont mis en évidence le rôle CLR5 dans l'inititiation des RAs chez le riz. CRL5 serait essentiel dans la formation de la RAs. Le gène CRL5 présente des similarités de séquence avec le gène Aintegumenta composé de deux domaines AP2 chez *A. thaliana*. CRL5 serait une cible directe d'une protéine ARF et agirait sur OsRR1. OsRR1 est un régulateur négatif des cytokinines (Figure 18).

De plus, des lignées transgéniques de mangues (*Mangifera indica*) surexprimant le gène MiARF2, présentent un phénotype racinaire avec une inhibition des RAs. Les auteurs suggèrent que cette inhibition racinaire peut s'expliquer par la répression de l'expression du facteur de transcription ANT et de ARGO, cette répression étant induite par la sur-expression de MiARF2 (Wu *et al.,* 2011).

Ces études suggèrent que les membres PLT et BBM du groupe AINTEGUMENTA sont impliqués dans le maintien du méristème racinaire et que AtANT serait plutôt impliqué dans les premières étapes de la formation de la RA.

Objectifs de la thèse

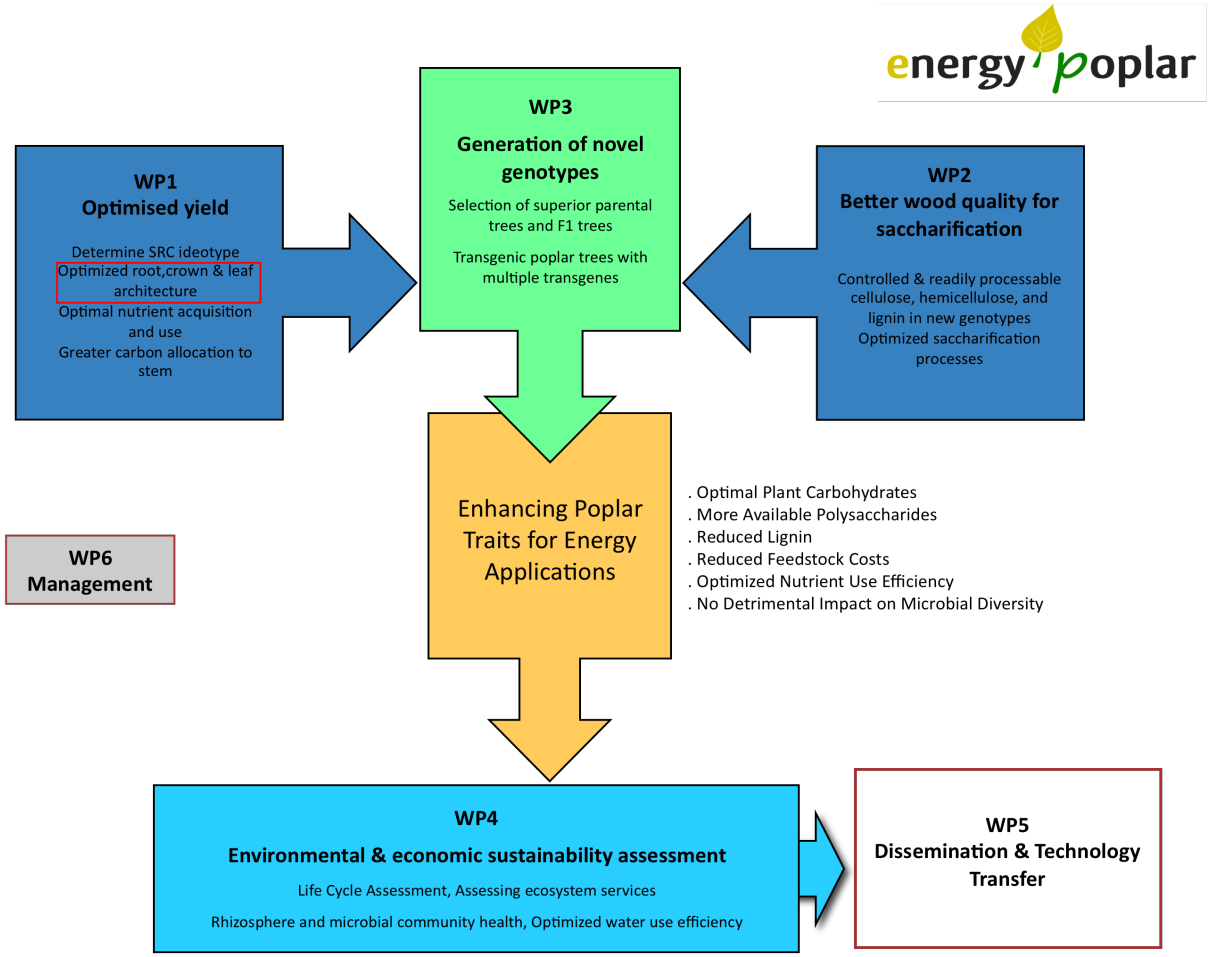


Figure 19 : Les principaux objectifs du projet EnergyPoplar, regroupés en Workpackages (WP). Notre équipe participe à la réalisation du WP1 en collaboration avec d'autres équipes du consortium. Le principal objectif de ce WP est de comprendre les déterminants génétiques et génomiques impliqués dans d'optimisation de la croissance (racinaire et aérienne) du peuplier.

Les plantations forestières sont devenues une source importante de bois et de production de biomasse. L'optimisation de la productivité de ces plantations est un des objectifs de plusieurs programmes de recherche qui ont débuté depuis les 5 dernières années (Herr, 2011). Le projet européen EnergyPoplar (2008-2012) a pour objectif de développer des peupliers comme culture de «bioénergie» de seconde génération. Ce projet intègre des approches ambitieuses afin (1) d'optimiser la quantité, la composition de la structure de la paroi cellulaire (rapport lignine/cellulose) pour le production de biéocarburant, et (2) de développer de nouveaux génotypes de peuplier possédant une forte croissance en champs avec un faible impact environnemental. Ces objectifs s'articulent autour de 5 WP (workpackage) (Figure 19). Notre unité est impliquée essentiellement dans la réalisation du WP1. Le principal objectif de ce WP est de comprendre les déterminants génétiques et génomiques impliqués dans l'optimisation de la croissance (racinaire et aérienne) du peuplier.

La rhizogénèse adventive constitue une étape clef dans les processus de régénération des espèces ligneuses. Elle assure une propagation clonale et un maintien rapide des génotypes d'élite avant leur introduction dans la production ou des programmes d'amélioration. La compréhension des mécanismes, mis en jeu lors de ce processus, présente donc un intérêt dans la sélection et la création de clones dit élites. Par ailleurs, de part ses fonctions d'absorption de l'eau et des éléments minéraux, le système racinaire joue un rôle essentiel dans la production de biomasse. Il est particulièrement important d'améliorer la croissance du peuplier en lui conférant un système racinaire optimisé. Ce caractère devrait permettre d'améliorer l'efficacité d'utilisation des éléments minéraux peu abondants dans les sols marginaux destinés aux taillis à courte rotation (TCR) de peupliers bioénergétiques.

Mon travail de thèse s'intègre dans le projet EnergyPoplar avec l'objectif d'identifier les déterminants génétiques de la rhizogénèse adventive du Peuplier.

J'ai débuté ce travail par la caractérisation de la cinétique et des étapes cellulaires de la rhizogénèse adventive de nos espèces modèles (*P. trichocarpa*, *P. tremula* x *P. tremuloides* et *P. tremula* x *P. alba*). La connaissance de la cinétique de *P. trichocarpa*

m’a servi de base pour l’analyse de la capacité à enraciner de quelques clones hybrides de peuplier, mis à notre disposition par le consortium d’EnergyPoplar.

Mon travail s’est ensuite dirigé vers l’identification des facteurs de transcription comme déterminants génétiques de la formation des RAs. Ce travail m’a conduit vers l’étude d’un facteur de transcription, membre de la famille AP2/ERF, *PtAIL1*.

Parallèlement, j’ai utilisé les données transcriptomiques obtenues au cours de la rhizogénèse adventive du Peuplier, pour débuter l’identification des gènes impliqués dans le transport, la signalisation et le métabolisme de l’auxine.

Chapitre 1 :

Etude des capacités à l'enracinement de quelques génotypes de Peuplier

Il nous a paru important de débuter notre travail sur la rhizogénèse adventive du peuplier, par l'analyse de la cinétique d'enracinement et l'observation des différents stades de formation des racines adventives de *P. trichocarpa*, espèce de référence pour les études moléculaires et connue comme étant une « espèce facile à enraciner ». Nous avons ajouté à cette étude, l'analyse de la cinétique d'enracinement de deux hybrides issus de croisements interspécifiques et utilisés pour la transformation génétique, *Populus tremula* x *Populus alba* (nommé *Pta,* clone INRA 717-1-B4) et *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (nommé *Ptt,* UPSC T89).

Dans le cadre du projet européen EnergyPoplar, nous avions comme objectif l'étude du développement racinaire des génotypes de peuplier sélectionnés par le consortium (Figure 19). Deux populations ont été utilisées, issues de croissements interspécifiques entre *P. deltoides* et *P. trichocarpa* (famille INRA 54), d'une part et entre *P. deltoides* et *P. nigra* (clones INRA Elit), d'autre part. Ces individus ont auparavant été caractérisés pour leur capacité à mycorhizer (Labbé *et al*., 2010) et pour leur teneur en glucose après prétraitement et saccharification.

La symbiose ectomycorhizienne est le thème de recherche privilégiée au sein de l'équipe. Elle se caractérise par l'interaction symbiotique entre des champignons rhizosphériques et les plantes pérennes tempérées (Smith et Read, 2008). Les champignons absorbent efficacement certaines formes de minéraux comme le phosphore ou l'azote, qui seront ensuite mises à la disposition de la plante hôte (Smith et Read, 2008). Cette association à bénéfice réciproque, favorise la croissance des arbres hôtes et le développement du système racinaire (Felten *et al.*, 2009), et présente ainsi un intérêt pour l'augmentation de la biomasse des arbres.

Le pourcentage en glucose récupérable après digestion enzymatique du bois présente un véritable intérêt dans la production d'éthanol. Après prétraitement, le bois sec est hydrolysé en glucose grâce au processus de saccharification. Ce glucose est ensuite converti en éthanol *via* la fermentation (Rubin *et al.*, 2008). Ainsi, plus le taux de glucose obtenu après saccharification est élevé, plus la quantité de bioéthanol produite est importante.

Dans ce chapitre, la capacité à enraciner de différents génotypes sera présentée et sera ensuite mise en relation avec leur capacité à mycorhizer et avec l'estimation du rendement de saccharification.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Matériel utilisé et conditions de culture

1.1.1. Culture en condition *in vitro*

L'enracinement est étudié en conditions *in vitro*, à partir de boutures, issues de croisements interspécifiques, le clone INRA 717-1-B4 (*Populus tremula* x *Populus alba*) et le clone UPSC T89 (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*).

La cinétique d'enracinement, réalisée avec le clone INRA 717-1-B4, est conduite avec des micro-boutures issues du premier ou des deux premiers entre-nœuds de plantules, cultivées préalablement en condition *in vitro* comme décrit par Felten et ses collaborateurs (2009). Les micro-boutures sont déposées sur une boîte de Pétri (140 mm de diamètre), contenant un milieu MS dilué à 1/2 (Murashige and Skoog,1962) et additionné de 2 $mg.L^{-1}$ d'IBA (Acide Indole 3-Butyrique). Les boîtes sont placées en conditions contrôlées en chambre de cultures phytotroniques (24°C, photopériode de 16h).

Pour l'hybride *P. tremula* x *P. tremuloides*, la méthode de culture est celle utilisée par l'UPSC (Suède). Les analyses d'enracinement sont réalisées en utilisant les 2-3 premiers entre-nœuds de plantules, cultivées en condition *in vitro*. Ces micro-boutures ont été placées dans des pots contenant du milieu ½ de MS. Les pots sont placés en conditions contrôlées avec une température jour/nuit de 22°C/18°C et avec une photopériode de 16h en chambre de cultures phytotroniques. Durant les 4 premiers jours de culture, les pots sont protégés par une feuille de papier.

1.1.2. Culture en système hydroponique

Les analyses d'enracinement sont menées sur des boutures dormantes issues de *P. trichocarpa* (clone 101-74), de *P.deltoides* x *P.trichocarpa* et de *P. deltoides* x *P. nigra*. Dans le contexte de ce projet de recherche, il était difficile d'analyser la capacité d'enracinement de l'ensemble des populations disponibles. Aussi, nous avons choisi 4 à 6 individus dans chacune des familles.

Genotype	Mean % Myc
661300443	71
661300486	71
661300391	**81**
661300472	56
661300330	72
661300473	59
661300275	32
661300499	**9**
661300505	63
661300432	54
661300313	67
661300454	38
661300307	34
661300377	54
101-74 P. tricho	47
73028-62 P. del	12

Tableau 2 : Capacité à mycorhizer des génotypes issus du croisement *P. deltoides* x *P. trichocarpa,* en présence *de Laccaria bicolor.* Le pourcentage moyen de mycorhizes observées après 8 semaines d'inoculation est indiqué pour chacun des clones étudiés ainsi que pour les deux parents, *P. trichocarpa* (101-74) et *P. deltoides* (73028-62) (Labbé *et al.*, 2010). Les clones encadrés représentent ceux dont la capacité à enraciner a été étudiée dans le cadre de la thèse.

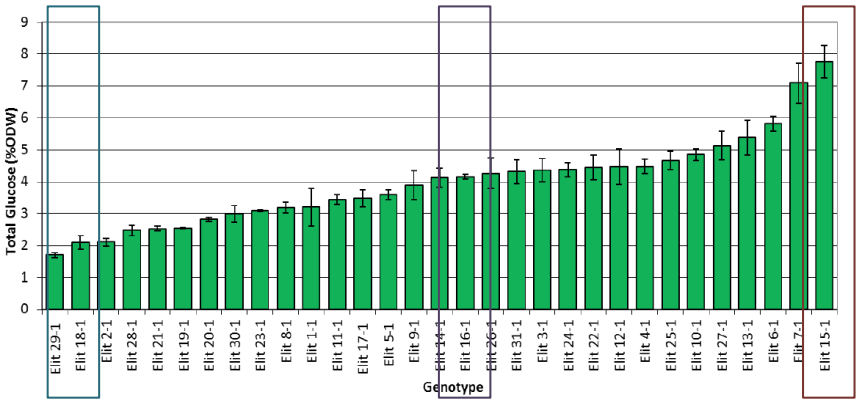


Figure 20 : Quantité en glucose obtenu après le processus de saccharification à partir de bois séché des clones issus du croisement *P. deltoides* x *P. nigra.* Les valeurs de glucose total correspondent au % de glucose total calculé par rapport au poids sec de départ. Les valeurs obtenues correspondent à une moyenne de 5 répétitions biologiques, avec leur barre d'erreur. Les clones encadrés représentent ceux dont la capacité à enraciner a été étudiée dans le cadre de la thèse. (EnergyPoplar, Deliverable D2.2)

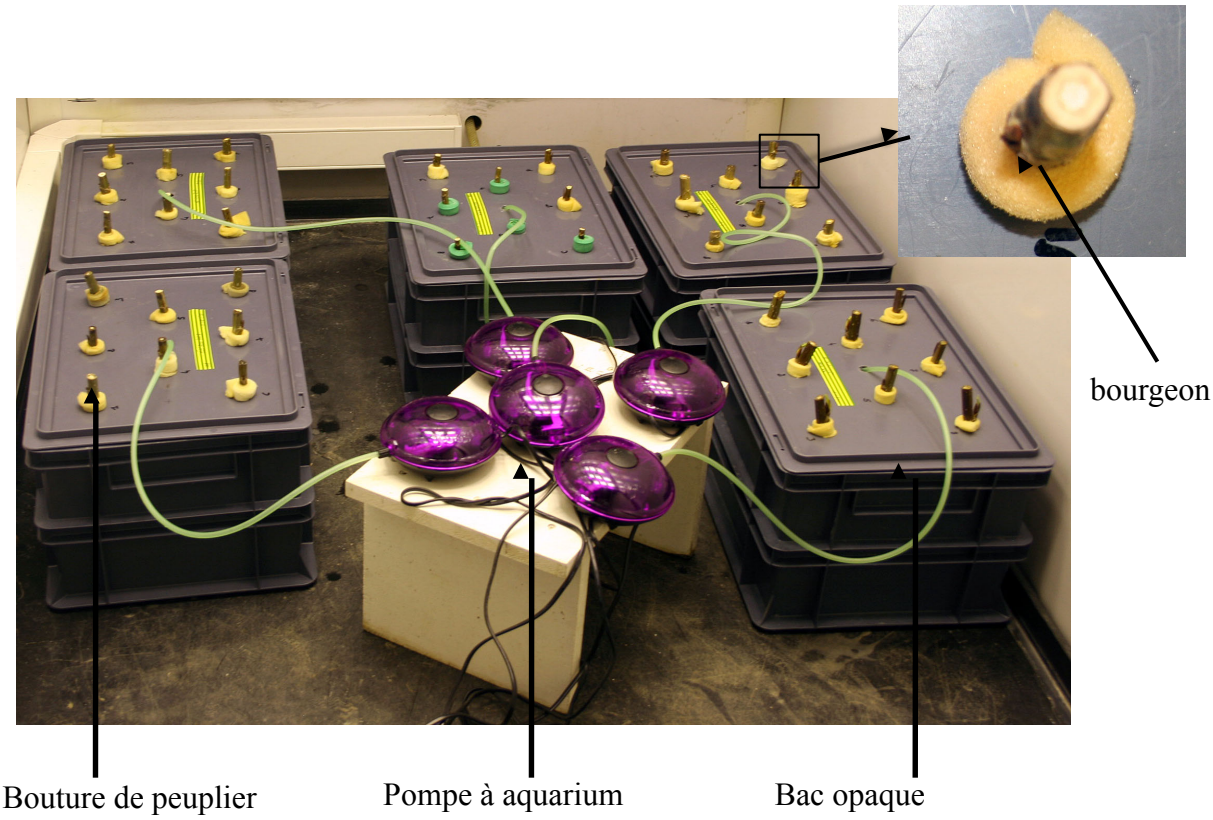


Figure 21 : Système de culture utilisé afin d'étudier la capacité d'enracinement des boutures de peuplier en conditions hydroponiques. L'extrémité des boutures est immergée dans un milieu nutritif (Merret *et al.,* 2009)

Des boutures d'environ 20 x 1 cm, issues du croisement *P.deltoides* x *P.trichocarpa,* sont prélevées sur quatre clones de la génération F1. Ces 4 individus sont choisis en fonction de leur capacité à mycorhizer (Tableau 2 ; d'après Labbé *et al*., 2010) : Les clones 661300443 et 661300391 sont deux clones ayant un fort pourcentage à mycorhizer, au contraire du clone 661300499 qui présente un faible taux de mycorhization. Le clone 661300307 est considéré comme un clone « intermédiaire » par rapport à son pourcentage de mycorhization.

Les 6 clones issus de *P. deltoides* x *P. nigra* sont choisis en fonction de leur production en glucose après le processus de saccharification (Figure 20). Des boutures issues de 2 individus, Elit7-1 et Elit15-1, présentant une forte concentration en glucose, respectivement 7,2% ODW (Oven Dried Weight) et 7,8 % ODW, ont été choisies. Au contraire, Elit18-1 et Elit29-1 présentent un faible pourcentage de production en glucose, 2,1% ODW et 1,8% ODW, respectivement. Elit14-1 et Elit16-1 présentent une production de glucose intermédiaire, 4,1% ODW et 4,2% ODW.

La culture est réalisée en condition hydroponique. Les boutures sont immergées jusqu'au niveau du 1er bourgeon dans des bacs opaques de 15 à 20 L (Figure 21) contenant le milieu de culture composé de macroéléments [KNO_3 (127 $\mu g\ mL^{-1}$), KH_2PO_4 (0,55 $\mu g.mL^{-1}$), $MgSO_4,7H_2O$ (123 $\mu g.mL^{-1}$) and $Ca(NO_3)_2,4H_2O$ (272 $\mu g.mL^{-1}$)], de microéléments [H_3BO (3,7$\mu g.mL^{-1}$), $MnCl_2,4H_2O$ (0,91 $\mu g.mL^{-1}$), $ZnSO_4,7H2O$ (0,1 $\mu g.mL^{-1}$), $H_8N_2O_7Mo_2$ ($3,1.10^{-3}$ $\mu g.mL^{-1}$) and $CuSO_4,5H_2O$ ($4,5.10^{-3}$ $\mu g\ mL^{-1}$)] et d'une solution de FeNaEDTA (3,67 $\mu g.mL^{-1}$). Le pH du milieu est alors ajusté à 5,8 avec du NaOH. La solution est aérée à l'aide d'une pompe à air conçue pour les aquariums. Les bacs sont placés, soit en phytotron sous conditions contrôlées avec une température de 21°C et une photopériode de 16h, ou en serre avec une température contrôlée de 20°C le jour et 10°C durant la nuit.

1.2. Analyses statistiques

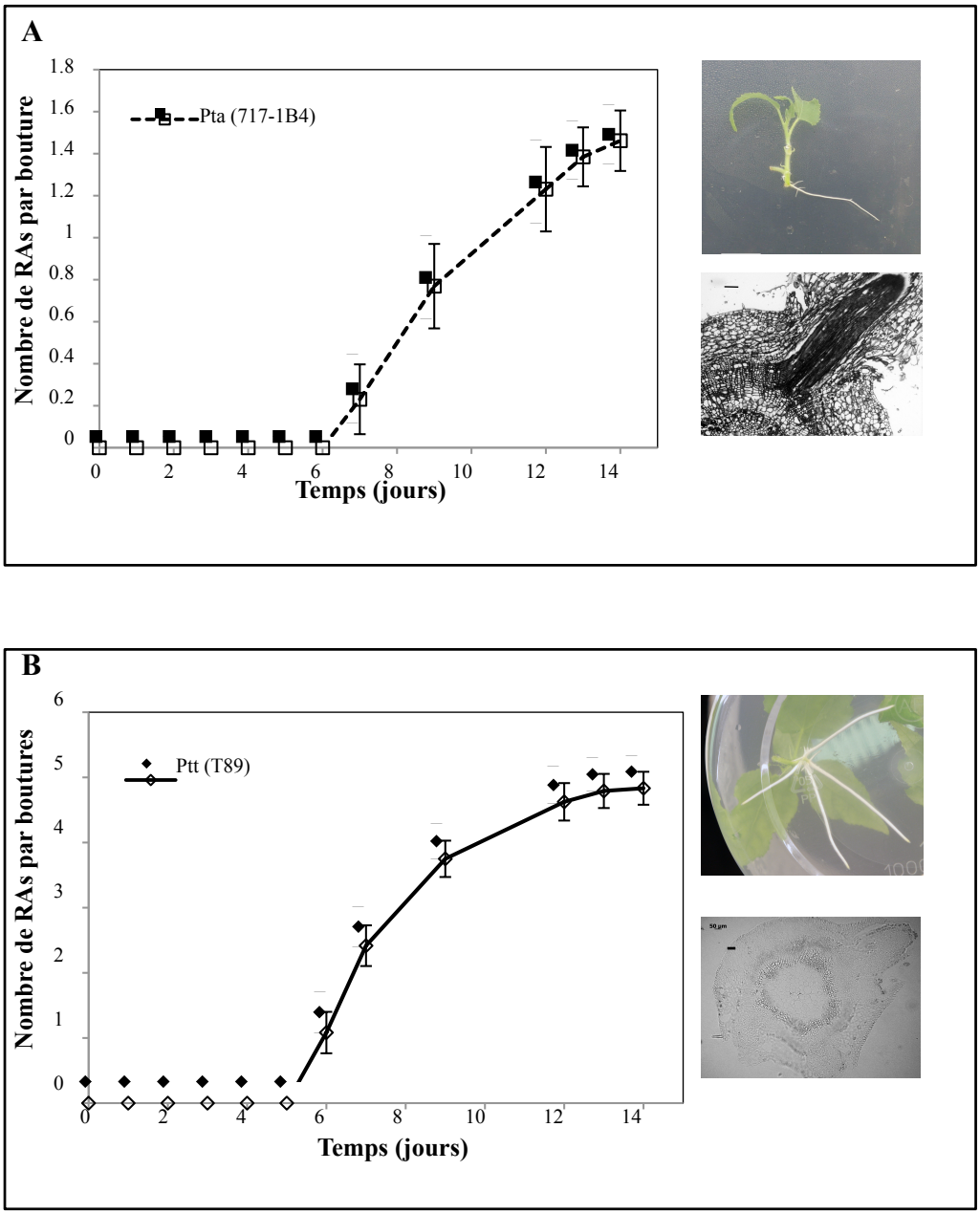


Figure 22 : Cinétique d'enracinement des boutures de *P. tremula* x *P. alba* (A*) et de P. tremula* x *P. tremuloides* (B) en condition *in vitro*. L'erreur standard est reportée pour chaque moyenne. A droite des deux graphiques, photos représentatives du système racinaire adventif après 12 jours de transfert (barre = 1cm) et d'une coupe transversale du tige au niveau de l'émergence des RAs, 10 jours après transfert (barre = 50µm)

La moyenne du nombre de racines adventives (RAs) par bouture de chacun des clones de *P. deltoides* x *P. trichocarpa* est comparée avec celle des boutures du parent *P. trichocarpa*. Les moyennes du nombre de RAs par bouture des clones *P. deltoides* x *P. nigra* sont comparées deux à deux. Dans ce cas, l'analyse statistique est représentée sous forme de matrice. Les données sont comparées avec un Test t de Student associé avec un test de Fisher.

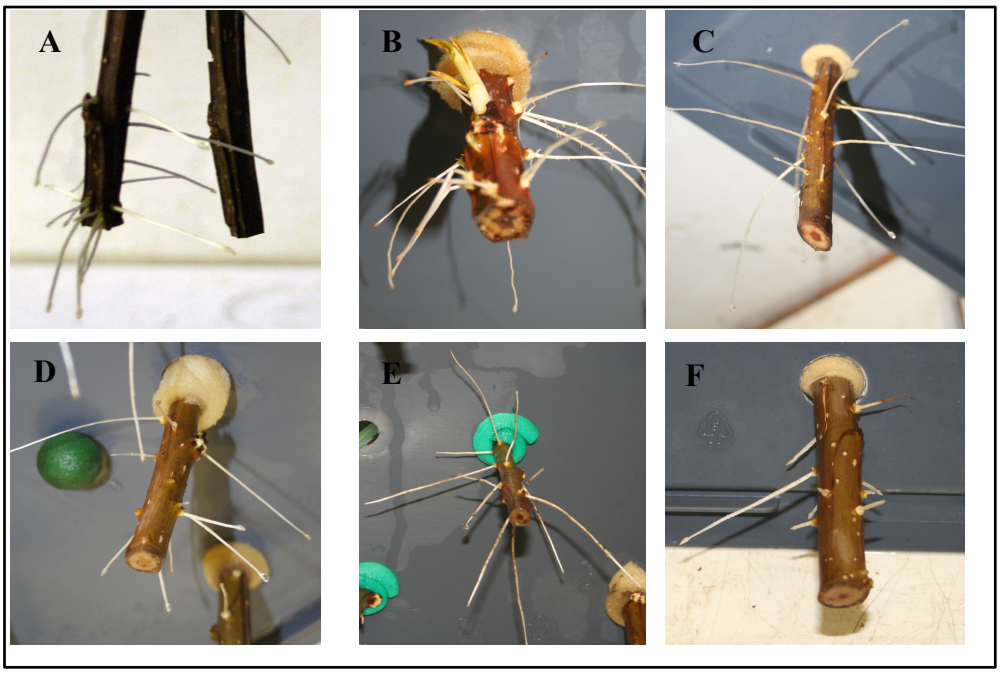
2. Résultats

2.1. Cinétique d'enracinement de *P. tremula* x *P. alba* et *P. tremula* x *P. tremuloides*

Les hybrides *P. tremula* x *P. tremuloides* (le clone UPSC T89) et *P. tremula* x *P. alba* (le clone INRA 717-1B4), sont deux hybrides génétiquement transformables et sont considérés comme des hybrides faciles à enraciner en condition *in vitro*. L'analyse de leur cinétique d'enracinement (Figure 22) indique que pour ces deux hybrides, les premières racines adventives sont visibles 6 à 7 jours après le transfert des boutures dans leur milieu de bouturage. Après 14 j de culture, le clone UPSC T89 produit en moyenne 4,6 RAs par bouture, alors que le clone INRA 717-1B4 présente en moyenne 1,5 RAs par bouture. Ainsi, bien que le clone UPSC T89 soit cultivé sans ajout d'auxine, celui-ci semble présenter un plus grande capacité à former des RAs, comparé à l'hybride *P. tremula* x *P. alba* (INRA717-1B4), cultivé en présence d'auxine. Ces analyses suggèrent donc que la capacité à former des racines adventives est dépendante du génotype.

2.2. Capacité à enraciner des clones hybrides *P. deltoides* x *P. trichocarpa*

Les individus, choisis selon leur capacité à mycorhizer, sont issus d'un croisement interspécifique entre une femelle *P. deltoides* (clone 73028-62) et un mâle *P. trichocarpa* (clone 101-74). L'observation de la formation des racines adventives révèle que la zone d'émergence est différente pour ces deux parents. Les RAs des boutures de *P. deltoides* apparaissent majoritairement à la base de la bouture et sont disposées plus ou moins en



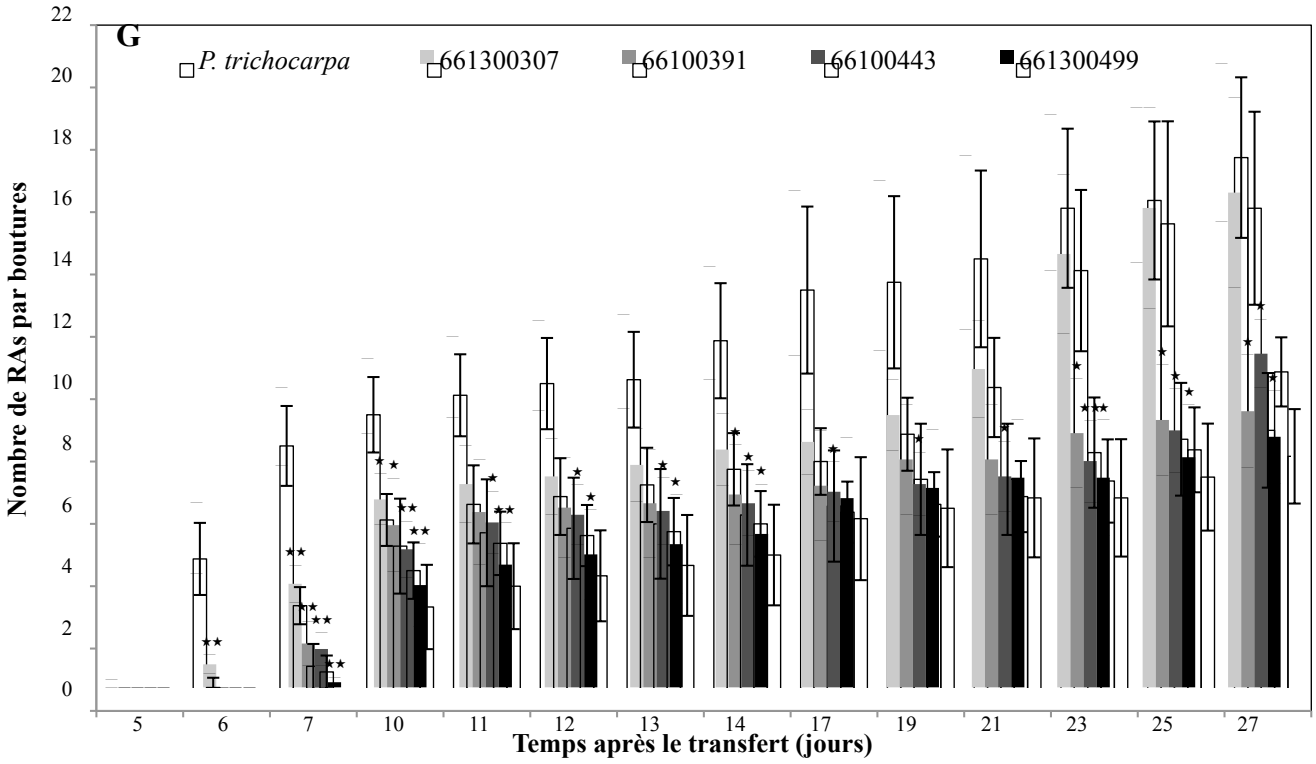


Figure 23 : Système racinaire adventif de A, *P. deltoides ;* B, *P. trichocarpa* et des clones hybrides *P. deltoides* x *P. trichocarpa* (C, 661300307 ; D, 661300391 ; E, 661300499, et F, 661300443), après 12 jours de culture en conditions hydroponiques.
G, Cinétique d'enracinement des boutures de *P. trichocarpa* et des 4 clones hybrides *P. deltoides* x *P. trichocarpa* (66100443, 66100391, 661300307 et 661300499), cultivées en conditions hydroponiquesChaque moyenne est comparée à celle du parent mâle *P. trichocarpa* à l'aide d'un test-t de Student. ⋆⋆correspond à une valeur $P < 0.01$ et ⋆ à une valeur $P < 0.05$.

forme de couronne alors que les RAs des boutures de *P. trichocarpa*, émergent aléatoirement le long de la bouture au niveau de la partie immergée (Figure 23A, B). Le patron d'émergence des RAs des clones hybrides est similaire à celui de *P. trichocarpa* (Figure 23C, D, E et F).

L'analyse du nombre de RAs par bouture indique que les premières RAs sont visibles sur les boutures de *P. trichocarpa* et sur celles du clone 661300307, après 6 jours de transfert en milieu hydroponique. Pour les autres clones étudiés, les premières RAs sont visibles après le 7ième jour (Figure 23G).

L'analyse statistique (comparaison avec *P. trichocarpa*) montre que les boutures des différents clones *P. deltoïdes* x *P. trichocarpa*, exceptées celles du clone 661300307, présentent un nombre moyen de racines adventives significativement plus faible que celles de *P. trichocarpa* (Figure 23G). Après 25 jours de bouturage, les boutures du clone 661300307 et de *P. trichocarpa* forment un nombre moyen de racines identique 16 RAs par bouture. Les boutures des autres clones étudiés développent environ 8 RAs par bouture. De plus, *P. trichocarpa* et le clone 661300307 sont les deux individus qui enracinent le plus rapidement. L'ensemble des boutures sont enracinées après 6 jours de cultures pour *P. trichocarpa*, 7 jours pour le clone 661300307, alors que 17 jours sont nécessaires pour le clone hybride 661300499.

Ainsi, le clone 661300307 présente une cinétique d'enracinement proche de celle de *P. trichocarpa* (clone 101-74) et se distingue de celles des autres clones hybrides étudiés, suggérant que cet hybride peut être considéré comme « facile à enraciner » en condition hydroponique.

2.3. Capacité à enraciner des clones hybrides *P. deltoides* x *P. nigra*

L'analyse du nombre moyen de racines par bouture indique clairement que les différents clones étudiés ne présentent pas une cinétique de formation de RAs identique (Figure 24). Les premières RAs sont visibles après 3 jours de transfert sur les boutures des clones Elit14-1, Elit15-1 et Elit16-1 alors qu'aucune RA n'est visible sur celles des clones Elit7-1, Elit18-1 et Elit29-1. En revanche, les RAs sont visibles sur l'ensemble des

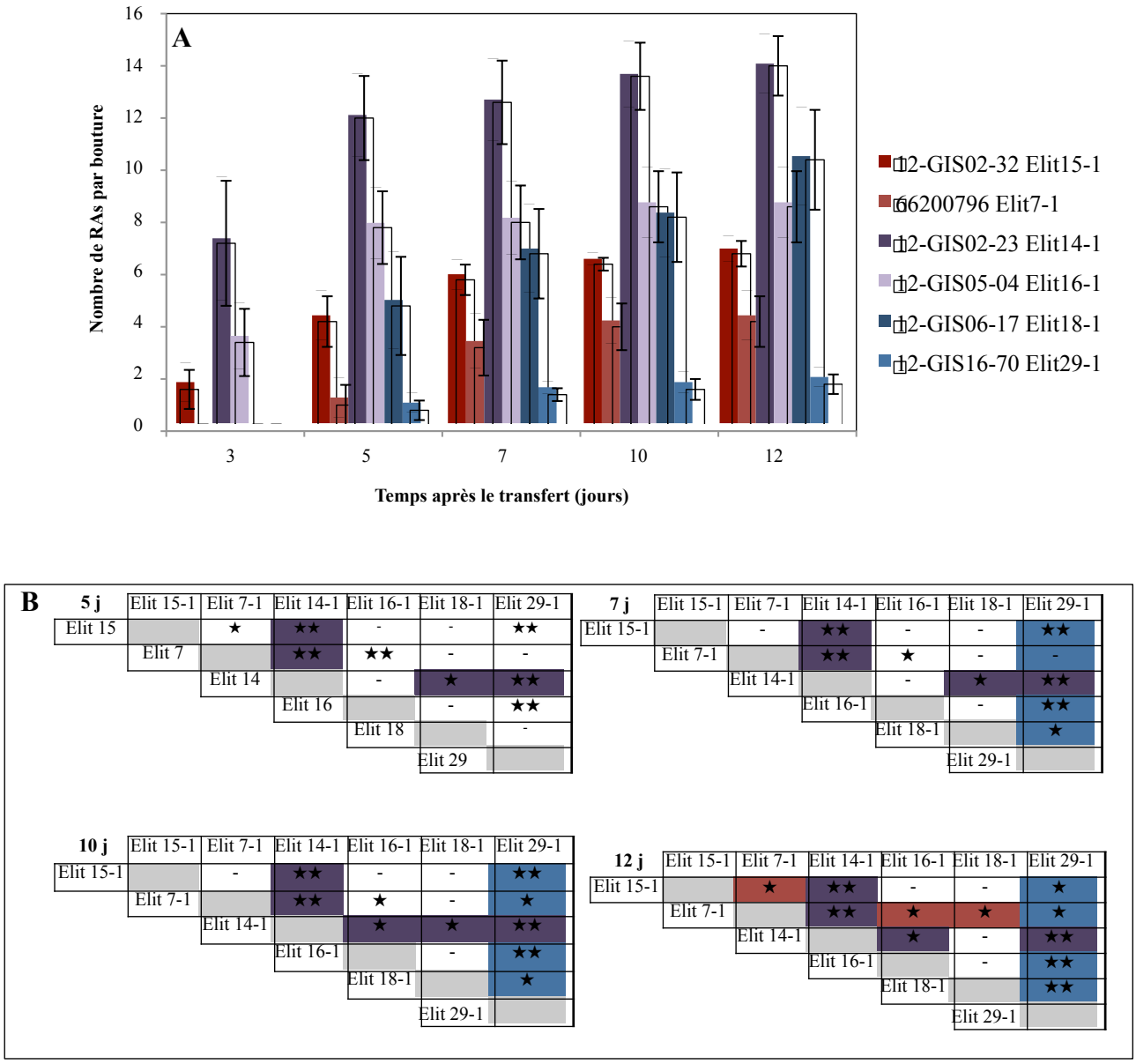


Figure 24 : A, Cinétique d'enracinement des boutures des 6 clones hybrides *P. deltoides* x *P. nigra* (Elit7-1, Elit14-1, Elit15-1, Elit16-1, Elit18-1 et Elit29-1), cultivées en conditions hydroponiques. L'erreur standard a été reportée pour chaque point. B, Comparaison des différents génotypes deux à deux, en utilisant un Test de Student : ★★ correspond à une probabilité $P < 0.01$, ★ à une probabilité $P < 0.05$.

boutures après 5 jours de culture. Les boutures des clones Elit16-1 et 14-1 ont toutes enraciné après 3 et 5 jours (respectivement) de culture, contrairement aux clones Elit29-1 et 7-1 qui nécessitent 7 et 10 jours de culture.

Deux clones, Elit14-1 et Elit29-1, présentent une capacité à enraciner très différente des autres clones étudiés (Figure 24A, B). A partir de 5 jours de bouturage, le nombre moyen de RAs formées est significativement supérieur pour les boutures du clone Elit14-1, avec 13,6 racines par bouture après 10 jours. A l'opposé, le nombre moyen de racines formées est de 1,6 RAs par bouture pour le clone Elit29-1.

Ainsi, le clone Elit14-1 présente une rhizogénèse adventive précoce avec un nombre de racines formées plus important. Ce clone peut être considéré comme un génotype « facile à enraciner » en condition hydroponique. Au contraire, le clone Elit29-1 est un génotype récalcitrant à l'enracinement.

3. Discussion

L'analyse de l'aptitude à enraciner des clones *P. deltoides* x *P. trichocarpa* de la famille 54 révèle que seul le clone 661300307 présente une capacité d'enracinement proche de celle du parent *P. trichocarpa,* connu comme génotype à forte capacité d'enracinement en condition hydroponique (Zalesny et Zalesny, 2009). Il est intéressant de noter que les racines latérales des boutures du clone 661300307 présentent une capacité à mycorhizer avec *Laccaria bicolor* identique à celle de *P. trichocarpa* (Labbé *et al.,* 2010 ; Tableau 2). Ces deux observations suggèrent que le clone 661300307 a une grande capacité à produire des racines (adventives et latérales).

La comparaison de la capacité à enraciner des clones hybrides avec leur taux de mycorhization en présence de *L. bicolor* n'indique pas de corrélation positive entre ces deux paramètres. Les deux clones hybrides 66100391 et 66100443 qui présentent un pourcentage de mycorhization important, respectivement 81% et 71%, sont capables de former des racines adventives, soulignant ainsi leur possible intérêt dans la production de biomasse.

Nos études menées avec des boutures de tiges de 6 clones Elit de *P. deltoides* x *P. nigra*, indiquent une importante diversité génotypique dans leur capacité à former des

racines adventives. Les boutures du clone Elit16-1 présentent des caractères du génotype « facile à enraciner », à l'opposé du clone Elit29-1. Ce dernier clone présente aussi une faible capacité à produire du glucose lors du processus de saccharification.

En conclusion, bien qu'il existe une diversité génotypique dans l'enracinement au sein des deux familles de Peuplier étudiées, l'ensemble des boutures analysées est capable de former des racines adventives. Ces résultats confirment les observations précédentes indiquant la capacité des boutures dormantes et matures du peuplier à former des racines adventives et ceci contrairement à l'Eucalyptus (Ruedell *et al*., 2009). Dans le contexte du projet Energypoplar, il semble donc que le critère de rhizogénèse adventive n'est pas un facteur limitant dans le choix des clones « élites » pour produire du biocarburant. Néanmoins, ces deux familles possèdent un réservoir de variabilité intéressante qui pourrait être exploitée dans la création et la sélection de nouveaux hybrides.

4. Conclusion :

Dans ce chapitre, l'objectif était de comparer la capacité à enraciner de différents clones d'une même famille dans le cadre du projet Energypoplar et de comparer différents génotypes.

Nos résultats montrent que :

- Parmi les clones testés, la rhizogénèse adventive n'est pas un facteur limitant dans le choix du clone « élite » pour la production de biocarburant. Tous les clones testés étant capable d'enraciner.

- Différents clones présentent des variabilités dans la capacité à enraciner au niveau du temps et du nombre de RAs.

- Selon les génotypes la capacité à enraciner à partir de bouture est plus ou moins forte, confirmant que la rhizogénèse est dépendante du génotype.

Chapitre 2 :

Implication du facteur de transcription du peuplier *AINTEGUMENTA Like 1 (PtAIL1)* dans la formation des racines adventives

Malgré l'importance économique que représente la rhizogénèse adventive dans la propagation clonale du peuplier, peu de régulateurs génétiques endogènes de ce processus ont été identifiés (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009 et 2010). Notre participation au projet EnergyPoplar a consisté à identifier les marqueurs moléculaires impliqués dans la formation des racines adventives du Peuplier.

Après avoir caractérisé les différentes étapes de la formation des racines adventives de l'espèce modèle, *Populus trichocarpa*, nous avons réalisé une analyse globale du transcriptome au cours de la formation des racines adventives. A partir de ces données, nous avons mis en évidence l'importance du facteur de transcription de la famille AP2/ERF, *AINTEGUMENTA-LIKE1* (*PtAIL1*), dans le contrôle de la formation de la racine adventive.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans un article (soumis) et sont présentés dans la première partie de ce chapitre. J'exposerai ensuite les études que nous avons réalisées dans l'objectif de préciser la fonction de PtAIL1 dans ce processus de développement. Je proposerai et discuterai ensuite un schéma de l'implication de PtAIL1 dans le contrôle de la formation de la racine adventive du peuplier.

1. Importance du facteur de transcription *PtAIL1* dans le contrôle de la formation de la racine adventive du peuplier

The Populus *AINTEGUMENTA-like* homeotic transcription factor PtAIL1 controls the formation of adventitious root primordia.

Article soumis

The *Populus AINTEGUMENTA Like 1* homeotic transcription factor *PtAIL1* controls the formation of adventitious root primordia

Adeline Rigal[a,], Anna Karlberg[b,1], Yordan S. Yordanov[c,1], Emilie Tisserant[a], Irene Perrone[d], Catherine Bellini[d,e], Victor B. Busov[c], Rishi Bhalerao[b,2], Francis Martin[a], Valérie Legué[a,2] and Annegret Kohler[a]

[a] INRA and University Henri Poincaré, Unité Mixte de Recherche INRA/Nancy University 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, INRA-Nancy, 54280 Champenoux, France;

[b] Umeå Plant Science Center, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, 90183 Umeå, Sweden;

[c] School of Forest Resources and Environmental Science, Michigan Technological University, Houghton, Michigan 49931-1295, USA;

[d] Umeå Plant Science Centre, Department of Plant Physiology, Umeå University, 90187 Umeå, Sweden

[e] Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, INRA-AgroParisTech Centre de Versailles-Grignon, 78026 Versailles Cedex, France

[1]A. K. and Y. Y. contributed equally to this work

[2,] Corresponding authors:
Valérie Legué
Tel: +33 3 83 39 40 13
Fax: +33 3 83 39 40 69
Email: Valerie.Legue@scbiol.uhp-nancy.fr

Rishi Bhalerao
Tel: +46 90 786 8488
Fax: +46 90 786 8165
Email: Rishi.Bhalerao@slu.se

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/supp/…

Abstract

Adventitious rooting is an essential but often rate limiting step in the clonal multiplication and plantation of elite tree germplasm as the ability to form roots declines rapidly in mature tissues with age in adult plants. Despite the importance of adventitious rooting, the mechanism underlying this developmental process remains poorly understood. We have described the transcriptional profiles associated with the developmental stages of adventitious root formation in the model tree *Populus*. Transcriptome analyses indicate highly specific temporal induction of the *PtAIL1* (*AINTEGUMENTA LIKE 1*) transcription factor of the AP2 family during adventitious root formation. Transgenic *Populus* overexpressing *PtAIL1* resulted in an increased number of adventitious roots, whereas RNAi mediated downregulation of *PtAIL1* expression led to a delay in adventitious root formation. Microarray analysis showed that the expression of 91 genes including transcription factors such as *AGAMOUS-Like 16* and *MYB36* were upregulated in the stem tissues generating root primordia in *PtAIL1* over-expressing plants whereas their expression was reduced in the RNAi lines. Thus we show that *PtAIL1* is a key regulator acting early in the regulation of adventitious rooting and we identify its potential downstream targets in this process.

Key words: adventitious root, *AINTEGUMENTA* gene, poplar

Introduction

The ability to rapidly form numerous adventitious roots provides a selective advantage for plant species that vegetatively propagate. The rooting ability of plants is also economically important particularly for forest trees as it opens the possibility to rapidly amplify millions of cuttings from elite clones for plantations. The genus *Populus* is a typical example of woody species that are propagated by direct planting of stem cuttings in the field. Represented by approximately 30 species widely distributed in the Northern hemisphere (1), poplars are fast growing plants showing high adaptability to marginal soils that make them plants of choice used for timber, pulp and bioenergy related applications. However one major limitation in clonal propagation of elite germplasms of poplar and several other tree species is the rapid loss or even highly reduced ability to form adventitious roots. Therefore identification of the molecular mechanisms underlying adventitious rooting should open possibilities for improvement of this trait in economically important plants for which clonal propagation is a requirement.

Adventitious roots are distinct from lateral roots in that they form from any tissue that is not a root, such as leaves and stems. Various molecular and genetic approaches have been used to study adventitious root development in Arabidopsis and other plants (3, 4). For example, Gutierrez and collaborators (4) have shown that a balance of *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*) transcripts control adventitious root initiation. Some of these ARFs (ARF 6 and ARF 8) are activators, while ARF17 is a repressor, and their expression is regulated by miRNAs (miR167 and miR160). *SCARECROW-like* genes are known to play a role during the earliest stages of adventitious formation in forest species (5). Interestingly, these genes are induced by auxin in rooting-competent cuttings of two distantly related forest species, *Pinus radiata* and *Castanea sativa*, before the activation of cell division that results in adventitious root formation (5). Recently Ramirez-Carvajal and collaborators (6) showed that a cytokinin type-B Response Regulator (PtRR13) is negatively regulated in the early steps of adventitious root formation in poplar stem cuttings. PtRR13 interfered with auxin transport and inhibited the transcription of the two *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (*AP2/ERF)* transcription factor genes.

Despite the importance of adventitious rooting for clonal propagation, no endogenous genetic regulators of this process have been identified in trees. Here we demonstrate that

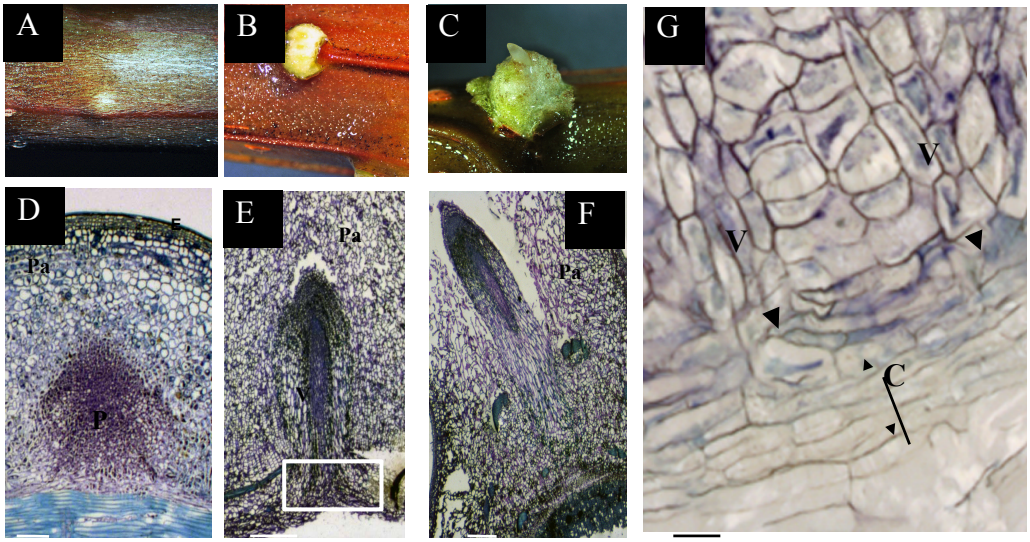


Fig. 1. Adventitious root development in *P. trichocarpa*. Images of the first visible stages (*A*-*C*) and representative longitudinal or cross sections (*D*-*G*) are shown. (*A*) Stage 1, intensely dividing cells forming the root primordium. (*B*) Stage 2, establishment of the main root tissues, as well as the vascular connections (v) of the incipient root with the pre-existing stem vasculature. (*C*) Stage 3, outgrowth and emergence of the adventitious root. (*D*) cross section of the stem at stage 1. (*E*) Longitudinal section of the newly formed adventitious root meristem at stage 2. (*F*) Longitudinal section of the emerging root at stage 3. (*G*) insert of image E, arrowhead illustrates the vascular connection in stage 2. c, cambium; Pa, parenchyma tissues; P, root primordium; Bars represent 1 mm for (*A*) to (*C*) and 100 µm in (*G*).

Pt*AINTEGUMENTA LIKE 1 (*Pt*AIL1)* a transcription factor of the *APETALA2* (*AP2*) family is a key regulator of adventitious rooting in populus. Global transcript profiling performed during adventitious root development in *P. trichocarpa* identified high level of the amount of the Pt*AIL1* transcription factor transcript during the early stages of adventitious rooting. Transgenic poplar lines over-expressing Pt*AIL1* exhibit an increased number of adventitious roots while RNAi-lines with a reduced level of Pt*AIL1* transcript show a reduced number of adventitious roots. We also identify the potential downstream targets of the Pt*AIL1* pathway such as transcription factors from the *AGAMOUS-like* and *MYB* gene families where expression is modulated in transgenic lines with altered *PtAIL1* expression. Our data identify a key role for Pt*AIL1* in the control of adventitious rooting in poplars.

Results

Adventitious root formation in *Populus* involves complex cellular events. Stem cuttings of *P. trichocarpa* (clone 101-74) were rooted in liquid medium without growth regulators (basal medium). The first emerging roots were observed on cuttings 6 days after the start of culture. The highest average root number per cutting (10 ± 2 roots/cutting) was obtained after 14 days. The first macroscopic evidence of root initiation was the appearance of root primordia, as lateral bulges observed at the stem surface 3 to 4 days after transfer to basal medium (Fig. 1*A*). Stem cross-sections showed intensely dividing cells forming root primordia (Fig. 1*D*). One to two days later the bark split (Fig. 1*B*), and the organized sequence of cell division and differentiation steps in the primordium led to the establishment of the main root tissues, as well as the vascular connections of the incipient root with the pre-existing stem vasculature (Fig. 1*E*). Subsequently, the outgrowth and emergence of the adventitious root occurred (Fig. 1*C,F*). We refer to the dormant cutting as stage 0, the organizing primordium as stage 1 (Fig. 1*A,D*), the primordium differentiation as stage 2 (Fig. 1*B,E*) and the elongating roots as stage 3 (Fig. 1*C,F*). Stage 2 clearly showed that the cambium and its immediate derivatives from the phloem are included in the primordium (Fig. 1*G*), suggesting that these cells could be the initial cells of adventitious roots.

Arabidopsis thaliana gene ID	*JGI_Populus trichocarpa* v1.1. gene model	Phytozome 7.0 ID	Name used in this study
At1g51190 (PLT2) and At3g20840 (PLT1)	fgenesh4_pg.C_LG_III001621	POPTR_0003s20470.1	Pt PLT1.2
	gw1.I.7266.1	POPTR_0001s05580.1	Pt PLT1.1
At1g72570.1 (AIL1)	fgenesh4_pg.C_LG_I001053	POPTR_0001s16960.1	Pt AIL5
	gw1.III.223.1	POPTR_0003s06330.1	Pt AIL6
At4g37750.1(Aintegumenta)	gw1.II.4141.1	POPTR_0002s11550.1	Pt AIL1
	gw1.VII.75.1	POPTR_0007s14690.1	Pt AIL3
	gw1.XIV.508.1	POPTR_0014s01260.1	Pt AIL4
	estExt_Genewise1_v1.C_LG_V4387 /gw1.V.4418.1	POPTR_0005s19220.1	Pt AIL2
At5g57390 (AIL5)	gw1.121.61.1	POPTR_0006s18330.1	Pt AIL7
At5g65510.1 (AIL7) At5g10510 (AIL6)	gw1.XVIII.2738.1	POPTR_0018s09900.1	Pt AIL8
	gw1.VII.3975.1	POPTR_0007s14210.1	Pt AIL9
At5g17430 (Babyboom)	gw1.X.1523.1	POPTR_0010s18840.1	Pt BBM1
	gw1.VIII.931.1	POPTR_0008s07610.1	Pt BBM2

Table 1 The *AINTEGUMENTA-like* gene family in poplar and Arabidopsis. Gene models as well as gene names are given. For Poplar the gene model names of both version 1.1 and Phytozome 7.0 were added.

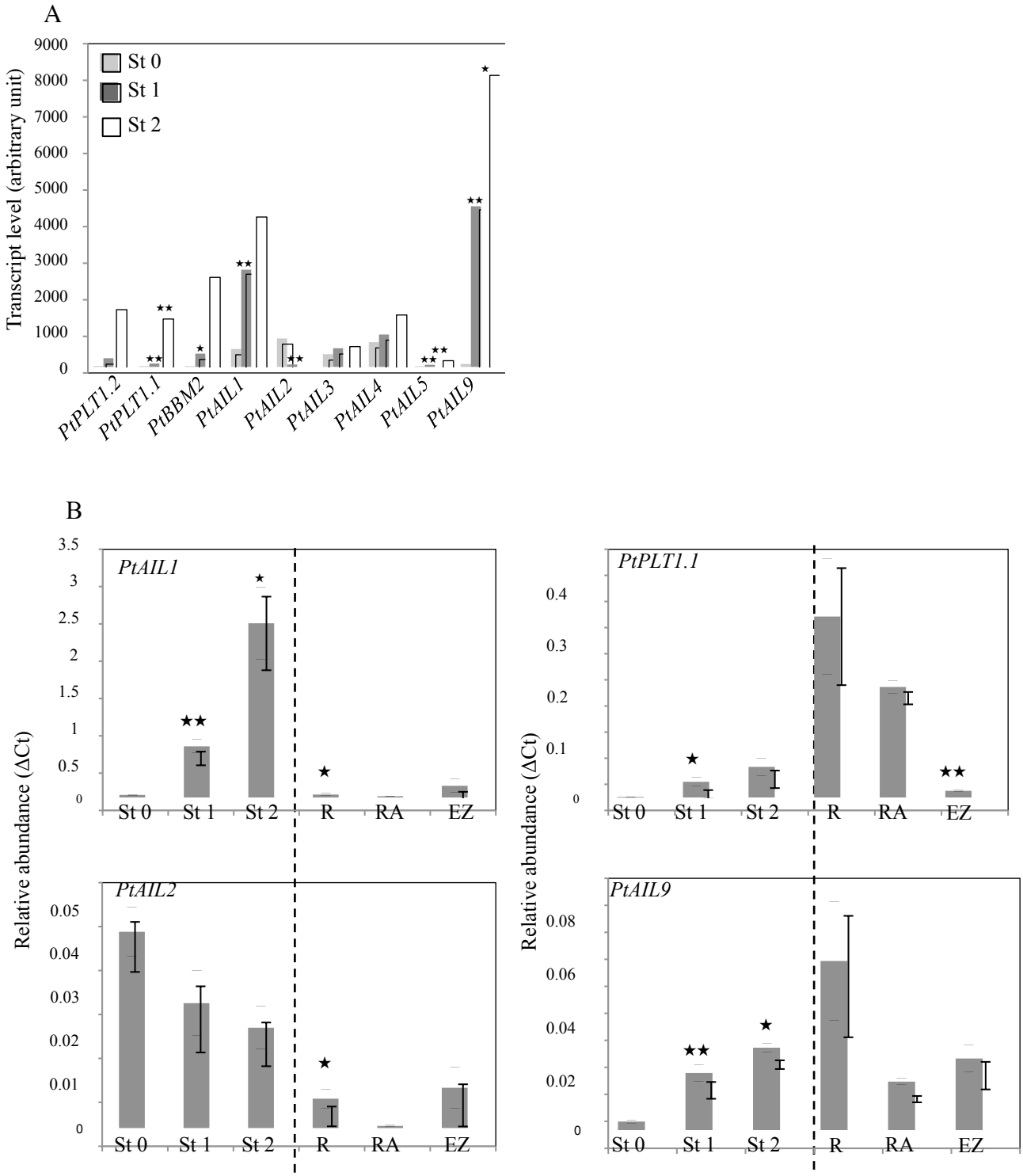


Fig. 2. Expression of *AINTEGUMENTA-like* genes during adventitious root formation and in fully developed roots of *P. trichocarpa*. (*A*) Expression level of *AIL* genes at stage 0 (St 0), stage 1 (St 1), and stage 2 (St 2) of adventitious root formation (microarray data). (*B*) Relative expression of *PtAIL1*, *PtAIL22, PtPLT1.1* and *PtAIL9* as measured by quantitative RT-PCR at stage 0 (St 0), stage 1 (St 1), stage 2 (St 2) of adventitious root formation, in mature root (R), in root apex (RA) and in root elongation zone (EZ). The averages and standard errors are derived from three biological replicates. The Student's T-test was performed between either two successive stages or between the root tip and elongation zone. ★★ indicates significance at P< 0.01 and ★ indicates significance at P<0.05 as determined by a Student's T-test.

Induction of PtAIL1 expression is associated with the early stages of adventitious root primordia development. To examine changes in gene transcription associated with the development of adventitious roots, we monitored the transcript levels in differentiating primordia by genome-wide expression microarrays. cDNA was prepared from replicate sets of *P. trichocarpa* rooted cuttings harvested at stages 0, 1 and 2. The expression of the vast majority of genes was not significantly modified during the adventitious root primordia initiation and development. However, pairwise stages analyses indicated that 8,034 non-redundant transcripts (i.e., 15%) showed significant changes in expression (> 5 fold, t-test with FDR correction, P-value < 0.01) in at least one of the developmental stages (Table S2). Among the differentially-expressed genes in stage 1, we identified several gene families encoding transcriptional factors, including *AP2/ERF* (44 regulated members), *MYB* (32 regulated members), *NAC* (25 regulated members), *WRKY* (24 regulated members), and *bHLH* (21 regulated members). In stage 2, genes from the *MYB* family were the most highly induced, followed by *AP2/ERF* related genes (Fig. S1). Since genes from the *ANT-like* sub-group of the *AP2/ERF* subfamily play a key role in cell division activity (7,8) and cell differentiation (9), we monitored the expression of this sub-group in stages 1 and 2. We found differential abundance for six of the 13 *AINTEGUMENTA*-like genes. Thus, the development of the root primordium was accompanied by increased levels of *PtPLT1.1, PtBBM2*, *PtAIL1*, *PtAIL5* and *PtAIL9* transcripts, while *PtAIL2* transcripts were down-regulated (Table 1; Fig. 2*A*). In contrast, the abundance of *PtAIL3* and *PtAIL4* transcripts were not significantly modified during these developmental stages. Quantitative real-time PCR analysis confirmed the above results and showed that at stage 1, the abundance of *PtAIL1*, *PtPLT1.1* and *PtAIL9* transcripts was up regulated by 20-, 30- and 7-fold, respectively, as compared to dormant cuttings (Fig. 2*B*). In contrast, *PtAIL2* expression was not significantly modified during the two studied stages. We also analysed the relative transcript amount of *PtPLT1.1, PtAIL1*, *PtAIL2* and *PtAIL9* genes in mature roots, root apex and the root elongation zone (Fig. 2*B*). In contrast to the others, *PtAIL1* transcript levels were low in entire root indicating a very specific mRNA accumulation during adventitious root primordium activation and formation.

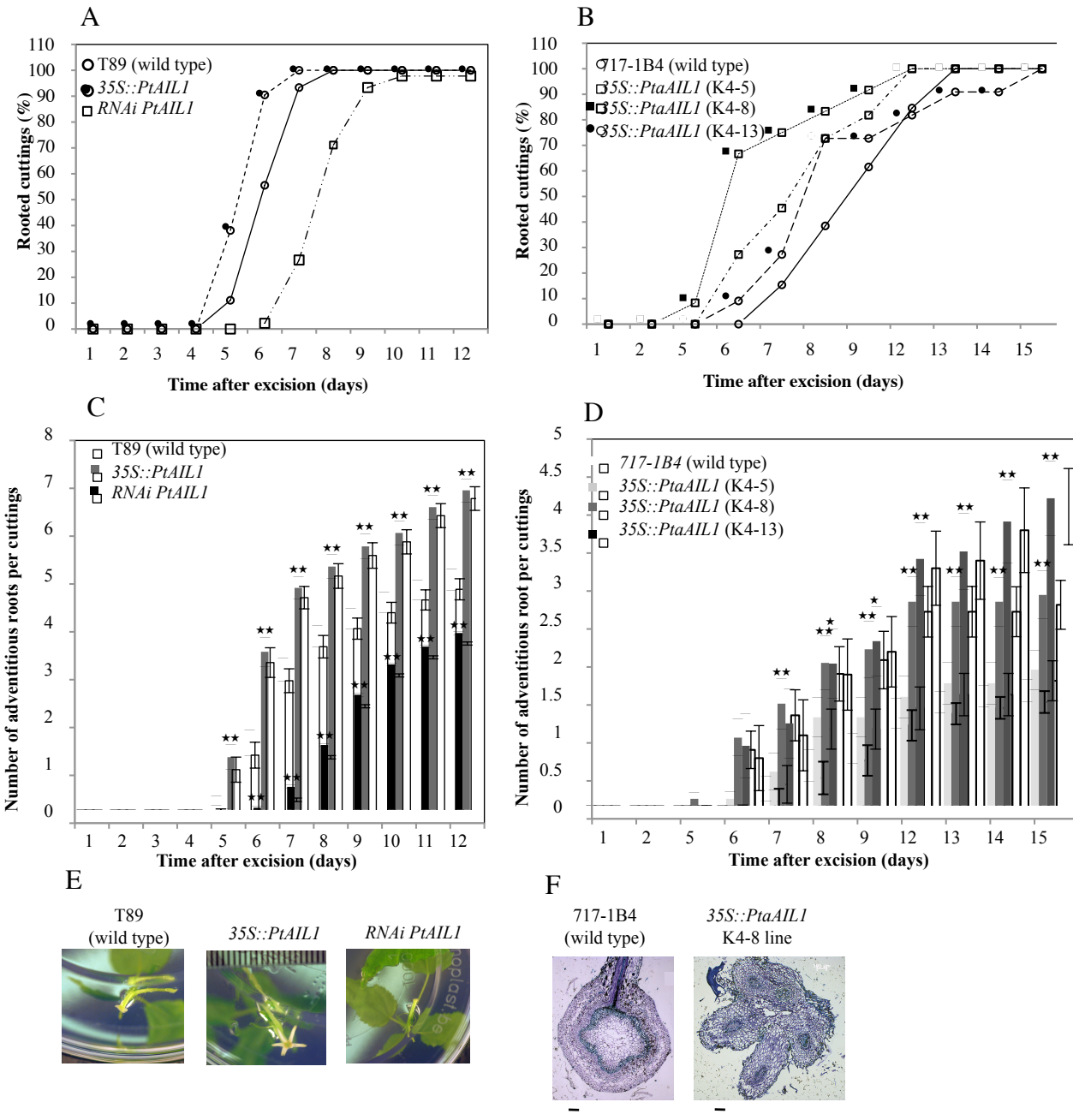


Fig. 3. Adventitious root development in transgenic lines of two poplar genotypes studied. (*A*,*B*) Percentage of rooted cuttings of (*A*) *P. tremula* x *P. tremuloides* T89 (wild type), *35::PtAIL1* overexpressor (AIL1oe line 3B) and RNAi *PtAIL1* (line 255-6) (*B*) of *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4 (wild type) and *PtaAIL1* overexpressing lines (K4-5, K4-8 and K4-13). (*C*,*D*) Number of adventitious roots in (*C*) *P. tremula* x *P. tremuloides* T89 cuttings (wild type), *35::PtAIL1* line (AIL1oe line 3B) and RNAi (line 255-6) (D) of *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4 (wild type) and *PtAIL1* overexpressing lines (K4-5, K4-8 and K4-13). (*E*) Representative images of the adventitious root systems of T89 (wild type), *35::PtAIL1* line (AIL1oe line 3B) and RNAi (line 255-6) after 6 days of transfer to rooting induction medium (Scale bar: 1 cm). (*F*) Representative Poplar stem cross-sections from 717-1B4 (wild type) and *PtAIL1* overexpressing lines (K4-8). Scale bar: 100µm.
Bars show SE; ★★ or ★ indicate significant differences compared to wild type plants as determined by a Student's t test ($P<0.01$ and $P<0.05$ respectively).

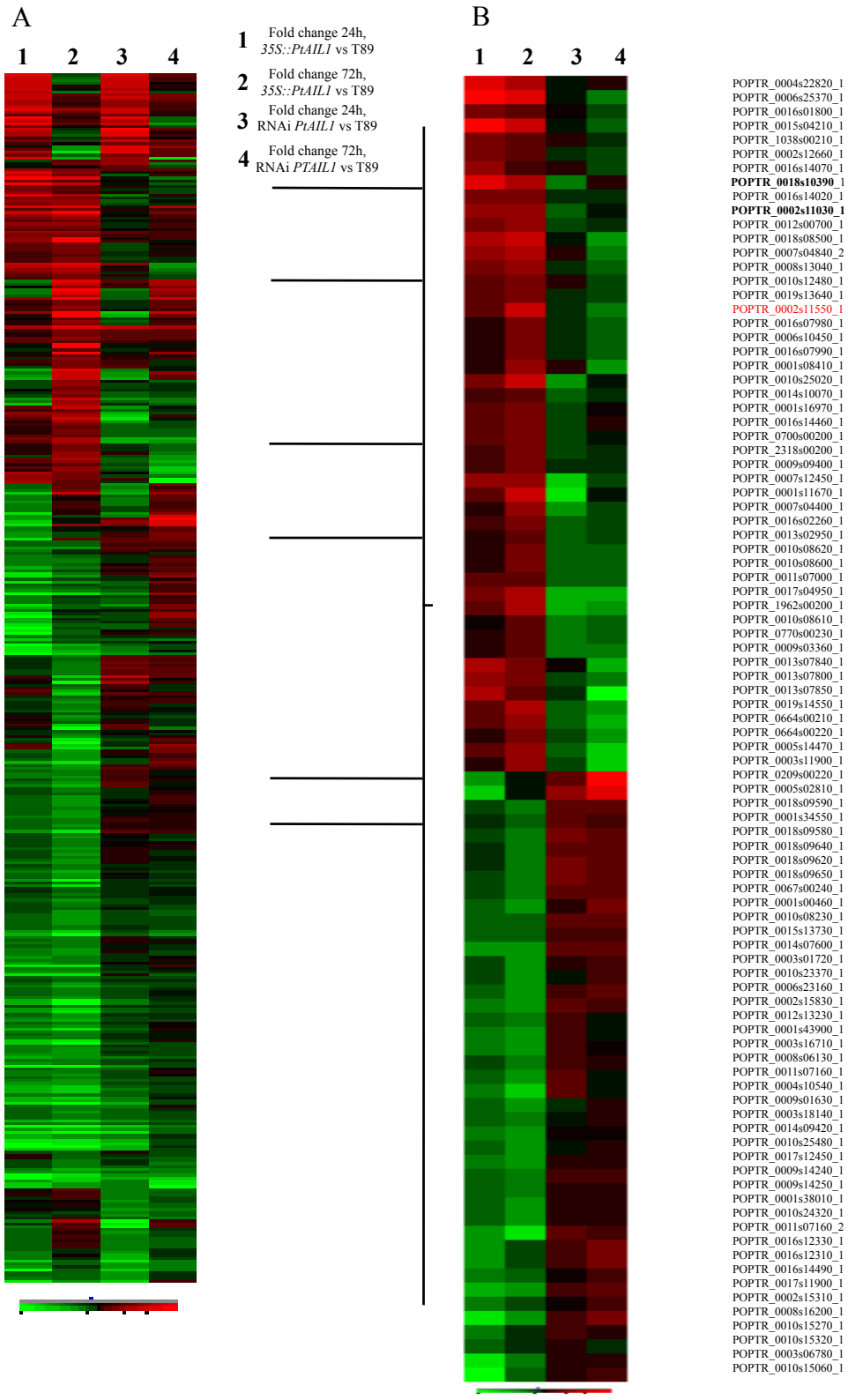


Fig. 4. (*A*) Hierarchical clustering of 422 differentially expressed genes between wild type T89, *35::PtAIL1* line (AIL1oe line 3B) and RNAi *PtAIL1* (line 255-6) at 24h and 72h after excision and transfer of the cuttings to rooting medium (fold change >2.5, p-value <0.01 and PPDE >0.95 in minimum one of the conditions). (*B*) Hierarchical clustering of transcripts with an increased expression in *PtAIL1* over-expressing plantlets and in contrast, a reduced expression in the *PtAIL1* RNAi lines, as compared to the wildtype T89 line, or vice versa. EPCLUST software was used for the clustering.

***PtAIL1* is a positive regulator of adventitious root formation**. The highly specific expression of PtAIL1 during adventitious root development prompted us to analyse its function in this process. Therfore we analysed the rooting capacity of transgenic lines of populus in which the transcript level of *PtAIL1* was perturbed. We first analyzed the ability to form adventitious roots of transgenic hybrid aspen (*P. tremula x P. tremuloides, clone T89*) lines constitutively over-expressing *PtAIL1* (*35S::PtAIL1*) or with a reduced expression of *PtAIL1* due to the expression of an RNAi construct (10). Secondly the *P. tremula* x *P. alba* hybrid (clone 717-1B4) was transformed with the *35S::PtaAIL1* construct (Fig. S2). As shown in Fig. 3*A* and 3*B*, transformed lines overexpressing *PtAIL1* showed a much earlier root emergence as compared to wild type and a significant increase in average root number per cutting (Fig. 3*C*,*D,E and F*). In contrast, the RNAi line showed a striking delay in adventitious root formation and a significant decrease in the number of total roots per cutting (Fig. 3*A*,*C* and *E*). These findings suggest that *PtAIL1* is a positive regulator of adventitious root primordium initiation.

Altered *PtAIL1* expression is accompanied by significant transcriptome changes. We further identified the potential downstream targets of PtAIL1 during adventitious root formation. For this, oligoarray analysis was used to identify genes differentially expressed in stems of *PtAIL1* over-expressing or RNAi lines. Line 3B (for *35S::PtAIL*) and line 255-6 for RNAi *PtAIL1* were chosen as they showed the strongest rooting phenotypes (Fig. S3). Total RNA was isolated from 2 mm sections of the basal stem region of micropropagated plants 24h and 72h after rooting induction. cDNA was labeled and hybridized to *P. trichocarpa* oligoarrays. 422 genes were differentially expressed (>2.5 fold, *p*-value <0.01, Posterior Probability of Differential Expression (PPDE) >0.95; Fig. 4*A*, Table S3). Hierarchical clustering of the genes with changes in transcript levels identified a group of 91 genes with opposite transcript patterns in *PtAIL1* over-expressing plantlets compared to *PtAIL1* RNAi lines (Fig. 4*B*, Table S4). Several of the genes with the highest changes in transcript levels encoded transcription factors such as *MYB36,* the *AGAMOUS*-like *AGL16*, the bHLH *HEC2*, *MINI ZINC FINGER MIF2* and *WRKY70* (Table S4). We examined the transcript pattern of the above genes during the three stages of adventitious root formation in *P. trichocarpa* (Fig. 5) and compared it to that of *PtAIL1* (Fig. 2*A*). During primordium formation, an increased transcript level of *PtAIL1*

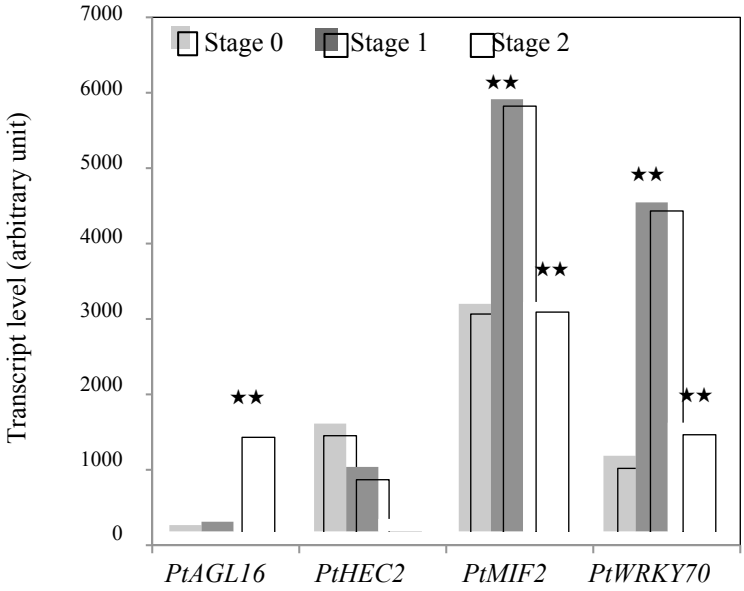


Fig. 5. Level of expression of *AGAMOUS*-like *AGL16 (PtAGL16)*, bHLH *HEC2 (PtHEC2), MINI ZINC FINGER MIF2 (PtMIF2) and WRKY70* (*PtWRKY70*) genes during adventitious root formation in *P. trichocarpa* (Stage 0-2). Data were obtained from microarray analyses at stage 0, 1 and 2. The Student's T-test was performed between two successive stages. ★★ indicates significance at $P < 0.01$ as determined by a Student's T-test.

was followed by an increased transcript level of *AGL16*, *WRKY70* and *MIF2* showed transcription peaks only during the primordium formation. In addition, only *MYB36* and *AGL16* were up-regulated in the stem of *PtAIL1* over-expressing line and down-regulated in *PtAIL1* RNAi line before rooting (Table S3). These two genes were also up-regulated in the 717-1B4 wild type and *PtAIL1* over-expressing lines 5 days after shoot excision. These results suggest that *MYB36* and *AGL16* are likely targets of the *PtAIL1*-controlled gene network.

Discussion

In *P. tremula* x *Populus tremuloides, PttAIL1*/*PttANT1* is expressed in the cambial zone in cells that undergo intensive cell proliferation (11). Our data indicates that the adventitious root primordia originate in this stem region, suggesting that *AIL1* is involved in the primordium initiation during the adventitious root development. The simplest explanation of these morphological phenotypes is that *AIL1* promotes primordium development during adventitious root formation by activating cell division. Support for this hypothesis comes from recent findings in hybrid aspen where PtAIL1 has been shown to bind to D-type cyclin promoter as well as in Arabidopsis, overexpression of *ANT* (otholog of *PtAIL1*) leads to larger organ size indicating a role in the control of cell division activity (10). Currently the signals regulating the induction and maintenance of a high expression of *PtAIL1* in the cambial zone, remain unknown but it is tempting to invoke the role of auxin in this process. It has been shown that auxin plays a major role in adventitious root formation (12). Basipetal transport and accumulation of auxin at the base of stem cuttings is required for adventitious root formation (13,14). It remains to be determined whether *AIL1* is triggered by auxin signalling pathways or regulates auxin levels and allocation as shown for AIL/PLT proteins in roots (15,16).

Our data show that the poplar orthologues of *MYB36* and *AGAMOUS-like16* (*AGL16*) may be the most promising candidate genes regulated by *PtAIL1*. It has been shown that *AGL16* is expressed at relatively high levels in the root quiescent center in *Arabidopsis thaliana* (17). Interestingly, it was reported that *AGAMOUS* is a possible target of AtANT (18,19). A number of different MYBs are also almost exclusively expressed in the root quiescent center in *Arabidopsis thaliana* (17). Müller and collaborators (18) have

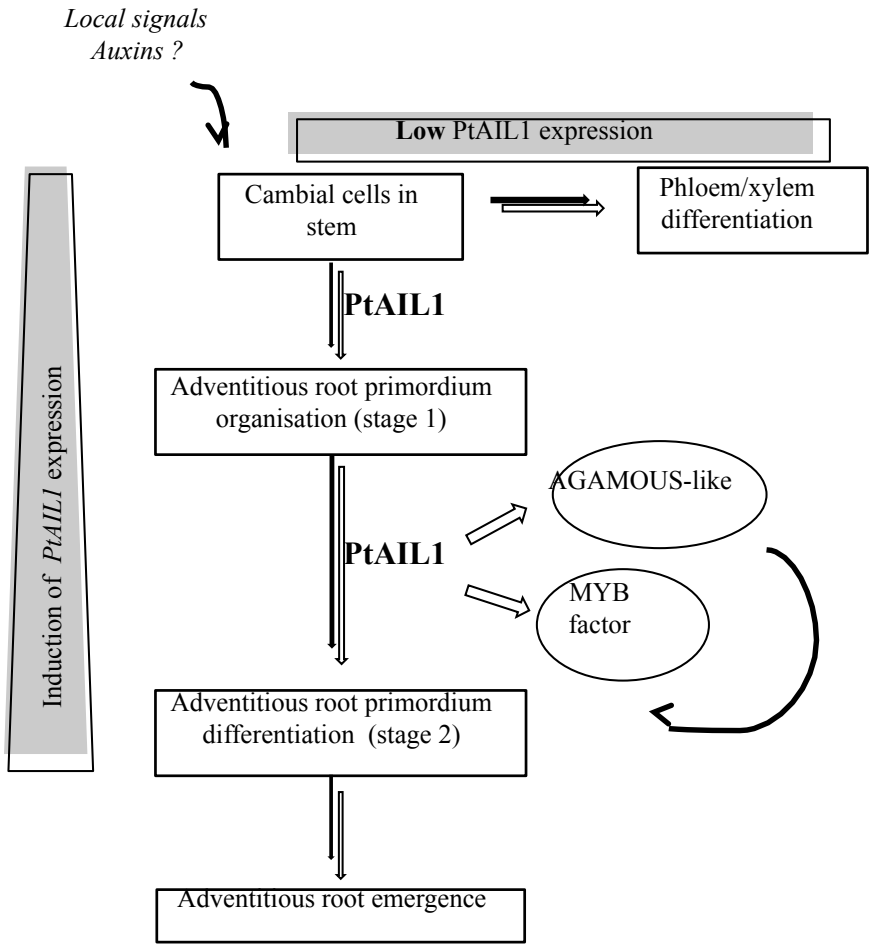


Fig. 6. Schematic of adventitious root development in Poplar and hypothetical PtAIL1 targets involved in this process. Subsequent to receiving an unknown signal, cambial cells become competent to form an adventitious root. This process is accompanied by an increase in *PtAIL1* expression, which is maintained at a high level until the root meristem organization (stage 2). This increase induces changes in the transcription of target genes such as *AGAMOUS-like* (*AGL16*) and *MYB36*.

shown that AtMYB36 was almost exclusively found in the root. Together, these data suggest that PtAIL1, PtAGL16 and PtMYB36 are a part of a regulatory network controling adventitious root formation in poplar. Based on our results, we propose a model for PtAIL1 action in the control of adventitious rooting (Fig. 6). Our data demonstrate that PtAIL1 plays an important regulatory role at several developmentally important switches and its effect is likely mediated via regulation of the activity of AGL and MYB transcription factors.

The identification of PtAIL1 transcription factor as a positive regulator of adventitious rooting opens up the possibility to overcome the key limitation in clonal propagation in forestry. Additionally, the novel role of the tree ortholog of AINTEGUMENTA as a regulator of adventitious rooting offers an interesting parallel to root development in Arabidopsis.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions. For rooting leafless, hardwood dormant stems, the hardwood dormant stems from *Populus trichocarpa* Torr. & Gray (clone 101-74) were collected from stool beds in January 2010, then cut into 25 cm cuttings (6-7 nodes). These were sealed in polyethylene bags and kept in cold storage (0°C) until removed for rooting. Selected cuttings had a diameter range of 0.8 to 1.1 cm. For rooting and growth, cuttings were sub-irrigated, as previously described (21).

In vitro rooting experiments were performed with the wild-type (WT) and transgenic lines of *Populus tremula* x *Populus alba* INRA 717-1B4 and of *Populus tremula* x *Populus tremuloides* UPSC clone T89 as described previously (10,22). The number of roots per rooted cutting or micro-propagated plantlet were estimated throughout the rooting period. For adventitious root quantification, 8 to 40 individual plants of *Populus trichocarpa*, *Populus tremula* x *Populus alba* and/or *Populus tremula* x *Populus tremuloides* for each set of experimental conditions were observed on a daily basis. Adventitious roots were counted and images were taken using a Canon camera (EOS 350 digital) and a Discovery V.8 stereomicroscope (Zeiss, Germany).

For poplar transformation, we used the *Agrobacterium*-mediated transformation procedure as described previously (10,23).

Histological analysis. Samples were fixed over 4 h at 4°C in 4% (w/v) para-formaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7) adapted from reference 24. Dehydrated samples were embedded in Diawax (MM Microm, France), sectioned into 7-µm-thick sections using a rotary microtome (MM Microm, France), and then stained with toluidine blue.

Gene expression and microarrays analysis.

Each experiment (microarray transcript profilings and real-time quantitative PCR assays) was carried out in triplicate using three biologically different plant pools. For microarrays and quantitative RT-PCR (qPCR) on *P.trichocarpa*, total RNA was extracted from samples using the RNeasy Plant mini kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. For the root tip sample (harvested less than 50 mg) of *P. trichocarpa*, we used the RNeasy micro kit (QIAGEN) but added a first clean-up step with QIAshredder Mini Spin Columns (QIAGEN). For each extraction, an on-column digestion step with DNAse I (QIAGEN) was included. For experiments performed with the hybrid *P. tremula* x *P. tremuloides* (UPSC T89), and its transgenic plants, 2 mm of the stem base from the base of excised shoots were collected. Total RNA was extracted as described for *P. trichocarpa* root tips samples. qPCRs were performed using the primers listed in Table S1. We used elongation factor 1B (EF1B) (24) and the putative protein A (25) as reference genes, as their expression was not regulated according to the microarray data. qPCRs were performed as described by 22. Relative gene expression for each stage was based on ΔCt calculations using the mean of the two references gene expressions, according to 26. Transcriptome analyses were performed on the first visible step of adventitious root formation in *P. trichocarpa* and on stem bases (zone of emergence) at 3 times of culturing (time 0, 24h and 72h) for the *Populus tremula* x *Populus tremuloides* hybrids. Transcriptome analyses on *P. trichocarpa* were performed with the *Populus* whole-genome expression array version 2.0, manufactured by NimbleGen Systems Limited (Madison, WI). NimbleGen whole genome microarray analyses were performed for three biological replicates with a technical replicate on each array according to manufacturer's instructions. Single dye labelling of samples, hybridization procedures, data acquisition, background correction, and normalization were performed at the

NimbleGen facilities (NimbleGen Systems, Reykjavik, Iceland) following their standard protocol. Microarray probe intensities were normalized across all chips. A Student *t*-test with false discovery rate (FDR) (Benjamini-Hochberg) multiple testing corrections was applied to the data using the ARRAYSTAR software (DNASTAR). Transcripts with a significant *p*-value <0.01 and ≥ 5-fold change in transcript level were considered as differentially expressed. Transcriptome profiling on Aintegumenta transgenic lines were realized using the *Populus trichocarpa* custom-exon expression array (12x135K), manufactured by Roche NimbleGen Systems Limited (Madison, WI) (http://www.nimblegen.com/products/exp/index.html). Included in the oligoarray were 43,929 annotated gene models (*Populus trichocarpa* genome v2; Phytozome 5.0), 5,859 random 60-mer control probes and labelling controls. Log2-transformed data were calculated and were subjected to the CyberT statistical framework (http://www.igb.uci.edu/servers/cybert/) (27). Cyber-T also contains a computational method (PPDE) for estimating experiment-wide false positive and negative levels based on the modelling of *p*-value distributions. Transcripts with a PPDE above 0.95, a Bayesian P-value <0.01 and > 2.5-fold change in transcript level were considered to be significantly differentially expressed.

The two complete transcriptome datasets are available as series (GSE34096) at the Gene Expression Omnibus at NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). For hierarchical clustering of transcripts, the EPCLUST software was used, available at (http://www.bioinf.ebc.ee/EP/EP/EPCLUST/).

Acknowledgements

This work was supported by the European Commission within Project EnergyPoplar (FP7-211917) and the Network of Excellence EVOLTREE (FP6-016322), and the Genomic Science Program of the US Department of Energy, Office of Science, Biological and Environmental Research under contract DE-AC05-00OR22725, and the French Space Agency (CNES). RPB acknowledges support from Vinnova, TC4F and Future Trees. IP is the recipient of a fellowship from the C Kempe Foundation. The research utilized in part the Functional Genomics Facilities at INRA-Nancy financed by INRA, Région de Lorraine and the European Commission FEDER through the Institut Fédérateur de Recherche No 110. We would like to thank P Vion, JP Leclerc, C

Delaruelle, and E Morin for technical assistance, F Elegbede, I Hummel and C Fourrey for helpful discussions and C Bastien (INRA-Orléans) for providing the cuttings.

References

1. Eckenwalder JE (1996) in *Biology of Populus and its implication for management and conservation*, eds Steller RF, Bradshaw HD Jr., Heilman PE, and Hinckley TM (NRC Reserch Press, Ottawa), pp7-32.
2. Casson SA, Lindsey K (2003) Genes and signalling in root development. *New Phytol* 158:11-38.
3. Geiss G, Gutierrez L, Bellini C (2009) in *Root Development*, ed Beekman T (Wiley-Blackwell, Oxford), pp 376.
4. Gutierrez L, et al (2009) Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* 21:3119-32.
5. Sanchez C, et al (2007) Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. Tree Physiol 27:1459-1470
6. Ramírez-Carvajal GA, Morse AM, Dervinis C, Davis JM (2009) The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in Populus. *Plant Physiol* 150: 759-71.
7. Krizek BA (2009) Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Curr Opin Plant Biol* 12:17-22
8. Mizukami Y, Fischer R (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:942-7.
9. Nole-Wilson S, Tranby TL, Krizek BA (2005) *AINTEGUMENTA*-like (*AIL*) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Mol Biol* 57:613-28
10. Karlberg A, Bako L, Bhalerao RP (2011) Short day–mediated cessation of growth requires the downregulation of AINTEGUMENTALIKE1 transcription factor in hybrid aspen. *PLoS Genet 7*: e1002361
11. Schrader J, et al (2004) A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial Stem cell identity. *Plant Cell* 16:2278-2292
12. Ludwig-Müller J (2009) in *Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants – from genes to applications*, eds Niemi and Scagel. Research signpost, pp. 1–29
13. Hausman JF, Kevers C, Gaspar T (1995) Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots *in vitro*. *Plant Sci*, 110:63–71
14. Guerrero JR, Garrido G, Acosta M, Sanchez-Bravo J (1999) Influence of 2,3,5-triiodobenzoic acid and 1-N-naphthylphthalamic acid on indole-acetic acid transport in carnation cuttings: relationship with rooting. *J Plant Growth Regul* 18:183–190.
15. Krizek BA (2011) Auxin regulation of *Arabidopsis* flower development involves members of the *AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT)* family. *J Exp Bot* 62:3311-3319
16. Hu Y, Xie Q, Chua NH (2003) The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* 15:1951-1961

17. Nawy T, et al (2005) Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* 17:1908–1925
18. Krizek BA, Prost V, Macias A (2000) *AINTEGUMENTA* promotes petal identity and acts as a negative regulator of *AGAMOUS. Plant Cell* 12:1357-66.
19. Nole-Wilson S, Krizek BA (2000) DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res* 28:4076-82
20. Müller D, Schmitz G, Theres K (2006) Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:586-97
21. Merret R, et al (2010) Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanic formalism. *BMC Biol* 8:18
22. Felten J, et al (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in Poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151:1991-2005
23. Han KH, et al (2000) An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Rep* 19: 315-320
24. Gutierrez L, et al (2008) The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* 6:609–618
25. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* 4:14
26. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:45
27. Baldi P, Hatfield GW (2002) DNA microarrays and gene expression: from experiments to data analysis and modeling. *Cambridge University Press*

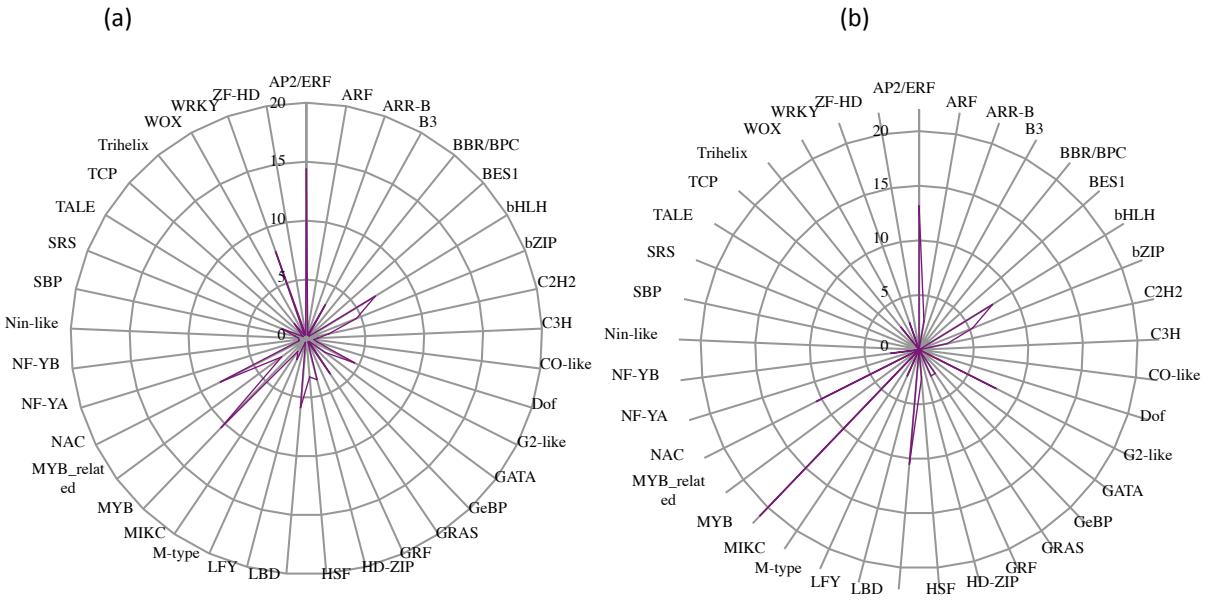


Fig. S1 Transcription factor families with differential gene expression during adventitious root formation in *P. trichocarpa*. The total number of regulated transcription factor (TF) genes was set to 100% and the percentage for each TF family is shown. (*A*) Stage 1 compared to stage 0; (*B*) Stage 2 compared to stage 1. Genes were considered as differentially expressed when they met the following criteria: fold-change >5 and p-value <0.01.

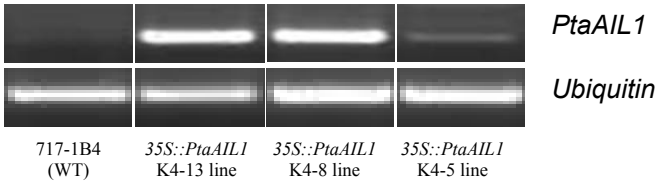


Fig. S2 Transcript level of *PtaAIL1* in *P. tremula* x *P. alba* (717-1B4) and in the *35S::PtaAIL1* transgenic lines determined by semi-quantitative RT-PCR.

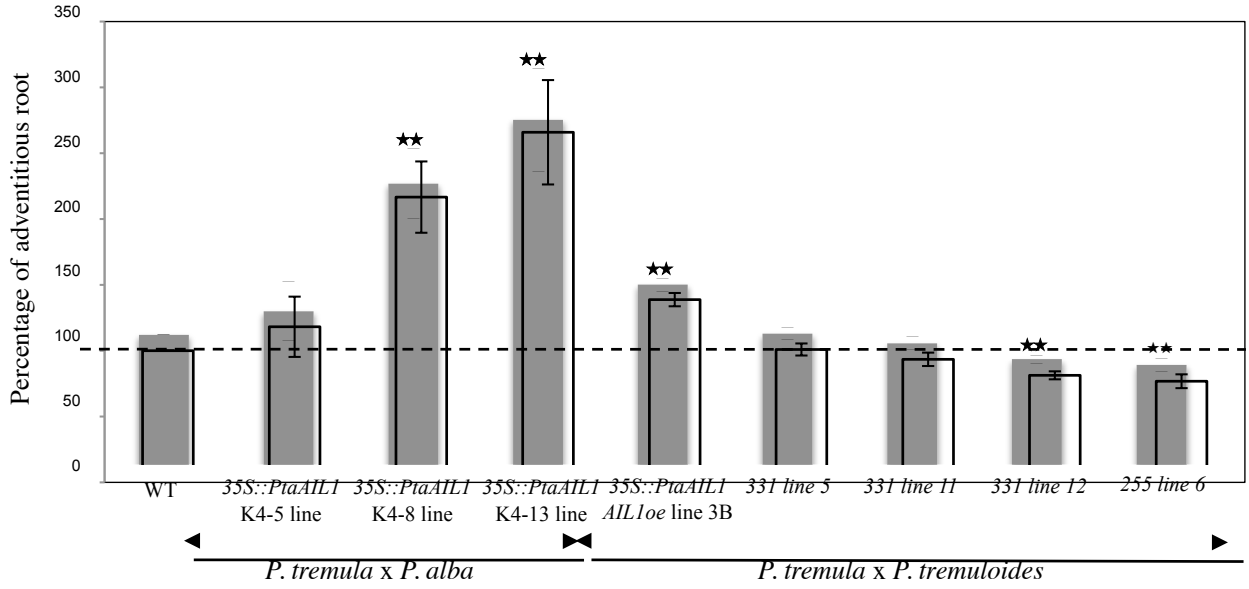


Fig. S3 Relative adventitious root (AR) number after 12 days. Wild type root number at 12 days was set to 100%.

Target gene	Primer forward	Primer reverse
PtAIL1	CAAATGCCTGTGGAGAATCA	ACCAACGATGAGGGGTTAGA
PtAIL2	CCTTTATCTCGGGACGTTCAGC	GTGTTGCTGGCCATGATCCTATC
PtPLT1.1	AAGCTGCTGCTCCAAGAAGGAC	ACCTTCCTGTCCATCGATGCCTTG
PtAIL9	CCTCCAAACCACCAACAATTTCGC	TGCAGTTGCCATGGATGAGGTG

Table S1 Primer sequences used for qPCR analysis.

2. Etude de la fonction de PtAIL1

2.1. Matériels et methodes

2.1.1. Acclimatation des lignées *P. tremula* x *P. alba*

Les lignées transgéniques de l'hybride *P. tremula* x *P. alba* surexprimant *PtaAIL1, 35S::PtaAIL1* (nommées K4-5, K4-8 et K4-13) ainsi que la lignée sauvage *P. tremula* x *P. alba* (clone INRA 717-1B4, *Pta*), cultivées initialement *in-vitro*, ont été acclimatées pour une culture en serre (24°C, photoprériode de 16h). Les plantes cultivées en condition *in vitro* durant 1 à 2 mois dans les conditions décrites précédemment (p31), sont placées dans des pots de 1litre contenant un mélange tourbes/vermiculite (50/50) et sont recouvertes avec un sachet plastique Ziploc afin de les maintenir dans une atmosphère humide. Après 2 semaines de culture, les sachets Ziploc ont été ouverts progressivement puis enlevés. Les plantes sont ensuite rempotées dans des pots de plus en plus volumineux de façon à favoriser leur développement. Ces plantes « mère » ont été cultivées en serre pendant 2 ans et recepées régulièrement.

2.1.2. Analyse de la capacité à enraciner des boutures non dormantes

Des boutures comprenant 7 entre nœuds sont prélevées à différents niveaux sur les ramifications de l'année des plantes « mères ». Les 7 premiers entrenœuds correspondent au niveau 1, les 7 suivants correspondent au niveau 2 et ainsi de suite jusqu'au niveau 9. Environ 30 boutures sont prélevées pour chacune des lignées. Les boutures sont ensuite placées dans des conditions identiques de celles utilisées par nos collègues du centre INRA-champenoux et développées par Druart et Gruselle (Department of Life Science, Belgique). La base des boutures est mise en contact pendant 10 secondes dans une solution d'acide indol butyrique (IBA à 2 g/l). Les boutures sont ensuite placées dans des pots de 6 litres contenant 3 litres de tourbe, 3 litres de sable, et 10 g de calcaire magnésien ainsi que du fertilisant (Nutricote 100 à 6g/l). Un dispositif « mini-serre » équipé d'un arrosage à aspersion de façon à maintenir une humidité importante a été concu.

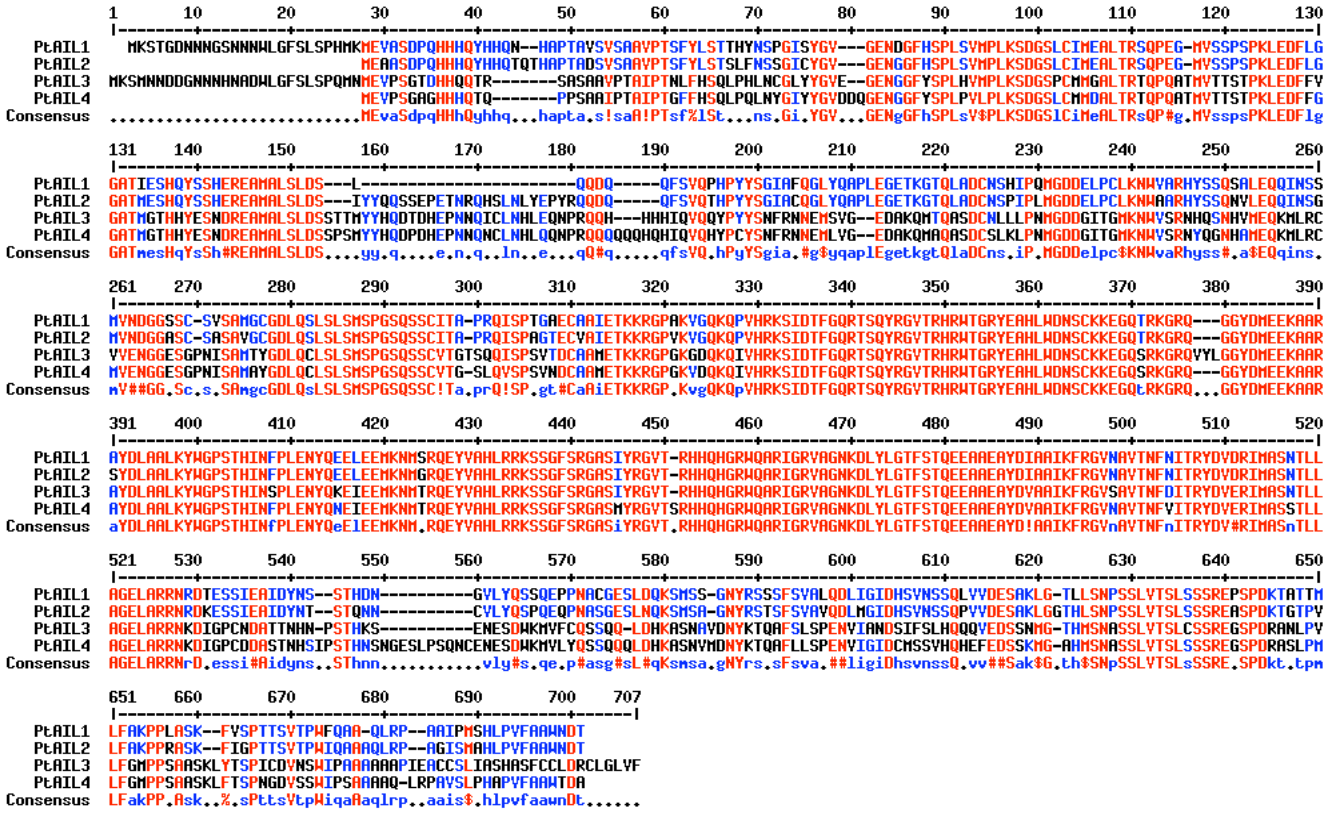
Après 8 semaines du bouturage, le taux de survie de l'ensemble des boutures est estimé. Pour chacune des boutures issues des lignées *35S::PtaAIL1* et de la lignée sauvage *Pta*, les racines adventives formées sont comptées sur les boutures prélevées au niveau 4 et 5.

2.1.3. Formation des racines latérales des lignées transgéniques *35S::PtaAIL1*

Cette expérimentation a été conduite sur les lignées transgéniques *35S::PtaAIL1 (K4-5* et K4-8) et la lignée sauvage *Pta*, en collaboration avec A. Vayssières (UMR IaM) selon le protocole utilisé pour les expérimentations de mycorhization *in vitro*, mis au point au sein de notre équipe (Felten *et al*., 2009). Les racines latérales formées sont comptées sur chacune des plantules au moment du transfert dans le nouveau milieu et après 4, 7, 10 et 16 jours de culture. Le nombre de racines latérales nouvellement formées est obtenu par soustraction du nombre de racines observées à un temps donné du nombre de racines latérales présentes au début de l'expérience (au moment du transfert).

2.1.4. Observation de la coloration GUS

Cette analyse a été réalisée à l'Uméå Plant Science Center (UPSC, Suède) en collaboration avec R. Bhalerao et C. Bellini. Les lignées utilisées sont des lignées transgéniques *PtAIL1::GUS* issues de l'hybride *P. tremula* x *P. tremuloïdes* (T89), dans lesquelles le promoteur de *PtAIL1* a été fusionné avec la séquence codante de la protéine uidA (codant une ß-glucoronidase, nommée GUS) (Karlberg *et al*., 2011). Les plantules sont cultivées en condition *in vitro*, dans les conditions identiques que celles utilisées par la culture de *P. tremula* x *P. tremuloïdes* (T89) (voir p31). L'enracinement est réalisé *in vitro*, à partir de boutures comprenant 3 entre-nœuds dans un milieu identique. La zone d'émergence des racines (localisée à la base de la bouture) est prélevée juste après excision (T0) et après 3, 5 et 7 jours d'enracinement. Le protocole de la coloration GUS ainsi que l'inclusion des échantillons en LRwhite, sont réalisés en suivant les instructions décrites par Karlberg et ses collaborateurs (2011). Des coupes de 15 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome à rotation HM350 (Microm International GmbH, Allemagne), puis transférées sur une lame de verre. Les lames sont conservées à 60°C pendant une nuit, puis « montées » en utilisant le milieu de montage Entellan (Merck, Allemagne).



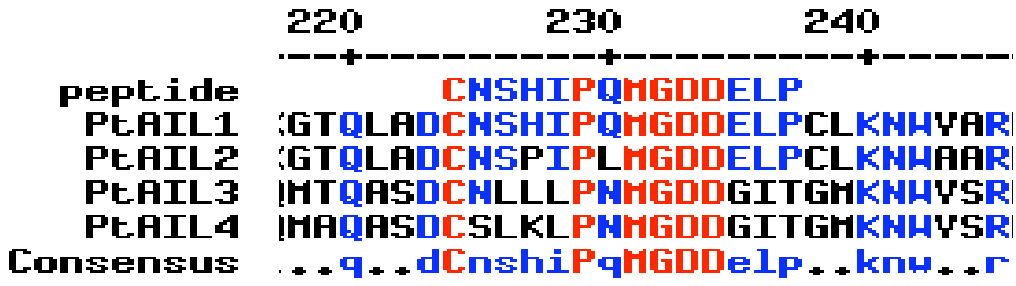


Figure 25 : A, alignement des séquences peptidiques des 4 membres du sous groupe *AINTEGUMENTA* du peuplier. B, alignement de ces 4 séquences avec la séquence du peptide de synthèse utilisé pour la production de l'anticorps anti-PtAIL1. Les résidus de plus fort et de plus faible consensus sont respectivement représenté en rouge et en bleu (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/)

2.1.5. Immunolocalisation de la protéine PtAIL1

- **Obtention de l'anticorps anti-PtAIL1**

Les expérimentations d'immunolocalisation sont réalisées à l'aide d'un anticorps obtenu chez le lapin à partir d'un peptide de synthèse. La séquence du peptide est déterminée à partir de l'alignement des séquences peptidiques des 4 membres du sous groupe *AINTEGUMENTA* du peuplier et orthologues de AtANT, nommés PtAIL1, PtAIL2, PtAIL3 et PtAIL4, (Karlbeg *et al*., 2011 ; Figure 25A). Ces séquences étant très proches, il a été difficile d'obtenir un peptide spécifique de PtAIL1. En effet, la séquence CNSHIPQMGDDELP choisie pour la synthèse du peptide présente 85% d'homologie avec PtAIL2 (Figure 25B). Le peptide synthétisé est utilisé comme antigène pour la production des anticorps anti-PtAIL1 dans le lapin. Les anticorps sont obtenus, purifiés par affinité et déssalés par la société Eurogentec (Seraing, Belgique).

- **Protocole d'immunolocalisation**

L'immunolocalisation est réalisée sur des tiges de *P. trichocarpa* au stade « primordia » de racines adventives (nommé stade 1) et de tiges de *P. tremula* x *P. tremuloides* (à T0, juste après excision). Ces échantillons sont préalablement fixés pendant 4 h dans une solution contenant du paraformaldehyde 4% (v/v) et un tampon phosphate salin (PBS, pH 7). Les échantillons de *P. trichocarpa* sont inclus dans la paraffine Diawax comme décrit précédemment (voir p50) et les échantillons de *P. tremula* x *P. tremuloides* sont inclus dans l'agarose. L'immunolocalisation est réalisée sur des coupes de 7 µm d'épaisseur obtenues à partir des tiges de *P. trichocarpa* et sur des coupes de 40 µm de tiges de *P. tremula* x *P. tremuloides* incluses en agarose. Uniquement, les échantillons inclus en paraffine, sont réhydratés après déparaffinage, par passage dans des bains successifs de 2 min d'éthanol à concentration décroissante [95% (v/v), 70%(v/v), 50%(v/v), et 30%(v/v)].

Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min dans du tampon PBS contenant 0,05 M de glycine, puis rincés 2 fois 5 min dans le tampon PBS. Les coupes sont ensuite incubées pendant 1 heure dans une solution de PBS contenant 1,5 % de BSA (w/v) et 0,05 % Tween 20 (v/v) (appelé tampon bloquant, TB). L'incubation avec l'anticorps anti-PtAIL1, dilué au 1/1000 dans le tampon TB, s'est déroulée pendant une nuit . Les coupes témoin sont été incubées dans du tampon TB ou dans une solution contenant le serum

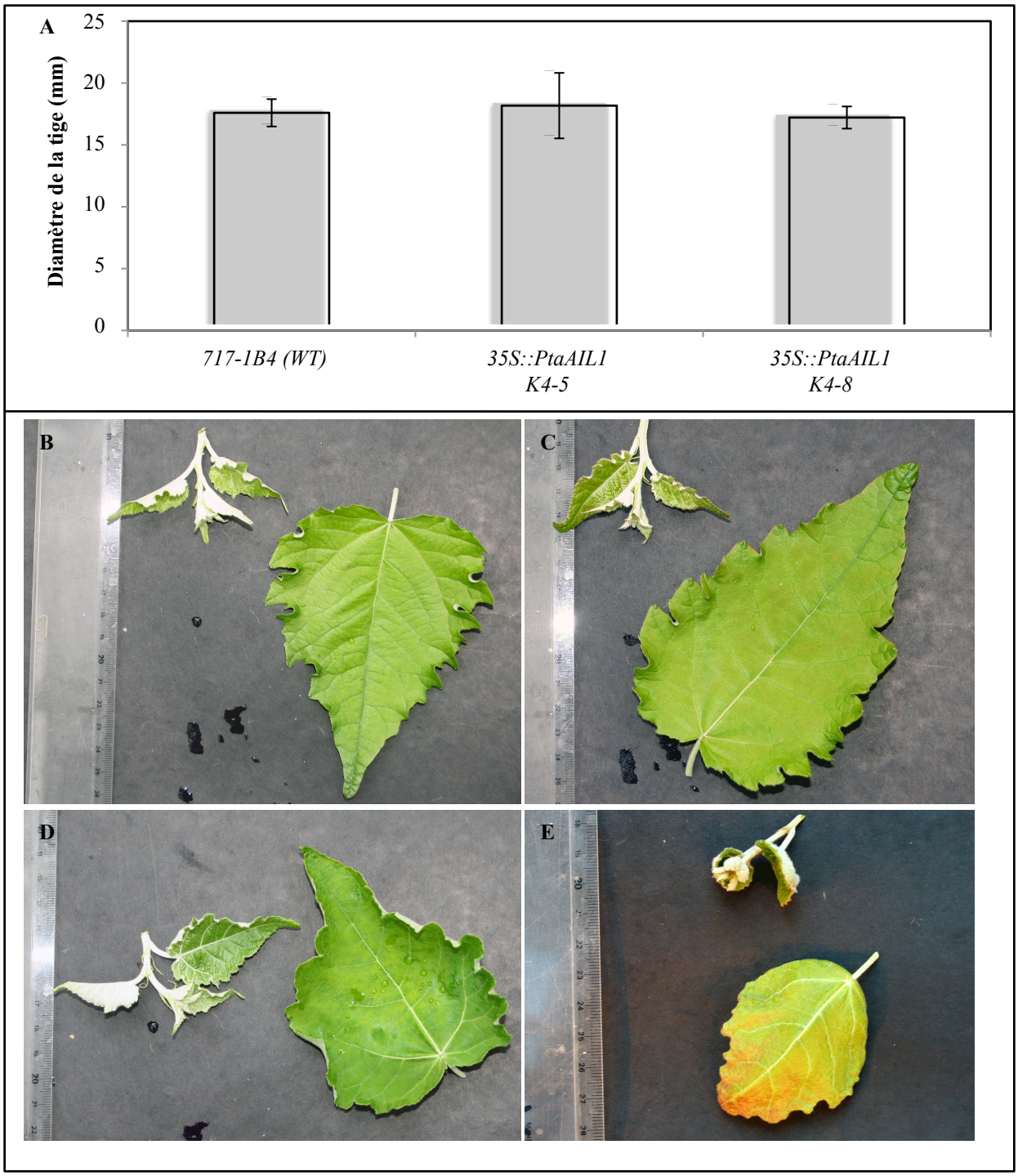


Figure 26 : A, diamètres de la base des tiges des lignées *35S::PtaAIL1* et de la lignée sauvage de *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4, âgées de 15 mois. La moyenne et l'intervalle de confiance ont été obtenues à partir de 3 à 7 répétitions biologiques.
B à E, photos représentatives du bourgeon apical et de la 7ème feuille (B) de la lignée sauvage *(WT, 717-1B4)* et des lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* cultivées en serre. C, *35S::PtaAIL1 K4-5; D, 35S::PtaAIL1 K4-8; E, 35S::PtaAIL1 K4-13.*

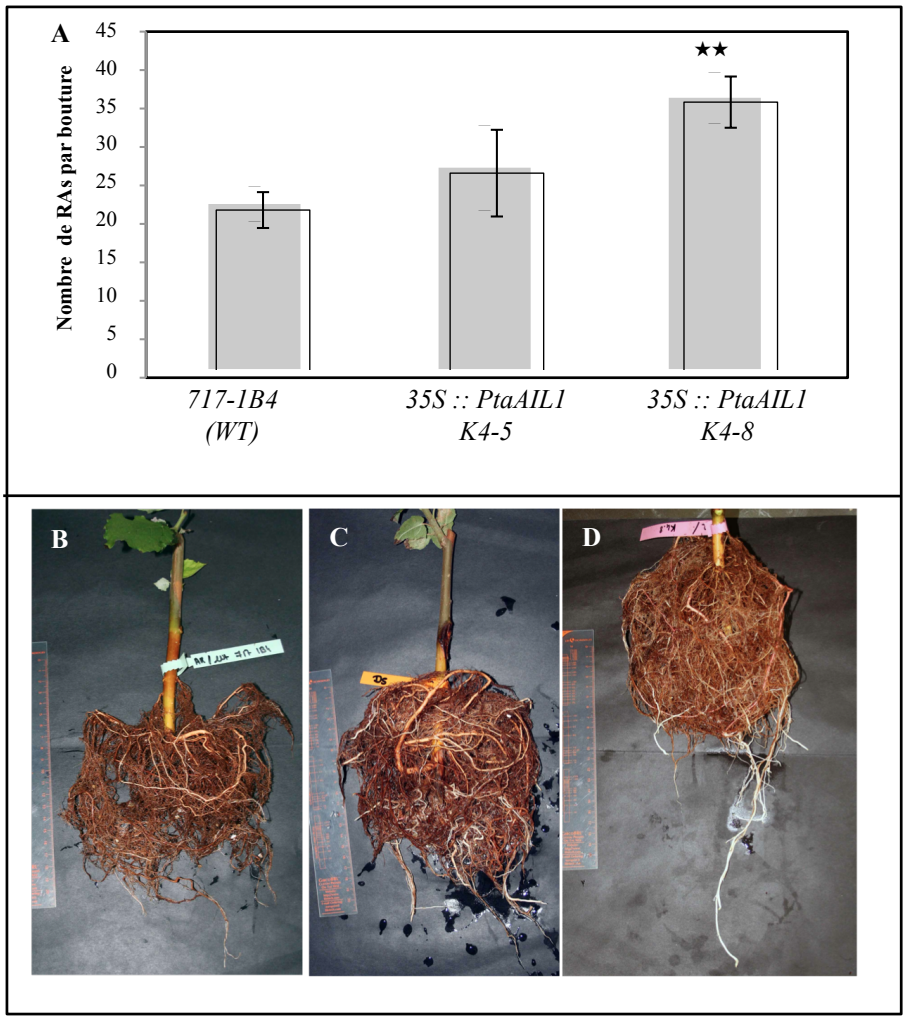


Figure 27 : A, nombre moyen de racines adventives par bouture de *P. tremula* x *P. alba* après deux mois de croissance en serre. La moyenne et l'intervalle de confiance sont obtenus à partir de 5 à 6 répétitions biologiques. ★★ représente une probabilité P<0.01 avec un test de Student.
B à D, systèmes racinaires de plantes âgés de 7 mois. B, 717-1B4 (sauvage); C, *35S:: PtaAIL1 K4-5; D, 35S::PtaAIL1 K4- 8*

pre-immune (à concentration égale à celle utilisé pour l'anticorps anti-PtAIL1). Après 3 rinçages dans du PBS, les coupes sont mises à incuber dans l'anticorps secondaire IgG AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA), dilué à 1/200 dans le tampon bloquant. Les coupes sont ensuite rincées dans une solution de PBS contenant du Tween 20 à 0,2%, puis sont montées dans une solution « antifading » contenant un marqueur fluorescent des noyaux, le DAPI (Slow Fade Gold, Invitrogen). Les coupes sont observées à l'aide d'un microscope confocal Radiance 2100 AGR3Q-BLD Rainbow (Bio-Rad), en utilisant les objectifs X60 (O.N 1,4) and X100 (O.N 1,4).

2.2. Résultats

2.2.1. Phénotype et capacité d'enracinement des boutures non dormantes des lignées *35S::PtaAIL1*

L'acclimatation de la lignée *35S::PtaAIL1* nommée K4-13 a échoué. Seule une plantule de cette lignée s'est développée en serre et il n'a pas été possible de la bouturer.
Un an et 3 mois après acclimatation, le diamètre moyen à la base de la tige des différentes lignées *35S::PtaAIL1* (K4-5 et K4-8) n'est pas significativement différent du diamètre moyen des plantes de la lignée sauvage *Pta* 717-1B4 (Figure 26A). En revanche, les feuilles des lignées transgéniques *35S::PtaAIL1,* nommées K4-8 et K4-13, sont morphologiquement différentes de celle de la lignée sauvage (Figure 26B). Les feuilles des lignées transgéniques sont incurvées par comparaison à celles de la lignée sauvage. Ces analyses phénotypiques du système aérien suggère que la croissance en diamètre ne semble pas être affectée par la sur-expression de *PtaAIL*. En revanche, la formation des feuilles est modifiée.

Le nombre moyen de RAs de la lignée K4-8, est significativement plus important que la lignée sauvage, contrairement à la lignée nommée K4-5 (Figure 27A). Après 7 mois de culture, les systèmes racinaires des deux lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* étudiées semblent être plus développés que celui de la lignée sauvage (Figure 27B, C et D).

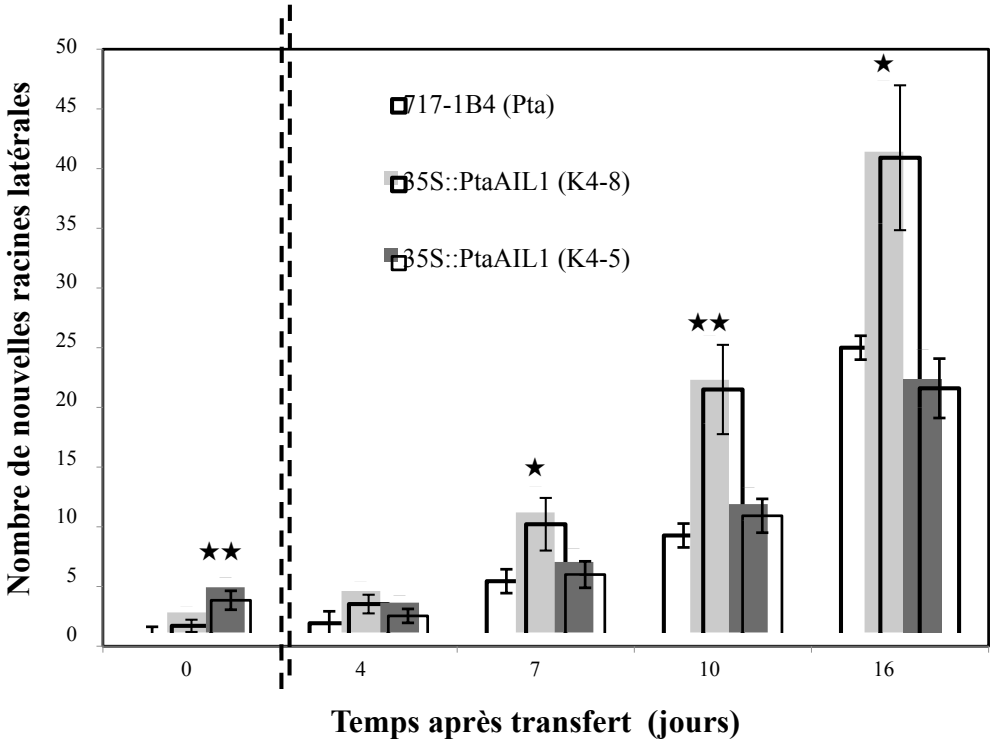


Figure 28 : Cinétique de formation de nouvelles racines latérales de la lignée sauvage 717-1B4 et des lignées *35S::PtaAIL1* (K4-8 et K4-5). La moyenne est reportée avec l'intervalle de confiance. Un test de Student est réalisé par rapport au sauvage ,★★ représente une valeur $P<0.01$ et ★ une valeur $P<0.05$

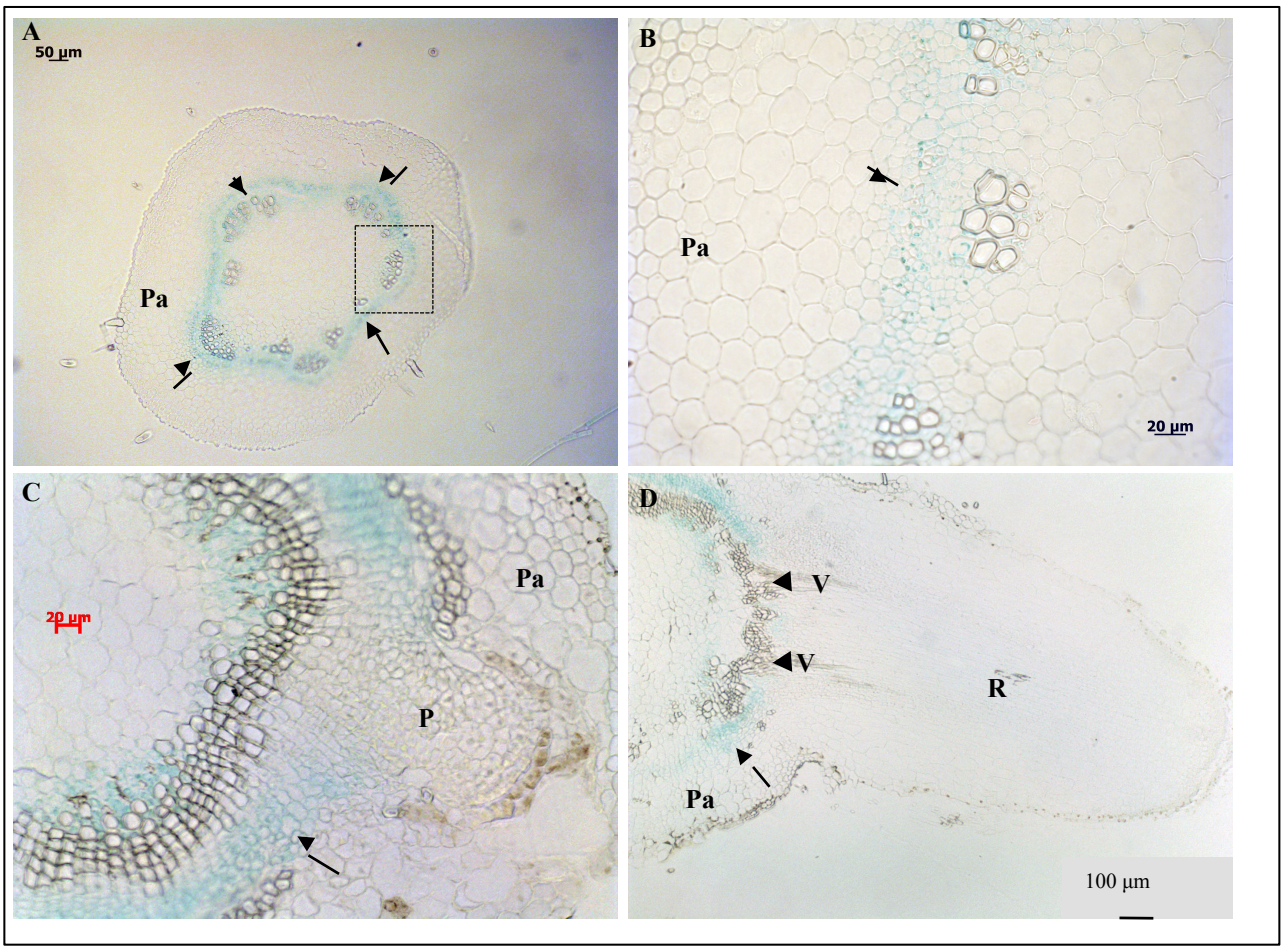


Figure 29 : Localisation de l'activité GUS, sous le contrôle du promoteur *PtAIL1* lors de la formation de la RA de *P. tremula* x *P. tremuloïdes*. A et B, stade 0 correspondant à une section de tige au niveau 3ème entre nœud, B agrandissement der la partie encadrée en A. C, stade 1 correspondant au stade pour lequel le primodium est formé. D, stade 3 dans lequel la RA émerge.
Les flèches indiquent le cambium actif ; Pa, parenchyme; P, primordium; R, racine; V, vaisseaux vasculaires, les pointes de flèche correspondent aux connections vasculaires.

Le taux de survie est également supérieur chez les lignées *35::PtaAIL1*. Après deux mois de culture, 75% des plantes de la lignée K4-8 sont enracinées, 66% pour la lignée K4-5, et 63% pour la lignée sauvage.

2.2.2. Formation des racines latérales des lignées *35S::PtaAIL1*

Les lignées 35S::*PtaAIL1* présentent également un phénotype racinaire spécifique (Figure 28). Au moment du transfert, le nombre de racines latérales de la lignée K4-5 est plus important que celui de la lignée sauvage. Le nombre de racines formées après 7 jours de culture après le transfert est significativement plus important pour la lignée K4-8. Cette différence reste significative après 10 et 16 jours de culture.

2.2.3. Localisation de l'expression de *PtAIL1* et localisation de la protéine PtAIL1

La localisation des transcrits *PtAIL1* est analysée dans des différents stades de développement de la RA en utilisant des lignées transgéniques GUS (Karlberg *et al.*, 2011). L'expression de *PtAIl1* est localisée au niveau de l'anneau cambial et dans les cellules proches en cours de différentiation (Figure 29A et B). Lorsque le primordium racinaire est formé, son expression est uniquement localisée dans les cellules cambiales, situées de part et d'autre du primordium (Figure 29C). Lors de l'émergence de la racine adventive (Figure 29D), l'activité du promoteur de *PtAIL1* n'est pas visible dans la RA mature, mais reste localisée dans le cambium. *PtAIL1* est détecté de part et d'autre de la RA ainsi qu'au niveau des tissus, situés entre les vaisseaux vasculaires. L'observation de la coloration GUS dans des coupes de tiges situées au dessus de la zone de formation des racines adventives montre à nouveau la présence de l'expression de *PtAIL1* sur l'ensemble de l'anneau cambial.

Ainsi, la localisation de l'activité du promoteur est localisée avant l'induction de la rhizogénèse et son territoire est restreint, de part et d'autre du primordium.

L'immunolocalisation de la protéine PtAIL1 est réalisée sur des coupes de tiges de *P. tremula* x *P. tremuloides* (T89), cultivées *in vitro* et de boutures dormantes de *P. trichocarpa.* Les marquages fluorescents sont observés principalement dans le noyau suggérant une localisation nucléaire de la protéine PtAIL1 (Figure 30 E et F). Dans les sections temoins, aucun marquage n'est visible dans ces zones en absence d'anticorps.

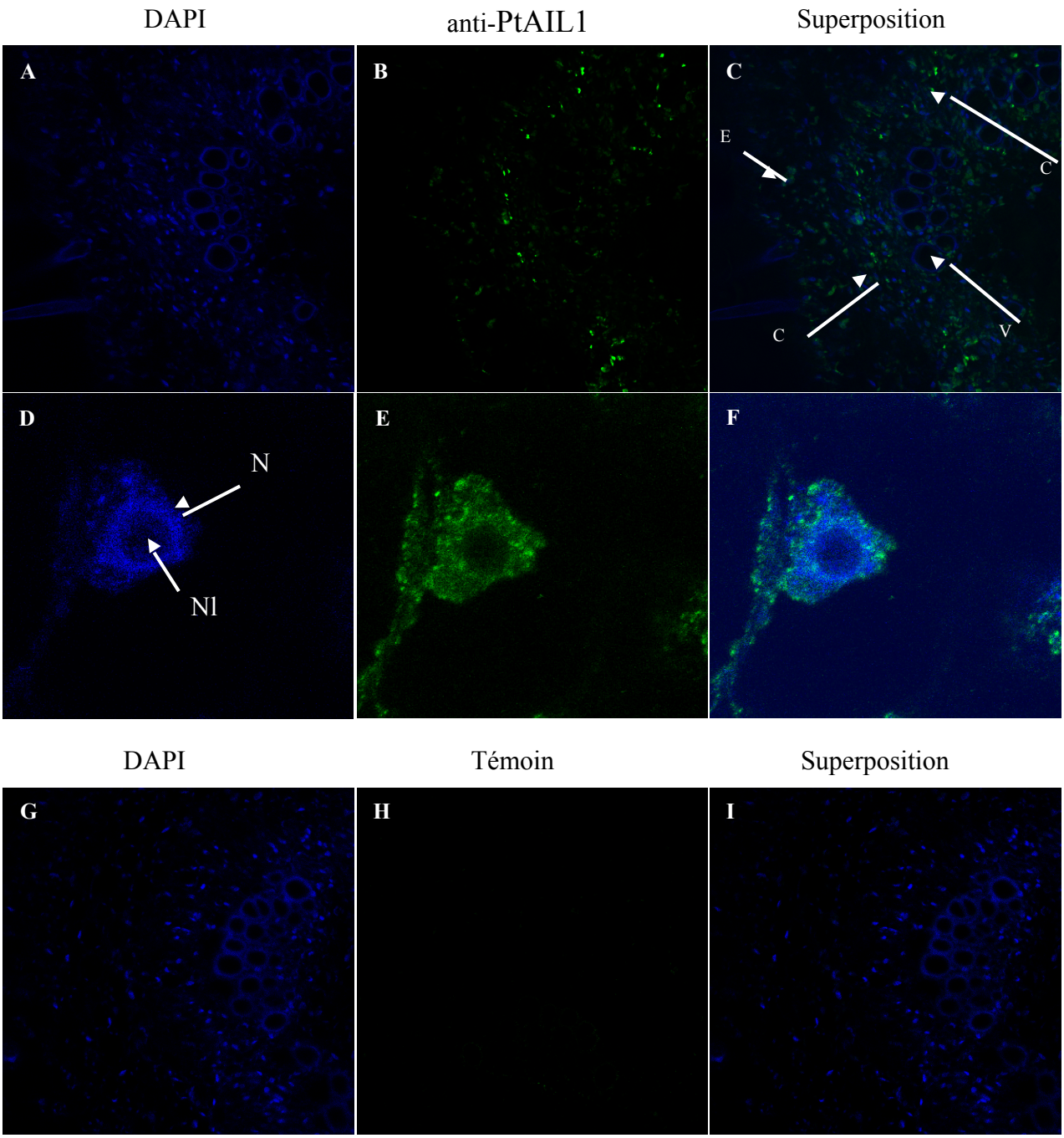


Figure 30 : Localisation de PtAIL1 dans les tiges de *P. tremula* x *P. tremuloides*. (A à C) et *P. trichocarpa* (D à F). A et D, marquage des noyaux avec le DAPI ; B et C, anticorps Anti-PtAIL1 avec Anticorps 2^{ndaire} couplé à l'Alexa 488; F, superposition de A et B et, et -D respectivement. C, cambium; V, vaisseaux vasculaires; E, rhizoderme ; N, noyau; Nl, nucléole. Pour l'expérimentation contrôle : G, marquage au DAPI; H, Anticorps 2^{ndaire} couplé à l'Alexa 488; I, superposition de G-H

La localisation de PtAIL1 est principalement dans les cellules cambiales et les cellules proches de système vasculaire (Figure 30A à C).

2.3. Discussion

La surexpression du gène *PtaAIL1* conduit à une modification de la formation des feuilles des peupliers transgéniques. Les lignées K4-8 et K4-13 ont un système foliaire composé de feuilles incurvées. Chez *Arabidopsis thaliana,* AtANT orthologue de PtAIL1, est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire au cours du développement des feuilles. De plus, la surexpression ectopique de *AtANT* induit la formation de feuilles globalement plus larges par rapport aux lignées sauvages (Kang *et al*., 2007 ; Mizukami et Fisher, 2000). Les lignées transgéniques *35S*::*PtaAIL1* ne semblent pas avoir des feuilles plus larges par rapport aux peupliers sauvages, mais elles sont clairement plus incurvées. Cette observation n'a pas été rapportée chez *Arabidopsis thaliana*, suggérant un effet spécifique de la surexpression de *PtAIL1* lors de la formation des feuilles du peuplier.

L'analyse du phénotype racinaire des lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* en serre révèle des résultats en accord avec les expérimentations menées en condition *in vitro*. La lignée K4-5 présente un développement racinaire similaire aux lignées sauvages alors la lignée K4-8 produit des RAs en plus grand nombre dans les deux conditions. Ces deux lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* ayant des niveaux d'expression de *PtAIL1* différents (voir article Figure S 2), le nombre de RAs dans ces deux conditions semble être corrélé avec le niveau d'expression de ce gène.

De plus, l'analyse du taux de survie renforce cette observation. La lignée sauvage *Pta* 717-1B4 enracine facilement en culture *in vitro*, mais montre des difficultés en culture en pots ou en condition hydroponique, à partir de boutures dormantes. En pots, les lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* ont un taux de survie plus important que la lignée sauvage. Ces résultats suggèrent un meilleur enracinement des lignées transgéniques 35S::*PtaAIL1* engendrant un taux de mortalité plus faible par comparaison au sauvage.

En plus de leur capacité à produire de RAs en grand nombre, en condition *in vitro* ou en serre, les lignées transgéniques *35S*::*PtaAIL1*, K4-8 et K4-5 produisent significativement plus de racines latérales que la lignée sauvage. sont également affectées dans la formation des racines latérales. Au cours de la cinétique de formation de nouvelles racines latérales, la lignée K4-8 produit significativement plus de racines latérales que la lignée sauvage dès 7 jours de culture et que la lignée K4-5 après 10 jours. En revanche, la lignée K4-5 n'est pas affectée dans la formation des racines latérales. Ces premiers résultats, toujours en association avec le niveau de surexpression de *PtaAIL1*, laissent supposer que la surexpression de *PtaAIL* induit la formation des racines latérales. Ainsi, PtAIL1 pourrait aussi être impliqué dans la formation des racines latérales, renforçant l'idée de son rôle dans l'initiation du primordium racinaire.

La localisation de l'activité du promoteur de une expression de *PtAIL1* dans le cambium et les cellules procambiales. Cette donnée est en accord avec les résultats décrits par Schrader et ses collaborateurs (2004). D'après nos observations, l'initiation des RAs aurait lieu au niveau des cellules cambiales, suggérant que PtAIL1 intervient dans l'initiation des RA. L'activité du promoteur de *PtAIL1* n'a pas été observé au sein du primordia et de la RA mature). Toutefois, au stade de l'organisation du primordium (Figure 29C), le nombre de couches cellulaires de l'anneau cambial semble plus important, suggérant une plus forte activité de ces cellules, pouvant ainsi expliquer l'augmentation des transcrits *PtAIL1* lors de l'organisation du primordium (stade 1). Il a été montré que le gène *AtANT* est exprimé dans les primordia des jeunes organes d'Arabidopsis et ainsi que dans les cellules procambiales (Elliott *et al*., 1996). De plus Schrader et ses collaborateurs (2004) ont mis en évidence que *PttANT1* (équivalent de *PtAIL1*) est exprimé avant que les cellules entrent dans la zone de prolifération maximale du cabium et suggèrent que ce gène contrôle l'activité des cellules cambiales. Ces données sont en accord avec nos observations obtenues avec *P. tremula* x *P. tremuloides*,

PtAIL1, appartient à la famille de facteur de transcription AP2/ERF, caractérisée par la présence de deux domaines AP2, d'attachement à l'ADN. La localisation de la protéine PtAIL1 par immunolocalisation est essentiellement nucléaire, ce qui confirme sa fonction de facteur de transcription.

3. Conclusion

- Les observations histologiques des différents stades de formation de la racine adventive de *P. trichorcharpa*, ont montré que les cellules cambiales seraient à l'origine de l'initiation de la RA.

- L'analyse transcriptomique réalisée au cours de la formation de la racine adventive révéle la régulation de plusieurs facteurs de transcription, particulièrement les membres du groupe AINTEGUMENTA de la famille AP2/ERF. La cinétique de leur expression au cours du développement de la RA suggère clairement un rôle de PtAIL1 dans l'initiation de la RA.

- La surexpression de l'expression de *PtAIL1* induit une initiation plus rapide des RAs ainsi qu'une augmentation du nombre de RAs alors que la diminution de l'expression de *PtAIL1* induit un retard dans l'initiation des RAs et une diminution du nombre de RAs, confirmant l'implication de *PtAIL1* l'initiation de la RA du peuplier. L'analyse du développement racinaire de boutures non dormantes des lignées surexprimant *PtaAIL1* confirment les résultats obtenus en condition *in vitro*.

- La comparaison des transcriptomes des lignées transgéniques *P. tremula* x *P. tremuloides*, surexprimant ou réprimant *PtAIL1*, par comparaison à la lignée sauvage, suggère que *PtAIL1* interviendrait dans un réseau de gènes dont les facteurs de transcription, *PtMYB36* et *PtAGL16*.

- L'analyse de la formation des racines latérales des lignées surexprimant *PtaAIL1* suggère que *PtaAIL1* interviendrait également dans la formation des racines latérales.

- L'utilisation de la lignée transgénique *pPtAIL1::GUS*, montre une expression de *PtAIL1* dans les cellules cambiales avant l'induction de la rhizogénèse et une restriction de l'expression

Chapitre 3 :

Régulation des gènes intervenant dans les voies auxiniques au cours de la formation de la racine adventive

Il est maintenant connu que l'auxine a un rôle important dans la rhizogènèse adventive de nombreuses espèces. L'application de l'acide indole-3-acetique (AIA) et l'acide indole 3-butyrique (IBA), induit la formation des racines adventives. La régulation de gènes impliqués dans le transport, la signalisation et le métabolisme de l'auxine a été mise en évidence essentiellement chez des espèces herbacées (Voir Figures 11, 12 et 14 dans « analyse bibliographique »).

A chaque étape de la formation des RAs, l'auxine qu'elle soit endogène ou exogène joue un rôle central. Chez de nombreuses espèces, comme le peuplier, une accumulation d'auxine à la base de la bouture précède la formation des RAs (Hausmann *et al.*, 1995 ; Guerrero *et al.*, 1999). De plus, l'auxine peut initier la division cellulaire ainsi que la formation de primordia (Doerner, 2000 ; Berleth et Sachs, 2001 ; Casimiro *et al.*, 2001) renforçant l'idée d'un rôle dans la formation de RAs. Les variations de la concentration en auxine ont été montrées comme intimement liées avec les différentes étapes physiologiques du développement de la racine adventive (Heloir *et al.*, 1996). Par ailleurs, les mutants d'*A. thaliana* affectés dans le transport et l'homéostasie de l'auxine présentent une modification dans la formation de la racine adventive (Steinmann *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 2005).

L'homéostasie auxinique au sein de la cellule détermine son action sur les événements cellulaires et coordonne ainsi la croissance de l'ensemble de la plante (Pop *et al*., 2011). L'homéostasie de l'AIA implique des processus complexes, dont sa synthèse, son métabolisme (dégradation, conjugaison) et son transport.

L'auxine est principalement synthétisée dans les jeunes feuilles et est ensuite activement transporté majoritairement de cellule à cellule, de manière polarisée. Le transport de l'auxine est coordonné par un réseau de protéines transmembranaires intervenant dans le transport de cellule à cellule, appelées respectivement AUX/LAX et PINs (Figure 30A). L'entrée de l'AIA dans la cellule se réalise par diffusion ou *via* l'intervention de protéines membranaires, la famille AUX/LAX. Cette famille est composée de 4 membres chez *A. thaliana* et 8 membres chez le Peuplier (Felten *et al.,* 2009 ; Annexe 4). Les PINs, forment une famille de 8 membres chez *Arabidopsis* (revue, Friml et Palme, 2002) et de 16 membres chez le peuplier (appelés PtPINs, Felten *et al*., 2009 ; Annexe 2). Les PINs ont une fonction dans l'efflux de l'auxine (hors de la cellule)

et leur localisation cellulaire asymétrique détermine le transport polarisé de l'hormone (revue, Petrášek et Friml, 2009). Il a été mis en évidence (Vanneste et Friml, 2009) que des signaux endogènes et externes modulent le transport de l'auxine à différents niveaux (transcriptionnels, abondance et localisation des protéines au sein de la membrane).

Une fois l'AIA synthétisée, son homéostasie est maintenue par conjugaison avec les oses ou/et les acides aminés. L'AIA est fréquemment conjugué avec des acides aminés *via* l'activité des protéines enzymatiques dont les GH3 (IAA–amino acid synthase) (revue, Tromas et Perrot-Rechenmann, 2010). Les GH3 constituent une famille de 19 membres chez Arabidopsis et 14 chez le peuplier (communication I. Perrone, Annexe 1). L'expression des *AtGH3* est inductible par l'auxine mais aussi par l'acide jasmonique (communication personnelle (C.Bellini)).

L'accumulation de l'auxine à l'intérieur de la cellule, crée un gradient auxinique, qui déclenche des mécanismes de signalisations complexes. La signalisation implique plusieurs familles de gènes dont la famille AUX/IAA et la famille ARF. De façon très générale (Figure 31B), la perception de l'AIA *via* le complexe nucléaire SCF/TIR1 conduit à la libération des AUX/IAA, préalablement liés aux facteurs de transcription, les ARF (pour Auxin Response Factor). Les protéines AUX/IAA ainsi libérées sont dégradées et parallèlement, les gènes appelés « gènes de réponse à l'auxine » sont induits. Il a été mis en évidence que l'apport d'auxine induit rapidement l'expression des gènes AUX/IAA et ARF (revue, Tromas et Perrot-Rechenmann, 2010)

En considérant l'ensemble de ces données, nous avons identifié les gènes impliqués dans le transport (gènes codant les PIN et AUX/LAX), la conjugaison (gènes codant les GH3) et la voie de signalisation de l'auxine (codant les AUX/IAA et ARF).

L'objectif de cette première analyse est de décrypter l'implication de l'auxine :

(1) dans les stades précoce de la rhizogènèse

(2) au cours des différents stades visibles de formation de la RA

Ce travail est réalisé à partir des données transcriptomiques, obtenues à 24 h de rhizogenèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides* (clone T89) et aux stades 1 (stade

Tableau 3 : Niveau d'accumulation des transcrits des gènes impliqués dans les voies de l'auxine, à T0 et à 24 h de rhizogénèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides*..

Nom pour *P. trichocarpa*	Orthologue *A. thaliana*	Niveaux de transcrits à T0	Niveau des transcrits à 24 h	Rapport d'expression 24 h vs T0	Bayes.lnp P-value	PPDE (<p)
PtGH3.1	*AtGH3.1*	6	2008	**361,26**	3.17E-05	1.00
PtGH3.2	*AtGH3.1*	2	4654	**1886,70**	1.25E-10	1.00
PtGH3.3	*AtGH3.1*	1	694	**693,58**	9.33E-15	1.00
PtPIN8	*AtPIN1*	41	1124	**27,37**	0.002992915	0.94
PtPIN15/PtPIN16	*AtPIN8*	1540	286	**0,19**	0.002748951	0.94
PtIAA4.2	*AtIAA20*	311	2639	**8,49**	0.000211905	0.99
PtIAA20.1	*AtIAA20*	397	2870	**7,24**	0.000112676	1.00
PtIAA29.2	*AtIAA29*	1596	11842	**7,42**	3.73E-06	1.00
PtIAA29.3	*AtIAA29*	948	7962	**8,40**	1.42E-05	1.00

organisation du primordium) et stade 2 (différenciation du primordium) de la rhizogénèse adventive de *P. trichocarpa.*

1. Matériels et méthodes

L'obtention des données de transcriptomique obtenues avec *P. trichocarpa* et avec *P. tremula* x *P. tremuloides*, ainsi que les méthodes d'analyses sont identiques de celles utilisées précédemment décrites dans la première partie du chapitre 2. Ainsi, nous disposons des données transcriptomiques de *P. tremula* x *P. tremuloides* au moment du transfert (T0) et après 24 h de rhizogénèse *in vitro*. Avec les données de *P. trichocarpa*, nous disposons des niveaux des transcrits dans une bouture dormante (stade 0), au stade d'organisation du primodium racinaire (stade 1) et au stade de différenciation de ce primordium racinaire (stade 2).

Nous avons porté notre attention sur les membres des différentes familles, *PtGH3*, *PtPIN*, *PtAUX*, *PtIAA* et *PtARF* présentant un rapport significativement supérieur à 5 (avec une valeur $P < 0.01$) dans au minimum un des stades analysés.

Afin de resituer les gènes de ces familles chez le peuplier vis à vis des familles de gènes connus chez *A. thaliana*, les arbres phylogénétiques de ces familles, préalablement réalisés dans l'équipe (Felten *et al*., 2009) sont présentés en annexe (Annexes 1 à 5). Ces données sont accompagnées des valeurs des niveaux des transcrits obtenus dans les microarrays. Les valeurs p correspondent aux valeurs obtenues avec un Test-t de Student par comparaison au T0 pour les données à 24h et 72h et par comparaison au stade T0 pour les données obtenues aux stades 1 et 2

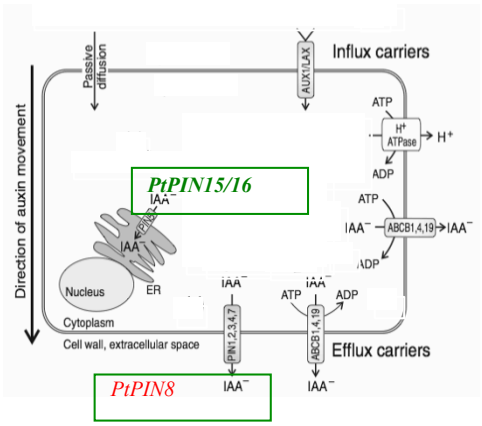
2. Résultats et discussion

2.1. L'auxine comme signal de l'initiation des racines adventives du peuplier ?

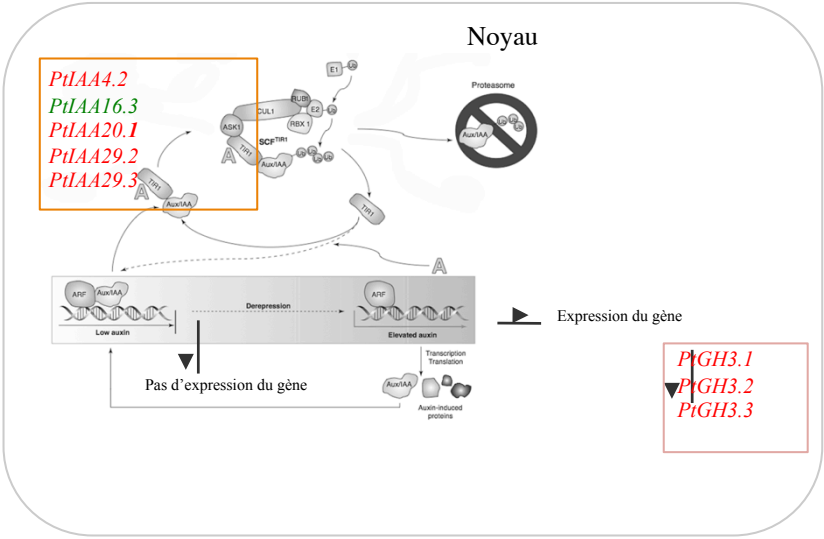
L'analyse transcriptomique révèle que les transcrits de 3 gènes de la famille *PtGH3* (*PtGH3.1*, *PtGH3.2* et *PtGH3.3*) s'accumulent à 24h alors que leur présence n'est pas détectée au moment de l'excision (Tableau 3). De manière intéressante, l'accumulation

A

Voies de transport de l'auxine



Voies de signalisation de l'auxine



B

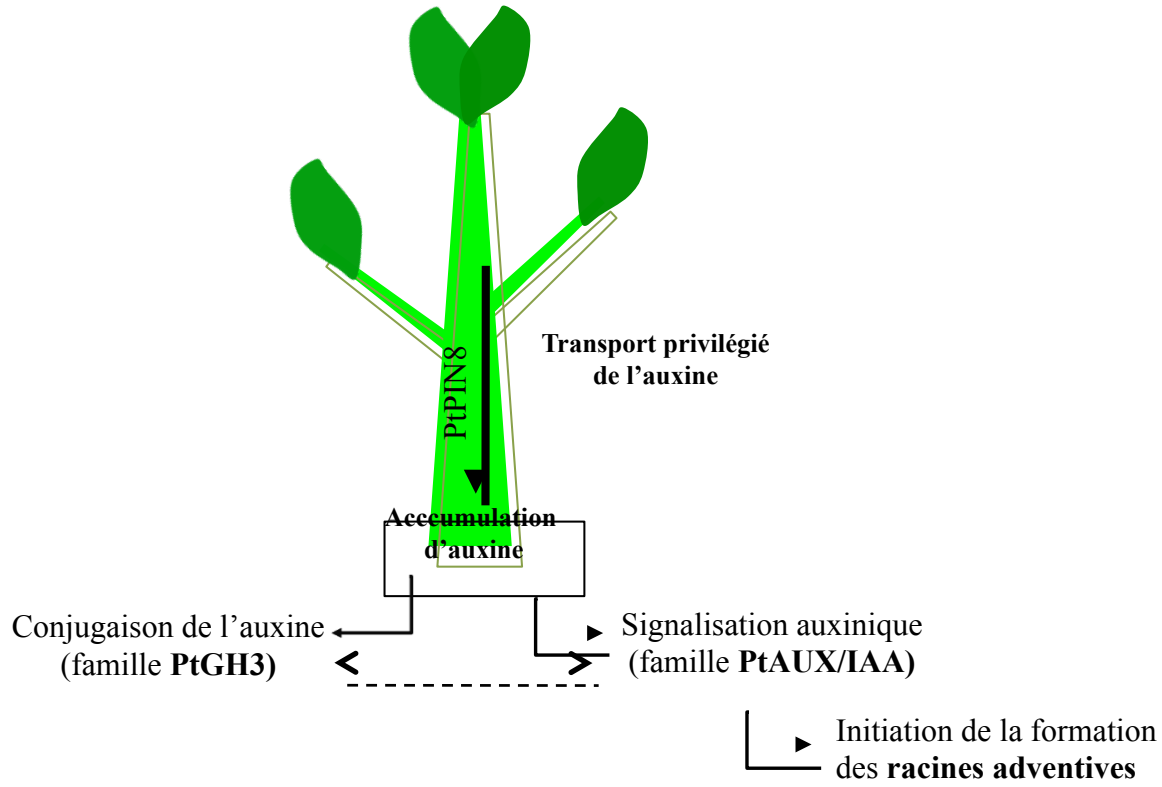


Figure 31 : A. Schéma de synthèse illustrant les gènes régulés à 24 h de la rhizogénèse adventive du peuplier. Les gènes induits sont en rouge et ceux réprimés, en vert. Les schémas illustrant les voies de transport de l'auxine et de signalisation sont issues respectivement, de Petrasek et Friml (2009) et, de Felten et al (2009) (simplifié d'après Badescu et Napier (2006)). B, Schéma hypothétique du rôle de l'auxine comme signal de rhizogénèse adventive du peuplier.

de ces transcrits est maintenue ou diminuée à 72h de la rhizogénèse (Annexe 1B). Ces résultats suggèrent une induction de l'expression des gènes de la famille *PtGH3* dans les étapes précoces de la rhizogénèse. Les gènes régulés appartiennent au groupe II de la famille *PtGH3* (Annexe 1A), dont l'expression est induite en présence de l'auxine chez *Arabidopsis thaliana* (Staswick *et al*., 2005). La sur-expression de ces gènes pourrait être attribuée à une accumulation de l'auxine à la base de la bouture, déclenchant des mécanismes de conjugaison dans les étapes précoces de la rhizogénèse adventive. De manière intéressante, l'équipe de C. Bellini (Sorin *et al.*, 2005 et 2006, Gutierrez *et al*., 2009) a montré une corrélation positive entre l'expression des membres de la famille *AtGH3* et le nombre de racines adventives d'*A. thaliana* (Figures 11 et 31).

L'analyse des gènes des familles *PtAUX/LAX* et *PtPIN*, impliquées dans le transport de l'auxine, indique que seul le niveau des transcrits codés par *PtPIN8* augmente à partir de 24h (Tableau 3 ; Annexe 2B) et ceci parmi les 16 membres de la famille *PtPIN* (Annexe 2A). Une diminution significative de l'accumulation de *PtPIN15/16* est aussi observée à partir de 24h (Tableau 3, Annexe 2B). *PtPIN8* est un des orthologues de *AtPIN1* (Felten *et al*., 2009) et, est impliqué dans le transport basipète de l'auxine dans la tige (Benkova *et al.*, 2003). Ainsi, les étapes précoces de la rhizogénèse adventive du peuplier impliqueraient une augmentation du transport de l'auxine *via* PtPIN8, contribuant à une accumulation de l'auxine à la base de la bouture de tige. Le rôle important de *OsPIN1*, orthologue de *PtPIN1* et *AtPIN1*, a aussi été mis en évidence dans l'émergence des racines adventives du riz (Xu *et al*., 2005).

L'analyse de la régulation des membres de la famille PtAUX/IAA révèle qu'uniquement les transcrits de 4 gènes (*PtIAA4.2*, *PtIAA20.1, PtIAA29.2* et *PtIAA29.3*) s'accumulent à 24 h de la rhizogénèse (Tableau 3) alors que ceux de 2 autres membres, *PtIAA16.3* et *PtIAA27.2* diminuent à partir de 24 h (Annexe 3B). Il est intéressant de noter que les transcrits du gène *PtIAA29.2* augmente de façon transitoire à 24h (Annexe 3B). De plus, *PtIAA29.2* appartient à des groupes plus étendus de *P. trichocarpa* (Kalluri *et al*., 2007 et Annexe 3A).

Tableau 4 : Niveau d'expression des transcrits significativement régulés durant l'organisation (stade 1, note St1)et la différentiation du primordium racinaire (stade 2, noté St2) de lors de la rhizogénèse adventive de *P. trichocarpa*

Nom	Orthologue *A.thaliana*	Niveau des transcrits St0	Niveau des transcrit St1	Niveau des transcrits St2	Rapport d'expression St1 vs St0	P value St1 vs St0	Rapport d'expression St2 vs St1	P value St2 vs St1	Rapport d'expression St2 vs St0	P value St2 vs St0
PtGH3.1	*AtGH3.1*	70	1950	7088	**28.00**	0.000758	3.64	0.168	**101.77**	0.000000227
PtGH3.3	*AtGH3.1*	66	1499	1108	**22.77**	0.000172	0.74	0.691	**16.84**	0.000000915
PtGH3.5	*AtGH3.5/AtGH3.6*	115	2396	5464	**20.78**	0.00721	2.28	0.405	**47.38**	0.000169
PtGH3.6	*AtGH3.5/AtGH3.6*	32	597	1104	**18.88**	0.0000253	1.85	0.489	**34.92**	0.000146
PtGH3.7	*AtGH3.17*	16	65	827	3.98	0.0132	**12.71**	0.00931	**50.60**	0.00000421
PtGH3.8	*AtGH3.17*	18	91	394	5.01	0.0612	4.33	0.183	**21.67**	0.00000299
PtGH3.14		3171	736	1274	**0.23**	0.00000148	1.73	0.00484	**0.40**	0.0000193
PtGH3.9	*AtGH3.9*	20	38	184	1.89	0.215	4.84	0.186	**9.17**	0.015
PtPIN2	*AtPIN1*	929	864	6530	0.93	0.937	7.56	0.078	**7.03**	7.13E-08
PtPIN8	*AtPIN1*	26	377	1595	**14.23**	0.0043	4.23	0.155	**60.23**	0.000000528
PtPIN9	*AtPIN2*	17	45	1279	2.60	0.115	**28.40**	0.00248	**73.76**	1.67E-08
PtPIN11	*AtPIN5*	16	128	46	**8.17**	0.00659	0.36	0.438	**2.95**	0.177
PtPIN12	*AtPIN5*	16	61	2020	3.83	0.0539	**33.12**	0.00879	**126.91**	0.00000511
PtAUX4	*AtAUX1*	605	5517	6595	**9.12**	0.000000956	1.20	0.437	**10.91**	0.00000322
PtAUX6	*AtLAX2*	122	1171	4794	9.58	0.0154	4.09	0.165	**39.20**	0.000037
PtAUX7	*AtLAX3*	566	6915	6308	**12.23**	0.00000455	0.91	0.845	**11.15**	0.000000418
PtAUX8	*AtLAX3*	92	882	2992	9.57	0.0118	3.39	0.168	**32.46**	0.0000119
PtIAA7.1	*AtIAA14/7*	54	56	1273	1.04	0.884	**22.75**	0.00466	**23.61**	0.000396
PtIAA7.2	*AtIAA14/7*	85	4156	25107	**48.76**	0.000428	6.04	0.067	**294.59**	5.86E-08
PtIAA16.4	*AtIAA16*	1513	1217	7110	0.80	0.519	**5.84**	0.00553	**4.70**	0.000216
PtIAA28.2	*AtIAA28*	280	3628	1072	**12.95**	0.0000237	0.30	0.0352	**3.82**	0.000409
PtIAA29.1	*AtIAA29*	1387	370	223	0.27	0.07	0.60	0.601	**0.16**	0.000236
PtIAA34	*AtIAA32/34*	157	15	17	**0.10**	0.00000693	1.09	0.554	**0.11**	0.00000515
PtIAA33.1	*AtIAA33*	254	48	1081	**0.19**	0.00723	**22.64**	0.000389	**4.26**	0.00291
PtIAA33.2	*AtIAA33*	41	2681	9649	**65.90**	0.00017	3.60	0.169	**237.15**	0.000000113
PtIAA12.1	*AtIAA12/13*	63	143	546	2.26	0.236	3.82	0.145	**8.65**	0.000358
PtIAA19.3	*AtIAA6/19*	22	755	1410	33.61	0.0136	1.87	0.722	**62.80**	0.000000116
PtIAA3.1	*AtIAA3/4*	492	9671	7527	**19.65**	0.000000149	0.78	0.0841	**15.29**	9.62E-08
PtIAA3.2	*AtIAA3/4*	1103	24099	24113	**21.84**	1.24E-08	**1.00**	9.99E-01	**21.85**	2.55E-08
PtIAA3.3	*AtIAA3/4*	5949	523	698	0.09	0.0135	1.34	0.826	**0.12**	0.000162
PtIAA3.4	*AtIAA3/4*	2724	227	226	**0.08**	6.73E-08	**1.00**	9.99E-01	**0.08**	9.10E-06
PtARF10.1	*AtARF10*	415	4726	2745	**11.39**	0.0000187	0.58	0.161	**6.61**	0.00000127
PtARF16.1	*AtARF10*	655	2041	3652	3.11	0.0125	1.79	0.297	**5.57**	0.0000109
ARF5.1	*AtARF5*	379	1869	1874	**4.92**	0.0000456	1.00	0.998	**4.94**	0.0376
PtARF5.2	*AtARF5*	600	7885	4975	**13.15**	1.19E-09	0.63	1.32E-01	**8.30**	6.25E-06
PtARF2.2	*AtARF15*	12773	3816	2572	**0.30**	0.0000404	0.67	0.278	**0.20**	0.0000377
PtARF6.4	*AtARF6*	2048	695	302	**0.34**	0.00398	0.43	0.173	**0.15**	0.00038
PtARF9.3	*AtARF11/18*	5436	444	404	**0.08**	0.00000582	0.91	0.881	**0.07**	0.0000361
PtARF17.2	*AtARF17*	1046	1893	362	1.81	0.0102	**0.19**	0.0042	0.35	0.00742

La famille AtAUX/IAA étant composée des gènes inductibles par l'auxine (revue, Pop *et al*., 2011), laisse suggérer que les voies de la signalisation auxinique sont modifiées dans les étapes précoces de la rhizogénèse adventive du peuplier (Figure 31A).

Ainsi, l'analyse du transcriptome à 24h de rhizogénèse adventive des boutures de *P. tremula* x *P. tremuloides* met clairement en évidence une régulation des gènes impliqués à la fois dans le transport, la signalisation et le métabolisme de l'auxine (Figure 31A). Ces premiers résultats nous conduit à proposer un modèle hypothétique du rôle de l'auxine dans les étapes précoces de la rhizogénèse adventive du peuplier (Figure 31B) : l'excision de la tige et son transfert dans un milieu de bouturage conduiraient à une accumulation d'auxine à la base de la bouture provenant d'une augmentation du transport basipète de l'auxine (*via* PtPIN8). L'auxine perçue dans les cellules cambiales de la base de la tige, cellules initiales de la rhizogénèse du peuplier, déclencherait les voies de signalisation et conduirait à l'initiation des RAs du peuplier. Parallèlement, l'accumulation d'auxine à la base de la bouture induirait une modification du métabolisme de l'auxine *via* PtGH3. L'auxine peut donc être considérée comme un des signaux de la rhizogénèse adventive du peuplier.

2.2. Régulation des gènes des voies de l'auxine au cours de l'organisation et de la différenciation du primordium racinaire

Au cours de la formation et de la différenciation du primordium racinaire, les familles de gènes répondant à l'auxine sont aussi fortement régulées (Tableau 4 et Figure 32).

L'analyse des rapports d'expression indiquent que les membres de la famille PtGH3 sont particulièrement régulés au cours de la formation de la RAs de *P. trichocarpa* (Tableau 4, Annexe 1). Exceptés les transcrits du gène *PtGH3.14* qui diminuent, ceux des gènes *PtGH3.1, PtGH3.3, PtGH3.5, PtGH3.6, PtGH3.7, PtGH3.8 et PtGH3.9* s'accumulent lors de l'organisation (stade 1) et lors de la différenciation du primordium (stade 2).

L'expression induite de *PtGH3.3*, *PtGH3.5* et *PtGH3.6* permettant de réguler l'homéostasie de l'auxine a été mis en évidence lors de l'initiation de la RA d'*Arabidopsis thaliana* (Sorin *et al.*, 2005, 2006 ; Gutierrez *et al*., 2009). Toutefois, nous

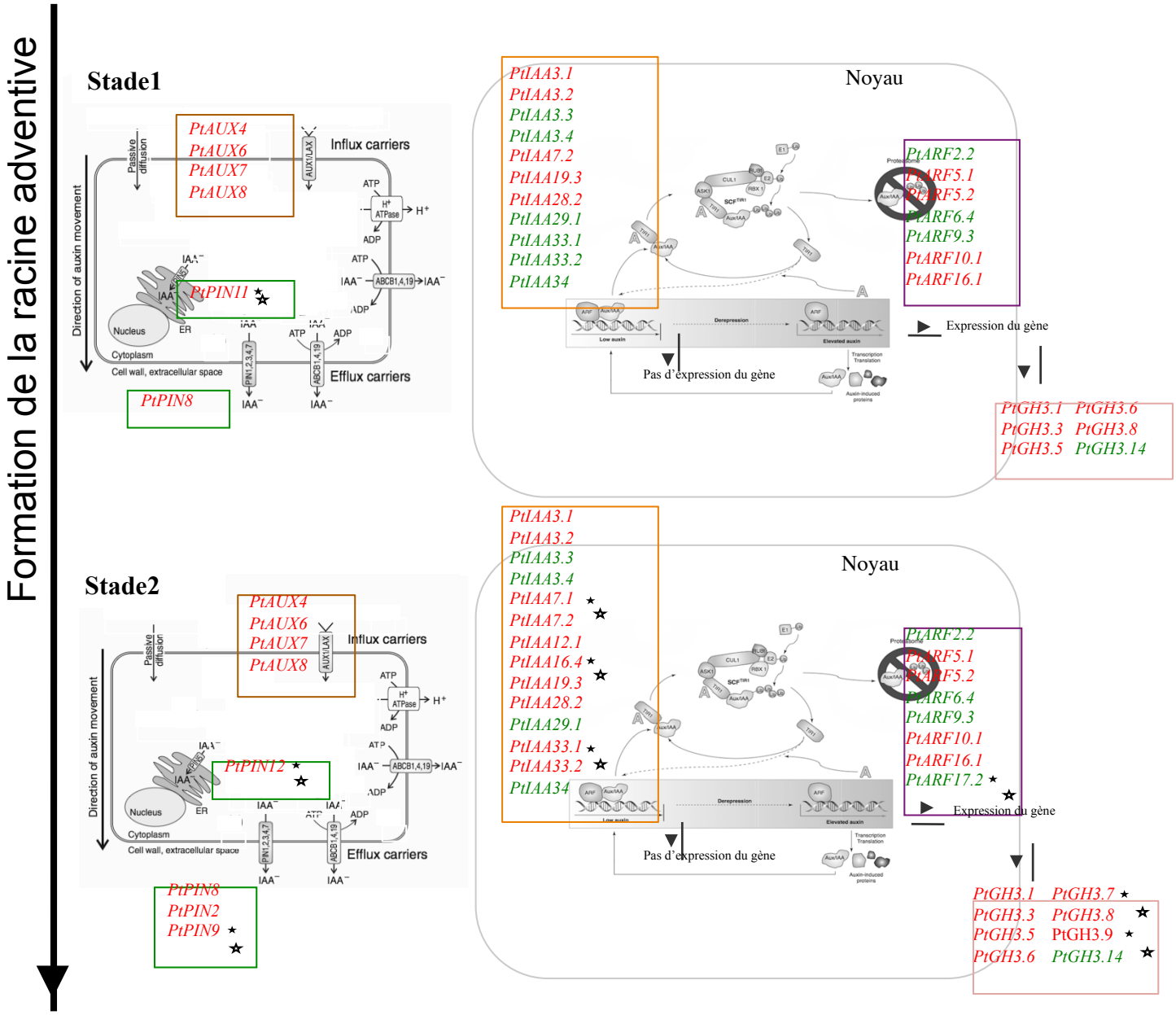


Figure 32 : Régulation des voies auxiniques au cour de la formation de la racines adventive. Les gènes surexprimés par rapport Stade 0 sont en rouge et les réprimés en vert. Les gènes spécifiques d'un stade précis sont associés à une étoile (D'après Petrasek et Friml (2009); Felten et al (2009) (simplifié d'après Badescu et Napier (2006)))

pouvons supposer que *PtGH3-5* et *PtGH3-6* seraient également impliqués à différentes étapes de la formation de la RA du Peuplier.

Contrairement aux résultats obtenus à 24h et 72h de la rhizogénèse, les transcrits de quatre membres de la famille PtAUX/LAX (*PtAUX4*, *PtAUX6*, *PtAUX7* et *PtAUX8*), impliquée dans l'influx de l'auxine, sont significativement régulés (Tableau 4, Annexe 4). Le niveau de ces transcrits augmente dans les deux stades de la formation de la RA. Les membres de la famille PtPIN, impliquée dans le transport d'efflux de l'auxine, sont également régulés. L'accumulation des transcrits (*PtPIN2*, *PtPIN8*, *PtPIN9*, *PtPIN11* et *PtPIN12)* est supérieure au stade de différenciation du primordium, indiquant leur implication dans la racine nouvellement formée. Plus précisément, les transcrits de *PtPIN9*, orthologue de *AtPIN2*, sont très abondants, suggérant la mise en place du transport basipète dans le cortex et l'épiderme de la jeune racine (Krecek *et al*., 2009). Un des orthologues de *AtPIN5, PtPIN11*, s'exprime au stade de la formation du primordium racinaire alors que *PtPIN12* s'exprime dans la différenciation de ce primordium (Annexe 2). A*tPIN5* est impliqué dans la régulation de l'homéostasie cellulaire de l'auxine (Mravec *et al*., 2009).

De nombreux membres de la famille PtAUX/IAA semblent également être régulés positivement ou négativement au cours la formation de la RA de *P. trichocarpa* (Tableau 4 et Annexe 3B). Il est intéressant de noter que le niveau des transcrits de *PtIAA7.1*, *PtIAA16.4* et *PtIAA33.1* augmente essentiellement au stade 2, suggérant leurs implications dans la différenciation du primodium racinaire. Deux autres membres *PtIAA28.2* et *PtIAA3.1* présentent un profil intéressant : ils sont surexprimés au stade 1 puis leur niveau de transcrits tend à diminuer, supposant plutôt un rôle dans l'organisation du primordium racinaire. L'induction de gènes de la famille AUX/AIA étant induite à la suite de la perception de l'auxine, ce qui nous laisse supposer un rôle de l'auxine dans ces étapes de formation et de différenciation du primordium.

Contrairement aux résultats observés à 24h et 72h, les *PtARFs* sont particulièrement régulés au cours de la formation de la RA de *P. trichocarpa* : leur niveau de transcrits augmente significativement au stade 1 puis reste identique au stade 2 (Tableau 3 :

Annexe 5). Kalluri et ses collaborateurs (2007) ont montré que le niveau d'expression de *PtARF5.1* et *PtARF5.2* est légèrement supérieur dans les racines que dans la tige et les feuilles du peuplier. De plus, l'expression des gènes *AtARF5* et *AtARF7* est localisée dans le centre quiescent et les cellules voisines de la racine primaire d'*Arabidopsis*, et *AtARF16* dans la coiffe racinaire (Rademacher *et al*., 2011). Ces données combinées à nos observations suggèrent l'implication de ces gènes dans l'organisation de la coiffe racinaire. De façon intéressante, le gène *AtARF17.2* décrit comme un répresseur de la rhizogénèse adventive chez *Arabidopsis* (Gutierrez *et al*., 2009) est significativement réprimé durant les stades de formation et de différenciation du primordium racinaire. Les PtARFs, semblent donc être des facteurs de transcription induit par l'auxine dans les étapes tardives de la formation de la RA.

Nos analyses indiquent donc une régulation des gènes impliqués dans les voies auxiniques lors de l'organisation et la différenciation du primordium racinaire. Or, *PtAIL1* est fortement exprimé à ces deux stades. Deux questions peuvent alors se poser : est que l'expression de *PtAIL1* est induite par l'auxine ? Ou au contraire, est ce la signalisation auxinique est induite par PTAIL1. Nos expériences ne permettent pas d'y répondre. Néanmoins, récemment, l'analyse du transport de l'auxine dans les doubles mutants ant/ail6 d'*A. thaliana* montre que celui-ci est perturbé lors de l'initiation des fleurs (Krizek et al., 2011), suggérant que l'existence d'un lien entre les membres *AINTEGUMENTA* et le transport de l'auxine. Il serait donc possible que AtANT soit une des cibles des voies de signalisation de l'auxine et en retour celui ci interviendrait dans la répartition de l'auxine, de la même façon que les AINTEGUMENTA-like/PLETHORA (Aida *et al*., 2004 ; Blilou *et al*., 2005). De plus, l'expression de AtANT dans les organes en formation est réprimée par ARF2, un régulateur négatif de la croissance des organes (Schruff *et al*., 2005). Il apparaît donc que AtANT peut être relié à l'auxine suggérant l'intérêt de poursuivre ces études.

L'auxine n'est pas la seule hormone contrôlant la formation de la racine adventive (voir « analyse bibliographique et Figure 11). Des études ont montré l'implication de l'éthylène, les cytokinines et les jasmonates. Nous poursuivons actuellement l'analyse

des transcriptomes en se focalisant sur la régulation des gènes impliqués dans la synthèse et la signalisation de ces hormones.

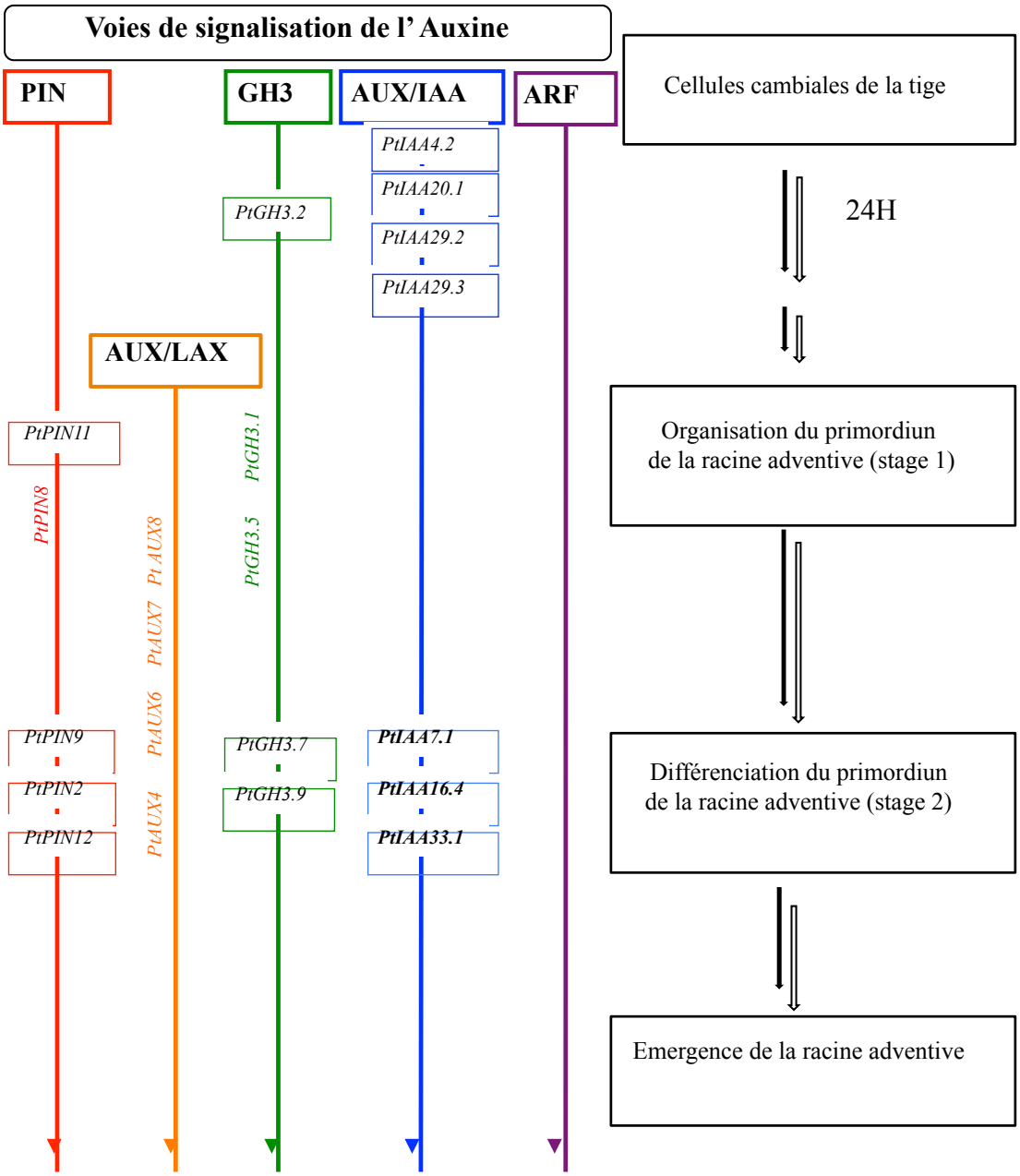


Figure 33 : Modulation des familles impliquées dans la voie de signalisation de l'auxine au cours du développement de la racine adventive et des gènes potentiellement impliqués chez le peuplier. Les gènes encadrés sont des gènes induits seulement dans une des étapes du processus de formation de la racine adventive. Ceux en couleurs sur les flèches sont exprimés tout au long du processus.

3. Conclusion

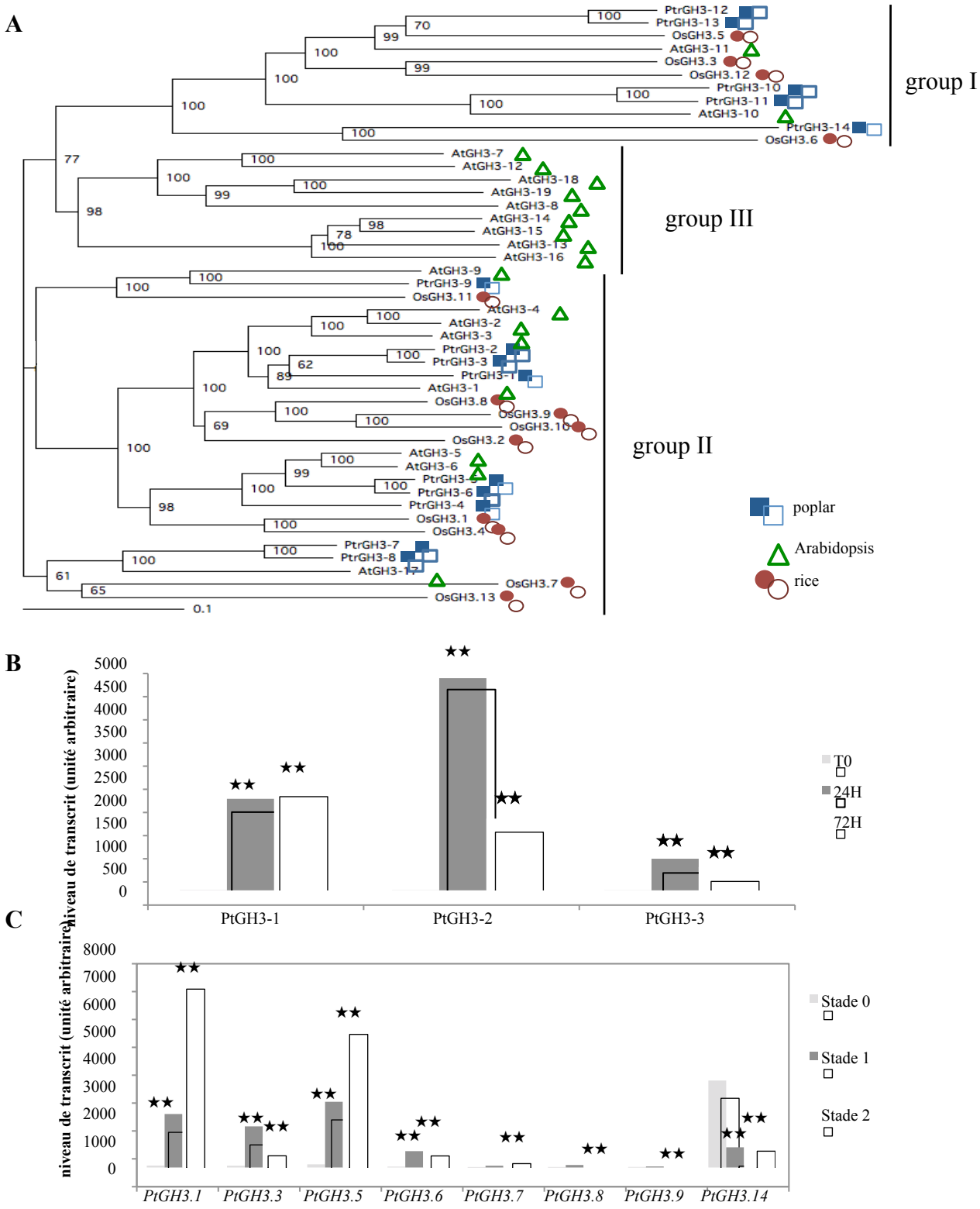
Nous avons débuté un travail afin de décrypter la régulation de certaines familles de gènes impliquées dans les voies auxiniques. Nos résultats nous permettent de proposer un schéma hypothétique de la régulation de ces familles au cours de la formation de la RA (Figure 33). Dans les étapes précoces de la rhizogénèse, les voies auxiniques semblent fortement régulées. De plus, nous pouvons présager que certains gènes sont spécifiquement régulés dans un stade précis, et ainsi être considérés comme des candidats d'intérêt dans la formation de la RA (Figure 33).

Nous pouvons conclure que :

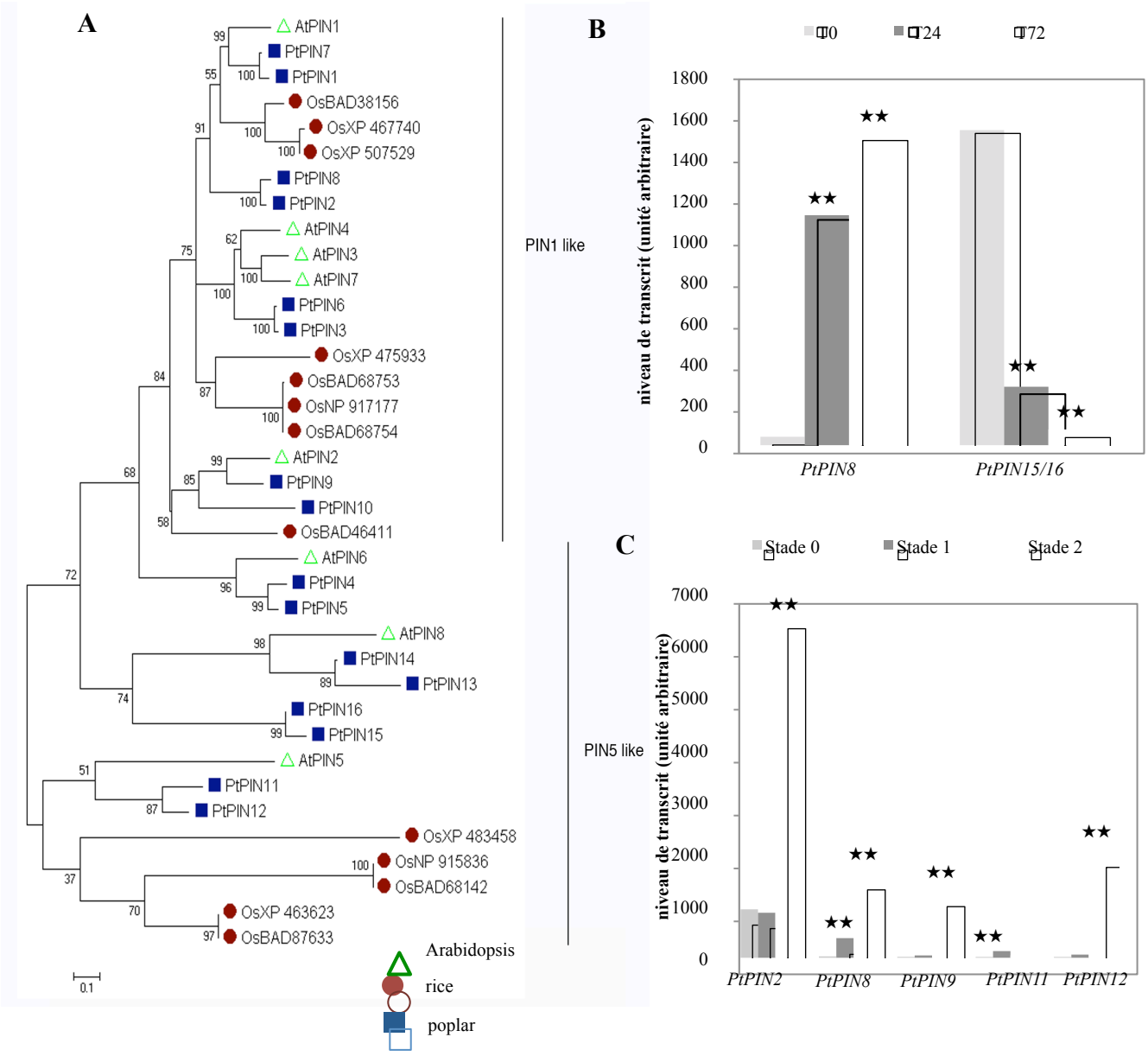
- les gènes des familles PtGH3 (*PtGH3.2*) et PtAUX/IAA (PtIAA4.2, PtIAA20.1, PtIAA29.2, et PtIAA29.3) sont majoritairement régulés au cours des 24 premières heures de la rhizogénèse, ainsi que *PtPIN8*.
- au cours des stades de l'organisation et du différenciation du primordium racinaire, les familles *PtPIN*, *PtAUX/LAX*, *PtAUX/IAA*, *PtGH3* et *PtARF* sont fortement régulées. Plus précisément, *PtPIN11* est significativement régulé uniquement lors de l'organisation du primordium racinaire. *PtPIN2*, *PtPIN9* et *PtPIN12*, *PtIAA7.1*, *PtIAA16.4* et *PtIAA33.1* et *PtGH3.7* et *PtGH3.9*, s'expriment plus particulièrement au stade de différenciation du primordium.

Ainsi, l'auxine peut être non seulement, considérée comme un des signaux inducteurs de la rhizogénèse adventive, elle est aussi impliquée dans chaque étape de la formation des RAs du peuplier.

Annexes



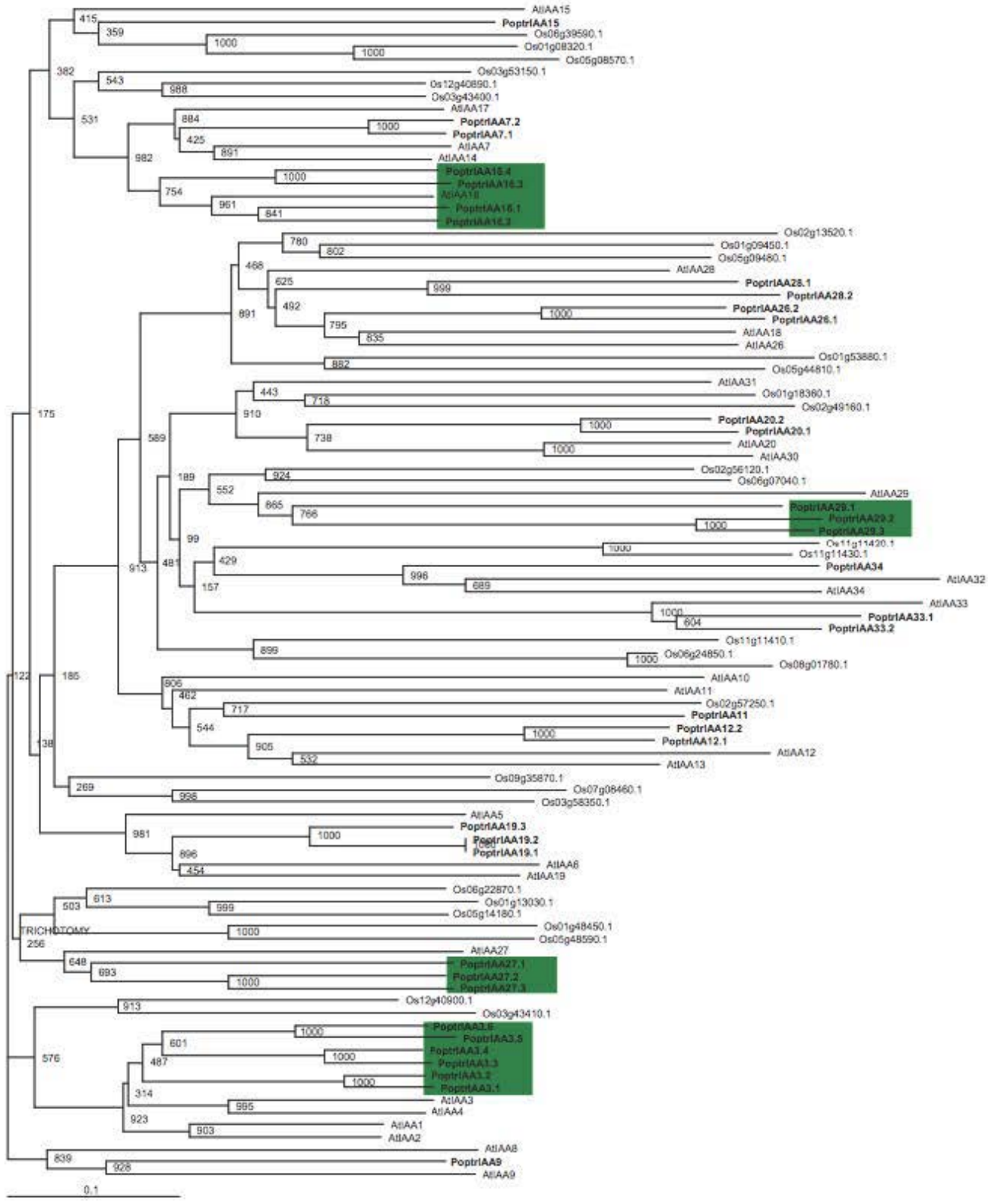
Annexe 1 : Régulation des gènes de la famille PtGH3 lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtGH3 de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtGH3 d'*A. thaliana* et OsGH3 d'*Oryza sativa* (Irene Perrone). B, niveau des transcrits des gènes significativement régulés après 24 h et 72 h de la rhizogénèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides*. C, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ★★ et ★ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, respectivement par comparaison au T0 ou St0.



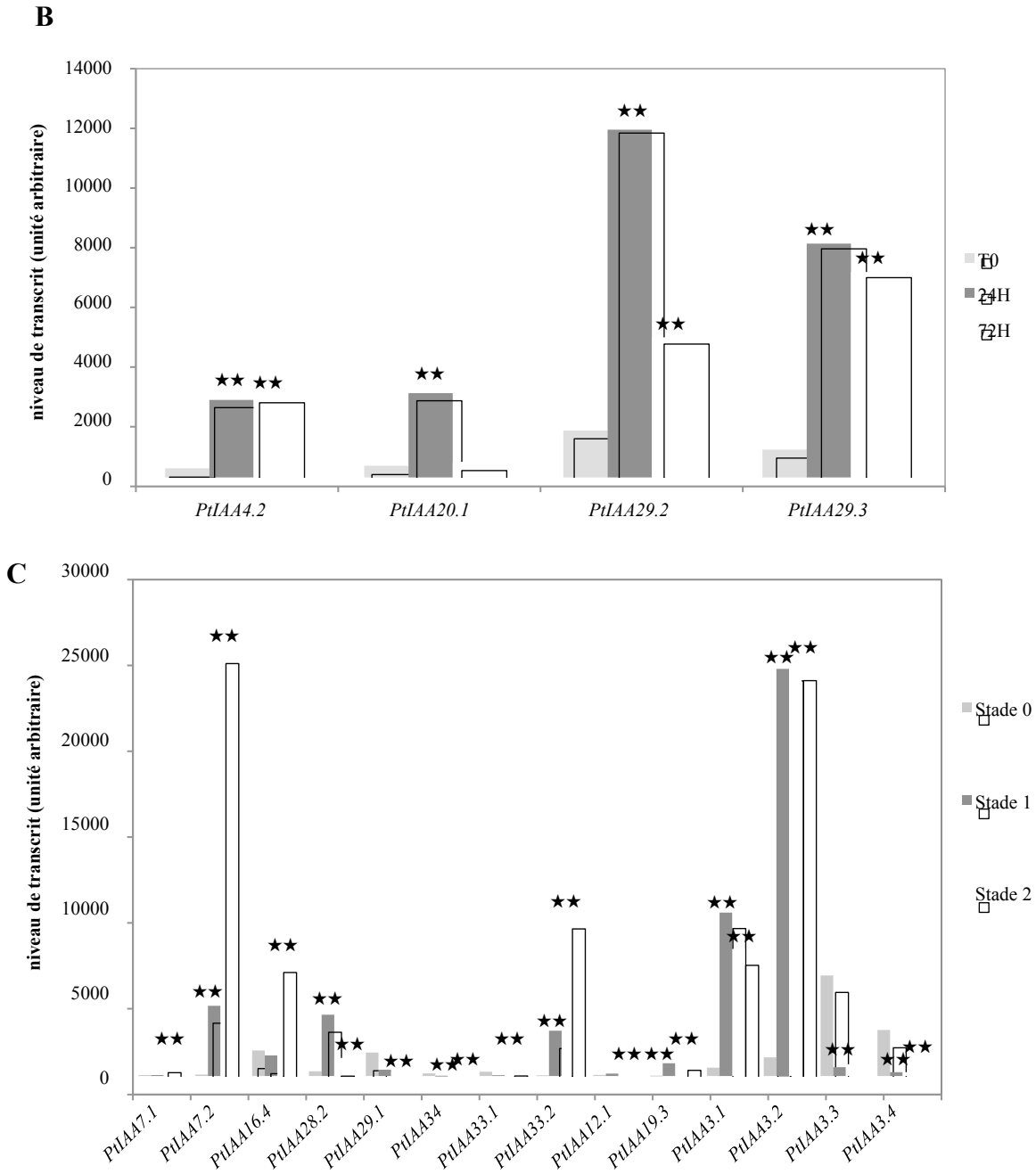
Annexe 2 : Régulation des gènes de la famille PtPIN lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtPIN de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtPIN d'*A. thaliana* et OsPIN d'*Oryza sativa* (Felten *et al.*, 2009). B, niveau des transcrits des gènes significativement régulés après 24 h et 72 h de la rhizogénèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides*, C, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ★★ et ★ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, respectivement par comparaison au T0 ou St0.

.

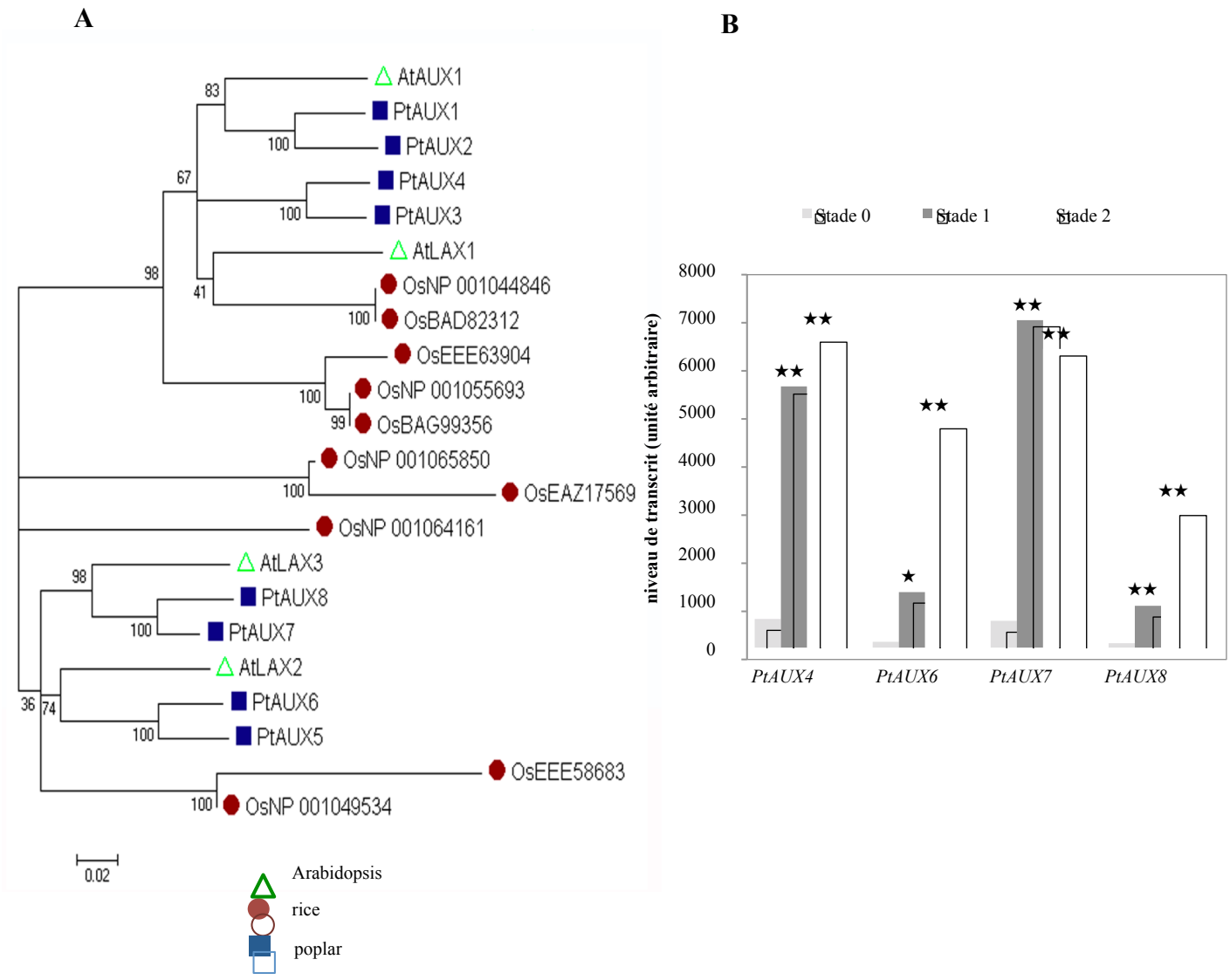
A



Annexe 3 : Régulation des gènes de la famille PtAUX/IAA lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtIAA de *P. trichocarpa* , notée en gras, en relation avec celles de AtIAA d'*A. thaliana* et OsIAA d'*Oryza sativa* (Kalluri *et al*, 2007). Les groupes encadrés en vert sont des groupes plus étendu dans *P. trichocarpa*.

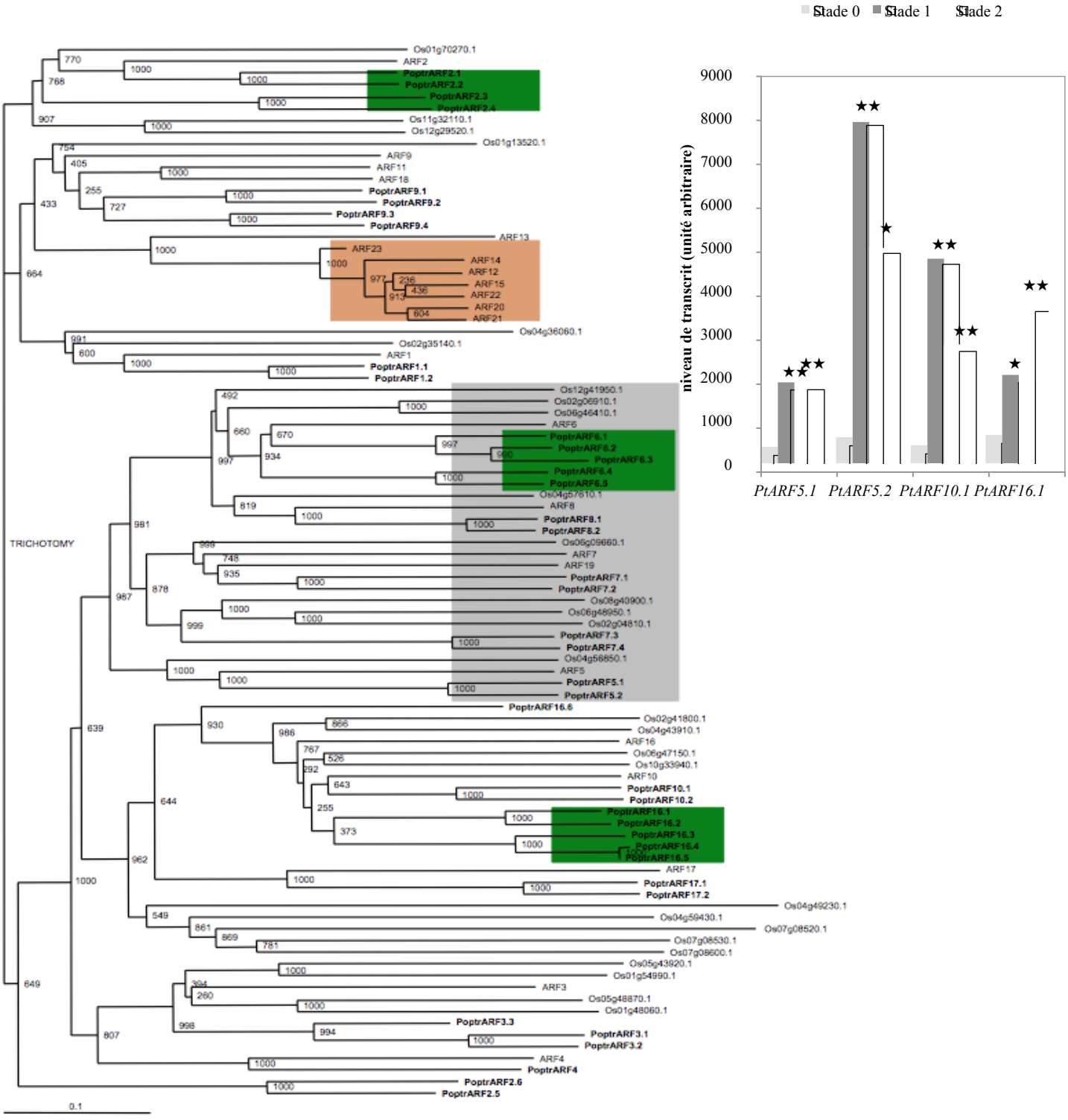


Annexe 3 suite : Régulation des gènes de la famille PtAUX/IAA lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. B, niveau des transcrits des gènes significativement régulés après 24 h et 72 h de la rhizogénèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides*, C, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ⋆⋆ et ⋆ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, respectivement par comparaison au T0 ou St0. .



Annexe 4 : Régulation des gènes de la famille PtAUX/LAX lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtPIN de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtAUX/LAX d'*A. thaliana* et OsAUX/LAX d'*Oryza sativa* (Felten *et al.*, 2009). B, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ⋆⋆ et ⋆ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, par comparaison au St0.

A



Annexe 5 Régulation des gènes de la famille PtARF lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtARF de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtARF d'*A. thaliana* et OsARF d'*Oryza sativa* (Kalluri *et al.*, 2007). B, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ★★ et ★ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, par comparaison au St0

Conclusions et perspectives

Les études réalisées sur la rhizogénèse adventive portent essentiellement sur le rôle des hormones dans ce processus, particulièrement sur leur impact en fonction de leur concentration. Une grande partie des gènes, connus pour être impliqués dans la formation des racines adventives, a été identifiée en utilisant des analyses génétiques. Depuis ces dernières années, des analyses moléculaires sont mises en place pour étudier plus précisément ce processus et ont permis d'identifier quelques réseaux de gènes impliqués dans ce processus de développement.

Mon travail de thèse nous permet de décrypter le réseau de gènes et les mécanismes moléculaires, impliqués dans la rhizogénèse adventive du peuplier.

1. Fonction de PtAIL1 dans la formation de la racine adventive

L'analyse du transcriptome réalisée dans les premiers stades visibles de la formation de RAs révèle l'importance de la famille de facteur de transcription AP2/ERF. Au sein de cette famille, les membres *AINTEGUMENTA* (*PtAIL*) sont particulièrement régulés. La cinétique de l'expression des membres du groupe AINTEGUMENTA du peuplier suggère le rôle potentiel de PtAIL1 dans la formation de la RA. En effet, le gène *PtAIL1* est surexprimé pendant les étapes de rhizogénèse, il est peu exprimé dans la racine mature, que ce soit à l'apex ou à la zone d'élongation. De plus, en collaboration avec V. Busov (Michigan TechUniversity), R. Bhalerao (UPSC) et C. Bellini (UPSC), nous avons pu analyser le développement racinaire de différentes lignées transgéniques, surexprimant ou réprimant l'expression du gène *PtAIL1* et ceci, dans deux génotypes différents. Les lignées surexprimant le gène *PtAIL1* forment plus de racines adventives et plus précocement que les lignées sauvages. Au contraire, la rhizogénèse des boutures issues des lignées réprimant le gène *PtAIL1* est retardée avec un nombre de RAs plus faible. Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la capacité d'enracinement des boutures matures et non dormantes de plantes transgéniques surexprimant *PtaAIL1*.

Une analyse transcriptomique réalisée à partir des boutures issues des lignées transgéniques surexprimant et réprimant le gène *PtAIL1* par comparaison avec la lignée sauvage met en évidence une interaction potentielle de *PtAIL1* avec *PtAGL16* (*AGAMOUS like 16*) et *PtMYB36*.

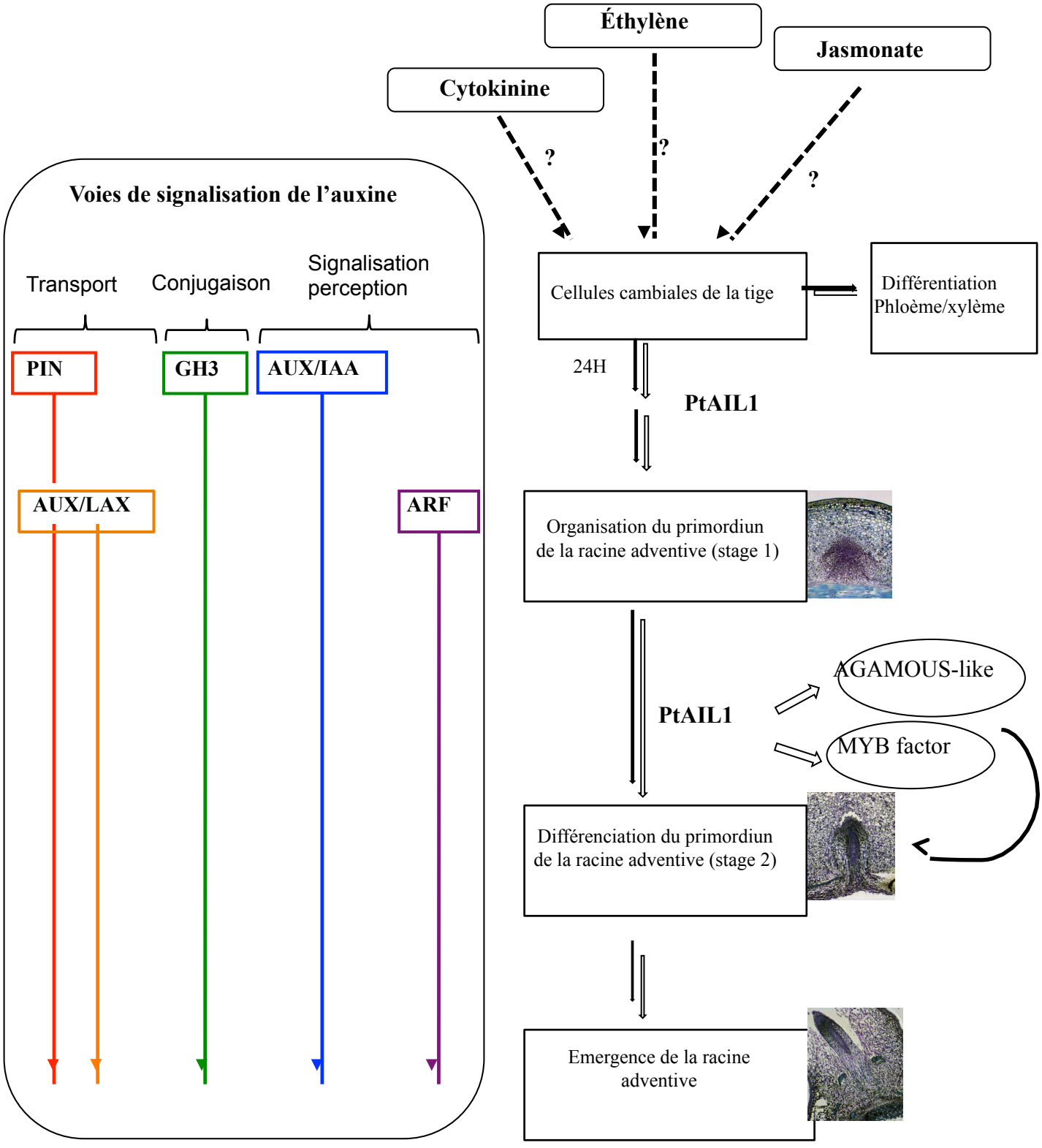


Figure 34 : Schéma du développement de la racine adventive et des gènes potentiellement impliqués chez le peuplier. Ce processus est accompagné par une augmentation de l'expression de PtAIL1 maintenu jusqu'à l'organisation du méristème racinaire. Cette augmentation de PtAIL1 induit une modulation de l'expression de *AGAMOUS-like (AGL16) et MYB36.* La formation de la racine adventive est accompagné d'une régulation des familles impliquées dans les voies auxiniques.

L'activité du promoteur *PtAIL1* est localisée dans le cambium (cellules supposées être les initiales des RAs du Peuplier), suggèrant le rôle de PtAIL1 dans le déroulement du cycle cellulaire de ce méristème. De manière intéressante, nos observations montrent que son domaine d'expression évolue au cours de la formation des RAs : seules les zones cambiales situées en périphérie des primordia expriment *PtAIL1*, ce qui laisse supposer une diminution de l'expression de *PtAIL1* lors de la différenciation cellulaire.

En conclusion, le facteur de transcription PtAIL1 est un facteur clef dans la formation de la racine adventive du Peuplier : il intervient dans un réseau de gènes dont *PtAGL16* et *PtMYB36.* Il régule l'activité cambiale et la différenciation cellulaire lors de la formation des RAs (Figure 34).

Toutefois nous avons peu d'informations sur la fonction et la régulation de ce gène. Il me semble particulièrement intéressant de poursuivre les recherches dans cette direction, en tentant de répondre à ces questions : Est-ce que PtAGL16 et PtMYB36 sont des cibles directes de PtAIL1 ? Interviennent ils en amont ou/et en aval de *PtAIL1* ? PtAIL1 a t'il une action rétroactive sur ces deux gènes?

Plusieurs études peuvent être envisagées :

(1) l'analyse de l'expression de *PtAGL16* et *PtMYB36* au cours de la formation de la racine adventive, en utilisant les plantes *35S::PtAIL1* et les lignées *RNAi*.

(2) la mise en évidence de *PtAGL16* et *PtMYB36* comme cible peut être réalisée par la technique de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).

(3) l'analyse moléculaire de l'activité du promoteur de *PtAIL1*

(4) l'analyse de la rhizogénèse adventive des lignées 35S et RNAi de *PtAGL16* et *PtMYB36*. Le modèle *A. thaliana*, pour lequel des lignées transgéniques sont accessibles pourraient être utilisées.

Nos analyses transcriptomiques de *P. trichocarpa* ont été réalisées à des stades d'organisation et de différenciation du primordium racinaire. Nous poursuivons nos recherches par l'étude de la régulation du transcriptome au niveau des cellules cambiales dans les étapes précoces de la rhizogénèse adventive, en utilisant la microdissection laser.

Ce travail s'inscrit dans le projet Kempe, mené par I. Perrone, en collaboration avec l'équipe de C. Bellini (UPSC).

2. L'implication de l'auxine dans la formation de la racine adventive du peuplier

L'analyse du transcriptome du peuplier à 24 h de la rhizogénèse adventive a permis de proposer un schéma de la régulation des voies auxiniques dans ces étapes précoces. Nous proposons que *PtPIN8* (orthologue de *AtPIN1*), intervenant dans le transport de l'auxine dans la tige serait à l'origine une accumulation de l'auxine à la base de la bouture. Cette accumulation d'auxine déclencherait l'expression de gènes codant des protéines dont les PtGH3 (PtGH3.1 et PtGH3.2). Cette augmentation de la concentration auxinique également induirait aussi la transcription des gènes de la famille *AUX/IAA* (*PtIAA20.1*, *PtIAA29.2* et *PtIAA29.3*). L'ensemble de ces protéines participerait à l'initiation des racines adventives. Ces voies de signalisation auxinique restent très fortement régulées pendant les étapes de formation et de différenciation du primordium racinaire.

Ainsi, l'étude transcriptomique de la régulation de l'auxine suggère l'implication de la famille PtGH3 dans la rhizogénèse adventive, en ceci en relation avec les données obtenues sur *A. thaliana* (Sorin *et al*., 2005 et 2006). Des lignées de Peuplier *35S* et *RNAi* de *PtGH3* sont actuellement générées. Leur capacité à enraciner sera analysée.

Des études récentes (Krizek, 2011) suggèrent un lien entre AtANT et les voies de signalisation de l'auxine. Il serait donc intéressant de :

(1) doser l'auxine à la base des boutures transgéniques *PtAIL1* que nous disposons

(2) d'envisager l'étude la régulation de l'expression de l'orthologue de *PtAIL1*, *AtANT*, au cours de la rhizogénèse adventive, dans des lignées d'*A. thalania* dont l'expression de gènes, impliqués dans les voies de signalisation de l'auxine, est modulée.

Ces études nous permettront de décrypter les voies de régulation de PtAIL1.

L'auxine n'est pas la seule hormone régulant la formation des RAs (revue, Geiss *et al*., 2010). Une attention particulière pourrait être portée au groupe des jasmonates. Il a été précédemment mis en évidence que ces hormones interviendraient au cours de la formation de la racine adventive du Pétunia (Akhami *et al.*, 2008). Par ailleurs, il est supposé que les jasmonates réguleraient l'expression des GH3. Une analyse des gènes, impliqués dans la synthèse et la signalisation des jamonates est en cours, à partir des données transcriptomiques.

Références bibliographiques

Ahkami AH, *et al.* (2009) Molecular physiology of adventitious root formation in Petunia hybrida cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist* 181(3):613-625.

Aida M, *et al.* (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119(1):109-120

Alonso JM, *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301(5633):653-657.

Bastien, JC, N Marron N. et al. (2011) "Les systèmes dédiés à la production de bois d'énergie En France " travaux de recherche et projets En cours. Rev. for. Fr. LXIII 2-2011

Benkova E *et al.* (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115(5) : 591-602.

Berleth T & Sachs T (2001) Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr Opin Plant Biol* 4(1):57-62.

Blilou I, *et al.* (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433(7021):39-44.

Boerjan W, *et al.* (1995) SUPERROOT, A RECESSIVE MUTATION IN ARABIDOPSIS, CONFERS AUXIN OVERPRODUCTION. *Plant Cell* 7(9):1405-1419.

Bollmark M & Eliasson L (1986) EFFECTS OF EXOGENOUS CYTOKININS ON ROOT-FORMATION IN PEA CUTTINGS. *Physiologia Plantarum* 68(4):662-666.

Boutilier K, *et al.* (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14(8):1737-1749 .

Bonduelle P. (1989) Poplar silviculture in short rotation coppices. Biomass production. *Informations-Foret, Afocel-Armef* 2 1-39

Brinker M, *et al.* (2004) Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in Pinus contorta (1[w]). *Plant Physiology* 135(3):1526-1539.

Busov VB, *et al.* (2004) An auxin-inducible gene from loblolly pine (Pinus taeda L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. *Planta* 218(6):916-927.

Busov VB, Yordanov YS et Meilan R. (2009) "*Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications* ". Edited by K. Niemi et C. Scagel : 85-104

Busov VB, Strauss SH & Pilate G. (2010) "Genetics and genomics of populus". Edited by S. Jansson, R.P. Bhalerao et A.T. Groover. **8** : 113-134

Casimiro I, *et al.* (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* 13(4):843-852.

Chardenon (1982) *Le peuplier aujourd'hui et demain* (idf).

Cho SK, Ryu MY, Song C, Kwak JM, & Kim WT (2008) Arabidopsis PUB22 and PUB23 are homologous U-box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *Plant Cell* 20(7):1899-1914.

Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, & Klee HJ (1999) Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology* 121(1):53-59.

Coleman WK, Huxter TJ, Reid DM, & Thorpe TA (1980) ETHYLENE AS AN ENDOGENOUS INHIBITOR OF ROOT REGENERATION IN TOMATO LEAF-DISKS CULTURED INVITRO. *Physiologia Plantarum* 48(4):519-525.

Confaloneieri M, Balestrazzi A, Bosoffi S, Carbonera D (2003) In vitro culture and genetic engineering of Populus spp : Synergy for forest tree improvment. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72 : 109-138

Delarue M, Prinsen E, Van Onckelen H, Caboche M, & Bellini C (1998) Sur2 mutations of Arabidopsis thaliana define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant Journal* 14(5):603-611.

Doerner P (2000) Plant stem cells: The only constant thing is change. *Current Biology* 10(22):R826-R829.

Dowkiw, A**.**(2003). « l'analyse génétique de la résistance et de la tolérance des peupliers hybrides aux rouilles » Thèse de doctorat

Dubois LAM, Vries DPd, & De Vries DP (1988) The effect of cytokinin and auxin on the sprouting and rooting of 'Amanda' rose softwood cuttings. *Acta Horticulturae* (226, vol. II):455-464.

Eckenwalder JE (1996) in *"Biology of Populus and its implication for management and conservation"*, eds Steller RF, Bradshaw HD Jr., Heilman PE, and Hinckley TM (NRC Reserch Press, Ottawa), pp7-32

Elliott RC, *et al.* (1996) AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 8(2):155-168.

Ermel FF, *et al.* (2000) Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta* 211(4):563-574.

Geiss G, L Gutierrez L and Bellini C. (2010). "*Root development* ". Annual Plant reviews, Edited by T. Beeckman **37** : 127-147

Felten J*, et al.* (2009) The ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor stimulates lateral root formation in poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151(4):1991-2005

Friml J & Palme K (2002) Polar auxin transport - old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* 49(3-4):273-284.

Galinha C*, et al.* (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449(7165):1053-1057.

Guerrero JR, Garrido G, Acosta M, & Sanchez-Bravo J (1999) Influence of 2,3,5-triiodobenzoic acid and 1-N-naphthylphthalamic acid on indoleacetic acid transport in carnation cuttings: Relationship with rooting. *Journal of Plant Growth Regulation* 18(4):183-190.

Gutierrez L*, et al.* (2009) Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *Plant Cell* 21(10):3119-3132.

Hao D, Ohme-Takagi M, & Sarai A (1998) Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant.) *J Biol Chem* 273(41):26857-26861.

Hausman JF, Kevers C, & Gaspar T (1995) AUXIN-POLYAMINE INTERACTION IN THE CONTROL OF THE ROOTING INDUCTIVE PHASE OF POPLAR SHOOTS IN-VITRO. *Plant Science* 110(1):63-71.

Heloir MC, Kevers C, Hausman JF, & Gaspar T (1996) Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of in-vitro-propagated walnut shoots. *Tree Physiology* 16(5):515-519.

Herr JR (2011) Bioenergy from trees. *New Phytologist* 192(2):313-315.

Hu YX, Wang YH, Liu XF, & Li JY (2004) Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research* 14(1):8-15.

Imin N, Nizamidin M, Wu T, & Rolfe BG (2007) Factors involved in root formation in Medicago truncatula. *J Exp Bot* 58(3):439-451

Inukai Y*, et al.* (2005) Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17(5):1387-1396.

Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M, & Okamuro JK (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 6(9):1211-1225.

Kalluri UC, DiFazio SP, Brunner AM, & Tuskan GA (2007) Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in Populus trichocarpa. *Bmc Plant Biology* 7.

Kang J, Mizukami Y, Wang H, Fowke L, & Dengler NG (2007) Modification of cell proliferation patterns alters leaf vein architecture in Arabidopsis thaliana. Planta 226(5):1207-1218.

Karlberg A, Bako L, & Bhalerao RP (2011) Short Day-Mediated Cessation of Growth Requires the Downregulation of AINTEGUMENTALIKE1 Transcription Factor in Hybrid Aspen. *PLoS Genet* 7(11):e1002361.

Kim S, Soltis PS, Wall K, & Soltis DE (2006) Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Mol Biol Evol* 23(1):107-120.

Kitomi Y*, et al.* (2011) The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOTLESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant J* 67(3):472-484.

Kitomi, Y., H. Kitano et al., (2011) Molecular mechanism of crown root initiation and the different mechanisms between crown root and radicle in rice. *Plant Signal Behav*. 6(9) : 1-3

Klucher KM, Chow H, Reiser L, & Fischer RL (1996) The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 8(2):137-153.

Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Encelot N, & Martin F (2003) The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. *FEBS Lett* 542(1-3):37-41.

Konishi M & Sugiyama M (2003) Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Development* 130(23):5637-5647.

Krizek BA (2011) Auxin regulation of Arabidopsis flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. *J Exp Bot* 62(10):3311-3319.

Krizek BA (2009) Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Curr Opin Plant Biol* 12(1):17-22.

Labbe J*, et al.* (2010) Identification of quantitative trait loci affecting ectomycorrhizal symbiosis in an interspecific F(1) poplar cross and differential expression of genes in ectomycorrhizas of the two parents: Populus deltoides and Populus trichocarpa. *Tree*

Genetics & Genomes 7(3):617-627.

Krecek P. *et al*. (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. Genome Biol. 2009;10(12):249.

Leple JC *et al*. (1992) Transgenic poplars : Expression of chimeric genes using four differnet constructs. *Plant Cell Rep* 11 : 137-141

Li M-Y, Cao Z-Y, Shen W-B, & Cui J (2011) Molecular cloning and expression of a cucumber (Cucumis sativus L.) heme oxygenase-1 gene, CsHO1, which is involved in adventitious root formation. *Gene* 486(1-2):47-55.

Li S-W, Xue L, Xu S, Feng H, & An L (2009) Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 65(1):63-71.

Lindroth AM*, et al.* (2001) Two S-adenosylmethionine synthetase-encoding genes differentially expressed during adventitious root development in Pinus contorta. *Plant Molecular Biology* 46(3):335-346.

Liu HJ*, et al.* (2005) ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant Journal* 43(1):47-56.

Ludwig-Muller J, Vertocnik A, & Town CD (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on Arabidopsis stem segments. *Journal of Experimental Botany* 56(418):2095-2105.

Luijten M. et R. Heidstra (2010). « Arabidopsis root development ». Annual Plant reviews, Edited by T. Beeckman **37** : 127-147

Ma CP, Strauss SH, & Meilan R (2004) Agrobacterium-mediated transformation of the genome-sequenced poplar clone, Nisqually-1 (Populus trichocarpa). *Plant Molecular Biology Reporter* 22(3):311-312.

Magnani E, Sjolander K, & Hake S (2004) From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* 16(9):2265-2277.

Martin F*, et al.* (2008) The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452(7183):88-U87.

Merret R, *et al* (2010) Monitoring the regulation of gene expression in a growing organ using a fluid mechanic formalism. *BMC Biol* 8:18

Mizukami Y & Fischer RL (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):942-947.

Mravek J *et al* (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. Nature 59(7250):1136-40

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, & Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* 140(2):411-432.

Negi S, Sukumar P, Liu X, Cohen JD, & Muday GK (Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *Plant J* 61(1):3-15.

Nole-Wilson S, Azhakanandam S, & Franks RG (2010) Polar auxin transport together with aintegumenta and revoluta coordinate early Arabidopsis gynoecium development. *Dev Biol* 346(2):181-195.

Nole-Wilson S, Tranby TL, & Krizek BA (2005) AINTEGUMENTA-like (AIL) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Mol Biol* 57(5):613-628.

Okamuro JK, Caster B, Villarroel R, Van Montagu M, & Jofuku KD (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):7076-7081.

Ozawa S, Yasutani I, Fukuda H, Komamine A, & Sugiyama M (1998) Organogenic responses in tissue culture of srd mutants of Arabidopsis thaliana. *Development* 125(1):135-142.

Pagnussat GC, Lanteri ML, & Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 132(3):1241-1248.

Parsons TJ, Sinkar VP, Stettler RF, Nester EW, & Gordon MP (1986) TRANSFORMATION OF POPLAR BY AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS. *Bio-Technology* 4(6):533-536.

Petrasek J & Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136(16):2675-2688.

Phatak SC, Jaworski CA, & Liptay A (1981) FLOWERING AND ADVENTITIOUS ROOT-GROWTH OF TOMATO CULTIVARS AS INFLUENCED BY ETHEPHON. *Hortscience* 16(2):181-182.

Pop TI, Pamfil D, & Bellini C (2011) Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Na.* 39(1):307-316.

Rademacher EH*, et al.* (2011) A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 68(4):597-606.

Rameau JC, Mansion D, & Dumé G (2005) *Flore forestière Française, guide écologique illustré* (idf).

Ramirez-Carvajal GA, Morse AM, Dervinis C, & Davis JM (2009) The Cytokinin Type-B Response Regulator PtRR13 Is a Negative Regulator of Adventitious Root Development in Populus. *Plant Physiology* 150(2):759-771.

Ramirez-Carvajal GA et Davis JM, 2010. Cutting to the base: Identifying regulators of adventitious rooting.Plant Signal Behav., 5, 281-3.

Riechmann JL & Meyerowitz EM (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry* 379(6):633-646.

Roy C. (2007) Formation Biomasse 2007 à l'attention des agents des DRAF et DDAF, Module 1 : Enjeux et contexte du développement des valorisations non alimentaire de la biomasse, item 4 : Prévisions et prospective. Paris, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche

Roy SK & Choudhury B (1972) Studies on physico-chemical characteristics of a few varieties of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) in relation to processing. *Journal of Food Science and Technology, India* 9(3):151-153.

Rubin EM (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454(7206):841-845.

Ruedell, C.M., J. Schwambach et al. (2009). "*Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications* ". Edited by K. Niemi et C. Scagel, p337-358

Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, & Scheres B (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes & Development* 17(3):354-358.

Sakuma Y*, et al.* (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(3):998-1009.

Sanchez C*, et al.* (2007) Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree Physiology* 27(10):1459-1470.

Sbabou L*, et al.* (2010) Molecular analysis of SCARECROW genes expressed in white lupin cluster roots. *Journal of Experimental Botany* 61(5):1351-1363.

Schrader J, et al (2004) A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial Stem cell identity. Plant Cell 16:2278-2292

Schruff MC*, et al.* (2006) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133(2):251-261.

Schwambach J, Fadanelli C, & Fett-Neto AG (2005) Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of Eucalyptus globulus. *Tree Physiology* 25(4):487-494.

Sedira M, Butler E, Gallagher T, & Welander M (2005) Verification of auxin-induced gene expression during adventitious rooting in rolB-transformed and untransformed apple Jork 9. *Plant Science* 168(5):1193-1198.

Sitbon F*, et al.* (1992) Transgenic Tobacco Plants Coexpressing the Agrobacterium tumefaciens iaaM and iaaH Genes Display Altered Growth and Indoleacetic Acid Metabolism. *Plant Physiol* 99(3):1062-1069.

Smith DL & Fedoroff NV (1995) LRP1, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of arabidopsis. *Plant Cell* 7(6):735-745.

Smith SE et DJ Read (2008). Mycorrhizal symbiosis. (Academic Press).

Smith DR & Thorpe TA (1975) ROOT INITIATION IN CUTTINGS OF PINUS-RADIATA SEEDLINGS .1. DEVELOPMENTAL SEQUENCE. *Journal of Experimental Botany* 26(91):184-&.

Sohn KH, Lee SC, Jung HW, Hong JK, & Hwang BK (2006) Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol Biol* 61(6):897-915.

Song J, Lu S, Chen Z-Z, Lourenco R, & Chiang VL (2006) Genetic transformation of Populus trichocarpa genotype Nisqually-1: A functional genomic tool for woody plants. *Plant and Cell Physiology* 47(11):1582-1589.

Sorin C*, et al.* (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *Plant Cell* 17(5):1343-1359.

Sorin C*, et al.* (2006) Proteomic analysis of different mutant genotypes of Arabidopsis led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development. *Plant Physiol* 140(1):349-364.

Steffens B, Wang JX, & Sauter M (2006) Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta* 223(3):604-612.

Steinmann T*, et al.* (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286(5438):316-318.

Terpstra, I. and R. Heidstra (2009). "Stem cells: The root of all cells." Semin Cell Dev Biol 20(9): 1089-96.

Thomas P, Lee MM, & Schiefelbein J (2003) Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (Vitis vinifera L.) stem cuttings. *Plant Cell and Environment* 26(9):1497-1504.

Thomashow MF (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599.

Torrey JG (1976) ROOT HORMONES AND PLANT-GROWTH. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 27:435-459.

Tromas A & Perrot-Rechenmann C (2010) Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies* 333(4):297-306.

Tuskan GA*, et al.* (2006) The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray). *Science* 313(5793):1596-1604.

Vanderkrieken WM, Breteler H, & Visser MHM (1992) UPTAKE AND METABOLISM OF INDOLEBUTYRIC ACID DURING ROOT-FORMATION ON MALUS MICROCUTTINGS. *Acta Botanica Neerlandica* 41(4):435-442.

Vanneste S & Friml J (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136(6):1005-1016.

Wang H*, et al.* (2011) OsSIZ1 Regulates the Vegetative Growth and Reproductive Development in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 29(2):411-417.

Werner T*, et al.* (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15(11):2532-2550.

Werner T, Motyka V, Strnad M, & Schmulling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(18):10487-10492.

Wessler SR (2005) Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain. *Trends in Plant Science* 10(2):54-56.

Woodward AW & Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95(5):707-735.

Wu B*, et al.* (2011) Over-expression of mango (Mangifera indica L.) MiARF2 inhibits root and hypocotyl growth of Arabidopsis. *Mol Biol Rep* 38(5):3189-3194.

Wuitschick JD, Lindstrom PR, Meyer AE, & Karrer KM (2004) Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in Tetrahymena thermophila have

APETELA2 DNA binding domains. *Eukaryotic Cell* 3(3):685-694.

Xu M, Zhu L, Shou HX, & Wu P (2005) A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant and Cell Physiology* 46(10):1674-1681.

Xuan W*, et al.* (2008) The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. *Plant Physiology* 148(2):881-893.

Yamaguchi-shinozaki K et Shinozaki K (1994) A NOVEL CIS-ACTING ELEMENT IN AN ARABIDOPSIS GENE IS INVOLVED IN RESPONSIVENESS TO DROUGHT, LOW-TEMPERATURE, OR HIGH-SALT STRESS. *Plant Cell* 6(2):251-264.

Yoon EK, Yang JH, & Lee WS (Auxin and Abscisic Acid Responses of Auxin Response Factor 3 in Arabidopsis Lateral Root Development. *J. Plant Biol.* 53(2):150-154.

Zalesny RS and Zalesny JA (2009) "*Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications* ". Edited by K. Niemi et C. Scagel p359-384

Zhao YD*, et al.* (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291(5502):306-309.

Zhou G, Taylor G, & Polle A (2011) FTIR-ATR-based prediction and modelling of lignin and energy contents reveals independent intra-specific variation of these traits in bioenergy poplars. *Plant Methods* 7.

Zhuang J*, et al.* (2008) Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in Populus trichocarpa. *Biochem Biophys Res Commun* 371(3):468-474 .

Zimmerman PW & Hitchcock AE (1948) Plant hormones. *Annual review of biochemistry* 17:601-626.

Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des racines adventives du Peuplier : rôle du facteur de transcription PtAIL1.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du projet européen ENERGYPOPLAR, dans lequel les chercheurs étudient les moyens d'améliorer les rendements de production de biomasse d'hybrides de Peuplier dans un système de sylviculture intensive afin d'obtenir une quantité de biomasse suffisante. La propagation clonale, utilisant des boutures, est un outil approprié dans la production rapide des peupliers sélectionnés. Une étape clé de cette propagation clonale est la formation de racines adventives. Dans ce contexte, un des objectifs de notre travail a été d'analyser la capacité à enraciner de plusieurs génotypes de peuplier sélectionnés. Les études que nous avons réalisées révèlent des disparités dans la capacité à enraciner suggérant que certains génotypes présentent des facilités à enraciner par rapport à d'autres.

Les mécanismes de la rhizogénèse adventive du peuplier sont encore peu connus. Le principal objectif de la thèse a été d'identifier des gènes clefs impliqués dans la rhizogenèse adventive du peuplier, plus précisément l'implication des facteurs de transcription (FT). Nous avons débuté, notre étude, par une analyse transcriptomique globale à différents stades de la formation de la racine adventive de *Populus trichocarpa*. Durant le développement de la racine adventive, le niveau des transcrits des familles PIN, GH3, AUX/IAA, AUX/LAX et ARF sont régulés suggérant l'implication des voies de signalisation de l'auxine.

De plus, cette analyse a révélé la régulation de l'expression de la famille de facteurs de transcription AP2/ERF, et plus particulièrement le membre *AIL1* qui présente un patron de régulation intéressant. Des études phénotypiques menées avec des mutants de Peuplier (35S::AIL1 et RNAi), dont l'expression d'*AIL1* est modifiée, indiquent une variation dans la formation des racines adventives et du nombre de racines adventives. Dans le but de décrypter le(s) réseau(x) de gènes associé(s) à l'expression de *PtAIL1*, nous avons réalisé une analyse transcriptomique visant à comparer les transcriptomes des plantes transgéniques et du sauvage. Cette analyse a permis de mettre en évidence des cibles potentielles de PtAIL1.

Mes résultats montrent clairement le rôle de PtAIL1 dans la formation des racines adventives et m'ont conduit à proposer un modèle hypothétique du réseau de gènes dans lequel AIL1 est impliqué.

Analysis of molecular mechanisms involved in adventitious root formation in poplar: The role of the *PtAIL1* transcription factor.

My thesis was part of the european project ENERGYPOPLAR aiming to improve biomass yield of poplar hybrids in a intensive forestry system. Clonal propagation, by use of cuttings, is a very powerful tool in the fast production of poplars. A key step of this process is the adventitious root formation. Therefore, I investigated the rooting behavior of several selected poplar genotypes. Differences in rooting capacity could be shown suggesting the existence of easy-to-root and difficult-to-root genotypes.

The molecular mechanisms of adventitious rooting in poplar are still poorly understood. The main goal of my thesis was to identify key genes involved in the adventitious rooting process in poplar, with particular interest in the role of transcription factors (TFs). An initial genome-wide transcript profiling of the different stages of adventitious root formation in *Populus trichocarpa* was carried-out. Auxin signaling seems to be involved in poplar adventitious root development, since the transcript level of several gene families like PIN, GH3, AUX/IAA, AUX/LAX and ARF were regulated.

Further, the AP2/ERF transcription factors family and in particular AIL1 were identified as important factors involved in adventitious rooting. The phenotypic characterization of poplar mutants with modified expression of the *AIL1* gene (35s::AIL1 and RNAi lines) showed differences in the chronology of adventitious root formation and in the number of roots formed. In order to investigate the pathway(s) associated with *PtAIL1* expression, transcriptomic analyses of transgenic lines and wild type were performed. Agamous-like and myb transcription factors were identified as possible candidate genes.

PtAIL1 is one of the key regulators involved in adventitious root formation in poplar.

Faculté des Sciences et Technologies,
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
En Biologie Végétale et Forestière

Par **Adeline Rigal**

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des racines adventives du Peuplier : rôle du facteur de transcription PtAIL1

Membres du Jury :

Rapporteurs :
Annabelle Déjardin, CR, HDR, INRA d'Orléans
Jacqueline Grima-Pettenati, DR, CNRS, Toulouse

Examinateurs :
Catherine Bellini, Professeur, UPSC, Suède
Nicolas Rouhier, Professeur, Nancy Université
Annegret Kohler, IR, INRA de Nancy (Co-directrice de thèse)
Valérie Legué, MdC, HDR, Nancy Université, (Co-directrice de thèse)

Unité Mixte de recherche 1136 INRA/UHP Interactions Arbres - Microorganismes
Centre INRA de Nancy - 54280 Champenoux

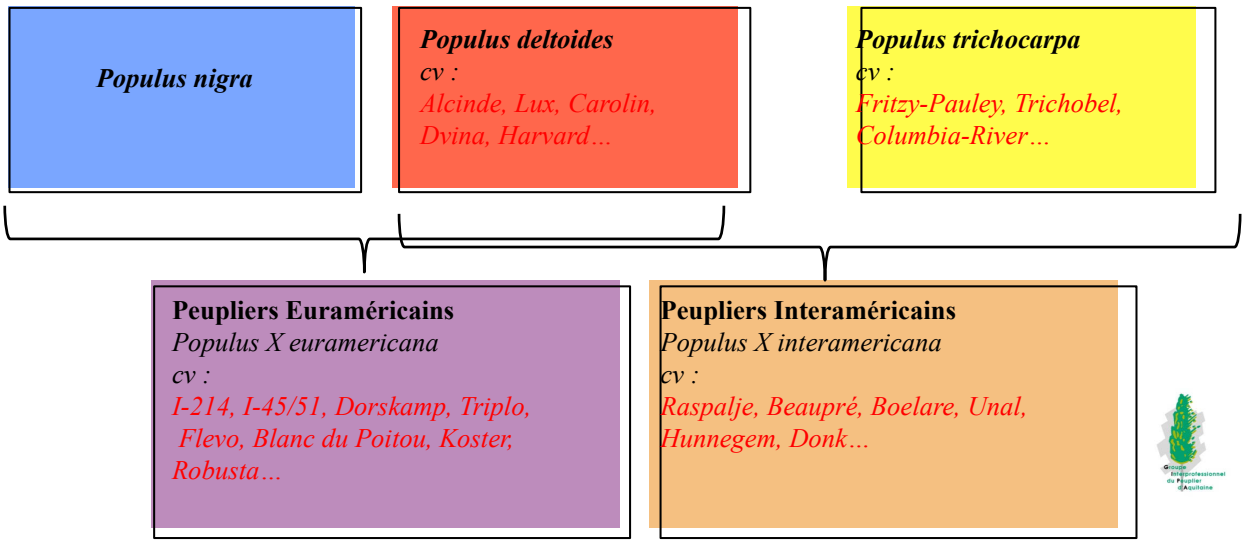


Figure 1 : Origine des différents cultivars, utilisés en France (GIPA, communication Lemaire H.)

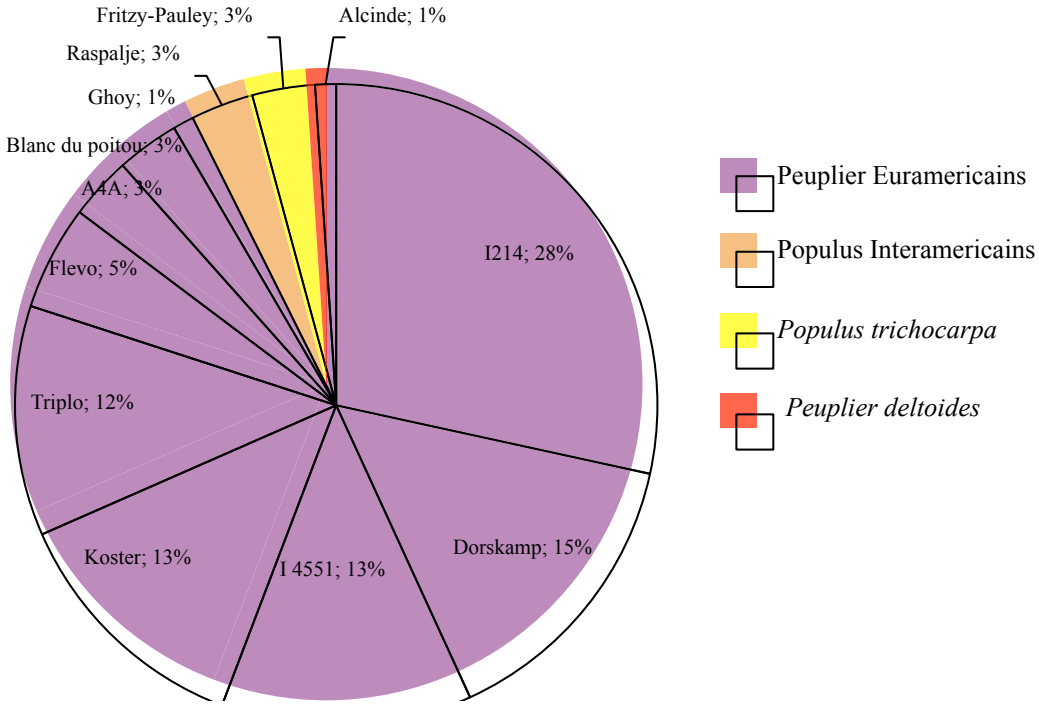


Figure 2 : Répartition par cultivar des ventes de plants de peuplier en France en 2006-2007 (DRAF/SERFOB Aquitaine 2008, Communication Lemaire H.).

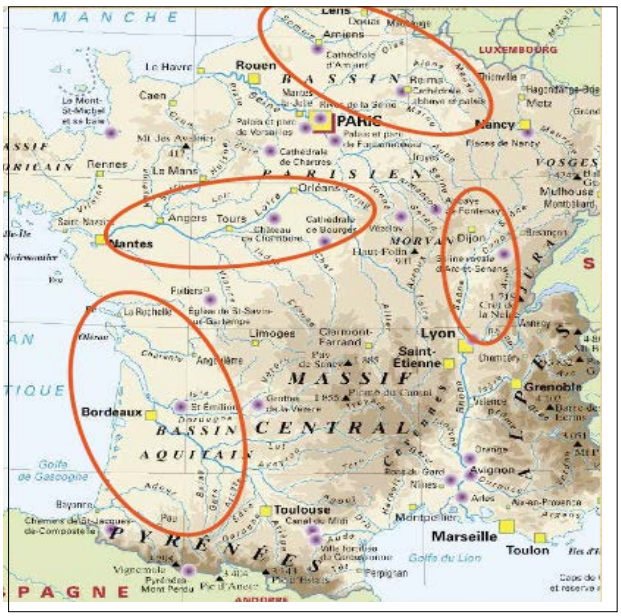


Figure 3 : Les grands bassins populicoles en France (FOGEFOR Dordogne Novembre 2009, communication Lemaire)

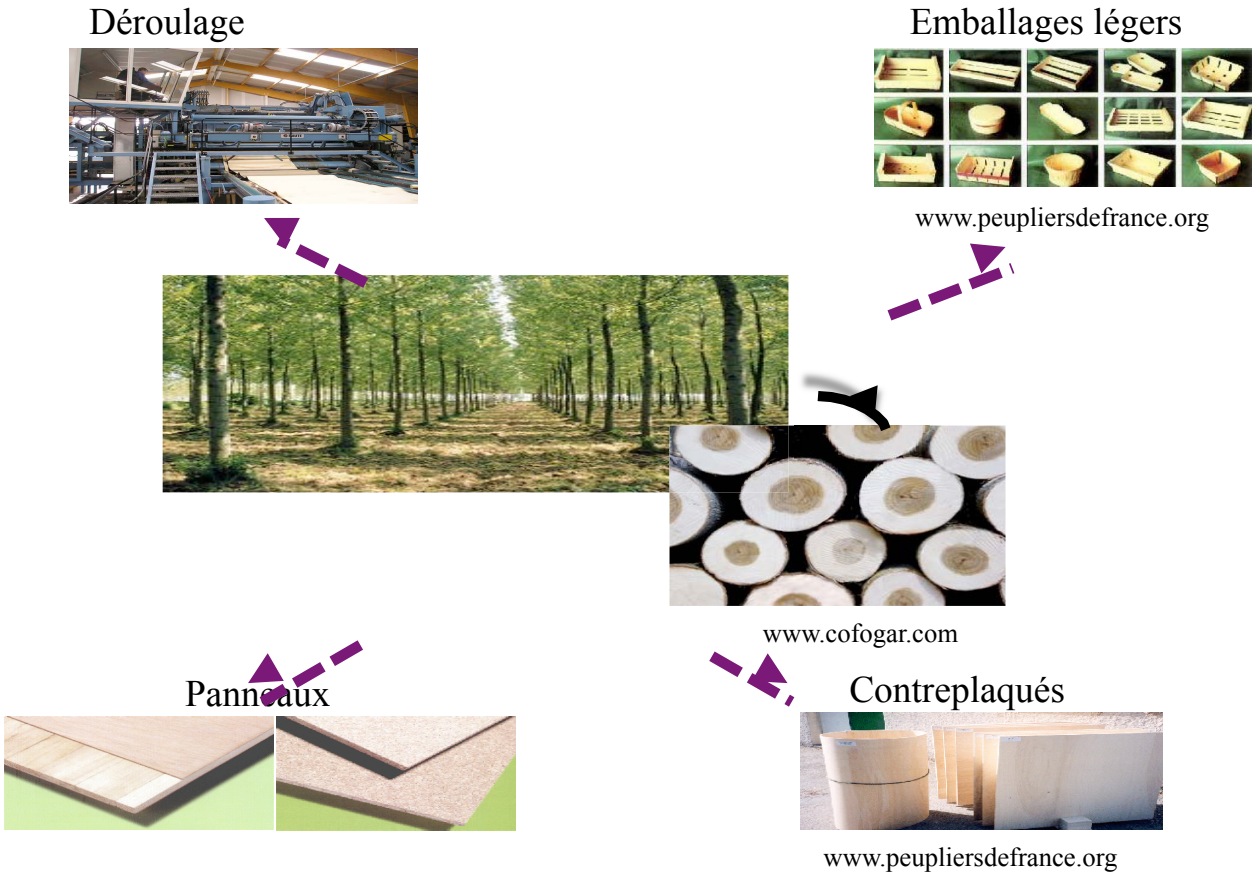


Figure 4 : Quelques utilisations du peuplier

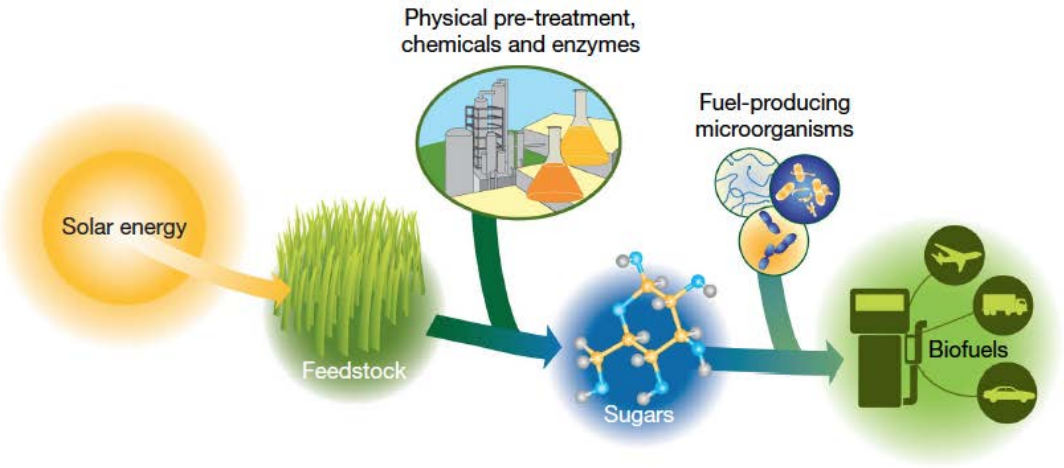


Figure 5 : La production de biocarburants implique des étapes complexe : à partir de la biomasse récoltée, les composants des parois cellulaires (riches en carbone) sont extraits puis sont transformés en sucres (essentiellement du glucose) par des pré-traitements physico-chimique et par le processus de saccharification. Les sucres obtenus sont ensuite convertis en biocarburants par fermentation microbienne (Rubin *et al.*, 2010)

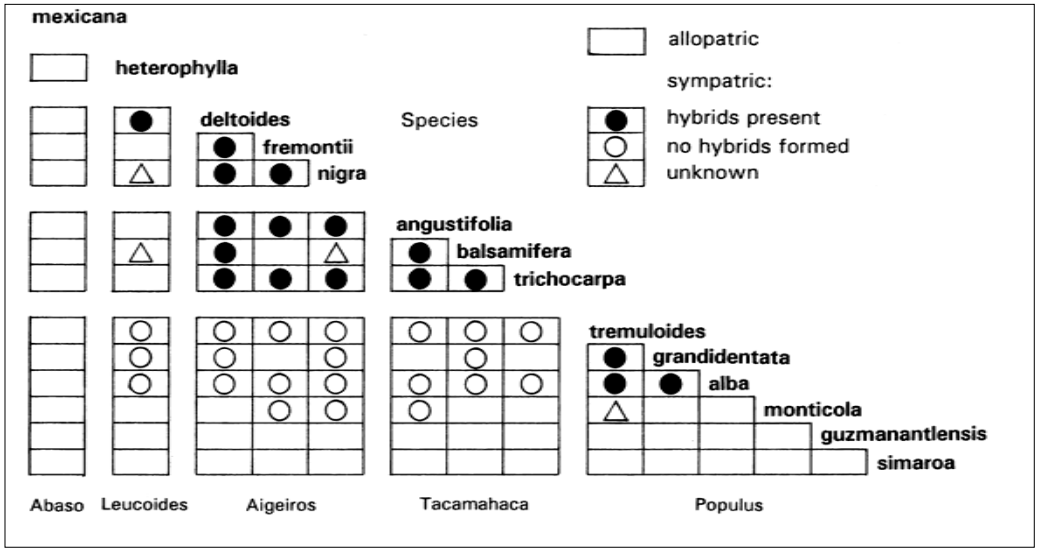


Figure 6 : Hybridations naturelles entre les différentes espèces de peupliers (D'après Eckenwalder, 1996).

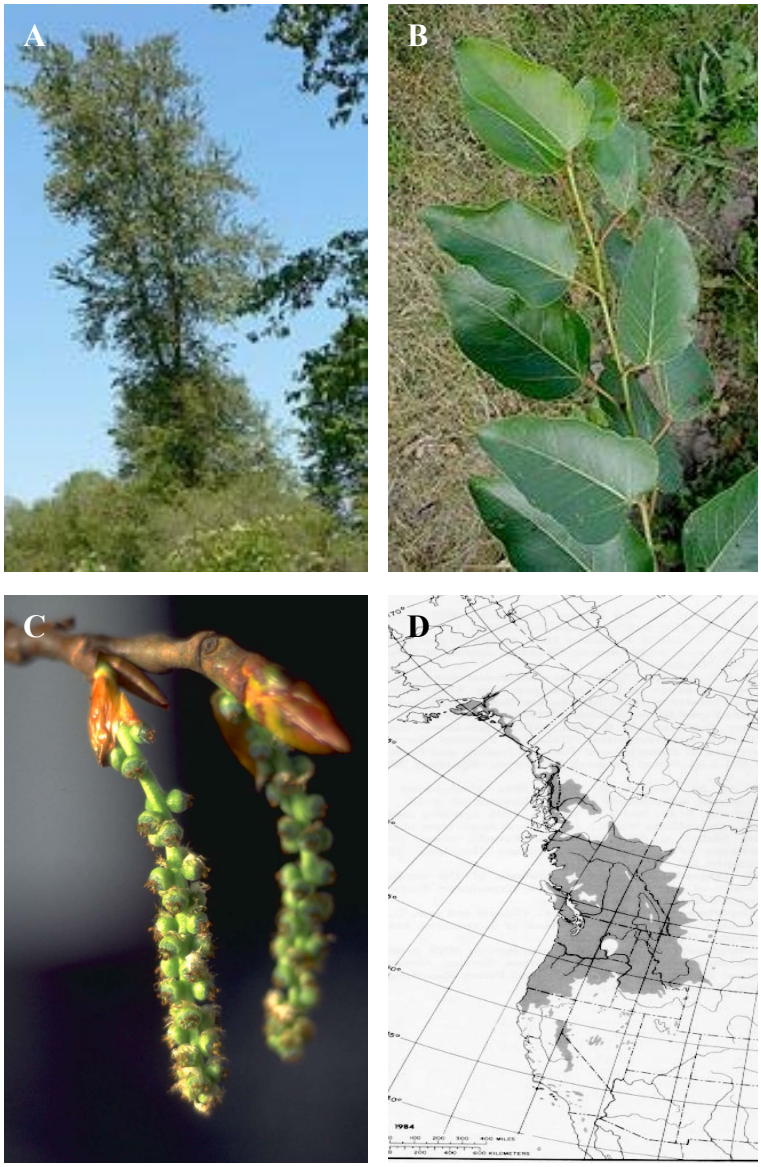
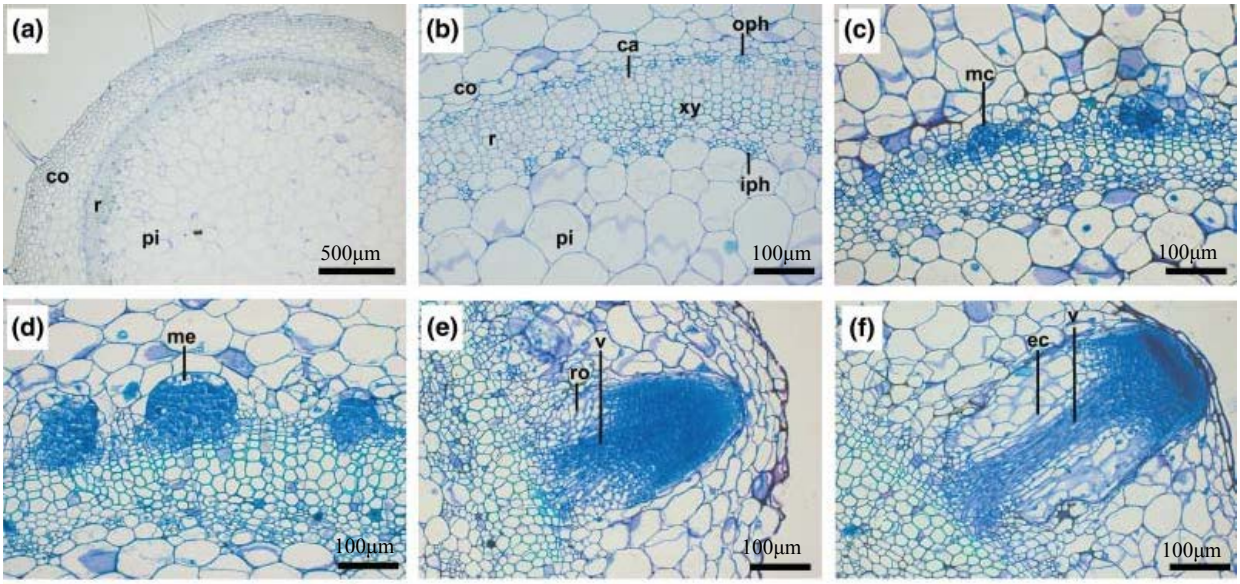


Figure 7 : A, vue d'ensemble de *Populus trichocarpa* (www.absoluteastronomy.com) ; B, ses feuilles (http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1321211) et C, ses chatons (http://academic.reed.edu/biology/courses/bio332/lacamas.html).
D, aire géographique naturelle de *P. trichocarpa* (www.na.fs.fed.us/pubs/silvics_manual/volume_2/populus/trichocarpa.htm).



Figure 9 : Les trois types de racines. A, racines adventives formées à partir d'une bouture de *P. trichocarpa*, cultivée en condition hydroponique. B, racines latérales (pointes de flèche) de *P. tremula* x *P. alba*, cultivé en condition *in vitro*. C, racine embryonnaire de *Pisum sativum* (www.sciencephoto.com)



Mise en place des primordia racinaires

Différenciation des primordia racinaires

Emergence de la racine adventive

Figure 10 : Etapes successives de la formation des racines adventives à partir des boutures de tiges de Pétunia (*Petunia hybrida*). A et B, anatomie de la tige au moment de l'excision. cortex (co), le parenchyme (pi) et les tissus conducteurs (r) avec le phloème externe (oph), le cambium (ca), le xylème (xy) et le phloème interne (iph). C, les premières cellules (mc) du futur méristème racinaire sont visibles après 3 j ; D, les premiers méristèmes racinaires (me) sont identifiés après 4 j ; E, les primordia racinaires se différencient avec la mise en place du cortex racinaire (ro) et des vaisseaux vasculaires (v) après 6 j ; F, après 8 j, la racine adventive émerge progressivement. Les vaisseaux vasculaires centraux (v) sont formés et sont entourés par des cellules allongées de la zone (Ahkami *et al.*, 2009).

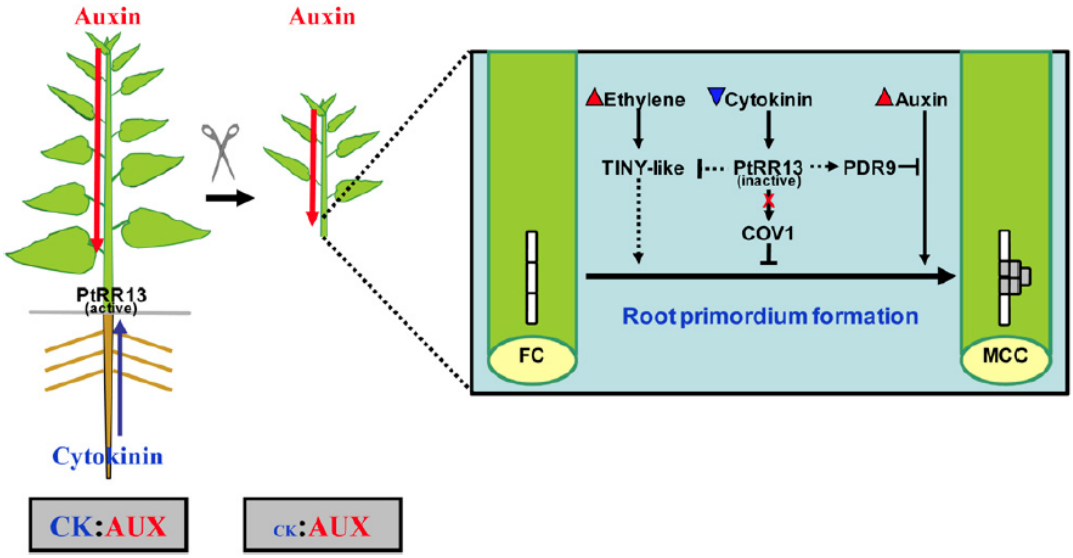


Figure 12 : Fonctions potentielles de PtRR13 dans le développement des racines adventives de peuplier, *P. tremula* x *P. alba* (Ramirez-Carvajal *et al*., 2010). L'équilibre du rapport cytokinine/auxine régule la croissance et le développement des plantes. L'excision perturberait cette balance hormonale en stimulant les voies de signalisation de l'auxine, en diminuant ainsi le rapport cytokinine/auxine. La formation des primordia des racines adventives implique la formation d'un groupe de cellules méristématiques (MCC) à partir des cellules initiales, devenues compétentes (FC). PtRR13 aurait un rôle central : (1) son induction activerait la transcription de *COV1,* régulateur négatif de la vascularisation. (2) Parallèlement la présence de PtRR13 perturberait la formation des primordia en interférant le gradient auxinique *via* la stimulation de la transcription de *PDR9*, codant une protéine de l'efflux d'auxine, et (3) *via* l'inhibition de l'expression du facteur de transcription *TINY-like* induit par l'éthylène et/ou le stress.

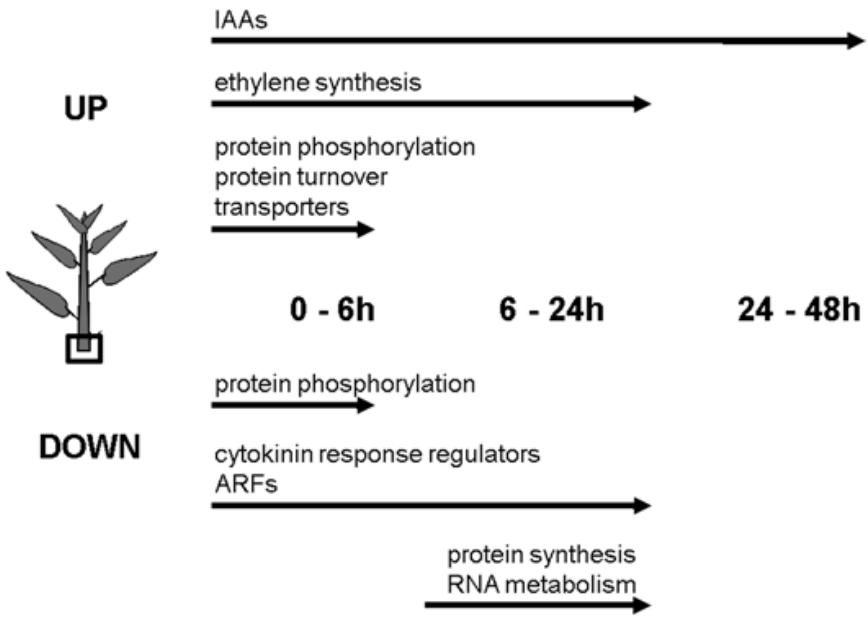


Figure 13 : Familles de gènes régulés significativement dans les étapes précoces de la formation des racines adventives du peuplier, *P. tremula* x *P. alba* (Ramirez-Carvajal *et al*., 2010)

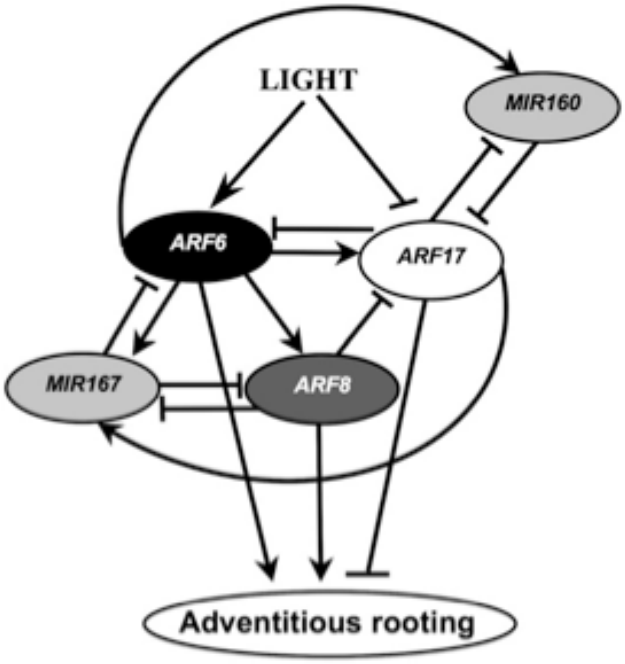
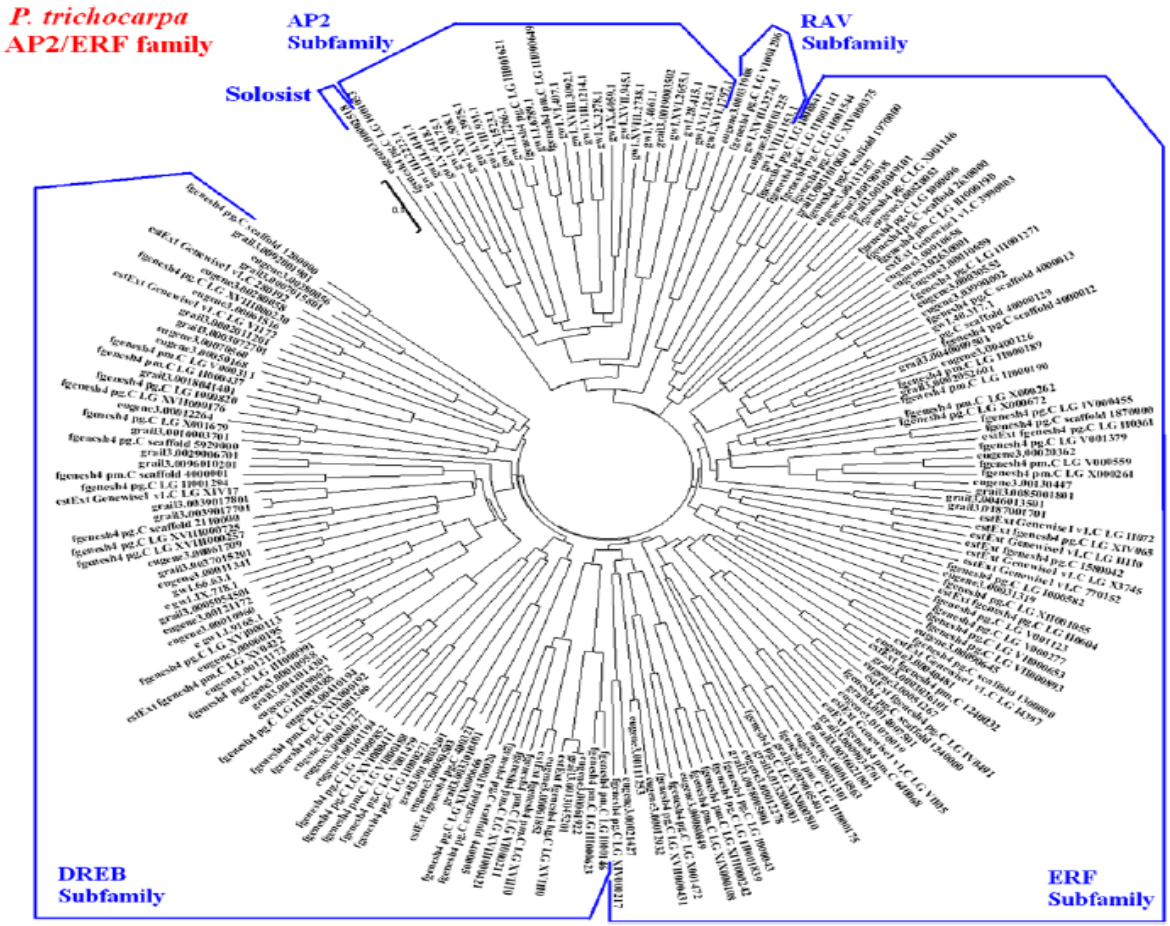


Figure 14 : Modèle intégrant les boucles de régulation des *ARF* et *miRNA* impliquées dans le contrôle de la racine adventive d'*A. thaliana*. L'initiation des racines adventives est contrôlée par une balance entre les transcrits des gènes *ARF* (*ARF6*, *ARF8* et *ARF17*), ayant des rôles d'activateur et/ou de d'inhibiteur. Les niveaux des transcrits des *ARFs* sont modulés par la présence de *MIR160* et *MIR170* (Gutierez *et al.*, 2009).

A



B

Summary of the AP2/ERF family between *P. trichocarpa* and *A. thaliana*

Plant		*P. trichocarpa*		*A. thaliana*	
Classification	Group	Number	Percent	Number	Percent
DREB subfamily	A1	6	3.00	6	4.14
	A2	18	9.00	8	5.52
	A3	2	1.00	1	0.70
	A4	26	13.00	16	11.03
	A5	14	7.00	16	11.03
	A6	11	5.50	9	6.21
	Total	77	38.50	56	38.63
ERF subfamily	B1	19	9.50	15	10.34
	B2	6	3.00	5	3.44
	B3	35	17.5	18	12.41
	B4	7	3.50	7	4.83
	B5	8	4.00	8	5.52
	B6	16	8.00	12	8.28
	Total	91	45.50	65	44.82
Ap2 subfamily		26	13.00	17	11.71
RAV subfamily		5	2.50	6	4.14
Solosist		1	0.50	1	0.70
Total		200		145	

The number of AP2/ERF family from *A. thaliana* was according to Sakuma et al. [18].

C

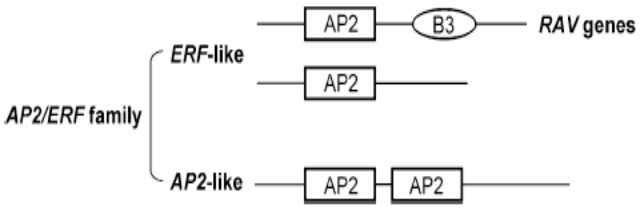


Figure 15 : La famille AP2(APETALA)/ERF(ETHYLENE RESPONSE FACTOR). A, arbre phylogénétique de la famille AP2/ERF pour *Populus trichocarpa ;* B, comparaison des groupes composant la famille AP2/ERF chez *A. thaliana* et chez *P. trichocarpa* (Zhuang *et al*. 2008). C, structure des différents groupes de la sous famille *AP2/ERF* (Kim *et al*. 2006).

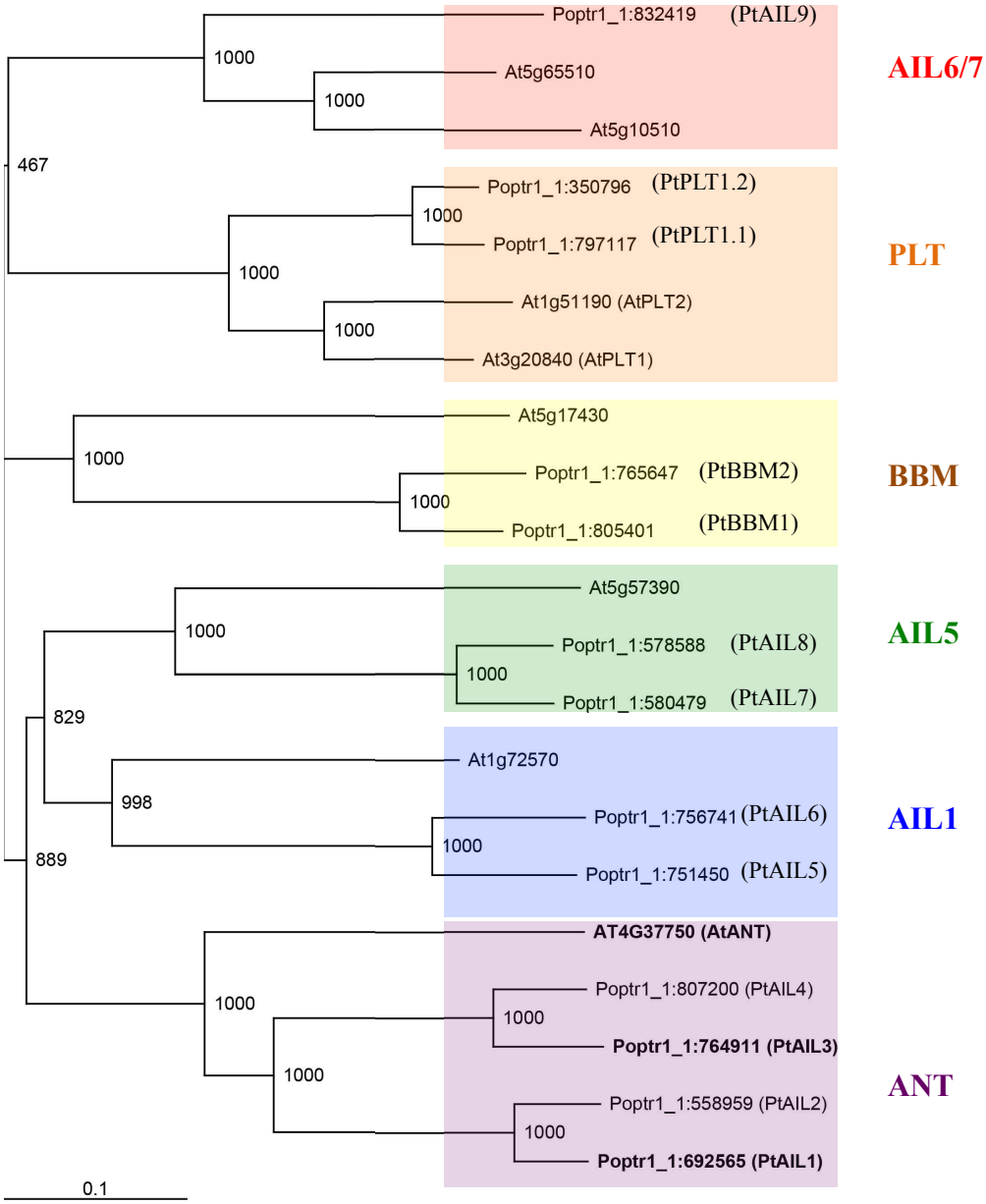


Figure 16 : Arbre phylogénétique des membres du groupe AINTEGUMENTA, réalisé à partir des séquences protéiques d'*Arabidopsis thaliana* (notées At) et de *P. trichocarpa* (notées Poptr 1_1:…et Pt). Selon Kalberg *et al*., 2009

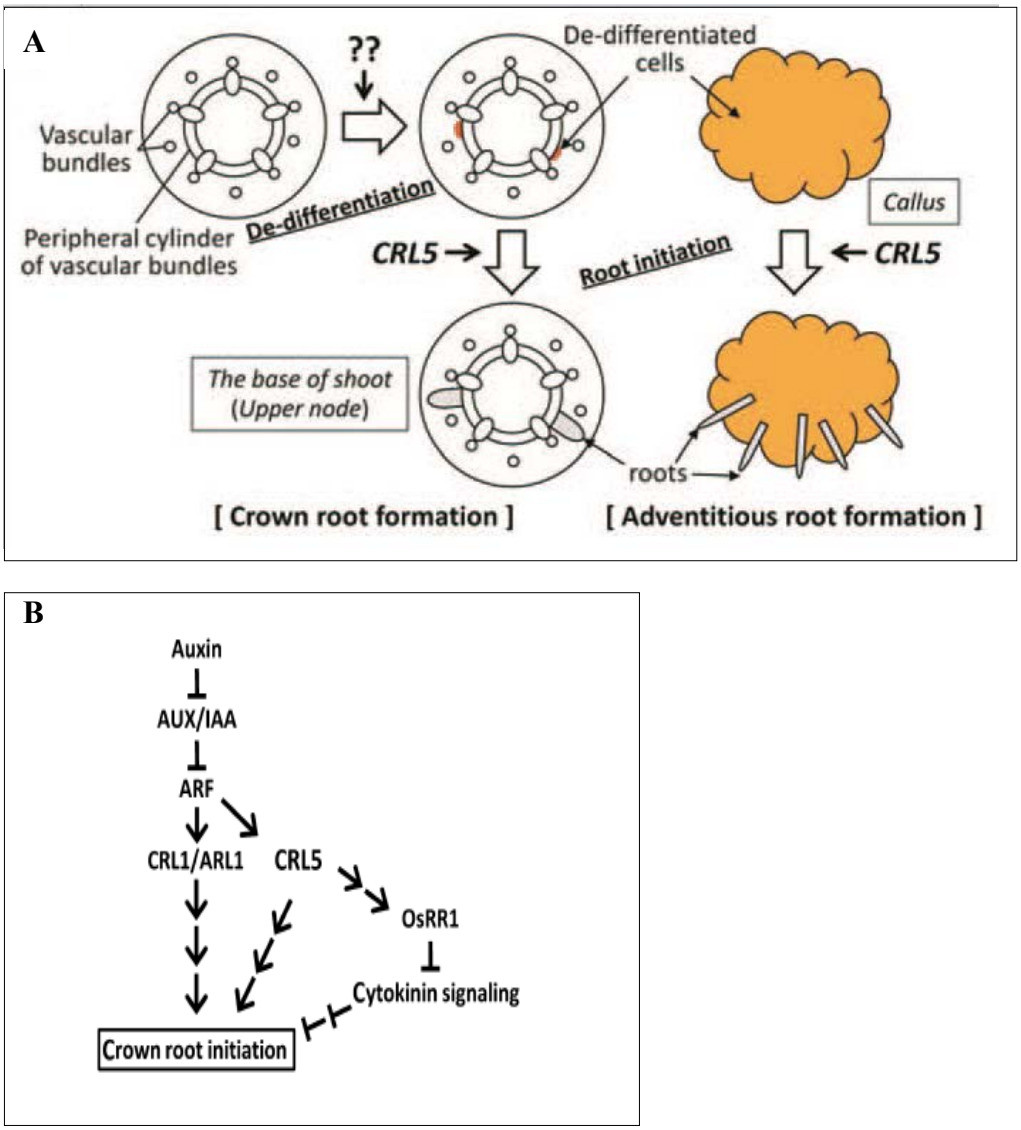


Figure 18 : A, Représentation schématique de la formation de la racine adventive du riz. La protéine CLR5 aurait un rôle dans les cellules en différentiation et induirait l'initiation des racines adventives (Kitomi Y. *et al.*, 2011b). B, Réseau de gènes dans lequel intervient CLR5, conduisant à l'initiation des racines adventives (Kitomi Y. *et al.*, 2011a)

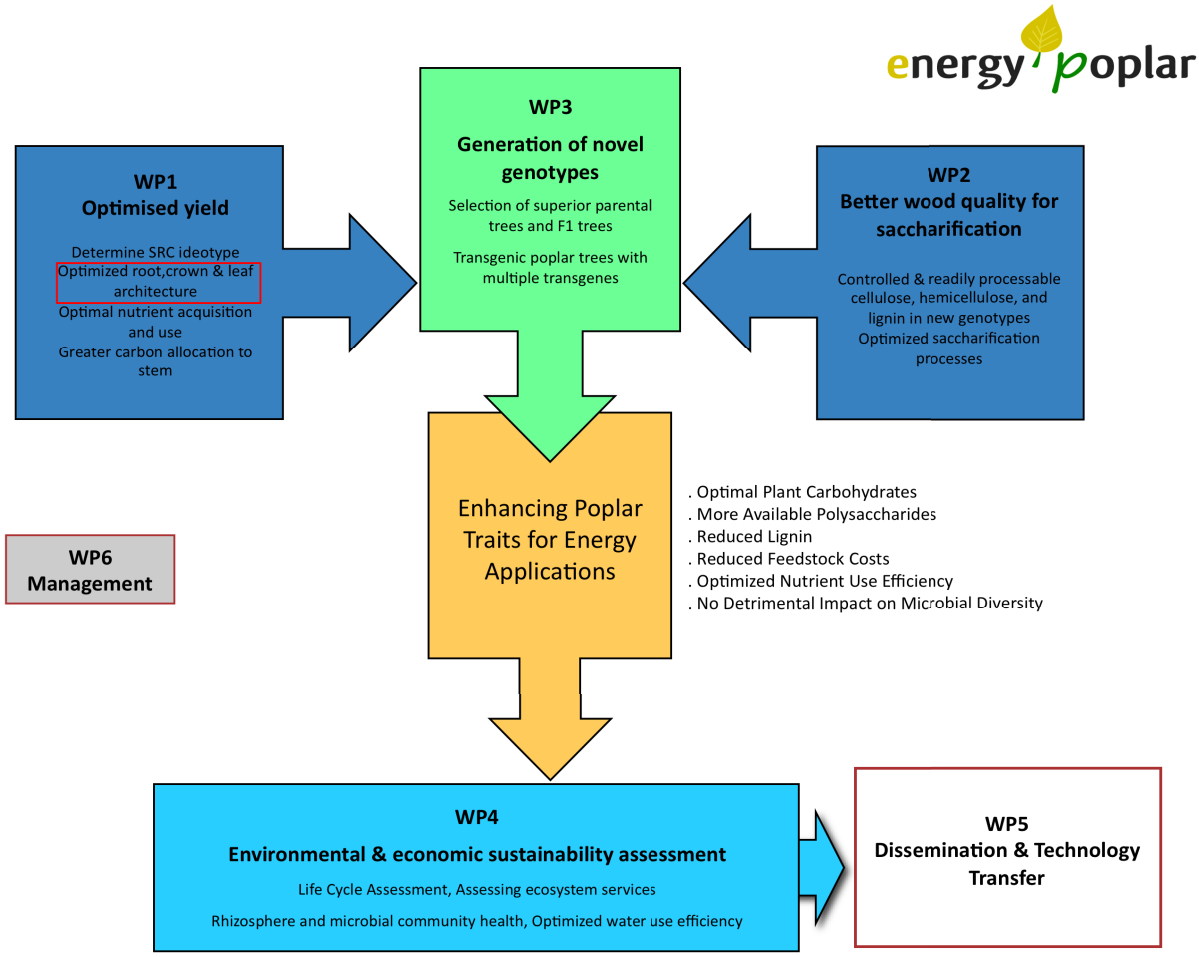


Figure 19 : Les principaux objectifs du projet EnergyPoplar, regroupés en Workpackages (WP). Notre équipe participe à la réalisation du WP1 en collaboration avec d'autres équipes du consortium. Le principal objectif de ce WP est de comprendre les déterminants génétiques et génomiques impliqués dans d'optimisation de la croissance (racinaire et aérienne) du peuplier.

Genotype	Mean % Myc
661300443	71
661300486	71
661300391	**81**
661300472	56
661300330	72
661300473	59
661300275	32
661300499	**9**
661300505	63
661300432	54
661300313	67
661300454	38
661300307	34
661300377	54
101-74 P. tricho	47
73028-62 P. del	12

Tableau 2 : Capacité à mycorhizer des génotypes issus du croisement *P. deltoides* x *P. trichocarpa,* en présence *de Laccaria bicolor.* Le pourcentage moyen de mycorhizes observées après 8 semaines d'inoculation est indiqué pour chacun des clones étudiés ainsi que pour les deux parents, *P. trichocarpa* (101-74) et *P. deltoides* (73028-62) (Labbé *et al.*, 2010). Les clones encadrés représentent ceux dont la capacité à enraciner a été étudiée dans le cadre de la thèse.

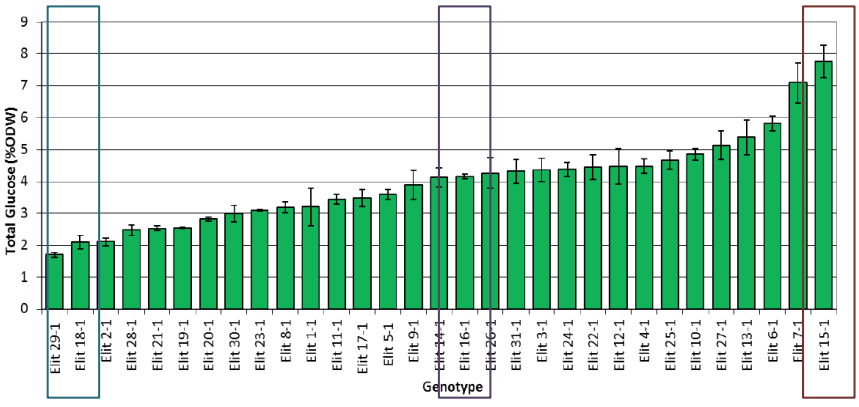


Figure 20 : Quantité en glucose obtenu après le processus de saccharification à partir de bois séché des clones issus du croisement *P. deltoides* x *P. nigra.* Les valeurs de glucose total correspondent au % de glucose total calculé par rapport au poids sec de départ. Les valeurs obtenues correspondent à une moyenne de 5 répétitions biologiques, avec leur barre d'erreur. Les clones encadrés représentent ceux dont la capacité à enraciner a été étudiée dans le cadre de la thèse. (EnergyPoplar, Deliverable D2.2)

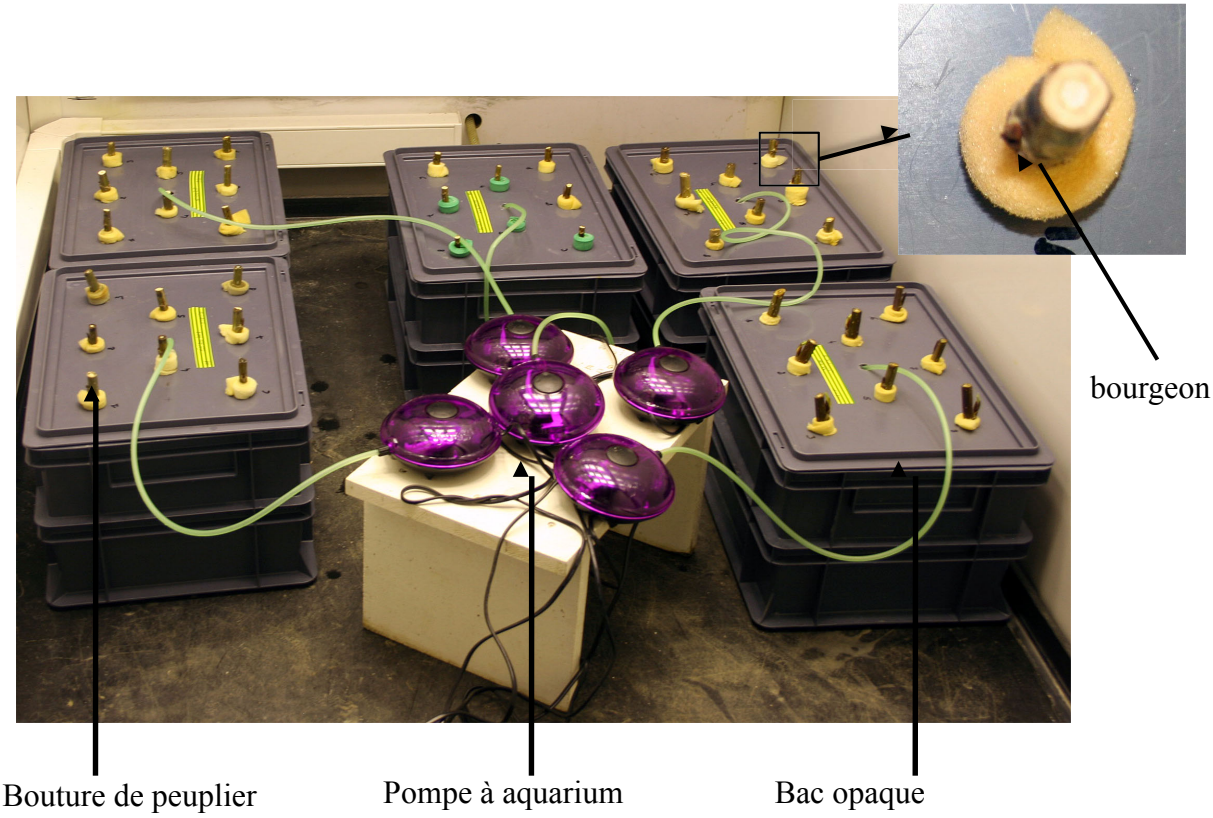


Figure 21 : Système de culture utilisé afin d'étudier la capacité d'enracinement des boutures de peuplier en conditions hydroponiques. L'extrémité des boutures est immergée dans un milieu nutritif (Merret *et al.,* 2009)

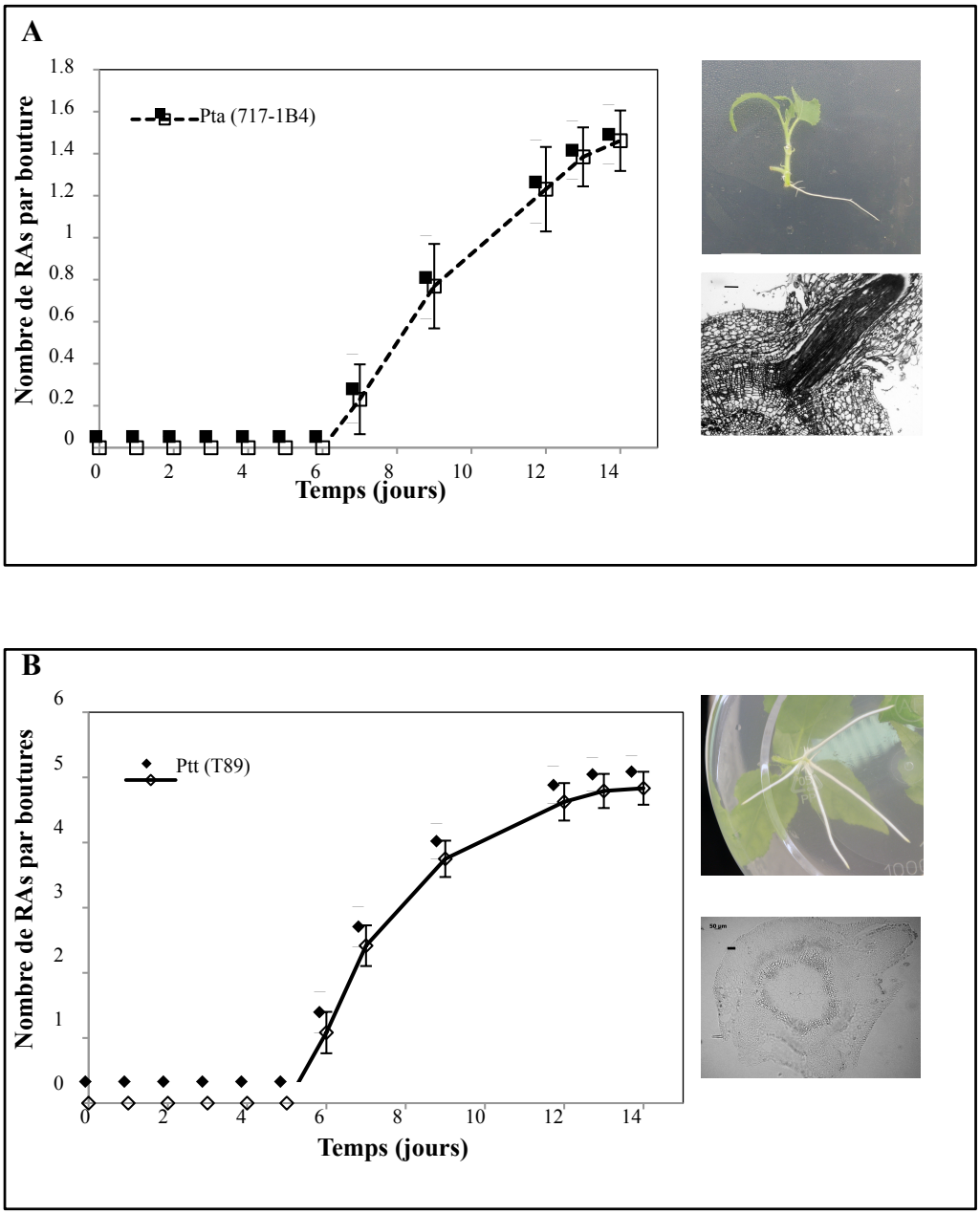


Figure 22 : Cinétique d'enracinement des boutures de *P. tremula* x *P. alba* (A*) et de P. tremula* x *P. tremuloides* (B) en condition *in vitro*. L'erreur standard est reportée pour chaque moyenne. A droite des deux graphiques, photos représentatives du système racinaire adventif après 12 jours de transfert (barre = 1cm) et d'une coupe transversale du tige au niveau de l'émergence des RAs, 10 jours après transfert (barre = 50µm)

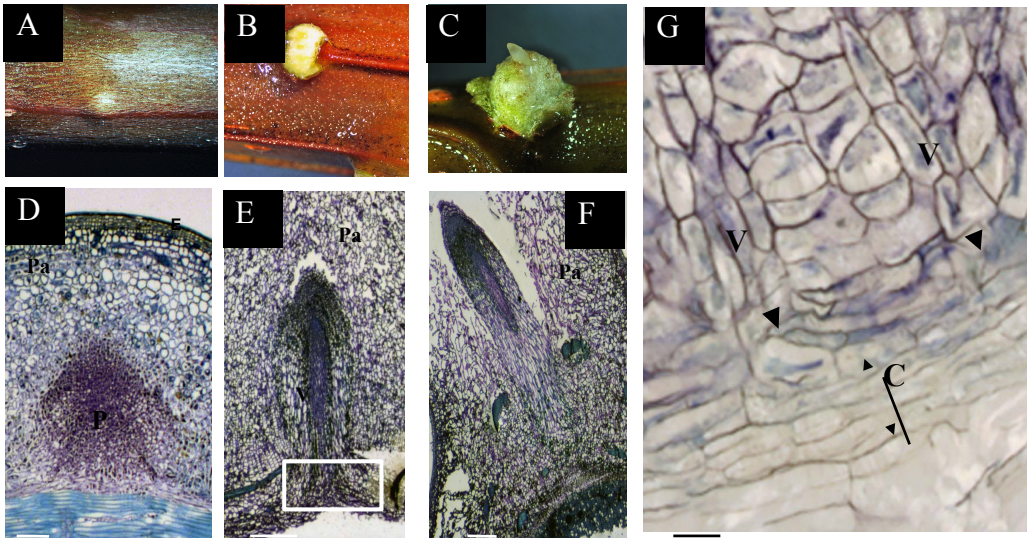


Fig. 1. Adventitious root development in *P. trichocarpa*. Images of the first visible stages (*A*-*C*) and representative longitudinal or cross sections (*D*-*G*) are shown. (*A*) Stage 1, intensely dividing cells forming the root primordium. (*B*) Stage 2, establishment of the main root tissues, as well as the vascular connections (v) of the incipient root with the pre-existing stem vasculature. (*C*) Stage 3, outgrowth and emergence of the adventitious root. (*D*) cross section of the stem at stage 1. (*E*) Longitudinal section of the newly formed adventitious root meristem at stage 2. (*F*) Longitudinal section of the emerging root at stage 3. (*G*) insert of image E, arrowhead illustrates the vascular connection in stage 2. c, cambium; Pa, parenchyma tissues; P, root primordium; Bars represent 1 mm for (*A*) to (*C*) and 100 µm in (*G*).

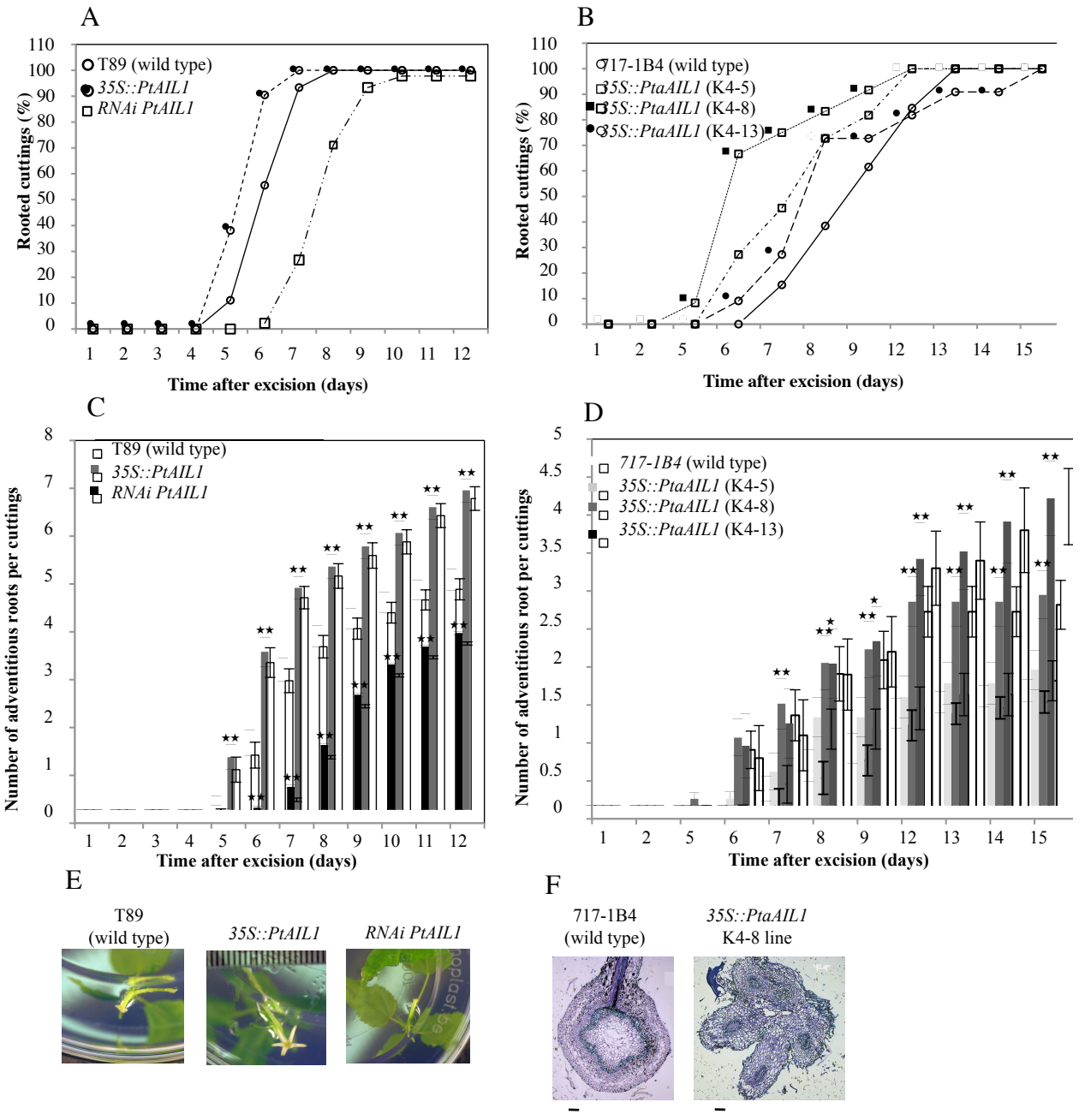


Fig. 3. Adventitious root development in transgenic lines of two poplar genotypes studied. (*A*,*B*) Percentage of rooted cuttings of (*A*) *P. tremula* x *P. tremuloides* T89 (wild type), *35::PtAIL1* overexpressor (AIL1oe line 3B) and RNAi *PtAIL1* (line 255-6) (*B*) of *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4 (wild type) and *PtaAIL1* overexpressing lines (K4-5, K4-8 and K4-13). (*C*,*D*) Number of adventitious roots in (*C*) *P. tremula* x *P. tremuloides* T89 cuttings (wild type), *35::PtAIL1* line (AIL1oe line 3B) and RNAi (line 255-6) (D) of *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4 (wild type) and *PtAIL1* overexpressing lines (K4-5, K4-8 and K4-13). (*E*) Representative images of the adventitious root systems of T89 (wild type), *35::PtAIL1* line (AIL1oe line 3B) and RNAi (line 255-6) after 6 days of transfer to rooting induction medium (Scale bar: 1 cm). (*F*) Representative Poplar stem cross-sections from 717-1B4 (wild type) and *PtAIL1* overexpressing lines (K4-8). Scale bar: 100µm.
Bars show SE; ★★ or ★ indicate significant differences compared to wild type plants as determined by a Student's t test ($P<0.01$ and $P<0.05$ respectively).

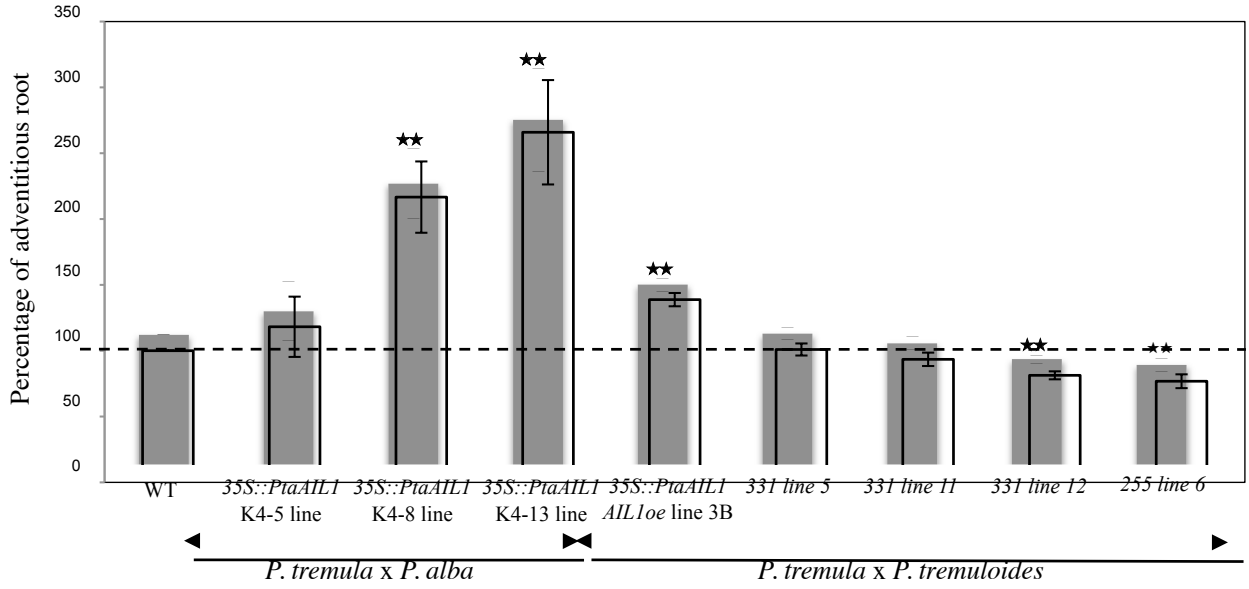
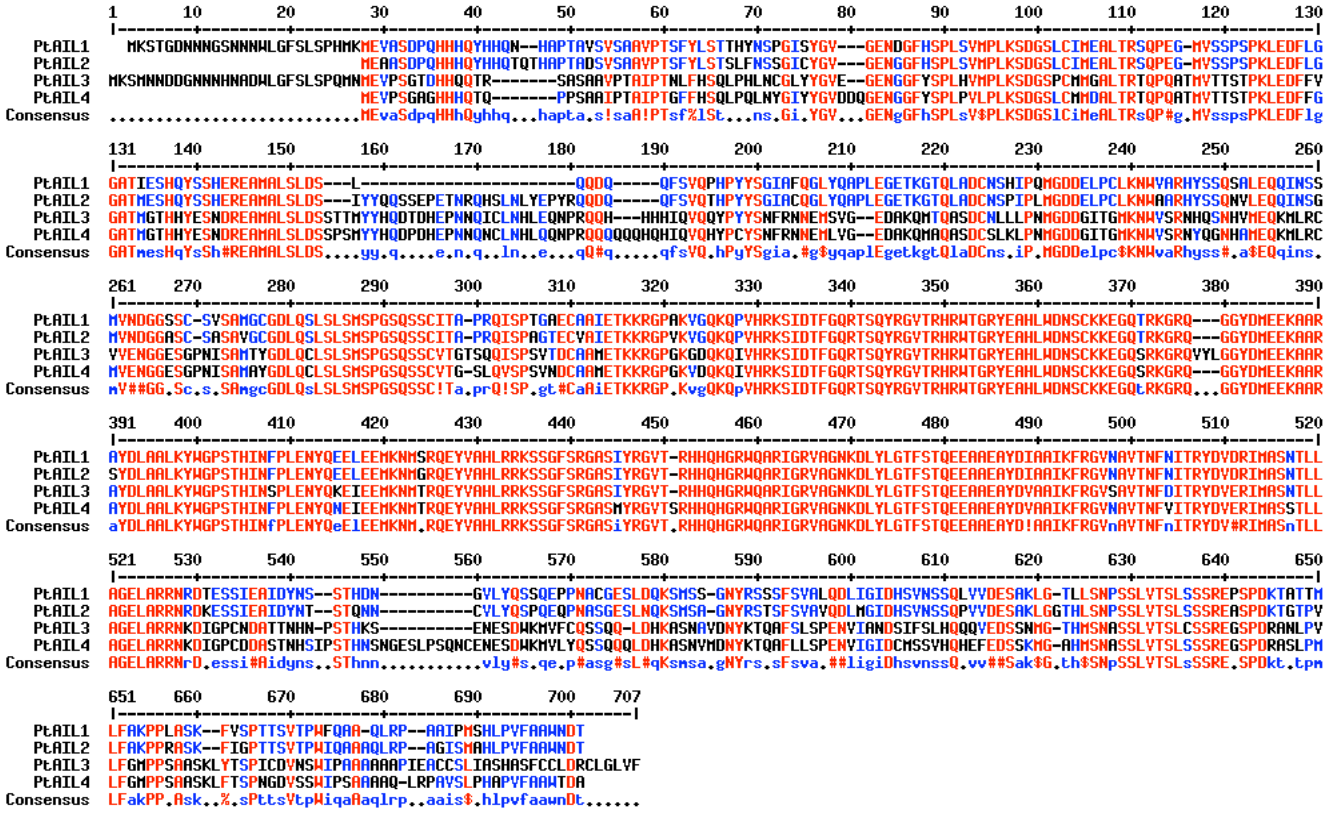


Fig. S3 Relative adventitious root (AR) number after 12 days. Wild type root number at 12 days was set to 100%.



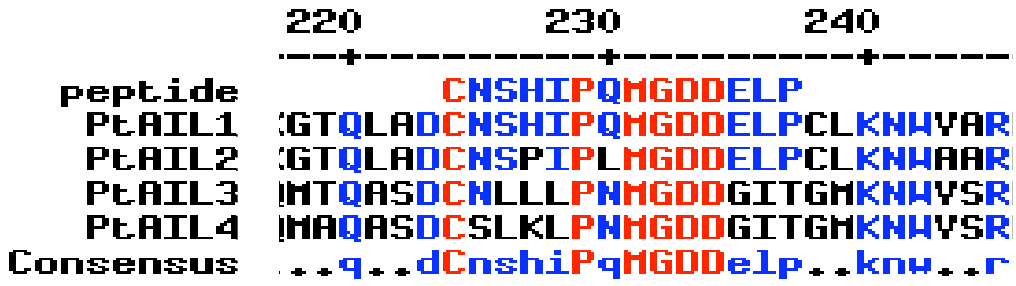


Figure 25 : A, alignement des séquences peptidiques des 4 membres du sous groupe *AINTEGUMENTA* du peuplier. B, alignement de ces 4 séquences avec la séquence du peptide de synthèse utilisé pour la production de l'anticorps anti-PtAIL1. Les résidus de plus fort et de plus faible consensus sont respectivement représenté en rouge et en bleu (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/)

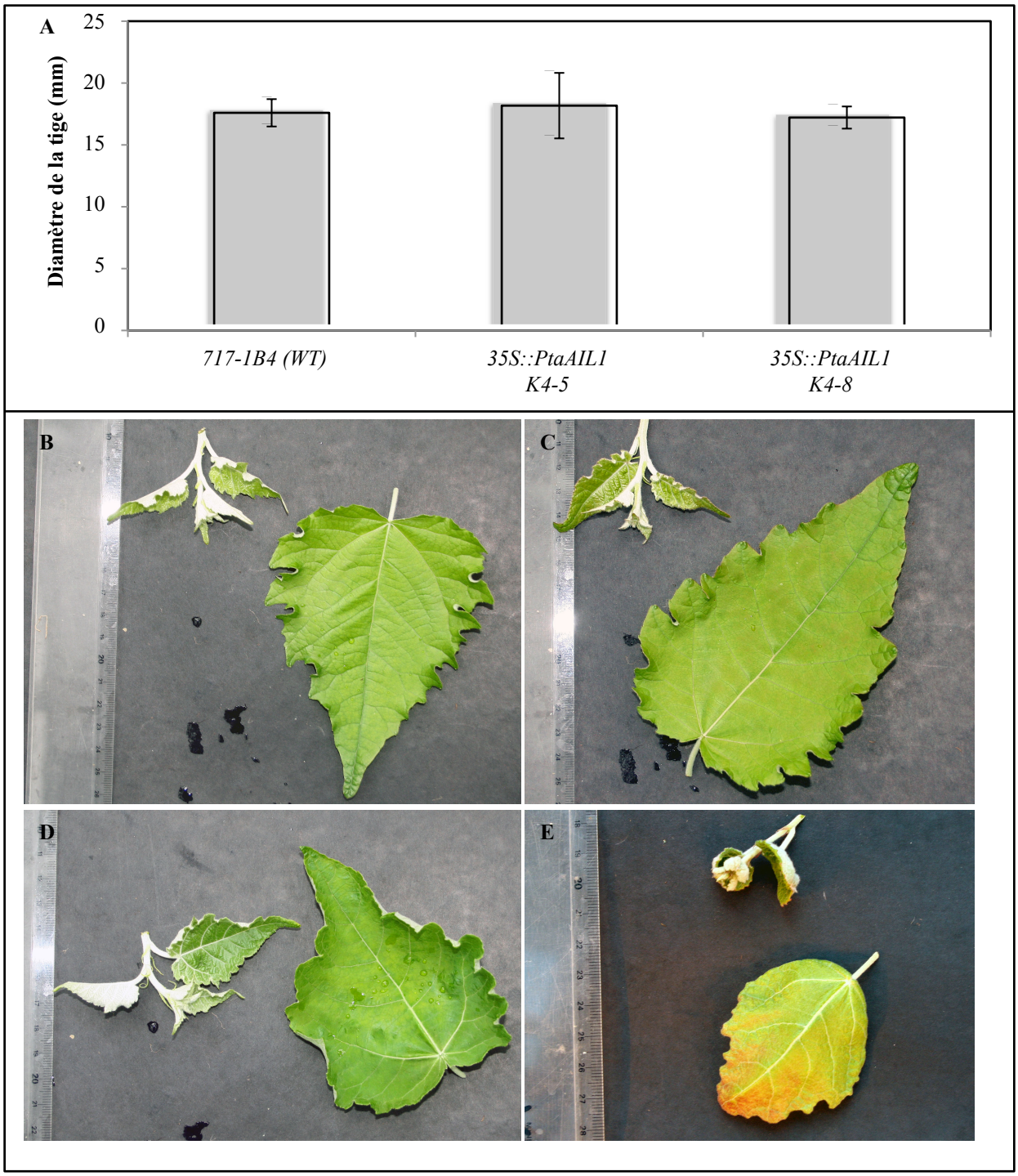


Figure 26 : A, diamètres de la base des tiges des lignées *35S::PtaAIL1* et de la lignée sauvage de *P. tremula* x *P. alba* 717-1B4, âgées de 15 mois. La moyenne et l'intervalle de confiance ont été obtenues à partir de 3 à 7 répétitions biologiques.
B à E, photos représentatives du bourgeon apical et de la 7ème feuille (B) de la lignée sauvage *(WT, 717-1B4)* et des lignées transgéniques *35S::PtaAIL1* cultivées en serre. C, *35S::PtaAIL1 K4-5; D, 35S::PtaAIL1 K4-8; E, 35S::PtaAIL1 K4-13.*

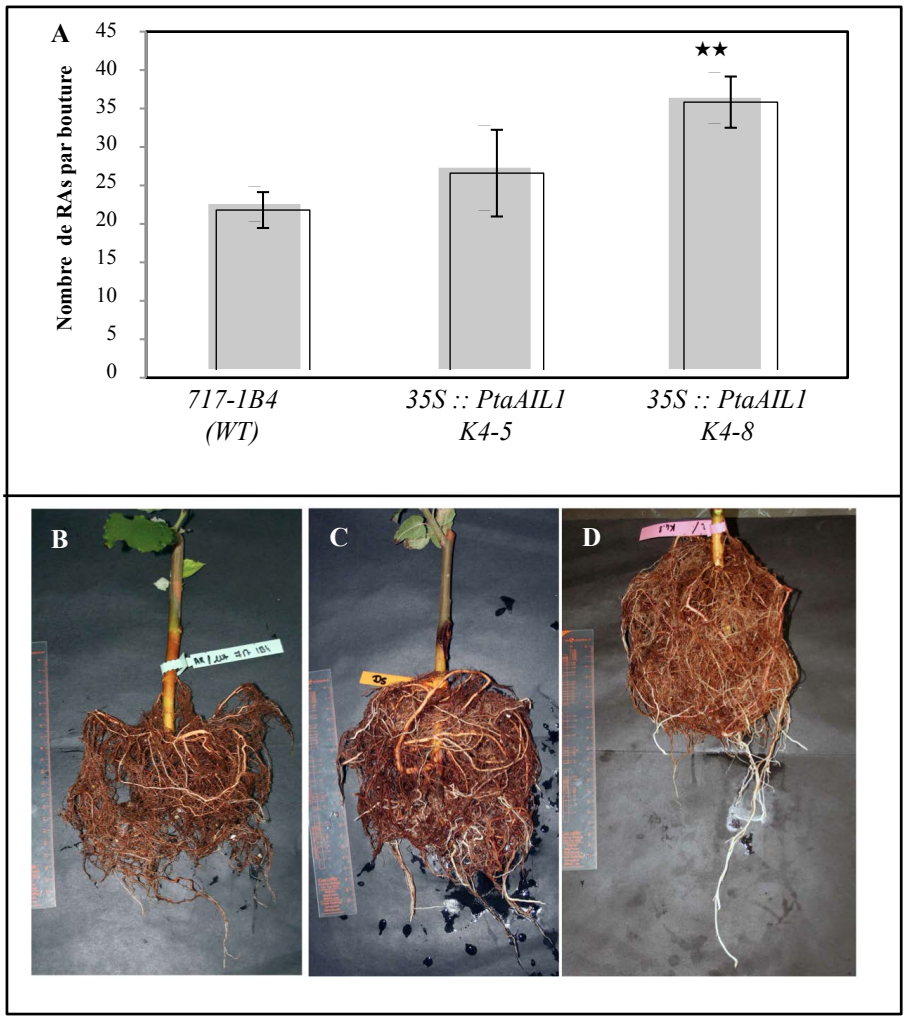
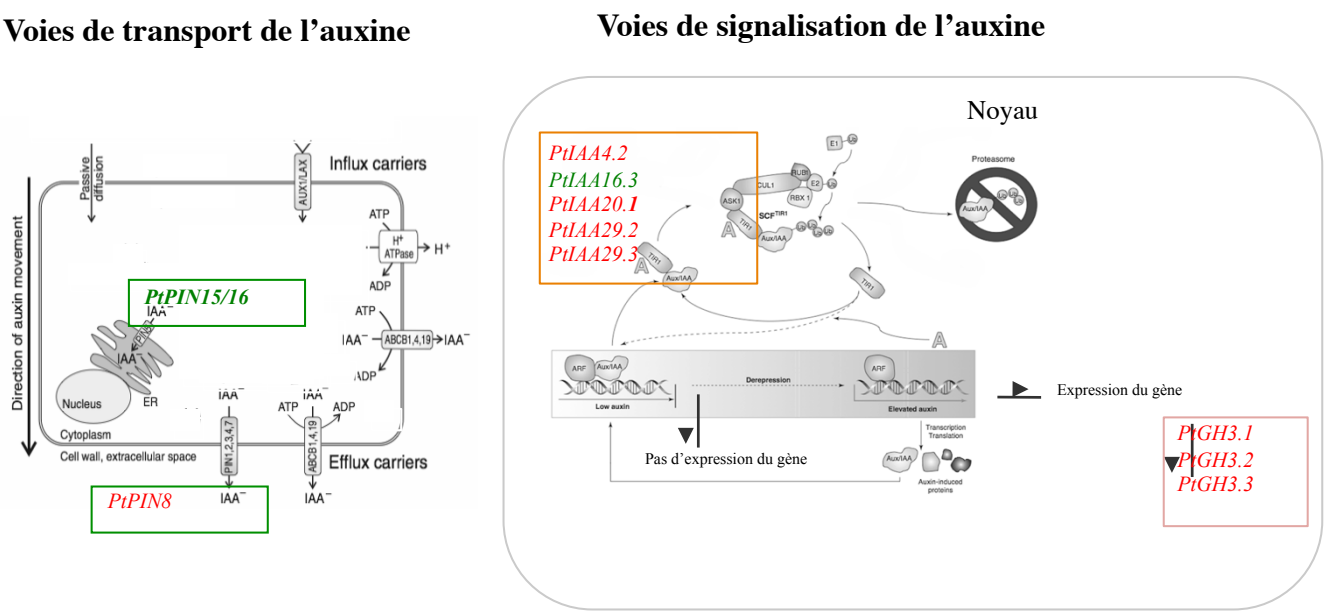


Figure 27 : A, nombre moyen de racines adventives par bouture de *P. tremula* x *P. alba* après deux mois de croissance en serre. La moyenne et l'intervalle de confiance sont obtenus à partir de 5 à 6 répétitions biologiques. ★★ représente une probabilité P<0.01 avec un test de Student.
B à D, systèmes racinaires de plantes âgés de 7 mois. B, 717-1B4 (sauvage); C, *35S:: PtaAIL1 K4-5; D, 35S::PtaAIL1 K4- 8*

A



B

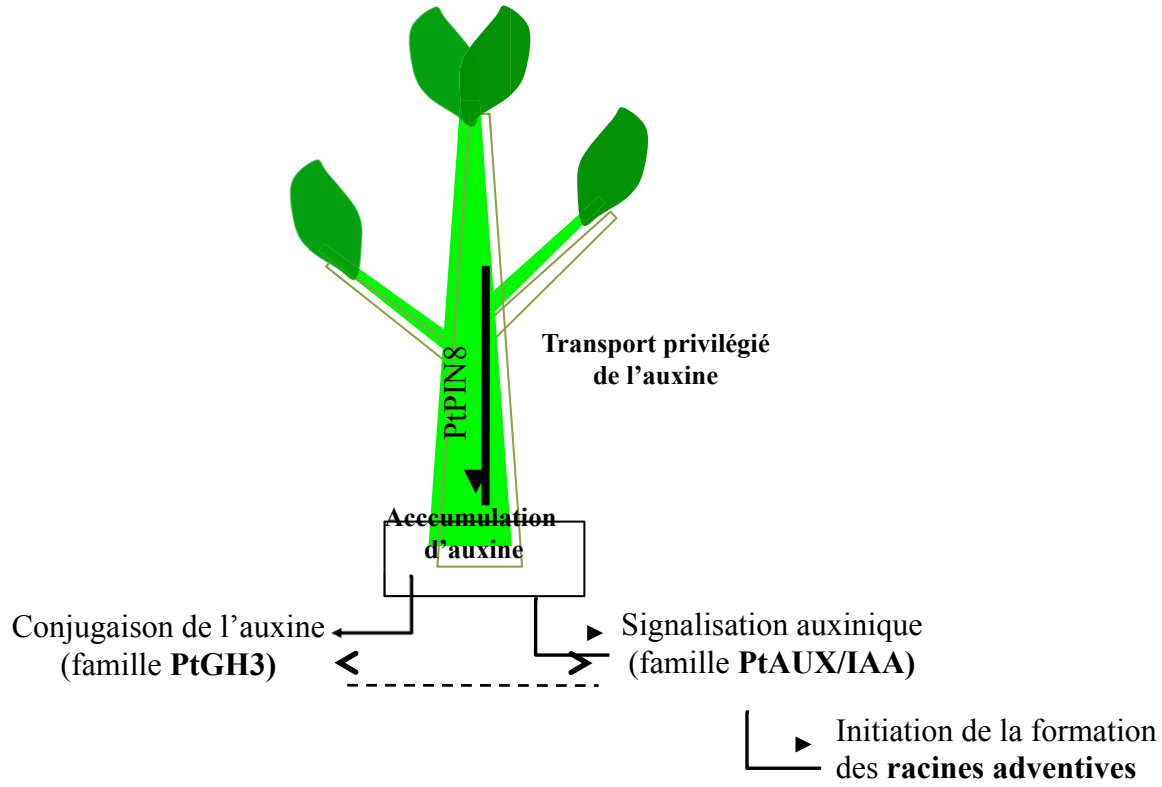


Figure 31 : A. Schéma de synthèse illustrant les gènes régulés à 24 h de la rhizogénèse adventive du peuplier. Les gènes induits sont en rouge et ceux réprimés, en vert. Les schémas illustrant les voies de transport de l'auxine et de signalisation sont issues respectivement, de Petrasek et Friml (2009) et, de Felten et al (2009) (simplifié d'après Badescu et Napier (2006)). B, Schéma hypothétique du rôle de l'auxine comme signal de rhizogénèse adventive du peuplier.

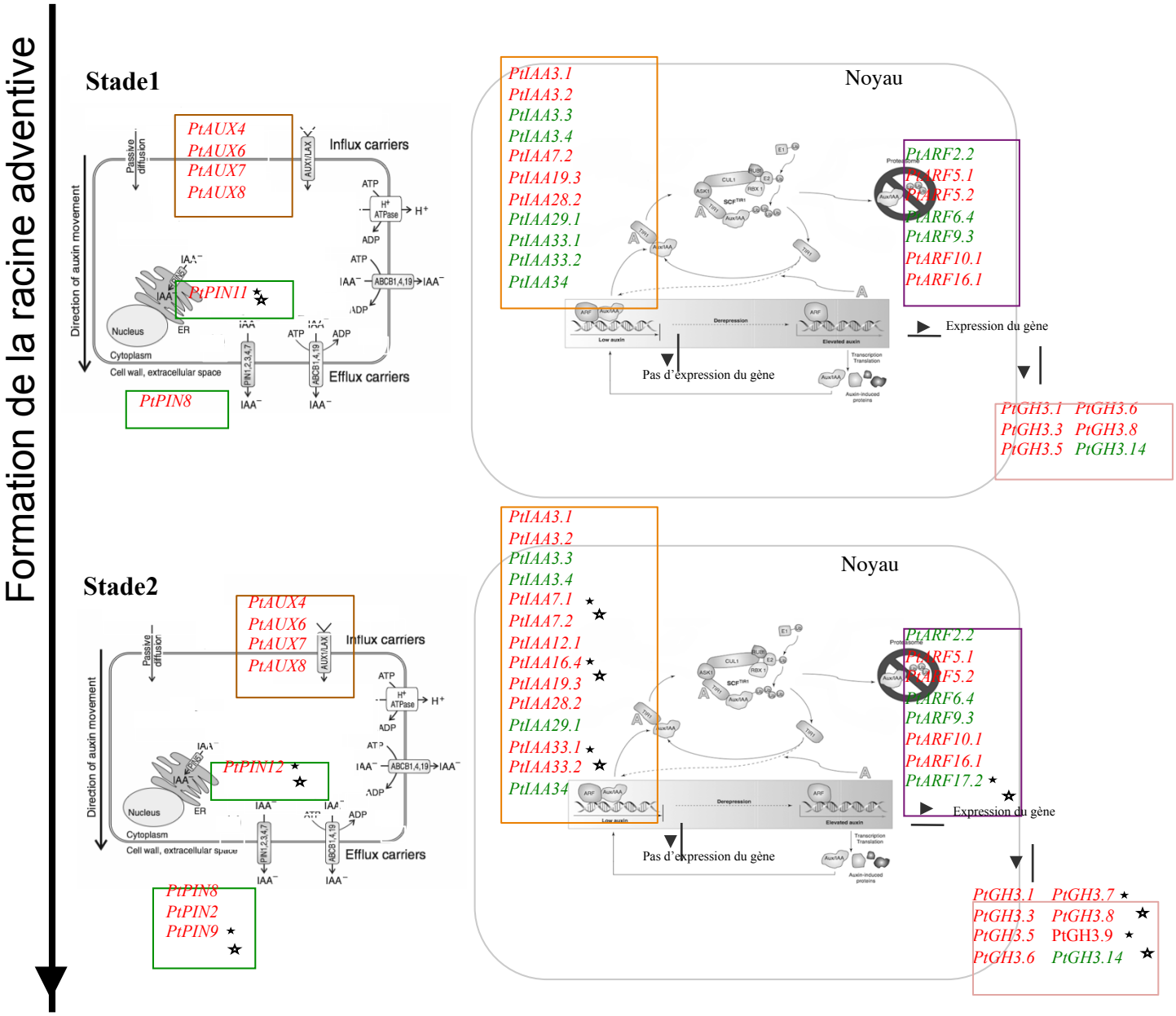
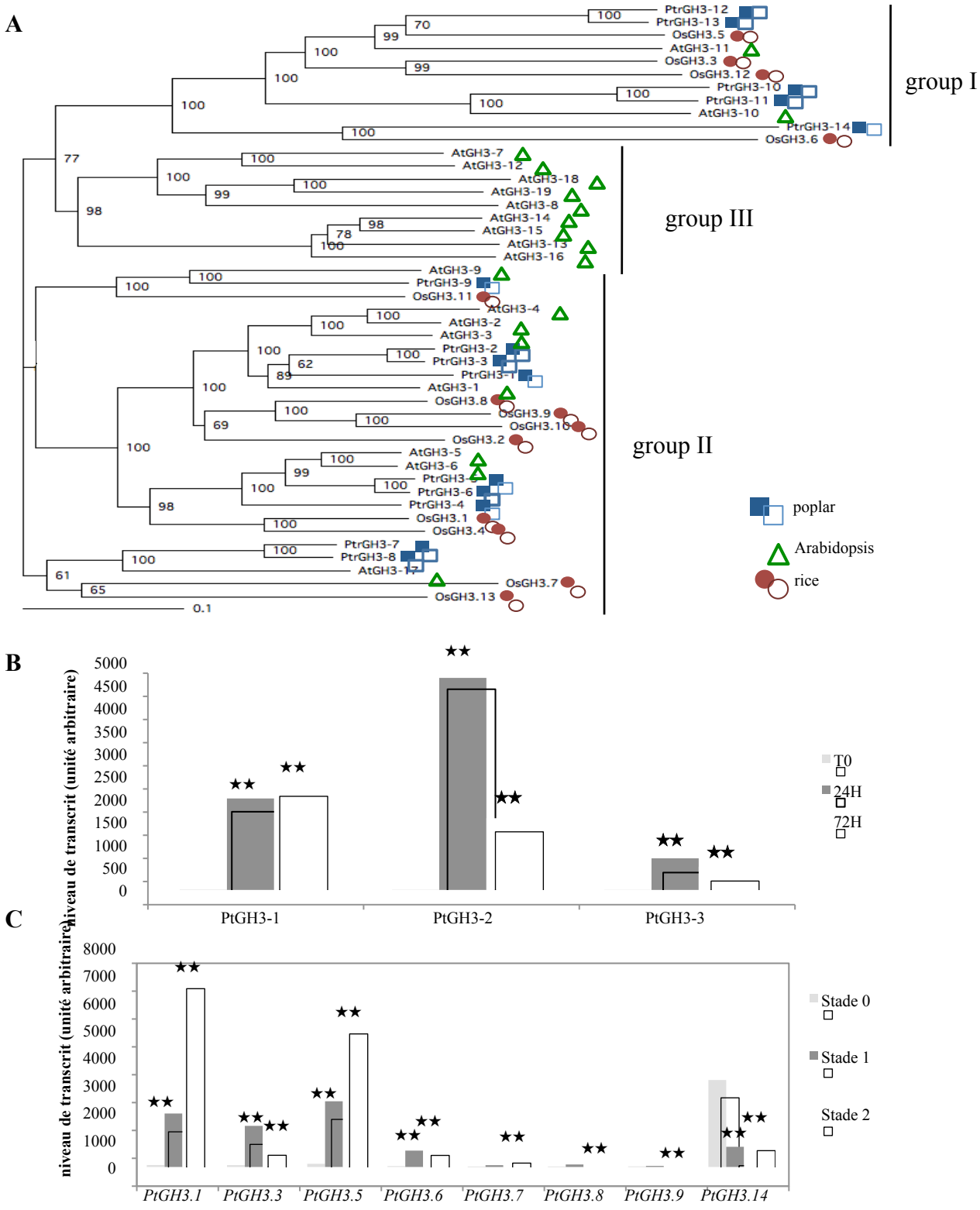
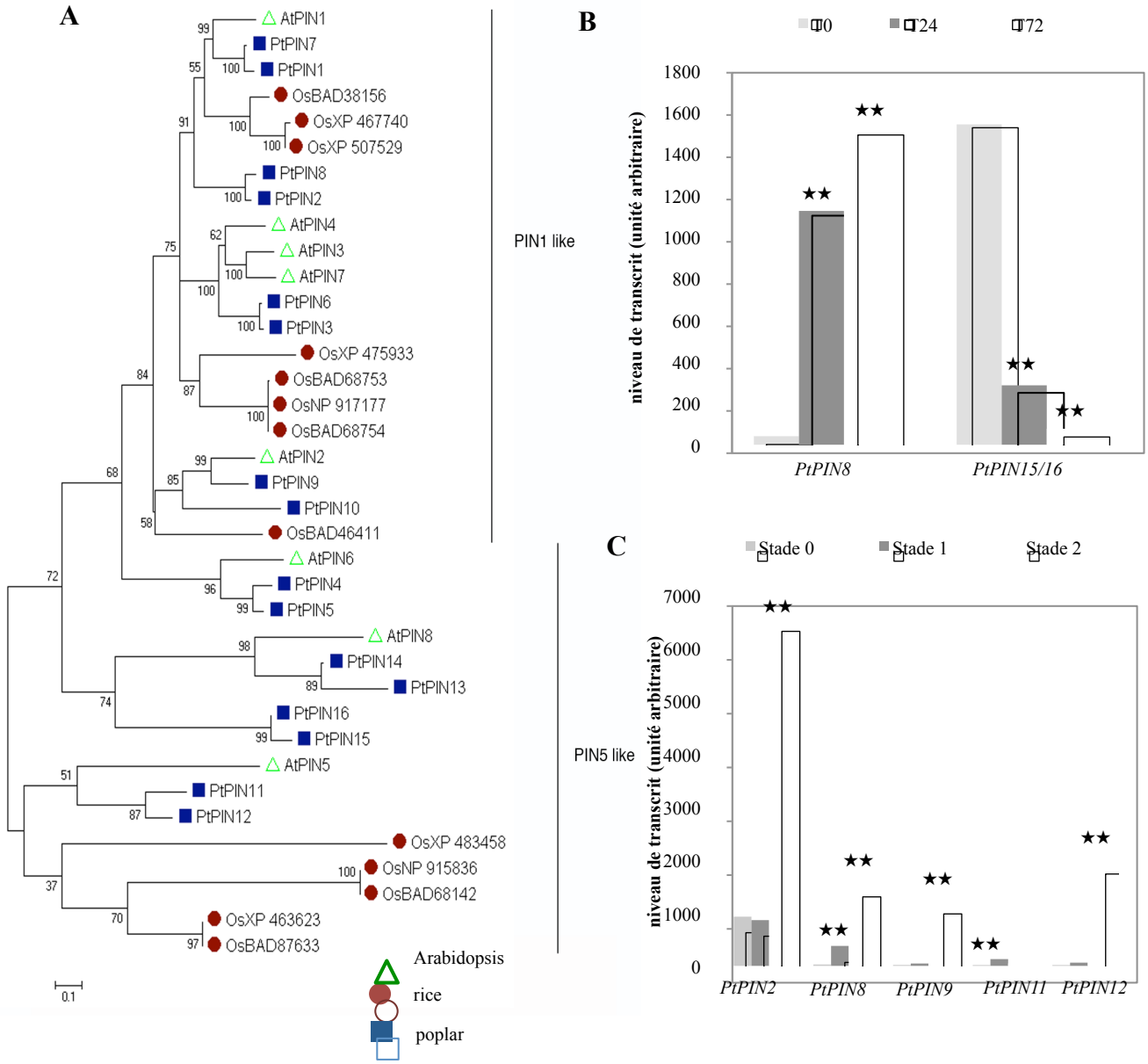


Figure 32 : Régulation des voies auxiniques au cour de la formation de la racines adventive. Les gènes surexprimés par rapport Stade 0 sont en rouge et les réprimés en vert. Les gènes spécifiques d'un stade précis sont associés à une étoile (D'après Petrasek et Friml (2009); Felten et al (2009) (simplifié d'après Badescu et Napier (2006)))

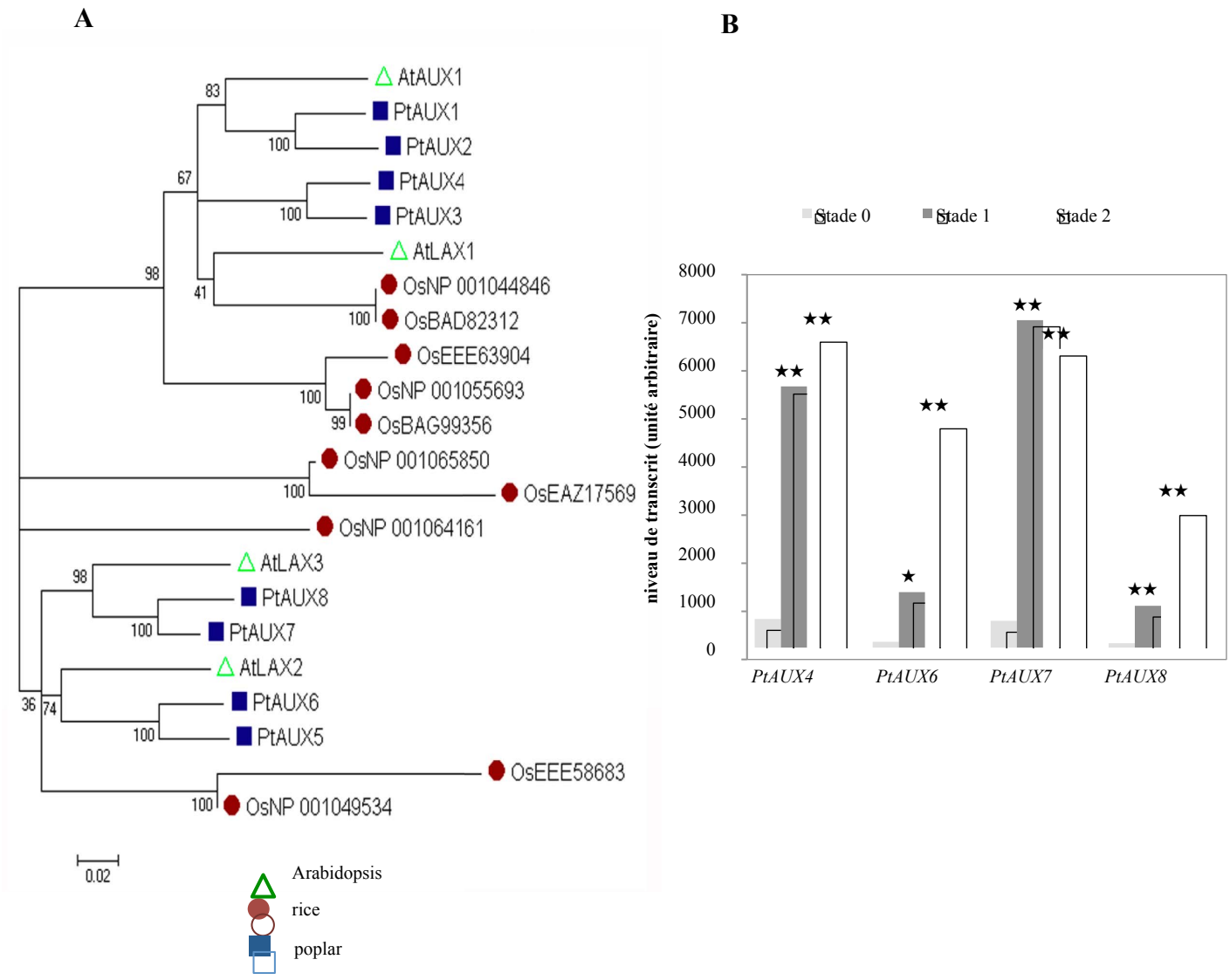


Annexe 1 : Régulation des gènes de la famille PtGH3 lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtGH3 de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtGH3 d'*A. thaliana* et OsGH3 d'*Oryza sativa* (Irene Perrone). B, niveau des transcrits des gènes significativement régulés après 24 h et 72 h de la rhizogénèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides*. C, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ★★ et ★ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, respectivement par comparaison au T0 ou St0.



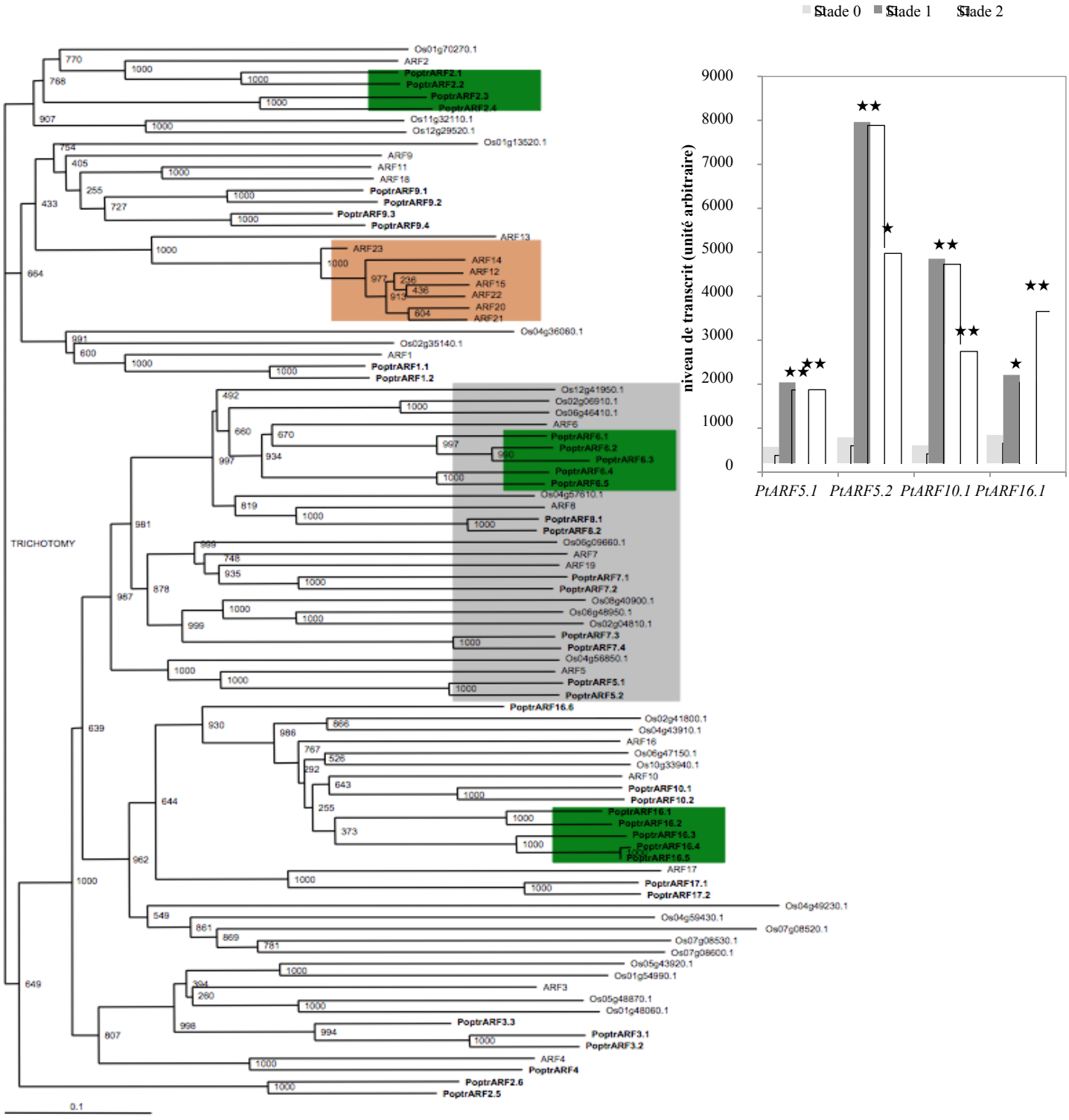
Annexe 2 : Régulation des gènes de la famille PtPIN lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtPIN de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtPIN d'*A. thaliana* et OsPIN d'*Oryza sativa* (Felten *et al.*, 2009). B, niveau des transcrits des gènes significativement régulés après 24 h et 72 h de la rhizogénèse adventive de *P. tremula* x *P. tremuloides*, C, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ★★ et ★ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, respectivement par comparaison au T0 ou St0.

.



Annexe 4 : Régulation des gènes de la famille PtAUX/LAX lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtPIN de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtAUX/LAX d'*A. thaliana* et OsAUX/LAX d'*Oryza sativa* (Felten *et al.*, 2009). B, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ⋆⋆ et ⋆ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, par comparaison au St0.

A



Annexe 5 Régulation des gènes de la famille PtARF lors de la rhizogénèse adventive du peuplier. A, cladogramme de la famille PtARF de *P. trichocarpa* en relation avec celles de AtARF d'*A. thaliana* et OsARF d'*Oryza sativa* (Kalluri *et al.*, 2007). B, niveau des transcrits des gènes aux stade 0, stade 1 et stade 2 de la formation de la racine adventive de *P. trichocarpa*. ★★ et ★ correspondent à une valeur $p < 0.01$ et < 0.05, par comparaison au St0

Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des racines adventives du Peuplier : rôle du facteur de transcription PtAIL1.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du projet européen ENERGYPOPLAR, dans lequel les chercheurs étudient les moyens d'améliorer les rendements de production de biomasse d'hybrides de Peuplier dans un système de sylviculture intensive afin d'obtenir une quantité de biomasse suffisante. La propagation clonale, utilisant des boutures, est un outil approprié dans la production rapide des peupliers sélectionnés. Une étape clé de cette propagation clonale est la formation de racines adventives. Dans ce contexte, un des objectifs de notre travail a été d'analyser la capacité à enraciner de plusieurs génotypes de peuplier sélectionnés. Les études que nous avons réalisées révèlent des disparités dans la capacité à enraciner suggérant que certains génotypes présentent des facilités à enraciner par rapport à d'autres.

Les mécanismes de la rhizogénèse adventive du peuplier sont encore peu connus. Le principal objectif de la thèse a été d'identifier des gènes clefs impliqués dans la rhizogenèse adventive du peuplier, plus précisément l'implication des facteurs de transcription (FT). Nous avons débuté, notre étude, par une analyse transcriptomique globale à différents stades de la formation de la racine adventive de *Populus trichocarpa*. Durant le développement de la racine adventive, le niveau des transcrits des familles PIN, GH3, AUX/IAA, AUX/LAX et ARF sont régulés suggérant l'implication des voies de signalisation de l'auxine.

De plus, cette analyse a révélé la régulation de l'expression de la famille de facteurs de transcription AP2/ERF, et plus particulièrement le membre *AIL1* qui présente un patron de régulation intéressant. Des études phénotypiques menées avec des mutants de Peuplier (35S::AIL1 et RNAi), dont l'expression d'*AIL1* est modifiée, indiquent une variation dans la formation des racines adventives et du nombre de racines adventives. Dans le but de décrypter le(s) réseau(x) de gènes associé(s) à l'expression de *PtAIL1*, nous avons réalisé une analyse transcriptomique visant à comparer les transcriptomes des plantes transgéniques et du sauvage. Cette analyse a permis de mettre en évidence des cibles potentielles de PtAIL1.

Mes résultats montrent clairement le rôle de PtAIL1 dans la formation des racines adventives et m'ont conduit à proposer un modèle hypothétique du réseau de gènes dans lequel AIL1 est impliqué.

Analysis of molecular mechanisms involved in adventitious root formation in poplar: The role of the *PtAIL1* transcription factor.

My thesis was part of the european project ENERGYPOPLAR aiming to improve biomass yield of poplar hybrids in a intensive forestry system. Clonal propagation, by use of cuttings, is a very powerful tool in the fast production of poplars. A key step of this process is the adventitious root formation. Therefore, I investigated the rooting behavior of several selected poplar genotypes. Differences in rooting capacity could be shown suggesting the existence of easy-to-root and difficult-to-root genotypes.

The molecular mechanisms of adventitious rooting in poplar are still poorly understood. The main goal of my thesis was to identify key genes involved in the adventitious rooting process in poplar, with particular interest in the role of transcription factors (TFs). An initial genome-wide transcript profiling of the different stages of adventitious root formation in *Populus trichocarpa* was carried-out. Auxin signaling seems to be involved in poplar adventitious root development, since the transcript level of several gene families like PIN, GH3, AUX/IAA, AUX/LAX and ARF were regulated.

Further, the AP2/ERF transcription factors family and in particular AIL1 were identified as important factors involved in adventitious rooting. The phenotypic characterization of poplar mutants with modified expression of the *AIL1* gene (35s::AIL1 and RNAi lines) showed differences in the chronology of adventitious root formation and in the number of roots formed. In order to investigate the pathway(s) associated with *PtAIL1* expression, transcriptomic analyses of transgenic lines and wild type were performed. Agamous-like and myb transcription factors were identified as possible candidate genes.

PtAIL1 is one of the key regulators involved in adventitious root formation in poplar.