



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

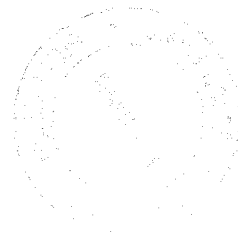
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INRA
C. de Rech. Forestières de Nancy
Unité Ecophysiologie Forestière
Equipe Sol et Nutrition
54280 Champenoux

University College of North Wales
School of Biological Sciences
Bangor
Gwynedd, LL57 2UW
UK

Université Henri Poincaré - Nancy I
Faculté des Sciences
BP 239
54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex



Thèse de l'Université Henri Poincaré - Nancy I

U.F.R. : Sciences et Techniques Biologiques
Ecole doctorale : Biologie et Santé
Spécialité : Biologie Forestière

***Effets du stress osmotique et de la carence en
potassium sur la croissance racinaire du pin maritime.
Etude biomécanique du grandissement cellulaire.***

présentée par

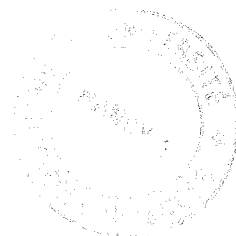
Marie-Béatrice TRIBOULOT

Soutenue publiquement le 25 janvier 1996 devant la commission d'examen:

Jury : MM. P. Dizengremel
P. Cruziat
J. Dainty
J. Pritchard
A. N'Guyen-Queyrens
G. Aussenac

Pr. Université de Nancy I
D.R. INRA Clermont Ferrand
Pr. Université de Toronto
Dr Université de Birmingham
C.R. INRA Bordeaux
D.R. INRA Nancy

*Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur*



A mes parents,

Préambule

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé en deux temps. La première phase a consisté à acquérir trois méthodologies nouvelles: le micromanomètre intracellulaire, le picolitre osmomètre et le dosage des éléments minéraux sur des micro-échantillons par analyse des émissions de rayons X. Cette période d'apprentissage d'un an s'est déroulée au laboratoire du Dr Deri Tomos à l'Université de Bangor (Pays de Galles), sous l'encadrement du Dr Jeremy Pritchard. Pendant cette année, j'ai acquis au contact d'une équipe très compétente le "savoir-faire" nécessaire à l'utilisation de ces outils. Je les ai appliqués à une espèce forestière, le pin maritime, ce qui n'avait pas été fait jusque là. Enfin, pendant cette période, j'ai également étudié les effets du stress osmotique sur la croissance racinaire du pin maritime.

A mon retour, j'ai installé l'équipement nécessaire à la mesure de la pression de turgescence cellulaire et de la pression osmotique cellulaire dans le laboratoire de l'équipe Sol et Nutrition à l'INRA de Nancy. C'est dans ce laboratoire, sous la responsabilité de Gérard Lévy, que se sont déroulées les deux dernières années de cette thèse. Pendant cette période, j'ai étudié les effets de la carence minérale sur la croissance racinaire du pin maritime.

Remerciements

A l'issue de cette thèse, je tiens à remercier:

Gilbert AUSSENAC, Directeur de l'Unité Ecophysiologie Forestière, pour m'avoir proposé ce sujet ainsi que pour l'appui et les conseils qu'il m'a donnés au cours de cette thèse.

Gérard LEVY pour son accueil au sein du laboratoire Sol et Nutrition ainsi que pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée lors la rédaction de ce mémoire.

Pierre DIZENGREMEL qui a accepté de présider ce jury.

Jack DAINTY et Pierre CRUIZIAT qui ont si aimablement accepté d'être les rapporteurs de ce jury.

Anne N'GUYEN-QUEYRENS pour ses conseils concernant la culture hydroponique du pin maritime et qui a bien voulu examiner cette thèse.

Deri TOMOS qui m'a très chaleureusement accueillie dans son laboratoire, à Bangor, et m'a fait profiter de ses connaissances concernant les relations hydriques et la croissance à l'échelle cellulaire.

Jeremy PRITCHARD qui m'a tout appris des *joies* de l'utilisation du micromanomètre intracellulaire et du picolitre osmomètre. Je le remercie également pour l'encadrement et les encouragements qu'il m'a prodigués au cours de ces trois années.

Claude BRECHET pour son assistance technique de haut vol, sa disponibilité permanente, sa bonne humeur et ses encouragements.

Erwin DREYER qui a montré beaucoup de disponibilité et qui m'a bien aidé pour la rédaction de ce mémoire.

Jean -Marc GUEHL pour ses conseils et son aide lors de la rédaction de ce mémoire.

Francis MARTIN, Jacques RANGER et André CLEMENT qui ont gentiment mis à disposition les HPLC et la chromatographie ionique pour le dosages des acides aminés, des sucres solubles et des anions.

Yves, Maryse, Daniel, Patrick, les Jean-Marie, Michel et Vincent pour les petits coups de main, les conseils, et les photos.

Toute l'Unité d'Ecophysiologie Forestière pour son amitié et sa bonne humeur.

Peter, Julian, Paul et Mike pour leur amitié, le bon temps passé au *Old Glan* et l'extraordinaire année qu'ils m'ont permis de passer à Bangor.

et Eric pour ... tout.

Tables des matières

Introduction.....	1
Etude bibliographique.....	5
Partie 1 : Le grandissement cellulaire.....	5
1.1 Aspect hydraulique du grandissement cellulaire.....	6
1.2 Aspect mécanique du grandissement cellulaire.....	6
1.3 Le modèle de Lockhart.....	7
1.3.1 Signification des paramètres ϕ et Y	9
1.3.2 Détermination des paramètres ϕ et Y	9
1.3.3 Notion d'extensibilité.....	10
1.4 Le relâchement des parois : point de départ du grandissement cellulaire.....	11
1.5 Aspect biochimique : origine du relâchement des parois.....	12
1.6 Grandissement cellulaire et absorption de solutés.....	12
1.7 Effets de différentes contraintes sur le grandissement cellulaire.....	13
1.8 Conclusion.....	15
Partie 2 : Croissance racinaire et contrainte hydrique.....	16
2.1 Croissance racinaire.....	16
2.2 Morphologie et architecture du système racinaire.....	17
2.3 Division et grandissement cellulaire.....	17
2.4 Ajustement osmotique.....	18
2.5 Rôle de l'acide abscissique.....	19
2.6 Conclusion.....	20
Partie 3 : Croissance racinaire et carence en potassium.....	21
3.1 Fonctions du potassium.....	21
3.1.1 Fonctions biochimiques.....	21
3.1.2 Fonctions biophysiques.....	22
3.2 Teneurs en potassium : normes et carence.....	22
3.2.1 Développement de la carence en potassium.....	22
3.2.2 Normes.....	23
3.2.3 Symptômes de la carence en potassium.....	23
3.2.4 Substitution du potassium.....	24
3.3 Croissance racinaire et carence en potassium.....	24
3.4 Conclusion.....	25
Matériel et méthodes.....	26
1 Matériel végétal, culture des plants et application des stress.....	26
1.1 Germination des graines.....	26
1.2 Culture hydroponique.....	26
1.2.1 Solutions nutritives.....	27
1.2.2 Ajustement du pH.....	27
1.3 Conditions de culture.....	28
1.4 Application des stress.....	28
1.4.1 Application du stress osmotique.....	28
1.4.2 Application de la carence en potassium.....	29
2 Mesure de la croissance.....	30
2.1 Cinétique de la croissance racinaire.....	30
2.2 Vitesse de croissance locale.....	30
2.3 Initiation des racines latérales.....	31

3	Mesure de la pression de turgescence cellulaire	32
3.1	Le micromanomètre intracellulaire	32
3.2	Les mesures.....	32
3.3	Avantages et limites.....	33
4	Mesure de la pression osmotique cellulaire.....	34
4.1	Le picolitre osmomètre.....	34
4.2	Les mesures.....	34
4.3	Avantages et limites.....	36
5	Analyse des propriétés rhéologiques.....	36
6	Analyses minérales et organiques	37
6.1	Récolte des tissus	37
6.2	Analyse des éléments minéraux	37
6.3	Analyse des sucres solubles	38
6.4	Analyse des acides aminés	39
7	Protocoles expérimentaux.....	39
7.1	Croissance racinaire et stress osmotique	39
7.2	Croissance racinaire et carence en potassium	40

Résultats41

Chapitre 1 : Analyse de la croissance racinaire en conditions optimales.....41

1.1	Anatomie de l'apex de la racine principale	42
1.1.1	Coupe longitudinale.....	42
1.1.2	Coupe transversale.....	42
1.2	Etude de la zone de croissance.....	43
1.2.1	Longueur des cellules et vitesse de croissance locale	43
1.2.2	Pression de turgescence et pression osmotique	44
1.2.3	Propriétés rhéologiques.....	44
1.3	Discussion.....	45
1.3.1	Gradient radial: turgescence et propriétés rhéologiques.....	45
1.3.2	Gradient longitudinal: vitesse relative d'élongation, turgescence et propriétés rhéologiques	45
1.3.3	Relations hydriques cellulaires.....	46
1.4	Conclusion.....	47

Chapitre 2 : Effets de différents niveaux de stress osmotique sur la croissance racinaire48

2.1	Croissance racinaire.....	48
2.2	Longueurs des cellules	49
2.3	Vitesse de croissance locale.....	49
2.4	Pression de turgescence cellulaire le long de la zone de croissance.....	50
2.5	Propriétés rhéologiques	51
2.6	Activité mitotique.....	52
2.7	Effet d'un stress osmotique de -0,66 MPa sur les relations hydriques cellulaires dans la zone d'élongation	52
2.8	Discussion.....	53
2.8.1	Variabilité de la croissance.....	53
2.8.2	Stress osmotique et grandissement cellulaire	53
2.8.3	Stress osmotique et activité mitotique.....	55
2.8.4	Relations hydriques cellulaires.....	55
2.9	Conclusion.....	56

Chapitre 3 : Effets de la carence en potassium sur la croissance du système racinaire57

3.1	Développement du système racinaire.....	57
3.1.1	Biomasse et rapport R/S	57
3.1.2	Croissance des racines principale et latérales.....	58
3.1.3	Initiation des racines latérales.....	58
3.2	Analyse biomécanique de la croissance de la racine principale.....	58
3.2.1	Longueur des cellules et vitesse de croissance locale	58
3.2.2	Pression de turgescence et pression osmotique	59
3.2.3	Extensibilité des parois.....	59

3.3	Analyse biomécanique de la croissance des racines latérales.....	60
3.3.1	Longueur des cellules et vitesse de croissance locale	60
3.3.2	Pression de turgescence et pression osmotique	60
	Mesures ponctuelles à 2-3,5 mm de l'apex	60
	Profils le long de l'apex	61
3.3.3	Extensibilité des parois	61
3.4	Teneur en potassium et pression osmotique.....	62
3.4.1	Solutés générant la pression osmotique dans les différentes parties du système racinaire.....	62
3.4.2	Effet des carences minérales sur les solutés générant la pression osmotique dans l'apex de la racine principale et des racines latérales.....	63
	Apex de la racine principale	63
	Apex des racines latérales	63
	Bilan.....	64
3.5	Discussion.....	65
3.5.1	Intensité de la carence en potassium.....	65
3.5.2	Solutés et pression osmotique.....	65
	Composition de l'extrait tissulaire des témoins	65
	Effets de la carence KD.....	66
3.5.3	Effet de la carence potassique sur la croissance	66
	Croissance de la racine principale	66
	Croissance des racines latérales	66
3.5.4	Comparaison des effets des carences KD et MD	67
3.5.5	Relations hydriques cellulaires.....	67
3.5.6	Différences entre racine principale et racines latérales	68
3.6	Conclusion.....	69
Discussion		70
1	Méthodologie.....	70
1.1	Les nouvelles microméthodologies.....	70
1.2	Mesure de l'extensibilité.....	71
2	Effet âge sur le contrôle de la croissance racinaire	71
3	Stress osmotique, carence en potassium et facteurs contrôlant la croissance racinaire	72
4	Contrôle de l'extensibilité pariétale.....	73
Conclusion.....		76
Références bibliographiques		79

Introduction

Le déficit hydrique et la pauvreté minérale du sol sont des contraintes répandues dans les écosystèmes forestiers et constituent deux facteurs qui limitent souvent la croissance des arbres. L'étude de ces deux contraintes sur la croissance et le fonctionnement des arbres constitue d'ailleurs un des objectifs du programme Ecophysiologie du département Forêts de l'INRA.

Les effets de la contrainte hydrique sur la physiologie et le fonctionnement global des arbres ont été amplement étudiés. Il a été montré que la sécheresse limite la croissance, affecte la photosynthèse et en général améliore l'efficacité d'utilisation de l'eau. Les effets des carences minérales ont été l'objet de nombreuses études également. Les sols forestiers sont souvent pauvres et des fertilisations en phosphore, azote mais aussi en potassium se sont révélées très utiles (Bonneau, 1995). Ces études ont pris et prennent en compte différents niveaux de fonctionnement. Cependant, jusqu'à présent le *déterminisme de la croissance racinaire*, et en particulier la réponse des racines à ces deux types de contraintes, reste très peu étudié et même tout à fait inexploré en ce qui concerne les ligneux.

Les effets du déficit hydrique sur le contrôle de la croissance racinaire ont été étudiés chez quelques espèces annuelles: blé (Pritchard *et al.*, 1990b, 1991), maïs (Pritchard *et al.*, 1993, Spollen et Sharp, 1991), soja (Itoh *et al.*, 1987). Chez les espèces ligneuses, les études des effets du déficit hydrique et des carences minérales sur les racines se sont essentiellement intéressées à la répartition de la biomasse finale ou, au mieux, à la cinétique de leur croissance (à l'aide de rhizotrons). Très rarement, les mécanismes par lesquels les contraintes modifient la croissance racinaire ont été analysés. Pourtant, la réaction des racines est essentielle pour la résistance et/ou l'adaptation de la plante à ces contraintes étant donné que celles-ci se manifestent en premier lieu au niveau du sol.

Pour étudier *les mécanismes de l'allongement de la racine ainsi que sa régulation*, il est nécessaire de travailler à une échelle très fine: la cellule. En effet, la croissance d'une racine résulte de la combinaison coordonnée de deux activités cellulaires: *la mitose et le grandissement cellulaire*. Comme le soulignent Green (1976) et Ray (1987), les divisions ne génèrent pas d'augmentation de volume par elles-mêmes mais

fournissent du matériel "brut", les cellules. C'est le grandissement individuel de chacune de ces cellules qui est responsable de l'allongement racinaire. Le volume cellulaire peut plus que décupler, et cela très rapidement. Par exemple, dans une tige en croissance, le volume cellulaire est multiplié par 12 en moins de 15 heures (Boyer, 1987). Par conséquent, *le contrôle de l'accroissement racinaire est intrinsèquement lié à la régulation du grandissement cellulaire.*

Lockhart (1965) a élaboré un modèle du grandissement cellulaire, intégrant ses aspects hydrauliques et mécaniques. Il a exprimé mathématiquement le fait que *le grandissement cellulaire était fonction de la conductivité hydraulique, de la pression de turgescence et des propriétés rhéologiques des parois.* La conductivité hydraulique conditionne les flux d'eau vers les cellules en croissance. La pression de turgescence constitue la force motrice de l'expansion en surface de la paroi. Les propriétés rhéologiques des parois caractérisent la facilité de celles-ci à se déformer.

Initialement conçu pour une cellule isolée (Green *et al.*, 1971), ce modèle est également appliqué à la croissance de tissus pluricellulaires. Cependant, l'étude anatomique d'un apex racinaire révèle une hétérogénéité entre les cellules qui le composent. La longueur et le diamètre des cellules varient selon qu'elles appartiennent à l'épiderme, au cortex ou à la stèle. A ces différences anatomiques pourraient s'associer des différences quant à la capacité d'élongation. Cette hypothèse est soutenue par des expériences simples comme celle décrite par Cleland (1987). Lorsqu'une portion de tige en croissance est fendue longitudinalement et qu'elle est placée dans un milieu permettant la croissance, les deux demis-cylindres se courbent vers l'extérieur, indiquant que les cellules des couches externes de la tige (épiderme ou premières couches corticales) ont une vitesse d'élongation plus faible que celles des couches internes. Des expériences similaires sur des racines montrent que dans ce cas, ce sont les cellules des couches internes du cortex qui limiteraient la croissance racinaire (Pritchard et Tomos, 1993). D'autre part, dans la direction axiale, le grandissement cellulaire s'exprime dans une zone d'élongation qui est particulièrement courte, 6 mm et 8 mm chez le blé et le maïs, respectivement (Pritchard *et al.*, 1988, 1993). *L'étude du grandissement cellulaire nécessite donc une résolution spatiale très fine des paramètres le contrôlant: pression de turgescence, propriétés rhéologiques et relations hydriques.*

Pendant longtemps, les études de croissance ont été réalisées à l'aide de méthodes globalisantes, permettant de travailler à l'échelle du tissu mais non de la cellule. La pression de turgescence était déterminée indirectement par différence entre les potentiels hydrique et osmotique moyens du tissu. La mise au point d'un *micromanomètre intracellulaire* (Hüsken *et al.*, 1978), qui permet de *mesurer la pression de turgescence directement dans une seule cellule, in situ*, a entraîné des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes contrôlant le grandissement cellulaire. Cette méthodologie a permis la détermination de la pression de turgescence longitudinalement et radialement dans la zone de croissance de tiges et de racines d'espèces variées. Associée à des mesures de croissance à haute résolution, elle donne accès aux propriétés mécaniques des parois cellulaires (les propriétés rhéologiques) et permet ainsi *d'accéder aux mécanismes de la régulation biomécanique de la croissance* (Pritchard, 1994). La miniaturisation d'un osmomètre (Malone, Leigh & Tomos, 1989), le *picolitre osmomètre*, permet également maintenant de mesurer la pression osmotique du contenu d'une seule cellule: le potentiel hydrique cellulaire peut être déterminé directement. Ces nouvelles microméthodologies permettent *l'étude des relations hydriques à l'échelle cellulaire.*

Des études antérieures de la croissance racinaire montrent que celle-ci peut être inhibée (Spollen & Sharp, 1991; Pritchard *et al.*, 1991), non affectée (Itoh *et al.*, 1987) mais aussi stimulée (Sharp & Davies, 1979;

Meyer & Boyer, 1981; N'Guyen & Lamant, 1989b) par le déficit hydrique. Cette dernière réaction paraît surprenante. En effet, le déficit hydrique n'est susceptible que d'abaisser la pression de turgescence qui est le moteur de l'allongement de la racine. Comment le stress hydrique peut-il induire des réactions si diverses et, en particulier, une augmentation de la croissance racinaire?

Le potassium (K) est le cation le plus abondant dans les tissus végétaux. Il est présent dans le cytoplasme, où il joue un rôle d'activateur de plusieurs enzymes, et dans la vacuole où il est responsable d'une bonne partie de la pression osmotique intracellulaire (Leigh & Wyn Jones, 1984). De même que pour la contrainte hydrique, la carence potassique est susceptible d'affecter la pression de turgescence et donc la croissance de la racine. Ericsson et Kähr (1993) ont montré que la carence en potassium réduisait la croissance racinaire de plantules de bouleau. Le même effet a été observé par Seillac (1967) sur le pin maritime. Ce dernier a montré que la carence en potassium réduit la croissance des racines latérales beaucoup plus que celle de la racine principale. Il apparaît donc que le système racinaire ne répond pas forcément de façon homogène à une contrainte.

Le déficit hydrique et la carence en potassium sont susceptibles d'affecter les relations hydriques et donc, la pression de turgescence des cellules en croissance. Chez une espèce forestière, comment ces contraintes affectent-elles la croissance racinaire? Quels effets ont-elles sur les paramètres biomécaniques de la croissance?

Objets de l'étude

L'objet principal de ce travail a été d'étudier **les aspects biomécaniques du contrôle de la croissance** de la racine de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.), c'est-à-dire de déterminer le rôle respectif de la pression de turgescence et des propriétés mécaniques des parois dans le contrôle de la croissance racinaire. Travailler à l'échelle **cellulaire** avec une **résolution spatiale très fine** fut la particularité majeure de cette étude.

Le pin maritime est une espèce présente essentiellement dans les Landes où elle est d'une importance économique considérable. De nombreux programmes d'études écophysiologiques sont en cours sur cette espèce: résistance à la sécheresse, comportement de la photosynthèse et de l'efficacité d'utilisation de l'eau face au stress hydrique et au doublement de la teneur en CO₂ atmosphérique, sélection génétique de familles plus performantes pour la croissance. Le pin maritime pousse sur des sols pauvres en éléments minéraux et sujets à des périodes de sécheresse. Nous avons donc étudié les effets du déficit hydrique d'une part, et de la carence potassique d'autre part, sur la croissance racinaire de plantules de pin maritime. Cette thèse a donc eu pour objet de répondre aux questions suivantes:

- *Comment la pression de turgescence et les propriétés mécaniques des parois participent-elles à la réponse de la croissance racinaire de plantules de pin maritime soumises à un déficit hydrique ou à une carence en potassium?*

- *Comment la croissance racinaire peut-elle être stimulée par une réduction de la disponibilité en eau?*

- Comment les différences de comportement entre racine principale et racines latérales face à la carence potassique (Seillac, 1967), s'expliquent-elles sur la base de leurs propriétés biomécaniques?

- Dans quelle mesure et par quels solutés, le potassium est-il remplacé dans les tissus racinaires des plants carencés?

Le travail a été scindé en trois étapes:

-1- La croissance racinaire de plantules de pin maritime a tout d'abord été étudiée en *conditions optimales*. Jusqu'ici, les études biomécaniques de la croissance racinaire n'avaient été conduites que sur des espèces annuelles: blé, maïs, soja. Nous avons donc étudié les aspects biomécaniques de la croissance racinaire d'une espèce forestière, le pin maritime: pression de turgescence cellulaire, vitesse relative d'élongation et propriétés rhéologiques ont été déterminées le long de la zone d'élongation de la racine principale. Parallèlement, les relations hydriques cellulaires ont été mesurées dans les cellules de la zone de croissance et les cellules matures de l'apex racinaire.

-2- Nous avons ensuite étudié les effets de trois intensités de stress osmotique sur la croissance racinaire du pin maritime. Une analyse biomécanique, du même type que celle conduite sur les plantules cultivées en conditions optimales, a permis de déterminer le rôle de la pression de turgescence et des propriétés rhéologiques dans la réponse de la croissance racinaire à chacun des niveaux de stress appliqué. L'étude biomécanique a été complétée par une analyse des relations hydriques cellulaires au sein de l'apex racinaire, en conditions hydriques limitantes.

-3- La dernière phase de ce travail fut consacrée à l'étude de la croissance du système racinaire de plantules de pin maritime ayant poussé sur une solution nutritive carencée en potassium. Après une caractérisation des effets de cette carence minérale sur la croissance du pivot et des racines latérales, une étude biomécanique a été conduite dans les deux types de racines. Les effets de la carence potassique sur les relations hydriques cellulaires ont également été déterminés dans les deux types racinaires, ainsi que sur la composition des solutés générant le potentiel osmotique dans différentes parties du système racinaire. Accessoirement, nous avons aussi étudié les effets d'une carence de tous les macro-éléments (N, P, K, Ca, Mg, Cl, S).

NB: Dans ce mémoire, le terme "**biomécanique**" est employé au sens "étude des déterminants du grandissement cellulaire par rapport à son aspect mécanique", c'est-à-dire étude de la pression de turgescence cellulaire et de l'extensibilité pariétale.

Etude bibliographique

Partie 1 : Le grandissement cellulaire

Dans ce mémoire, il n'est question que du *grandissement cellulaire irréversible*, c'est-à-dire correspondant à une déformation plastique, irréversible des parois. L'augmentation du volume cellulaire peut être considérable, de 50 à 500 fois le volume initial (Cosgrove, 1993b). C'est la somme du grandissement irréversible de cellules individuelles qui génère la croissance à l'échelle de l'organe.

Le grandissement cellulaire irréversible s'oppose au *grandissement cellulaire réversible* qui est relatif aux propriétés élastiques des parois et à la pression de turgescence (Ray, 1987). Ces variations de volume, relativement faibles, sont en général dues à des variations d'hydratation et ne contribuent pas à la croissance absolue de l'organe.

Le grandissement cellulaire consiste en une **absorption massive d'eau** couplée à une **extension des parois pectocellulosiques**. Le flux d'eau entrant dans les cellules en croissance constitue l'**aspect hydraulique** du grandissement cellulaire. L'extension des parois, sous l'effet mécanique de la pression de turgescence, en constitue l'**aspect mécanique**. L'augmentation de la surface pariétale suppose la synthèse de composants de la paroi. S'il ne se produisait qu'une extension sans qu'il y ait insertion de nouvelles macromolécules, la paroi s'affinerait de plus en plus. Cependant, l'apposition d'éléments nouveaux à la paroi

préexistante ne contribue pas à son agrandissement (Ray, 1987). Indépendante de la synthèse de nouvelles macromolécules, l'extension des parois est sous le contrôle de la cellule. La **régulation de l'extensibilité pariétale** constitue l'**aspect biochimique** du grandissement cellulaire. A ces trois aspects majeurs s'ajoute une **absorption de solutés**. En effet, l'activité cellulaire nécessite un apport d'énergie pour la respiration et la synthèse des macromolécules. D'autre part, la cellule en croissance absorbant un grand volume d'eau, le maintien de la pression osmotique (et donc de la turgescence) requiert une entrée et/ou la synthèse d'une quantité importante de solutés dans la cellule.

1.1 ASPECT HYDRAULIQUE DU GRANDISSEMENT CELLULAIRE

Décrivant l'absorption d'eau par la cellule, Lockhart (1965) a établi la première partie de son modèle sur cette observation: la cellule végétale se comporte comme un osmomètre (presque) parfait. La membrane plasmique est semi-perméable, l'eau diffuse mais pas les solutés. Le degré de semi-perméabilité à un soluté est décrit par le coefficient de réflectivité σ qui varie de 0 pour une membrane complètement perméable, à 1 pour une membrane parfaitement semi-perméable.

Lors de la croissance d'une cellule, son volume augmente par entrée d'eau. Ce flux entrant est passif, c'est-à-dire induit par une différence de potentiel hydrique entre l'intérieur de la cellule et le milieu extérieur. Le flux entrant d'eau peut être ainsi exprimé :

$$\frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} = L \cdot (\Psi_o - \Psi_i) = L \cdot (\sigma \Delta \pi_{i,o} - \Delta P_{i,o}) \approx L \cdot (\sigma \Delta \pi_{i,o} - P) \quad (1)$$

$$\text{sachant que:} \quad \Psi_o - \Psi_i = (P_o - P_i) - \sigma(\pi_o - \pi_i) = \sigma \Delta \pi_{i,o} - \Delta P_{i,o} \approx \sigma \Delta \pi_{i,o} - P \quad (2)$$

où $(1/V) (dV/dt)$ est l'augmentation relative du volume cellulaire (h^{-1}), L la conductance hydraulique membranaire ($h^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) ($L = A \cdot L_p$, où A est la surface de la membrane de la cellule et L_p la conductivité hydraulique membranaire), Ψ le potentiel hydrique (MPa), σ le coefficient de réflectivité membranaire, π la pression osmotique (MPa) et P la pression hydrostatique (MPa). Les indices i et o se rapportent aux milieux intra- et extra-cellulaire, respectivement. Lorsque la pression hydrostatique du milieu extérieur P_o est nulle, $\Delta P_{i,o}$ se simplifie en P , la pression de turgescence cellulaire.

Le grandissement cellulaire dépend donc de l'existence d'une différence de potentiel hydrique entre la cellule et son milieu environnant. Si celle-ci s'annule, l'entrée d'eau s'arrête et la croissance cesse. Le coefficient de réflectivité membranaire est souvent négligé (on considère $\sigma=1$), ce qui, selon Steudle (1993), reste une bonne approximation pour de nombreux solutés. La conductance hydraulique peut également réguler l'entrée d'eau dans la cellule et son rôle sera discuté ci-après.

1.2 ASPECT MÉCANIQUE DU GRANDISSEMENT CELLULAIRE

Les parois cellulaires possèdent des propriétés viscoélastiques: elles présentent, en réponse à l'application d'une force, "des flux de type visqueux, des déformations élastiques retardées ainsi que des déformations élastiques instantanées" (Cosgrove, 1993b). Plus simplement, Lockhart (1965) a observé une bonne corrélation entre l'accroissement cellulaire et la pression de turgescence. La deuxième hypothèse de Lockhart

traduit l'aspect biomécanique (et seulement plastique, c'est à dire irréversible) de l'expansion des parois et peut être ainsi formulé:

$$\frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} = \phi \cdot (P - Y) \quad (3)$$

où $(1/V) (dV/dt)$ est la vitesse d'expansion volumique de la cellule (h^{-1}), ϕ le coefficient d'extensibilité des parois ($h^{-1} MPa^{-1}$), P la pression de turgescence (MPa) et Y le seuil de turgescence au dessus duquel la croissance est possible (MPa). $(P-Y)$ représente la force motrice de l'extension et ϕ la "facilité" des parois à se déformer.

1.3 LE MODÈLE DE LOCKHART

Le modèle développé par Lockhart (1965) intègre les aspects hydraulique et mécanique du grandissement cellulaire. Il est encore aujourd'hui largement utilisé dans le cadre des études biomécaniques de la croissance (Pritchard *et al.*, 1990b, 1993; Spollen et Sharp, 1991; Steudle, 1992; Frensh et Hsiao, 1994; Tomos et Pritchard, 1994; etc ...).

Lorsqu'une cellule en croissance est en régime permanent, le flux entrant d'eau doit être identique à l'augmentation de volume cellulaire due à l'expansion des parois, les équations (1) et (3) sont égales. En éliminant P entre ces deux équations, on arrive à une nouvelle expression du taux de croissance:

$$\frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} = \frac{L \cdot \phi}{(L + \phi)} \cdot (\sigma \Delta \pi - Y) \quad (4)$$

ou bien, en réutilisant l'équation (2):

$$\frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} = \frac{L \cdot \phi}{(L + \phi)} \cdot (\Psi_o - \Psi_i + P - Y) \quad (5)$$

La croissance dépend donc du gradient de pression osmotique existant entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et est proportionnelle à un coefficient de croissance $[L \cdot \phi / (L + \phi)]$. La comparaison des grandeurs respectives de L et ϕ permet d'envisager différents cas extrêmes:

- $L \gg \phi$: l'équation (5) se simplifie pour donner l'équation (3), ce sont les propriétés mécaniques des parois (les propriétés rhéologiques) qui contrôlent le grandissement cellulaire. L'équilibre des potentiels hydriques est pratiquement respecté. Seul un très faible gradient de potentiel hydrique est nécessaire à la croissance.
- $L \ll \phi$: l'équation (4) se réduit à l'équation (1), c'est la conductance hydraulique qui limite l'expansion. Un fort gradient de potentiel hydrique est nécessaire à la croissance.

Dans le cas de cellules isolées, la conductance hydraulique, qui correspond uniquement à la conductivité hydraulique de la membrane plasmique, est si grande que l'équilibre des potentiels hydriques est toujours pratiquement respecté, même à des taux de croissance élevés (Cosgrove, 1986; Pritchard *et al.*, 1987).

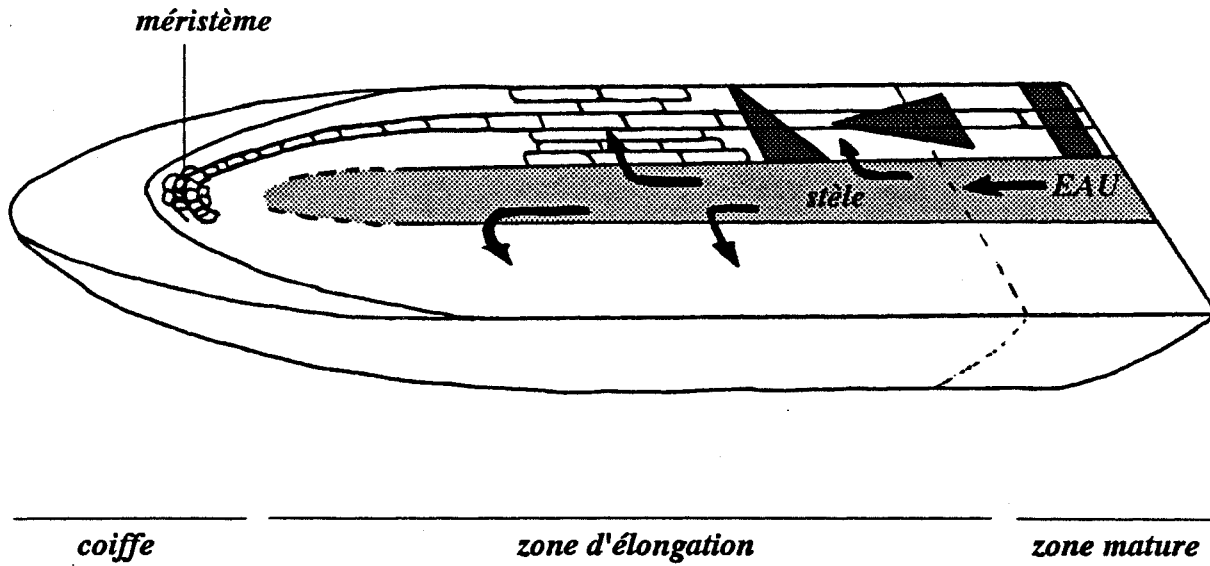


Figure 1 : Schéma de circulation de l'eau dans l'apex racinaire et positions des gradients de potentiel hydrique induits par la croissance. La base du triangle représente un potentiel hydrique élevé (faible valeur absolue).

Dans un tissu pluricellulaire, la définition de la conductance hydraulique est plus compliquée. Elle dépend de la résistance au flux d'eau à travers la membrane plasmique mais inclut aussi des résistances au transfert de l'eau à travers les parois, de la source vers les cellules en croissance (Cosgrove, 1993b; Steudle, 1994). Cependant, cela ne change pas la théorie du grandissement cellulaire mais deux écoles s'opposent quant au rôle de la conductance hydraulique dans la régulation du grandissement cellulaire.

- Molz et Boyer (1978) mesurent de forts gradients de potentiel hydrique dans les tissus en croissance. Ils concluent qu'une résistance au flux d'eau (radialement, du xylème vers l'épiderme) induit la naissance d'un potentiel hydrique plus négatif dans les cellules en croissance appelé *potentiel hydrique induit par la croissance*: la conductance hydraulique limite le grandissement cellulaire. Le gradient de potentiel hydrique, du xylème vers les cellules en croissance (fig. 1), serait de l'ordre de 0,2 à 0,4 MPa et n'existerait pas dans les régions matures (Wesgate et Boyer, 1984, 1985; Boyer *et al.*, 1985). Cosgrove et Cleland (1983) ont suggéré que ce gradient de potentiel résulterait de la présence de solutés dans l'apoplaste et non d'une faible conductance hydraulique, mais, d'autres études tendent à montrer qu'il n'existerait qu'une faible quantité de solutés dans les parois (Nonami et Boyer, 1987). Cependant, la pression osmotique de l'apoplaste ne pouvant être mesurée directement, les résultats dans la littérature restent contradictoires. Selon Pritchard (1994), le gradient de potentiel hydrique induit par la croissance dans les racines, est inférieur à la précision de mesure de ces potentiels.

- D'autres scientifiques penchent en faveur d'une conductance hydraulique non limitante pour la croissance, même à l'échelle d'un tissu. Selon Cosgrove (1985), des expériences de relaxation des parois *in vivo* (cf. § 1.3.2), montrent que L serait au moins 8 fois supérieure à ϕ et donc que L ne limiterait pas la croissance. Malone et Tomos (1992), par des mesures directes du potentiel hydrique cellulaire (par mesure des potentiels osmotique et de turgescence sur des cellules individuelles), montrent que la différence de potentiel hydrique entre cellules en croissance et cellules matures, dans une tige de pois, est inférieure à 0.05 MPa et concluent que L est suffisamment grand pour ne pas limiter la croissance. Tomos et Pritchard (1994) soulignent qu'ils n'ont jamais rencontré de cas où L limitait la croissance. Cosgrove (1987b) établit une liste non exhaustive de nombreux arguments soutenant l'hypothèse qui considère que L n'affecte pas le grandissement cellulaire. Selon Cosgrove (1985, 1987a), le gradient de potentiel hydrique induit par la croissance est de l'ordre de 0.05 MPa et limite la croissance pour une part d'environ 10%. Le rôle de la conductance hydraulique semble donc négligeable dans le contrôle du grandissement cellulaire, et ceci, même dans un tissu.

Ainsi, de nombreux auteurs ayant travaillé sur diverses plantes (Neumann *et al.* (1994); Pritchard *et al.* (1993) et Spollen et Sharp (1991), sur la racine de maïs; Ferris et Taylor (1994) sur la racine de diverses herbes de prairie; Pritchard *et al.* (1987) sur la racine de blé; Thomas *et al.* (1989) sur la feuille de *Lolium*; etc ...) ont considéré que L ne limite pas la croissance et ont analysé le grandissement cellulaire à travers l'équation simplifiée (3) où seul l'aspect biomécanique est pris en compte.

D'autre part, l'étude anatomique d'un apex racinaire montre que, lors du grandissement cellulaire, la variation de dimension dans la direction radiale est nettement inférieure (environ 10 fois) à celle se produisant dans la direction axiale. Ainsi, un modèle de Lockhart doublement simplifié est utilisé: le grandissement cellulaire est décrit en terme de variation relative de la *longueur* ($1/L \cdot (dL/dt)$) plutôt que du *volume* cellulaire. Finalement, le grandissement cellulaire est généralement étudié à l'aide de cette équation:

$$\frac{1}{L} \cdot \frac{dL}{dt} = \phi \cdot (P - Y) \quad (6)$$

1.3.1 Signification des paramètres ϕ et Y

Le modèle du grandissement cellulaire sous cette forme simplifiée (équation 6) serait particulièrement puissant si les paramètres ϕ et Y étaient constants. *Très hypothétiquement*, le seuil de turgescence minimale Y pourrait s'interpréter comme une tension minimale dans les parois nécessaire pour libérer le site de fixation d'une enzyme, le coefficient d'extensibilité ϕ représenterait alors la vitesse d'action de cette enzyme, qui pourrait couper des liaisons entre les polymères sous tension et donc permettre l'extension pariétale (Pritchard, 1994). Souvent cependant, il a été montré que ces deux paramètres étaient *variables*. Il semble que ϕ et Y varient de façon à maintenir le taux de croissance en dépit de variations de la pression de turgescence (Passioura, 1994). L'ajustement peut être très rapide, en 10 à 15 minutes (Passioura et Fry, 1992). Par exemple, suite à une augmentation de la pression de turgescence de 0,05 MPa, la vitesse d'allongement d'une cellule de *Nitella* augmente puis retourne rapidement à sa valeur initiale et s'y maintient (Green *et al.*, 1971). De nombreux comportements similaires ont été mentionnés: Serpe et Matthews (1992) sur les feuilles de *Begonia*, Zhu et Boyer (1992) sur l'algue *Chara*, Hsiao et Jing (1987) sur la racine de maïs.

La non-constance de ϕ et Y rend leur interprétation difficile. De plus, ces paramètres n'ont pas de signification biophysique. Passioura et Fry (1992) ont émis un modèle moléculaire permettant de rendre compte de la nature variable de ces paramètres. Les molécules d'hémicellulose se partageraient en deux populations, une dont les molécules seraient en charge et tendues entre deux microfibrilles de cellulose, l'autre dont les molécules seraient relâchées. Durant l'extension, certaines molécules à l'état relâché passeraient à l'état tendu pendant que des enzymes pourraient couper certaines molécules en charge. Le passage des hémicelluloses d'une population à l'autre se ferait continuellement au cours de l'extension de la paroi, à un rythme donné. Une variation de la turgescence induirait un changement de la distribution des hémicelluloses entre ces deux populations mais n'altérerait pas le rythme de passage des molécules d'un état à un autre. Le modèle mathématique associé à ces événements rend compte de la nature variable de ϕ et Y . Cependant, Cosgrove (1993b) émet une réserve car, selon ce modèle, la pression de turgescence suivrait une décroissance linéaire en cas de relâchement des stress pariétaux et non exponentielle comme cela semble se passer dans la réalité. Des progrès sur le plan biochimique sont nécessaires pour donner un sens mécanistique précis à ces paramètres ϕ et Y .

Bien que ϕ et Y soient susceptibles de varier, on peut tout de même considérer que lorsqu'un organe en croissance est *en régime permanent*, il peut être caractérisé par un couple (ϕ , Y) dont les valeurs décrivent l'extensibilité pariétale des cellules en croissance et sont donc utiles pour caractériser l'état physique des parois (Cosgrove, 1985; Pritchard *et al.*, 1990b).

1.3.2 Détermination des paramètres ϕ et Y

-1- La première méthode consiste à établir la relation entre la vitesse de croissance (r) et la pression de turgescence (P) (fig. 2). La vitesse de croissance et la pression de turgescence sont déterminées en conditions optimales, puis la turgescence est abaissée artificiellement en baignant la racine, par exemple, dans des solutions d'osmolarité variée. Après un temps suffisamment long pour permettre l'équilibre des potentiels hydriques (et donc l'abaissement de P), mais assez court pour ne pas que des phénomènes d'osmorégulation interfèrent et/ou que les paramètres (ϕ , Y) varient, r et P sont déterminés de nouveau. D'après l'équation (6), la pente de la droite de régression de r en fonction de P correspond à ϕ et l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses à Y . Cette méthode a été utilisée par Bunce (1977) sur la feuille de soja, Cleland (1976) sur le

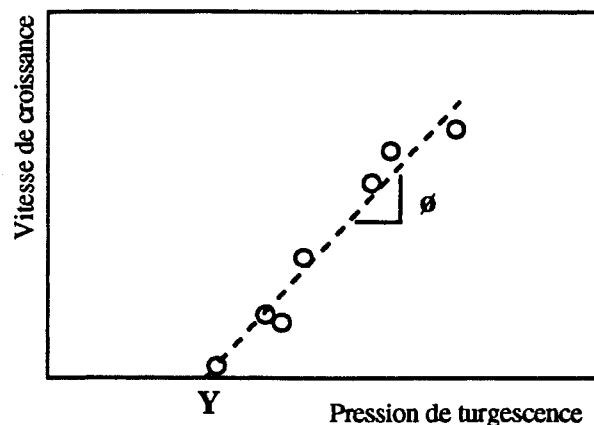


Figure 2 : Détermination des paramètres Y et ϕ du modèle de Lockhart en étudiant la corrélation entre vitesse de croissance et pression de turgescence. D'après le modèle de Lockhart, ϕ correspond à la pente de la régression et Y à l'intersection avec l'axe des abscisses.

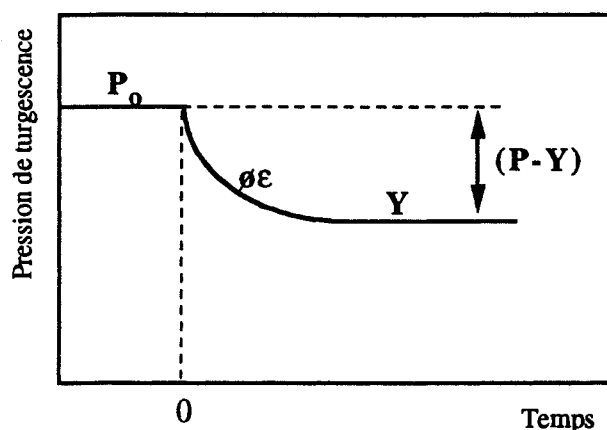


Figure 3 : Détermination des paramètres Y et ϕ du modèle de Lockhart en étudiant la relaxation de la pression de turgescence lorsque le flux d'eau vers les cellules en croissance est stoppé au temps zéro. La pression de turgescence minimale correspond à Y . La pente de la courbe permet de calculer ϕ sachant que ϵ est le module d'élasticité volumique. P_0 est la pression de turgescence initiale.

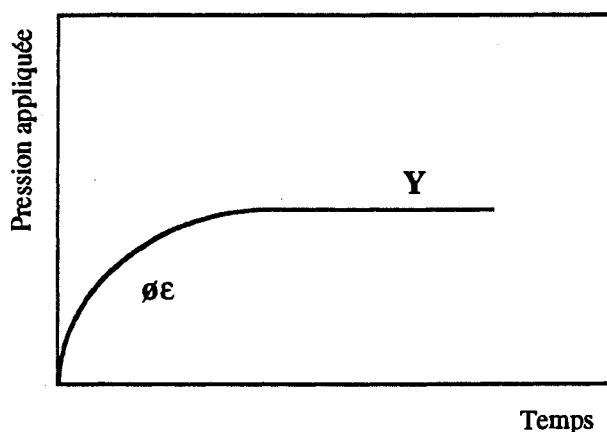


Figure 4 : Détermination des paramètres Y et ϕ du modèle de Lockhart en étudiant la pression à appliquer à un organe pour stopper sa croissance. La pressurisation compense la relaxation des tensions pariétales. La pente de la courbe permet de calculer ϕ sachant que ϵ est le module d'élasticité volumique. Y correspond au maximum de la pression appliquée.

coléoptile d'avoine, Pritchard *et al.* (1990b) sur la racine de blé. Dans de nombreux cas, la relation trouvée apparaît vraiment être linéaire et le modèle refléter la réalité. Par contre, il existe certains cas où la corrélation fait apparaître une relation curvilinéaire et l'interprétation est plus difficile (Cosgrove, 1993a).

-2- Un deuxième moyen de calculer ϕ et Y consiste à analyser *in vivo* le relâchement des parois des tissus en croissance. L'entrée d'eau dans la cellule (ou le tissu) est arrêtée par excision de l'organe en croissance. La déshydratation est inhibée par une forte humidité atmosphérique. En conséquence du relâchement des tensions pariétales et en l'absence d'absorption d'eau par la cellule, la pression de turgescence décroît exponentiellement selon l'équation :

$$P(t) = Y + (P_0 - Y) \cdot e^{-c\phi \epsilon t} \quad (7)$$

où P(t) est la pression de turgescence au temps t, P_0 la pression de turgescence initiale, c un coefficient correcteur et ϵ le module d'élasticité volumique (fig. 3). Le seuil atteint correspond à Y, pression de turgescence en dessous de laquelle le relâchement des parois ne se produit plus (se référer à Cosgrove (1985, 1987a) pour plus de détails).

-3- Une méthode voisine consiste à mesurer la pression hydrostatique à appliquer à un organe en croissance pour stopper son élongation. La pression appliquée compense la réduction des tensions pariétales et la diminution de turgescence qui en découlerait. En empêchant le gradient de potentiel hydrique de s'installer, cette pressurisation inhibe l'entrée d'eau (fig. 4). La "pression de compensation" augmente selon l'équation:

$$P_c(t) = Y \cdot (1 - e^{-c\phi \epsilon t}) \quad (8)$$

où $P_c(t)$ est la pression de compensation au temps t.

Ces deux dernières méthodes ont été utilisées par Cosgrove (1985) sur l'épicotyle de pois et Cosgrove (1987b) sur l'hypocotyle de soja mais n'ont jamais été appliquées à des racines. On notera que ce sont les trois seules méthodes qui donnent accès à ϕ et Y. D'autres méthodes permettent d'analyser l'extensibilité des parois mais ne se rapportent pas aux paramètres (ϕ , Y). Elles sont décrites dans le paragraphe suivant.

1.3.3 Notion d'extensibilité

Des précautions importantes sont à prendre pour utiliser ou interpréter ce terme "extensibilité". En effet, il est utilisé d'une étude à l'autre avec des sens très différents (Cosgrove, 1993a). Le ϕ de l'équation de Lockhart, le couple (ϕ , Y), les propriétés mécaniques des parois mesurées par l'extensiomètre d'Instron (Van Volkenburg *et al.*, 1983) et par d'autres méthodes encore sont tous appelés "extensibilité" et pourtant ne décrivent pas le même processus physique et *ne sont donc pas directement comparables*.

Les méthodes permettant d'évaluer l'extensibilité (dans toutes ses variantes) sont exhaustivement décrites et comparées par Cosgrove (1993a). Brièvement, les études de relâchement des parois de tissu en croissance *in vivo* ou *in situ*, la corrélation entre P et vitesse de croissance (§ 1.3.2) décrivent l'extensibilité spécifique au phénomène de croissance. Ces méthodes sont directement reliées à la théorie biophysique du grandissement cellulaire (équation 3) et permettent d'évaluer ϕ et Y. L'étude du relâchement des parois de tissu *in vitro*, l'extensiomètre d'Instron (Van Volkenburg *et al.*, 1983), sont des méthodes qui permettent d'évaluer l'extensibilité des parois, décrivant les propriétés du *matériau* viscoélastique que sont les parois, mais ne se rapportant qu'indirectement au phénomène de croissance (Cosgrove, 1993a).

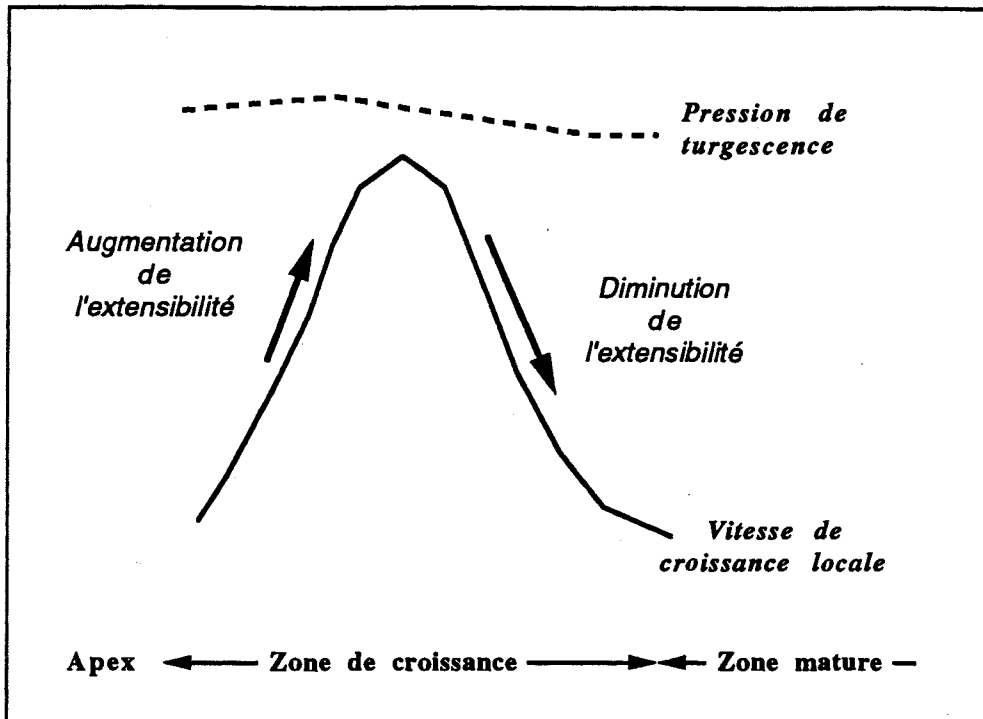


Figure 5 : Schéma explicatif de l'étude des propriétés rhéologiques par analyse comparée des profils de pression de turgescence et de vitesse de croissance locale des cellules le long de la zone de croissance d'un apex racinaire.

La différence entre ces deux familles de méthodes de mesure de l'extensibilité peut être illustrée par les expériences de Pritchard *et al.* (1990a). Une réduction de la température de 20 à 5 °C réduit très vite la croissance racinaire de plantules de maïs. L'extensiomètre d'Instron révèle une réduction de l'extensibilité des parois lorsque le stress est appliqué depuis 10 jours, mais, aucune différence n'apparaît pour les mesures effectuées 30 mn après le commencement du stress alors que la croissance est déjà fortement réduite. Par contre, une réduction de l'extensibilité ϕ , déterminée en étudiant la relation entre la vitesse de croissance et la pression de turgescence, est révélée moins de 15 minutes après la diminution de température.

Une dernière méthode, celle que nous avons utilisée dans notre étude, est à mi-chemin entre ces deux familles. Elle ne permet pas de déterminer ϕ et Y mais informe sur *l'extensibilité relative au phénomène de croissance*. La base de cette méthode repose sur une nouvelle simplification de l'équation de Lockhart (équation 6), qui peut être réduite à:

$$\frac{1}{L} \cdot \frac{dL}{dt} = \text{pression de turgescence} \times \text{extensibilité pariétale} \quad (7)$$

Dans ces conditions, le terme "extensibilité pariétale" intègre les paramètres ϕ et Y sans possibilité de distinction. Cette méthode consiste donc à faire une analyse comparative des variations de la pression de turgescence et de la vitesse de croissance locale. Ainsi, suite à un stress donné, si la pression de turgescence est maintenue mais la croissance inhibée, on peut conclure que l'extensibilité des parois a diminué. Si la pression de turgescence est réduite mais la croissance maintenue, l'extensibilité des parois a augmenté. Cette méthode ne permet pas de résoudre les situations où pression de turgescence et croissance varient dans le même sens. Par contre, si l'un seulement varie et si ces deux paramètres sont déterminés avec une bonne résolution spatiale, elle permet de déterminer des différences d'extensibilité en différentes positions au sein de la zone de croissance. Ainsi, Pritchard *et al.* (1991, 1993) mettent en évidence une variation des propriétés rhéologiques le long de la zone de croissance de racines de blé et de maïs. La pression de turgescence est uniforme le long de l'apex mais la vitesse de croissance locale (la vitesse d'élongation cellulaire en un point donné de la zone de croissance) varie considérablement (fig. 5). Les capacités d'extensibilité des parois varient au cours de la maturation des cellules.

1.4 LE RELÂCHEMENT DES PAROIS : POINT DE DÉPART DU GRANDISSEMENT CELLULAIRE

Lors de sa croissance, la cellule absorbe de l'eau et agrandit la surface de sa paroi. La relation de cause à effet entre ces deux phénomènes a été longtemps discutée.

Initialement, l'importance du gradient de potentiel hydrique dans la zone de croissance était mise en avant (Molz et Boyer, 1978; Wesgate et Boyer, 1984). La conductance hydraulique, supposée faible, aurait induit un gradient de potentiel hydrique du xylème vers l'épiderme. Ce gradient de potentiel hydrique, à l'origine du flux d'eau vers les tissus en croissance, aurait permis à la turgescence d'augmenter au-delà du seuil Y et aux parois de s'étendre. Ce grandissement aurait maintenu P et Ψ sous leur valeur d'équilibre, contribuant de façon dynamique au maintien du gradient de potentiel hydrique (Boyer, 1987).

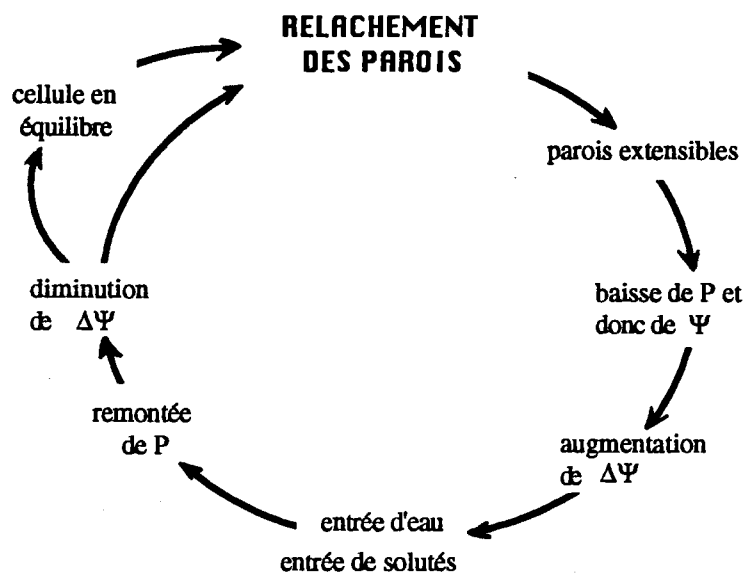


Figure 6 : Le relâchement des tensions pariétales induit une diminution de la pression de turgescence (P) et du potentiel hydrique cellulaire (Ψ) et initie le grandissement cellulaire.

Il est maintenant admis que le grandissement cellulaire est initié par un *relâchement de la tension mécanique dans les parois* (Boyer, 1993; Cosgrove, 1993b; Pritchard, 1994). En quelque sorte, la résistance exercée par les parois en opposition à la pression de turgescence, diminue (fig. 6). La pression de turgescence permet alors une extension de la surface pariétale, ce qui induit immédiatement une diminution de P et donc de la tension sur les parois, mais aussi du potentiel hydrique intracellulaire. Le gradient de potentiel naissant déclenche un flux d'eau entrant. Le potentiel hydrique, la turgescence et la tension dans les parois sont restaurés. Tant que le relâchement des parois continue, le grandissement continue également, sinon, la cellule retrouve son état d'équilibre (fig. 6). Ces étapes, décrites comme une suite d'événements, sont en fait quasi simultanées, le grandissement cellulaire est un phénomène continu, "fluide".

Parmi les arguments plaçant en faveur du rôle déterminant du relâchement des parois, les expériences de relaxation des parois (décrites au § 1.3.2, Cosgrove, 1985) montrent que les stress pariétaux et donc la turgescence, diminuent même en l'absence d'entrée d'eau. Par ailleurs, cette diminution de la turgescence ne se produit pas lorsqu'une goutte d'eau a été placée sur les extrémités sectionnées, ni lorsque l'expérience est menée sur une portion de tissu mature. *Cela confirme que le relâchement des parois est à l'origine du gradient de potentiel hydrique et du flux d'eau et non l'inverse.*

1.5 ASPECT BIOCHIMIQUE : ORIGINE DU RELÂCHEMENT DES PAROIS

S'il est maintenant admis que le relâchement des parois est à l'origine du grandissement cellulaire, la nature des processus impliqués n'est pas encore élucidée.

La paroi est une structure polyédrique complexe composée de trois réseaux : un réseau de microfibrilles de cellulose plongées dans une matrice d'hémicellulose, un réseau de pectines et un réseau de protéines. Ces réseaux seraient interconnectés et chacun serait susceptible de subir des réarrangements suite à des clivages et reformations de liaisons (Cosgrove, 1993a).

De nombreuses hypothèses concernant le processus qui déclenche le relâchement des parois ont été étudiées. Pritchard (1994) les classe en trois catégories selon qu'elles concernent : l'orientation des microfibrilles de cellulose, la composition globale de la paroi et les liaisons entre les différents éléments de la paroi. Des études concernant l'orientation des microfibrilles de cellulose, il ressort qu'une orientation transversale à l'axe d'élongation semble nécessaire à l'extension des parois mais aucune corrélation fine n'apparaît entre orientation et vitesse de croissance. Les travaux sur la composition de la paroi cellulaire mettent en évidence une corrélation négative entre la quantité de galactose et l'extensibilité pariétale. D'autres composés comme le glucose, le xylose ou les composés phénoliques ne présentent pas de lien évident avec les propriétés des parois. La troisième catégorie concerne les études de l'activité d'enzymes intervenant au niveau de différentes liaisons entre les constituants de la paroi cellulaire. Les corrélations entre l'activité de diverses enzymes, peroxydases, estérases, xyloglucane endotransglycosylase (XET) et l'état de relâchement des parois ne sont que partielles. Plus récemment, des résultats prometteurs ont été obtenus à propos de la sensibilité des parois à l'action d'expansines, protéines pariétales capables d'induire le relâchement de parois isolées (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Cosgrove et Li, 1993). De plus amples détails ainsi que les références initiales des différentes hypothèses sur le contrôle du relâchement des parois sont indiquées par Pritchard (1994).

Actuellement aucune hypothèse n'est complètement satisfaisante et les aspects biochimiques de l'expansion des parois ne sont pas résolus. Il est probable que plusieurs des hypothèses émises interviennent simultanément dans le contrôle du grandissement cellulaire (Pritchard, 1994).

1.6 GRANDISSEMENT CELLULAIRE ET ABSORPTION DE SOLUTÉS

S'il n'y avait pas absorption de solutés par les cellules en croissance, un doublement du volume cellulaire entraînerait une diminution de moitié de la pression osmotique et donc de la pression de turgescence. En fait, l'absorption de solutés semble très bien régulée et fortement couplée au grandissement cellulaire (Schmalstig et Cosgrove, 1990; Sharp *et al.*, 1990). Une éventuelle relation de cause à effet se pose entre grandissement cellulaire et absorption de solutés.

Stevenson et Cleland (1982) ont montré que des coléoptiles pouvaient encore croître après excision et donc arrêt de l'entrée de solutés et diminution du gradient de potentiel osmotique. Il semble que l'entrée de solutés ne soit pas strictement nécessaire au grandissement cellulaire. Cependant, la croissance est maintenue pendant un temps beaucoup plus long, jusqu'à 24 h après l'excision, quand des solutés absorbables (saccharose, ions) sont ajoutés au milieu d'incubation (Stevenson et Cleland, 1982). D'autre part, lorsque la croissance est réduite en conséquence de variations des propriétés rhéologiques, par exemple suite à l'addition de galactose dans le milieu de culture (en concentration très faible), les pressions osmotique et de turgescence augmentent un peu mais beaucoup moins que si le flux de solutés était resté identique (Pritchard, 1994). Il semble que la régulation de l'absorption de solutés soit d'une part très rapide et d'autre part une conséquence du grandissement cellulaire.

Selon Cosgrove (1993b), les plantes régulent *l'entrée de solutés dans les tissus en croissance comme une conséquence du grandissement cellulaire* et non comme un moyen de contrôler ce grandissement cellulaire. Si l'absorption de solutés est indispensable, c'est par rapport au maintien des pressions osmotique et de turgescence (pour compenser la dilution due à l'entrée d'eau) et pour l'apport d'énergie. Elle n'interviendrait pas dans le contrôle biochimique de l'expansion.

1.7 EFFETS DE DIFFÉRENTES CONTRAINTES SUR LE GRANDISSEMENT CELLULAIRE

Une altération de la croissance racinaire peut être induite par une perturbation du grandissement cellulaire mais aussi de l'activité mitotique. Cependant, la division cellulaire semble moins sensible aux stress environnementaux que le grandissement cellulaire (Jones, 1992). La première des activités cellulaires perturbées par un faible déficit hydrique serait le grandissement cellulaire (Hsiao *et al.*, 1976).

En ce qui concerne la régulation du grandissement cellulaire, d'après le modèle simplifié de Lockhart (équation 6), une variation du taux de croissance peut être induite par l'altération de la pression de turgescence ou des propriétés rhéologiques. Les plantes semblent, dans certaines limites, ajuster les propriétés rhéologiques pour compenser les perturbations physiques de la croissance (Cosgrove, 1987). D'autre part, il existe dans la littérature de nombreuses études où la croissance est inhibée par une contrainte environnementale sans que la turgescence soit réduite. Les changements des propriétés rhéologiques semblent, en grande partie, responsables des modifications de la vitesse de croissance.

Le froid. L'application du froid a réduit considérablement la croissance de la racine de plantules de maïs, en dépit d'une augmentation de la pression de turgescence (de 0,59 à 0,82 MPa). Un abaissement de la température de 30 à 15 °C a réduit l'extensibilité ϕ de 75% mais n'a pas affecté Y (Pritchard *et al.*, 1990a). Cette modification de l'extensibilité était irréversible pour les cellules dont la croissance avait été stoppée. Suite à un retour à une température normale, la reprise de croissance a nécessité une nouvelle génération de cellules. La croissance racinaire de plantules de blé a également été inhibée par une réduction de la température

(de 27 à 15°C) sans que la pression de turgescence ait été réduite. Dans ce cas, il semble que le froid ait diminué ϕ et augmenté Y (Pritchard *et al.*, 1990b). La croissance des feuilles de *Lolium temulentum* a été fortement inhibée par une chute de la température de 20 à 2 °C, sans que la turgescence ait été affectée (Thomas *et al.*, 1989). *Le froid semble ainsi essentiellement agir sur l'extensibilité des parois.*

La salinité. L'application de NaCl 100 mM pendant plusieurs jours a réduit la croissance de la racine de maïs. Il semble que le stress salin ait augmenté le seuil de turgescence Y (mesuré psychrométriquement) et ait réduit l'extensibilité des parois (Neumann *et al.*, 1994). Un stress salin (100 mM NaCl) appliqué au niveau des racines a également réduit l'extensibilité extensométrique des tissus foliaires en croissance (Neumann, 1993). Que le stress ait été de 20 minutes ou de 3 jours, le retour à des conditions normales a induit la récupération des propriétés initiales d'extensibilité des tissus foliaires en moins de 20 mn. La réversion a donc été rapide, même après 3 jours de stress.

Une forte concentration des ions K^+ ou SO_4^{2-} dans la solution nutritive (10 mM), a réduit la croissance racinaire de plantules de blé sans affecter la pression de turgescence. L'extensibilité extensométrique des parois a été diminuée (Pritchard *et al.*, 1987). L'application de 10 mM de KCl à des racines de blé a également inhibé l'élongation racinaire sans affecter P. Le seuil de turgescence Y a été augmenté et l'extensibilité ϕ légèrement diminuée (Pritchard *et al.*, 1990b).

Un excès de certains ions dans la solution nutritive (Na, K, SO_4^{2-}) semble réduire la croissance racinaire en affectant les propriétés rhéologiques des parois.

Le CO_2 atmosphérique. Ferris et Taylor (1994) ont montré que l'allongement racinaire est stimulé par le doublement de la teneur atmosphérique en CO_2 . La turgescence, mais aussi l'extensibilité des parois (mesurée avec l'extensiomètre d'Instron), ont augmenté en réponse à l'élévation du taux de CO_2 . Par ailleurs, l'augmentation de la teneur atmosphérique en CO_2 a stimulé l'expansion foliaire de *Populus euramericana*, *Plantago media*, *Sanguisorba minor* et *Phaseolus vulgaris* en augmentant l'extensibilité pariétale (Taylor *et al.*, 1994). Il semble tout de même que des variations interspécifiques existent. Par exemple, la croissance foliaire de *Lotus corniculata* a été stimulée par une augmentation de la production de cellules et non par une stimulation du grandissement cellulaire (Taylor *et al.*, 1994).

L'excision. Bien que ce ne soit pas une contrainte environnementale, certaines techniques de mesure de l'extensibilité utilisent une zone de croissance excisée. Pritchard *et al.* (1988) ont montré que l'excision de l'apex racinaire (1 cm) de plantules de blé inhibait considérablement la croissance et diminuait l'élasticité et la plasticité des parois (extensiomètre d'Instron), la turgescence étant seulement réduite de 0,1 MPa.

Le déficit hydrique. Les effets du déficit hydrique sont plus compliqués. En effet, le déficit hydrique peut entraîner une réduction de la pression de turgescence plus directement que les autres contraintes. Spollen et Sharp (1991) ont montré que le stress hydrique (-1,6 MPa) augmente l'extensibilité pariétale de la partie apicale de la zone d'élongation de racine de maïs: la vitesse de croissance locale y est maintenue en dépit d'une turgescence diminuée. L'application d'un stress osmotique de -0,5 MPa à des racines de *Vigna mungo* a rapidement stoppé la croissance et réduit la turgescence des cellules en croissance de 0,65 à 0,14 MPa (Itoh *et al.*, 1987). Alors que la croissance est revenue à son taux initial en une heure, P n'a atteint sa valeur de départ qu'au bout de 5 heures. Pendant toute cette phase de récupération, l'extensibilité des parois était plus forte, permettant un taux de croissance normal pour une turgescence réduite.

Cependant, il existe des cas où la situation inverse s'est produite, l'extensibilité a été diminuée par le stress hydrique. Dans la partie distale de la zone d'élongation de la racine de plantule de blé, 24 h après l'application d'un stress osmotique de 0,5 MPa, la turgescence initiale était rétablie mais la vitesse de croissance locale était restée plus faible, ce qui a conduit à dire que l'extensibilité des parois avait diminué (Pritchard *et al.*, 1991). L'analyse de l'adaptation des propriétés rhéologiques est de plus compliquée par l'existence de phases transitoires. Sur des racines de plantules de maïs, Pritchard *et al.* (1993) ont mis en évidence, 15 mn après l'application d'un stress osmotique de -0,48 MPa, une augmentation de l'extensibilité dans la partie apicale de la zone d'élongation, zone où la vitesse de croissance n'avait pas été affectée mais où la turgescence était réduite. Par contre, 24 h après l'application d'un stress de 0,96 MPa, P était revenu à sa valeur initiale tout au long de l'apex mais le taux de croissance locale était resté réduit dans la partie distale de la zone d'élongation : l'extensibilité des parois y était diminuée.

En ce qui concerne les parties aériennes, Roden *et al.* (1990) ont montré que la croissance foliaire du peuplier avait été inhibée par le stress hydrique et que l'extensibilité pariétale (mesurée par l'extensiomètre d'Instron) avait été réduite. Chez le maïs, une diminution de l'extensibilité des parois dans les feuilles en croissance a été enregistrée moins de 2 min. après le transfert des plantules dans une solution de polyéthylène glycol de potentiel hydrique -0.5 MPa (Chazen et Neumann, 1994).

A la lumière de ces précédents exemples, le rôle de la turgescence paraît donc mineur dans le contrôle du grandissement cellulaire. Cependant, il existe quelques cas dans la littérature où des variations de turgescence sont identifiées comme responsables des perturbations de la croissance. Par exemple, l'application de 100 mM de NaCl a inhibé la croissance foliaire du haricot (Neumann *et al.*, 1988). L'extensibilité pariétale a été légèrement augmentée et la turgescence réduite de 0,1 MPa par ce stress salin. Dans ce cas, la diminution de la pression de turgescence aurait été responsable de la réduction de croissance. D'autre part, Pardossi *et al.* (1994) ont montré que, chez le haricot, l'expansion foliaire est inhibée par une mise à la lumière ou un refroidissement des racines. Il semble que la diminution de la pression de turgescence enregistrée dans les cellules épidermiques soit suffisante pour expliquer cette réduction de croissance. Enfin, il ne faut pas oublier les différents cas où le stress hydrique a induit une diminution de la turgescence (Spollen et Sharp, 1991; Pritchard *et al.*, 1993). Dans ce cas, même si les propriétés rhéologiques jouent un rôle, la diminution de turgescence est responsable, au moins en partie, de la réduction de croissance.

1.8 CONCLUSION

Le grandissement cellulaire a été exprimé par Lockhart comme étant fonction de la conductance hydraulique, de la pression de turgescence et des propriétés mécaniques des parois. Le rôle de la conductance hydraulique reste controversé. De nombreuses études de la croissance, à l'échelle du grandissement cellulaire, considèrent que la conductance hydraulique joue un rôle négligeable, même au sein d'un tissu. Par contre, la pression de turgescence et les propriétés rhéologiques interviendraient dans la régulation du grandissement cellulaire. L'extensibilité pariétale paraît, en particulier, très modulable et jouerait un rôle central dans la réponse de la croissance à diverses contraintes.

Partie 2 : Croissance racinaire et contrainte hydrique

Le déficit hydrique étant un facteur limitant essentiel de la croissance, ses effets sont très étudiés, en particulier sur la croissance et la physiologie des parties aériennes. Les effets de la sécheresse sur le système racinaire, sur sa croissance comme sur sa physiologie, sont moins bien connus. Pourtant, le système racinaire est responsable de l'alimentation hydrique de toute la plante et de ce fait, joue un rôle très important en période de déficit hydrique. La capacité à maintenir la croissance et le fonctionnement du système racinaire est un gage de survie pour la plante. Dans ce paragraphe, nous allons faire une brève synthèse des différents éléments concernant la réaction du système racinaire à la contrainte hydrique.

2.1 CROISSANCE RACINAIRE

En général, le déficit hydrique réduit la croissance du système racinaire moins fortement que celle des parties aériennes. Wesgate et Boyer (1985) ont observé que l'élongation racinaire de maïs était arrêtée lorsque le potentiel hydrique du tissu en croissance atteint $-1,6$ MPa alors que la croissance de la tige, des soies et des feuilles était stoppée aux potentiels $-0,5$, $-0,75$ et $-1,0$ MPa, respectivement. De même, lors d'une application progressive d'un stress hydrique, l'inhibition de la croissance racinaire de plantules de maïs a commencé seulement 7 jours après le début du stress alors que la croissance foliaire a été réduite dès le 4^{ème} jour (Sharp et Davies, 1979). L'augmentation du rapport entre les biomasses des parties racinaires et des parties aériennes (R/S) est communément admise comme une réaction à la contrainte hydrique (Hsiao, 1973; Meyer et Boyer, 1981). C'est également le cas chez les espèces ligneuses. Le rapport R/S du pin maritime et du chêne sessile est augmenté significativement par le déficit hydrique (Guehl *et al.*, 1994).

Une stimulation de la croissance racinaire par un déficit hydrique modéré a même été observée dans plusieurs études. Chez le maïs, la première phase d'une période de dessèchement du sol a induit une croissance racinaire nettement supérieure à celle des témoins (Sharp et Davies, 1979). Une accélération de la croissance racinaire suite à l'application d'un déficit hydrique modéré, a également été observée par Meyer et Boyer (1981) sur des plantules de soja. Le même phénomène est présent chez les espèces ligneuses. Non seulement, l'élongation racinaire de plantules de pin maritime n'a pas été affectée par des stress de $-0,5$ et $-0,8$ MPa mais elle a été stimulée par un stress de $-0,2$ MPa (N'Guyen et Lamant, 1989b). Sharp et Davies (1979) ont suggéré que cette stimulation de la croissance racinaire pourrait être liée à une accumulation préférentielle des solutés dans les apex racinaires.

Il faut tout de même noter que la stimulation de l'élongation racinaire par une contrainte hydrique modérée n'est pas un cas général. Par exemple, un stress de $-0,2$ MPa appliqué à des plantules de maïs n'a pas augmenté la vitesse de croissance racinaire (Sharp *et al.*, 1988), à l'inverse de ce qu'ont trouvé Sharp et Davies

(1979). Il est probable que l'âge des plants, les conditions de culture, la vitesse d'installation du stress influencent la réaction des plants au déficit hydrique.

2.2 MORPHOLOGIE ET ARCHITECTURE DU SYSTÈME RACINAIRE

La réponse de la croissance du système racinaire face à la contrainte hydrique varie d'une espèce à l'autre (Reader *et al.*, 1993): sur 42 espèces de plantes vasculaires étudiées par ces auteurs, 7 ont présenté une augmentation de la profondeur d'enracinement en réponse au stress hydrique appliqué, 30 n'ont pas montré de différence significative et 5 ont montré une réduction de la profondeur d'enracinement. Les espèces présentant un enracinement plus profond ont aussi mieux maintenu la croissance des parties aériennes. Il semble que ces espèces présentent typiquement une régénération essentiellement par le stade graine alors que les espèces dont la profondeur d'enracinement n'est pas stimulée par la sécheresse se régénèrent à la fois via la graine et végétativement. Les capacités d'adaptation de l'architecture du système racinaire pourraient refléter le type écologique de l'espèce (Reader *et al.*, 1993).

Face à la sécheresse, certaines espèces comme *Sinapis alba* ou *Brassica napus* var. *oleifera*, présentent une rhizogénèse adaptative (Sabatier et Vartanian, 1983; Deleens *et al.*, 1989). Lorsque le potentiel hydrique du sol descend sous un certain seuil, la croissance des racines latérales est inhibée et la plante induit la mise en place de nombreuses racines courtes tubérisées qui sont hautement résistantes à la dessiccation. Ces racines, dont les cellules corticales sont hypertrophiées et accumulent de l'amidon, possèdent un très fort potentiel de croissance lors de la réhydratation.

Cependant, toutes les plantes ne présentent pas cette rhizogénèse adaptative très particulière et il existe d'autres réactions du système racinaire aux conditions hydriques limitantes. Sharp et Davies (1979) ont montré que lorsque la croissance racinaire du maïs était stimulée par un déficit hydrique modéré, le nombre et la longueur des racines latérales étaient augmentés. Par ailleurs, Osonubi et Davies (1978) ont observé un changement de la morphologie du système racinaire du chêne pédonculé en réponse au déficit hydrique. Le système racinaire des plants bien alimentés en eau était constitué de quelques racines épaisses et courtes, celui des plants stressés a été transformé en une profusion de racines longues et fines sans que la biomasse racinaire ait été affectée.

2.3 DIVISION ET GRANDISSEMENT CELLULAIRE

Pour comprendre les différentes réactions de la croissance du système racinaire face au déficit hydrique, inhibition ou stimulation, il faut considérer les deux mécanismes cellulaires qui génèrent la croissance: la division et le grandissement cellulaire.

Les effets du stress hydrique sur l'activité mitotique ne sont pas très clairs. Les travaux de Dunisch et Bauch (1994) montrent que la croissance radiale des trachéides diminue avant que l'activité des cellules péricleinales du cambium soit affectée. Lors de l'étude de la croissance racinaire chez l'oignon, le grandissement cellulaire s'est révélé beaucoup plus sensible à l'application de différents niveaux de stress osmotique (de -0,2 à -1,2 MPa) que la durée du cycle de division cellulaire (Gonzalez-Bernaldez *et al.*, 1968). Cependant, Gardner et Nieman (1964), utilisant la quantité d'ADN dans les cotylédons en croissance de radis comme indice de l'activité mitotique, ont montré que l'augmentation de la quantité d'ADN est réduite de moitié par la présence de 0,1 à 0,2 MPa de mannitol. Lecoœur *et al.* (1995) ont montré que la production de cellules dans les feuilles

de pois en croissance était réduite par l'application d'un stress hydrique. Par ailleurs, Meyer et Boyer (1972) ont observé que, dans l'hypocotyle de soja soumis au déficit hydrique, l'activité mitotique était réduite avec la même intensité que le grandissement cellulaire.

La division cellulaire peut être inhibée par une application assez longue d'un stress hydrique. Hsiao (1973) souligne qu'on ne sait pas si les effets de la contrainte sur l'activité mitotique sont directs ou non. Il est possible que la mitose soit inhibée par une altération des régulateurs de croissance ou par le fait que la cellule mère ne puisse atteindre une taille minimale (par grandissement cellulaire) pour entamer son cycle de division.

Selon Hsiao (1973), il semble que le grandissement cellulaire soit plus sensible au déficit hydrique que la mitose. Le grandissement cellulaire est susceptible d'être affecté à trois niveaux : la conductance hydraulique, la pression de turgescence et les propriétés rhéologiques des tissus en croissance (cf. Partie 1: le grandissement cellulaire). La baisse du potentiel hydrique du sol peut entraîner, s'il n'y a pas osmorégulation, une diminution de la pression de turgescence et donc du grandissement cellulaire. Le gradient de potentiel hydrique entre le tissu en croissance et le sol est responsable du flux d'eau entrant nécessaire au grandissement cellulaire. La réduction de ce gradient peut également être responsable d'une réduction du grandissement cellulaire (Meyer et Boyer, 1981). Enfin, le déficit hydrique peut modifier les propriétés mécaniques des parois et altérer la croissance.

Les conséquences du déficit hydrique sur le grandissement cellulaire ont été plus amplement développées dans le paragraphe 1.7, dans l'étude détaillée du grandissement cellulaire.

2.4 AJUSTEMENT OSMOTIQUE

Face à l'abaissement du potentiel hydrique du sol, les tissus en croissance doivent, pour maintenir la pression de turgescence, abaisser également leur potentiel osmotique, *i.e.* augmenter la concentration intracellulaire en solutés. *L'osmorégulation* ne doit pas être confondue avec la déshydratation des tissus où c'est la perte d'eau qui contribue à l'augmentation de la pression osmotique, et non l'entrée et/ou la synthèse de nouveaux solutés.

L'accumulation de solutés dans les racines en réponse au déficit hydrique a été observée par Osonubi et Davies (1978) chez le chêne pédonculé, par Ranney *et al.* (1991) chez le cerisier, par Sharp et Davies (1979) chez le maïs. Sharp et Davies (1979) ont suggéré que le meilleur maintien de la croissance racinaire, par rapport à la croissance des parties aériennes, pourrait être dû à une meilleure osmorégulation dans les racines. De même, la meilleure croissance de certaines familles de *Picea mariana* en situation hydrique limitante était associée à une meilleure osmorégulation (Tan *et al.*, 1992). Cependant Wesgate et Boyer (1985) indiquent que les potentiels osmotiques des feuilles et des racines de plants de maïs soumis à un déficit hydrique sont identiques. D'autre part, une étude, avec une très haute résolution spatiale du potentiel osmotique, des teneurs et des flux entrants d'hexoses, de potassium et d'eau le long de l'apex racinaire de maïs, montre qu'il n'y a pas accumulation de solutés mais réduction de la teneur en eau dans les apex racinaires de maïs soumis à un déficit hydrique (Sharp *et al.*, 1990). Ces résultats apparemment contradictoires peuvent peut-être être conciliés par les remarques de Morgan (1984) et Meier *et al.* (1992) qui observent que la vitesse de développement du déficit hydrique est déterminante pour l'intensité de l'osmorégulation.

Il est peu probable que l'augmentation de la pression osmotique soit due à une accumulation passive de solutés non utilisés à cause de la réduction de croissance (Morgan, 1984). En effet, cette hypothèse ne serait

pas cohérente avec le maintien, voire la stimulation, de croissance enregistrée dans certaines situations. Par ailleurs, le maintien de la pression osmotique est nécessaire à la croissance mais il n'est pas suffisant. Il a été montré que la croissance pouvait être réduite en dépit d'un maintien de la pression de turgescence (Pritchard *et al.*, 1991, 1993).

Les solutés impliqués dans les phénomènes d'osmorégulation sont très variables d'une espèce à l'autre. Le rôle des *minéraux* est controversé. La quantité de K rapportée à la matière sèche a diminué dans les racines de pin maritime soumis à un stress osmotique (N'Guyen et Lamant, 1989a). Le potassium n'a donc pas participé à l'osmorégulation. Ce résultat est en accord avec les travaux de Sharp *et al.* (1990) qui montrent que la teneur en potassium (en nmol/mm de tissu) n'augmente pas (voire diminue) dans les apex racinaires de plantules de maïs soumises à la sécheresse. Selon Morgan (1984), le potassium peut cependant participer à l'osmorégulation dans certains cas où il neutralise les charges négatives des acides aminés et des anions inorganiques.

Selon Pritchard (1994), l'osmorégulation suite à une sécheresse serait essentiellement due à des produits organiques. L'accumulation d'*hexoses* (glucose et fructose) est très classique (Meyer et Boyer, 1981, dans les plantules de soja; Meier *et al.*, 1992, dans *Pinus taeda*; Sharp *et al.*, 1990, dans les racines de maïs; Tan *et al.*, 1992, dans *Picea mariana*; dans *Quercus petraea*, Erwin Dreyer, comm. pers.). D'autres sucres participent parfois à l'ajustement osmotique. Le sorbitol, premier produit de la photosynthèse chez les Rosacées, a été le principal soluté responsable de l'osmorégulation dans les racines de *Prunus* (Ranney *et al.*, 1991). Dans une étude intraspécifique sur le pin maritime, N'Guyen et Lamant (1988) associent la présence de pinitol avec le degré d'adaptation à la sécheresse de différentes provenances. Cependant, la faible quantité de pinitol trouvée indique que ce polyol ne contribue pas significativement à la pression osmotique cellulaire. Peut-être le rôle de ce polyol est-il plus important chez des plants plus âgés. Il représenterait jusqu'à 2% du poids sec des aiguilles de pins maritimes âgés de 2 ans mais ne serait présent que sous forme de traces dans les racines (Catherine Picon, comm. pers.).

Les *composés azotés* participent parfois à l'ajustement osmotique, par exemple la proline dans les rameaux de *Pinus taeda* (Meier *et al.*, 1992) et dans les aiguilles de *Picea mariana* (Tan *et al.*, 1992). De même, Voetberg et Sharp (1991) ont montré que cet acide aminé participait activement à l'osmorégulation dans les racines de maïs.

2.5 RÔLE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE

En dehors du possible rôle de messager racinaire à destination des parties aériennes (Zhang et Davies, 1990), il semble que l'acide abscissique (ABA) joue un rôle important dans le maintien de la croissance racinaire de plantules de maïs soumises à des conditions hydriques limitantes (Saab *et al.*, 1990). En conditions hydriques optimales, l'application d'ABA réduit la croissance racinaire. Cependant, lorsque le potentiel hydrique du sol baisse, la présence d'ABA semble nécessaire au maintien de la croissance racinaire. En conditions hydriques limitantes, la réduction artificielle de la synthèse d'ABA dans les racines, par application de fluoridone, inhibe la croissance racinaire et stimule la croissance aérienne (Sharp *et al.*, 1994). Chez le mutant *vp5*, déficient en ABA, le déficit hydrique induit les mêmes symptômes. L'application d'ABA en plus de la fluoridone restaure la croissance racinaire en condition de déficit hydrique, démontrant le rôle stimulant de la phytohormone sur l'élongation racinaire (Sharp *et al.*, 1994).

Le rôle biochimique de l'ABA dans la régulation de la croissance racinaire en situation hydrique limitante n'a pas encore été clairement déterminé. Wu *et al.* (1994) ont montré qu'une augmentation de l'activité de la xyloglucane endotransglycosylase (XET) était associée au maintien de l'élongation racinaire en conditions hydriques limitantes, et que cette réaction nécessitait une augmentation de la teneur en ABA. Sharp *et al.* (1995) suggèrent que l'accumulation d'ABA par les racines subissant la déshydratation du sol réduirait la synthèse et/ou la sensibilité des racines à l'éthylène, phytohormone connue pour inhiber la croissance en général.

2.6 CONCLUSION

Le déficit hydrique peut stimuler ou inhiber la croissance racinaire, induire des changements de la structure des racines. La diversité de ces réactions n'a pas été expliquée jusqu'ici. L'activité mitotique semble être affectée par cette contrainte mais on ne sait si c'est directement ou indirectement. Le grandissement cellulaire peut être affecté par des variations des propriétés rhéologiques ou de la pression de turgescence. Les études des effets du stress hydrique sur l'extensibilité pariétale montrent qu'elle peut être augmentée ou diminuée selon les cas (§1.7). Les capacités d'osmorégulation sont importantes pour le maintien de la pression de turgescence et donc du grandissement cellulaire.

Partie 3 : Croissance racinaire et carence en potassium

Le potassium est un cation monovalent présent en grande quantité chez les plantes. Selon Ericsson et Kähr (1993), c'est le cation le plus abondant dans les tissus végétaux. Il est présent dans différents compartiments: cytoplasme, chloroplaste et vacuole et participe à de nombreuses fonctions (Marschner, 1993).

3.1 FONCTIONS DU POTASSIUM

3.1.1 Fonctions biochimiques

Selon Leigh et Wyn Jones (1984), la concentration en potassium dans le cytoplasme et le stroma du chloroplaste est fortement régulée et maintenue entre 100 et 200 mM. Marschner (1993) indique que dans ces compartiments, le potassium n'est pas remplaçable par d'autres cations comme le sodium. Cette nécessité d'homéostasie de la concentration en potassium est à mettre en relation avec les fonctions biochimiques du potassium dans ces compartiments.

- Dans le cytoplasme et le chloroplaste, la forte concentration en potassium neutralise les anions inorganiques et organiques, maintenant le pH dans la fourchette 7-8, optimum pour beaucoup de réactions enzymatiques.
- L'activité d'un grand nombre d'enzymes est soit dépendante, soit fortement stimulée par le potassium. Par exemple, la pyruvate kinase, la phosphofructokinase, les pompes à protons ATPases sont activées par le potassium. L'activation par le potassium serait liée à un changement de la conformation spatiale de l'enzyme. En général, l'activation enzymatique est maximale à partir d'une concentration en potassium voisine de 50 mM (Marschner, 1993).
- La synthèse protéique est également dépendante de l'ion potassium, impliqué dans plusieurs étapes de la transcription, dont par exemple l'attachement de l'ARN_t aux ribosomes (Wyn Jones *et al.*, 1979).
- Le potassium est un cation très mobile. Il participe activement au transport des assimilats dans le phloème en neutralisant les charges négatives des anions organiques comme le malate. Dans le xylème, il peut également être cotransporté avec les nitrates.
- Plus spécifiquement dans les parties aériennes, le potassium est nécessaire à la photosynthèse et joue un rôle important dans le fonctionnement des cellules de garde des stomates.

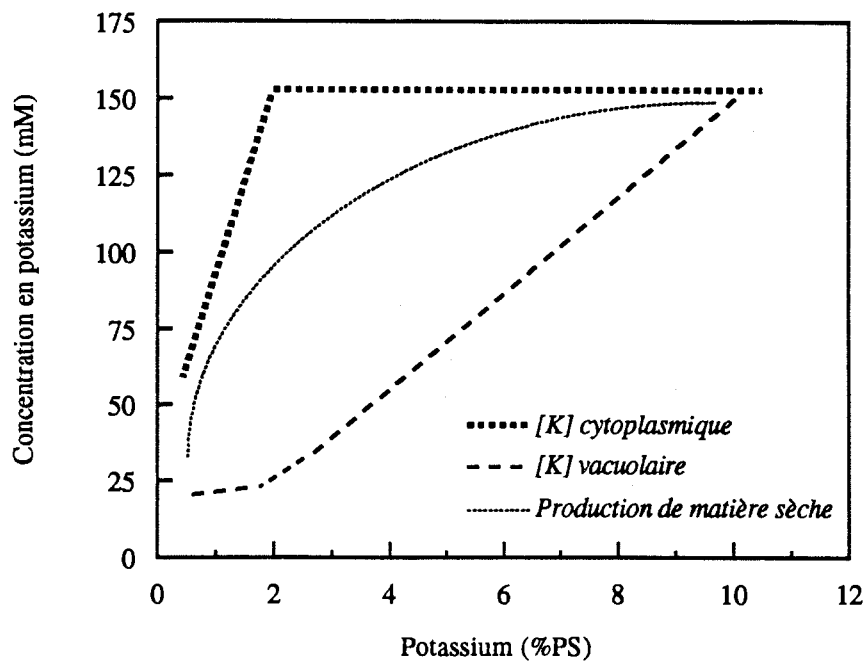


Figure 7 : Modèle décrivant l'évolution de la concentration en potassium dans le cytoplasme et dans la vacuole ainsi que la production de matière sèche (croissance) au cours de l'installation d'une carence en potassium. D'après Leigh et Wyn Jones (1984).

3.1.2 Fonctions biophysiques

Le potassium est le cation le plus abondant dans le suc vacuolaire. Il représente une part non négligeable de la pression osmotique. Dans certaines espèces, il représente, à lui seul, 50 % de la pression osmotique vacuolaire (cellule épidermique de feuille d'orge, Fricke *et al.*, 1994). Les proportions ne sont cependant pas toujours de cet ordre de grandeur. Dans la vacuole, le potassium est assez facilement remplaçable par d'autres cations (sodium, magnésium, calcium), par des sucres solubles ou des composés azotés (Leigh et Wyn Jones, 1984).

Le grandissement cellulaire ne peut pas être considéré uniquement comme une conséquence de l'accumulation de potassium ou d'autres solutés dans la cellule (cf. § 1.6). Par contre, l'accumulation de solutés est *nécessaire* au grandissement cellulaire. Le potassium et d'autres solutés participent au maintien de la pression osmotique et donc de la pression de turgescence dans les cellules en croissance. Dans ce cadre, plusieurs études ont montré une relation positive entre apport en potassium et vitesse de croissance. Par exemple, le potassium a multiplié par quatre l'extension des cotylédons de concombre en réponse à l'application de cytokinines (Green et Muir, 1979). Une carence en potassium a induit une baisse de la pression de turgescence dans les jeunes feuilles de haricot. Cette baisse de turgescence serait responsable de la réduction de croissance foliaire (Mengel et Arneke, 1982). Le déficit en potassium serait donc susceptible d'altérer la croissance.

Le potassium joue également un rôle important dans les relations hydriques de la plante. Le potassium intervient à trois niveaux importants : la régulation stomatique (et donc la régulation de la transpiration), la pression de turgescence et la photosynthèse. Le potassium ne participe pas ou très peu à l'osmorégulation qui intervient suite à une sécheresse (cf. § 2.4). Cependant, les plants déficients en potassium sont moins résistants au stress hydrique et la perte de turgescence est un symptôme typique de la combinaison de ces deux stress (Marschner, 1993).

3.2 TENEURS EN POTASSIUM : NORMES ET CARENCE

3.2.1 Développement de la carence en potassium

Le potassium est présent dans plusieurs compartiments intracellulaires mais sa concentration au sein de chacun de ces compartiments n'est pas régulée avec la même précision. Leigh et Wyn Jones (1984) ont proposé un modèle de distribution et de régulation du potassium dans la cellule. La concentration en potassium dans le cytoplasme serait prioritairement maintenue à une concentration assez élevée, d'environ 150 mM. Dans la vacuole, la concentration peut être tout aussi élevée. Cependant, en cas de réduction de l'apport en potassium, la concentration vacuolaire diminuerait et ce cation serait remplacé dans ce compartiment par d'autres solutés (autres cations, sucres solubles ou composés azotés). Ainsi, dans la phase d'installation de la carence, la concentration en potassium diminuerait dans la vacuole mais serait maintenue dans le cytoplasme (fig. 7). Lorsque la concentration en potassium a atteint un seuil minimal dans la vacuole (10-20 mM), la concentration cytoplasmique commencerait seulement à diminuer. La carence en potassium serait alors prononcée et les fonctions biochimiques dépendantes du potassium commenceraient à être altérées.

Tableau 1 : Teneur à partir de laquelle les symptômes de carence apparaissent, teneur critique (i.e. teneur minimale pour une croissance optimale) et teneur maximale de potassium en pourcentage du poids sec, chez diverses espèces herbacées et ligneuses.

Espèce	Organe	Teneur induisant des symptômes	Teneur critique	Teneur maximale	Référence
<i>Picea pungens glauca</i>	aiguilles	0.3 - 0.45	0.55		Alt <i>et al.</i> (1993)
<i>Pinus silvestris</i>	aiguilles	0.40 - 0.45	0.45 - 0.50		Bonneau (1992)
<i>Pinus silvestris</i>	aiguilles	0.44			Sarjala et Kaunisto (1993)
Erable à sucre	feuilles	0.45	0.9		Bonneau (1992)
Bouleau	feuilles		1.3		Bonneau (1992)
Plantules de bouleau	feuilles		1.2	3.8	Ericsson et Kähr (1993)
	racines		1.2	5.0	
<i>Lolium multiflorum</i>	feuilles		1.9 (- Na) 1.3 (+ Na)		Barracough et Leigh (1993)
<i>Lolium multiflorum</i>			0.8	7.2	Hylton <i>et al.</i> (1967)
<i>Zea mays</i>			1.3	2.0	Tyner (1946)
<i>Lycopersicum esculentum</i>			1.0	4.1	Besford (1975)
<i>Trifolium repens</i>			2.0	5.0	Gammon et Blue (1952)

3.2.2 Normes

Des normes de teneur en potassium ont été établies à partir d'analyses foliaires. Des seuils de teneur minimale en potassium en deçà desquelles la croissance est affectée, et des seuils où les symptômes de carence apparaissent ont été déterminés. Dans la plante, le potassium est le deuxième élément minéral en terme de quantité juste après l'azote. Selon Marschner (1993), la croissance est optimale quand la teneur en potassium est de l'ordre de 2 à 5 % du poids sec des parties végétatives de la plante. Selon Leigh et Wyn Jones (1984), la concentration critique, définie comme la teneur en potassium pour laquelle la croissance est à 90% du maximum, varie dans la gamme 0,5-2 % du poids sec. Cependant la concentration dans les plantes bien alimentées en potassium est souvent bien supérieure. Le tableau 1 donne quelques exemples de ces valeurs pour diverses espèces. Les teneurs varient d'une espèce à l'autre mais aussi d'un tissu à l'autre et avec le stade de développement (Barracough et Leigh, 1993). Parmi les espèces ligneuses, il semble que les pins soient des espèces peu exigeantes en potassium (tab. 1).

Lorsque le potassium est très disponible, on observe des accumulations de cet élément dans les tissus. Ainsi Ericsson et Kähr (1993) ont montré que la croissance de plantules de bouleau était à son maximum lorsque la teneur en potassium était supérieure à 1,2% du poids sec. Lorsque l'apport en potassium était nettement supérieur aux besoins, la teneur en potassium a augmenté jusqu'à plus de 5% du poids sec dans les racines et 3,8% dans les tiges et les feuilles. Ce phénomène, appelé "consommation de luxe", correspond à un stockage de cet élément dans la plante. Si l'apport diminue, il pourra ensuite être redistribué des organes matures où il est stocké vers les organes en croissance (Marschner, 1993).

L'approche traditionnelle des teneurs en éléments se fait en pourcentage du poids sec (%PS). Barracough et Leigh (1993) indiquent qu'exprimer la teneur en élément par rapport à une quantité d'eau présente plusieurs avantages. La teneur en potassium exprimée en millimole par litre (millimolaire, mM) est plus stable au cours du développement de la plante que la teneur exprimée en %PS. Dans certains cas, elle est indépendante de l'apport nutritionnel d'autres éléments (N et P). Enfin et surtout, ce mode d'expression de la teneur en potassium est justifié par le rôle physiologique du potassium et son importance dans les relations hydriques de la plante. C'est effectivement la quantité de potassium par rapport au contenu en eau qui est importante et non par rapport à la matière sèche. Barracough et Leigh (1993) ont étudié parallèlement la biomasse sèche, la concentration tissulaire en potassium et la pression osmotique de plants de *Lolium multiflorum* soumis à différents apports en potassium. La teneur en potassium minimale (pour une croissance optimale) était de 126 mM lorsqu'il n'y avait pas de sodium dans le sol et de 82 mM lorsque ce cation de remplacement était disponible. Les auteurs ont interprété ces valeurs comme des seuils en deçà desquels les fonctions biophysiques sont affectées. Une réduction plus forte de la croissance a été enregistrée lorsque la concentration en potassium devenait inférieure à 46 mM. Cette valeur pourrait correspondre à la concentration en deçà de laquelle les processus biochimiques sont affectés. Dans les plants de haricot, la concentration foliaire a diminué de 136 mM (plants témoins) à 50 mM dans les plants soumis à une réduction de l'apport en potassium (Mengel et Arneke, 1982). Cette réduction de la teneur en potassium était associée à une baisse de la turgescence et du grandissement cellulaire.

3.2.3 Symptômes de la carence en potassium

Les symptômes de la carence en potassium ne sont pas très caractéristiques. La réduction de croissance est la première conséquence d'un apport insuffisant en potassium. Lorsque le déficit s'intensifie, des symptômes

morphologiques apparaissent. Chez les feuillus, les bords des feuilles jaunissent puis se dessèchent. Chez les résineux, le bout des aiguilles jaunit, la transition avec la base, restée verte, est progressive. Lorsque la carence s'intensifie, il y a apparition de nécroses (Bonneau, 1992; Marschner, 1993). Seillac (1967) a décrit l'apparition des symptômes de la carence sur des plantules de pin maritime. Des petits anneaux nécrotiques apparaissent sur les feuilles primordiales puis toute la partie distale se dessèche et ensuite toute la feuille. La nécrose atteint ensuite le bourgeon terminal et la mort du pin survient. Peu d'observations ont été faites sur le système racinaire. Seillac (1967) a observé sur le pin maritime un brunissement des racines puis une nécrose.

En outre, les plants dont la teneur en potassium n'est pas optimale présentent une plus grande sensibilité à la sécheresse, au froid et à l'attaque de pathogènes (Marschner, 1993).

3.2.4 Substitution du potassium

Dans la vacuole des tissus matures, le potassium est remplaçable par d'autres solutés. Barraclough et Leigh (1993) ont mis en évidence le rôle du sodium en tant que cation de substitution. En présence de 10 mg kg⁻¹ de sodium dans le sol, la croissance de plants de *Lolium multiflorum* a été réduite lorsque la concentration tissulaire en potassium était inférieure à 126 mM. Lorsque la teneur du sol en sodium était de 90 mg kg⁻¹, la concentration en potassium à partir de laquelle la croissance était affectée était de 82 mM seulement. Le calcium peut également dans certains cas se substituer au potassium (Leigh et Wyn Jones, 1984). Les cations ne sont pas les seuls éléments pouvant remplacer le potassium. Marschner (1993) souligne la complémentarité des sucres solubles et du potassium. Leigh et Wyn Jones (1984) citent plusieurs études où teneur en sucres solubles et teneur en potassium sont inversement proportionnelles. Un dernier type de solutés est susceptible de compenser la réduction de la teneur en potassium: Sarjala et Kaunisto (1993) ont montré une corrélation négative entre teneur en putrescine et teneur en potassium dans les aiguilles de pin sylvestre. L'augmentation de la putrescine a commencé pour des teneurs en potassium de l'ordre de 0,5-0,55 %PS, c'est-à-dire avant le seuil critique pour la croissance. Lorsque la teneur en potassium n'était plus que de 0,35-0,43 %PS, la concentration en putrescine a augmenté exponentiellement. L'augmentation de la teneur en putrescine (cation divalent) pourrait être interprétée comme un moyen de maintenir le pH cytosolique (Marschner, 1993). Cette polyamine pourrait compenser jusqu'à 30% du déficit en équivalent potassium.

3.3 CROISSANCE RACINAIRE ET CARENCE EN POTASSIUM

Très peu d'études ont été consacrées aux effets de la carence en potassium sur la croissance racinaire. Une carence en potassium a induit une diminution de la biomasse racinaire de plantules de pin maritime (Seillac, 1967). La croissance de la racine principale mais surtout la croissance des racines latérales a été inhibée. Chez de jeunes plants de peuplier, la réduction de l'alimentation en potassium a induit une très forte réduction de la croissance des racines par rapport à la réduction de croissance des parties aériennes (Qi *et al.*, 1991). La concentration en potassium dans le méristème racinaire était également nettement plus affectée que celle dans le méristème de la tige. Le rapport partie souterraine/partie aérienne (Root/Shoot: R/S) a été réduit par la carence en potassium. Qi *et al.* (1991) ont conclu que la tige présentait une plus grande force de puits pour le potassium. Ericsson et Kähr (1993) ont également observé une diminution du rapport R/S en réponse à une carence potassique. Cependant, ils soulignent que toutes les études ne sont pas en accord en ce qui concerne l'allocation de la matière sèche lorsque l'apport en potassium est limitant pour la croissance. Ces différences seraient dues au fait que la plupart de ces études ont été conduites sur des plants dont le statut nutritif variait

au cours de l'expérience (Ingstad et Lund, 1986). La carence s'intensifiait au cours du temps. Selon Ericsson et Kähr (1993), la réponse des plants est différente lorsqu'ils sont acclimatés à un statut nutritif donné. C'est ainsi que sur les plantules de bouleau, des symptômes de carence sont apparus sur les feuilles se développant pendant la phase d'adaptation à l'alimentation réduite en potassium. Une fois le statut nutritif stabilisé, les nouvelles feuilles ne présentaient plus ces symptômes.

Ericsson (1995) a proposé une hypothèse expliquant cette diminution de l'allocation de la matière sèche aux parties racinaires lorsque l'apport en potassium est limitant. La réduction de la teneur des tissus en potassium induirait une réduction de la photosynthèse et donc du stock de carbone. L'équilibre entre la quantité de carbone et d'azote serait déterminant pour la répartition de la croissance entre parties aériennes et souterraines. La limitation de la croissance racinaire par la carence en potassium pourrait être due à une réduction précoce de l'apport en carbone. Ericsson (1995) remarque que toutes les carences minérales induisant une diminution du R/S (K, Mg, Mn) induisent avant tout une réduction de la photosynthèse. Les carences augmentant le R/S (N, S, P, Fe) n'affectent pas la photosynthèse directement.

3.4 CONCLUSION

La carence en potassium réduit la croissance racinaire. Très peu d'études ont cherché à expliquer comment la carence potassique affecte le grandissement cellulaire. Une réduction de la pression de turgescence induite par un déficit de la teneur en potassium semble susceptible de réduire la croissance malgré un remplacement possible de cet élément par d'autres composés. Les effets de la carence en potassium sur les propriétés rhéologiques n'ont jamais été l'objet d'une étude particulière.

Matériel et méthodes

1 MATÉRIEL VÉGÉTAL, CULTURE DES PLANTS ET APPLICATION DES STRESS

Les graines de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) sont issues de vergers à graines des Landes. Les individus parentaux ont été sélectionnés pour leur fort potentiel de croissance. Toutes les expériences ont été réalisées sur des plantules très jeunes, âgées de 2 à 5 semaines. L'essentiel des mesures se faisant sous microscope, la taille des plants utilisables était, de ce fait, limitée.

1.1 Germination des graines

Pour chaque expérience, les graines ont été stérilisées durant 20 minutes dans H₂O₂ 30%, rincées abondamment à l'eau déminéralisée et placées pendant un mois environ sur un papier humide, à 4 °C, à l'obscurité, afin de synchroniser leur germination. A la suite de cette période préparatoire, les graines ont été de nouveau désinfectées puis mises à germer à la lumière, à 18 °C (la germination est inhibée par une température supérieure à 20 °C). La germination s'est produite 8 à 15 jours après la mise à la lumière. Une fois la radicule longue de 1,5 cm, c'est à dire 2 jours après qu'elle ait pointé, les graines ont été transférées en culture hydroponique.

1.2 Culture hydroponique

Cette méthode de culture a été choisie pour deux raisons essentielles: l'accès direct aux racines et le contrôle aisé de la nutrition et du stress osmotique.

Dans un premier temps, les graines germées étaient installées au dessus d'un bac d'eau distillée grâce au système de fixation décrit sur la figure 8. Deux jours plus tard, les plantules, dont la radicule s'était allongée d'environ 1,5 cm, étaient transférées sur une solution nutritive. Elles étaient maintenues au dessus de la

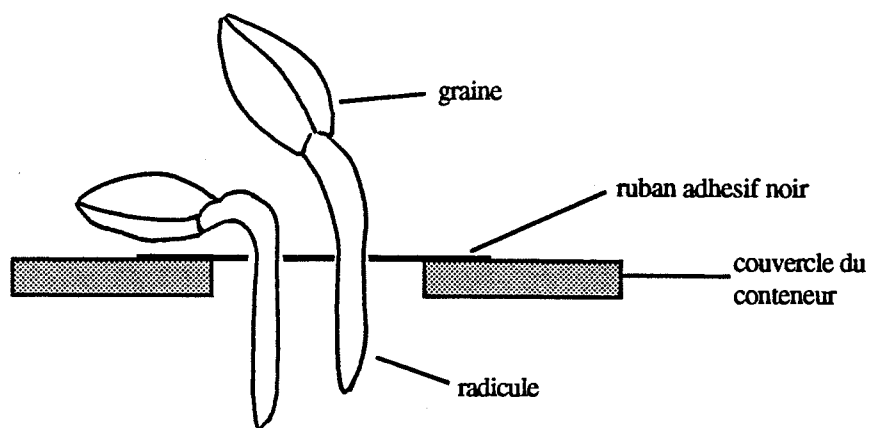


Figure 8 : Système de maintien de la graine germée au dessus de la solution nutritive durant les trois premiers jours suivant la germination.

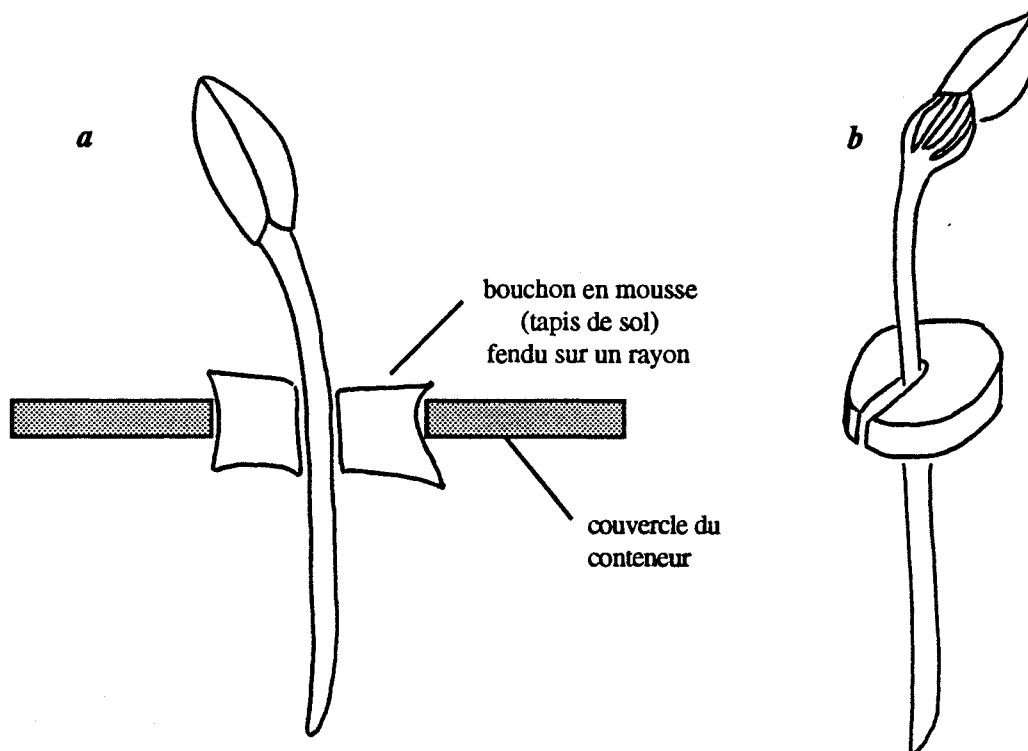


Figure 9 : Système de maintien des plantules plus âgées au dessus de la solution nutritive. *a*) bouchon inséré dans le couvercle. *b*) bouchon en mousse, fendu sur un rayon, inséré autour de la racine de la plantule de pin maritime.

Figure 10a : Conteneur utilisé pour la culture hydroponique des plantules de pin maritime avec son système d'aération.

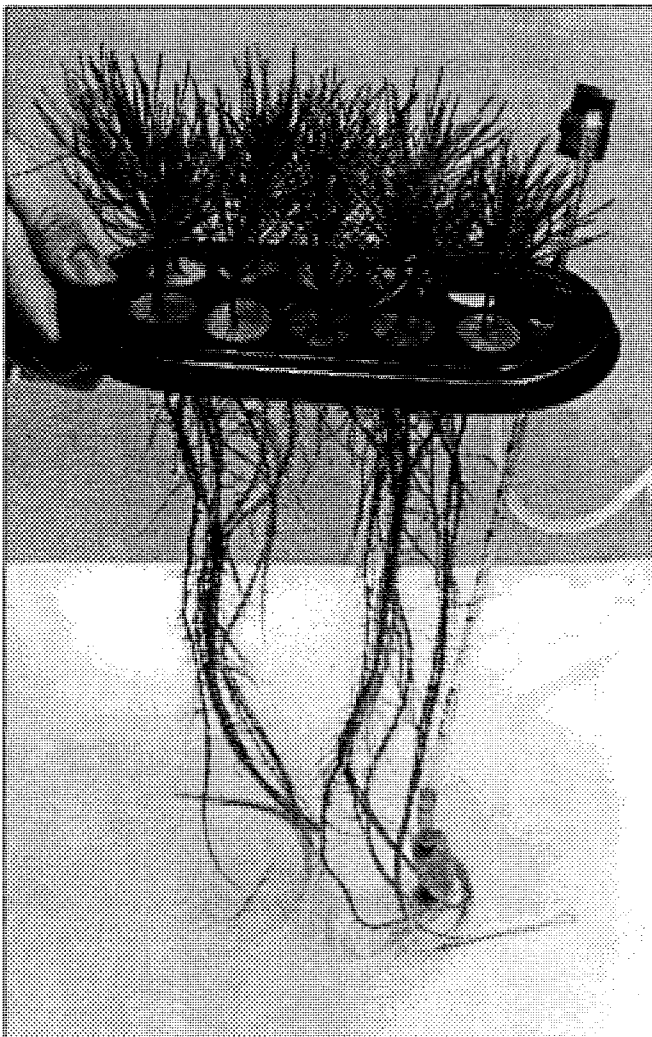
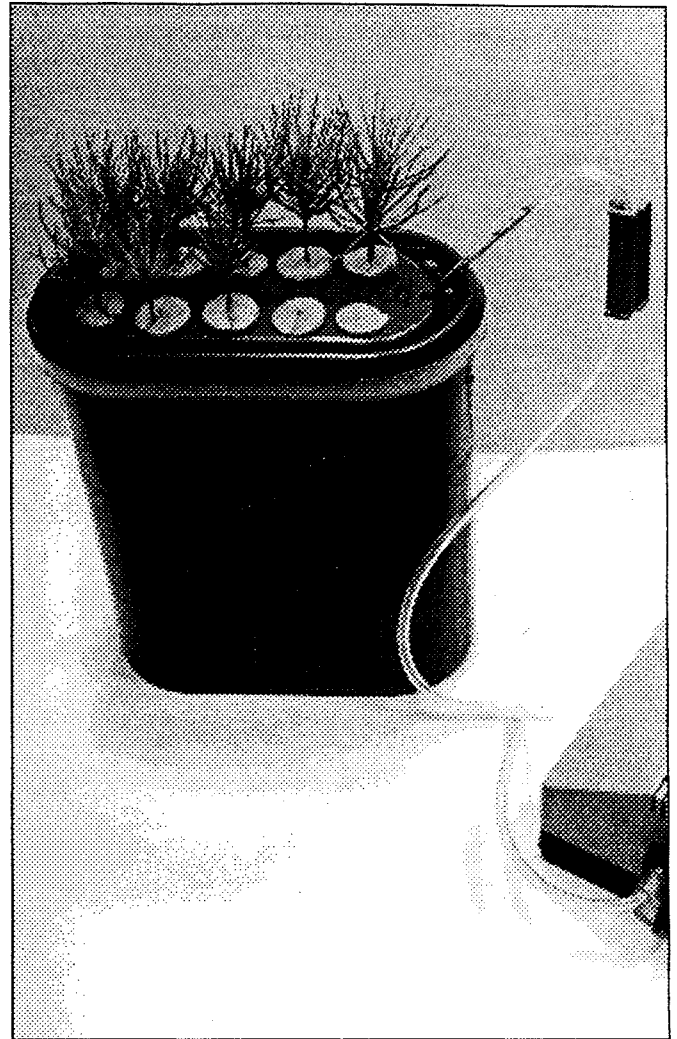


Figure 10b : Systèmes racinaires des plantules de pin maritime âgées de 3 semaines.

Tableau 2 : Composition des différentes solutions nutritives utilisées pour la culture hydroponique des plantules de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.).

	<i>Témoins (Solution de Seillac, 1960)</i>	<i>Carence en potassium</i>	<i>Carence en macroéléments</i>
	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
Macroéléments			
CaCl ₂	0.5 mM	0.5 mM	12.5 µM
MgSO ₄	0.5 mM	0.5 mM	12.5 µM
NH ₄ NO ₃	4.0 mM	3.0 mM	100 µM
KH ₂ PO ₄	1.0 mM	25 µM	25 µM
NH ₄ H ₂ PO ₄		1.0 mM	
Oligoéléments			
FeNaEDTA	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
H ₃ BO ₃	16 µM	16 µM	16 µM
MnCl ₂	3 µM	3 µM	3 µM
ZnCl ₂	0.3 µM	0.3 µM	0.3 µM
CuCl ₂	0.3 µM	0.3 µM	0.3 µM
Na ₂ MoO ₄	0.03 µM	0.03 µM	0.03 µM

solution à l'aide d'un second système de fixation (fig. 9a). Des bouchons fendus sur la moitié du diamètre ont été confectionnés dans un tapis de sol (fig. 9b). Ce système a permis d'insérer et de retirer la plantule du bac sans l'abîmer, même lorsque celle-ci possédait un système racinaire et une tige plus développés. A Bangor, des conteneurs de culture ont été fabriqués dans des boîtes plastiques d'une hauteur de 19 cm et de volume 3 l. Seize trous d'un diamètre de 2 cm ont été répartis sur le couvercle. Chaque bac de culture contenait 16 à 24 plants (il y avait parfois 2 plants par bouchon). A Nancy, des conteneurs différents ont été utilisés : 21 cm de haut pour un volume de 2,4 l. Dix trous seulement étaient répartis sur le couvercle et chaque pot contenait 10 à 15 plants (fig. 10a et 10b).

L'eau déminéralisée et les solution nutritives ont été aérées grâce à des pompes d'aquarium. Le débit était réglé afin de permettre une bonne aération sans provoquer l'agitation des racines.

1.2.1 Solutions nutritives

La solution nutritive que nous avons utilisée pour les témoins est celle de Seillac (1960) mise au point pour des plantules de pin maritime. Les solutions nutritives des différents traitements sont décrites dans le tableau 2. Deux types de carences ont été appliqués. La première a consisté à réduire l'apport en K à 1/40^{ème} de celui des témoins (KD). Ce niveau avait pour objectif d'épuiser les réserves de la graine et de carencer le plant en un mois. La deuxième carence a consisté à réduire l'apport de tous les macroéléments à 1/40^{ème} de celui des témoins (MD). Quel que soit le traitement, la solution de chaque conteneur était renouvelée une fois par semaine.

1.2.2 Ajustement du pH

Le pin maritime, comme de nombreux arbres, présente une forte préférence pour NH_4^+ par rapport à NO_3^- (Claude Plassard, comm. pers.). L'absorption massive des cations K^+ et NH_4^+ provoque une acidification du milieu de culture. En ce qui concerne le stress hydrique, les expériences s'arrêtaient à 17 jours alors que le système racinaire n'était encore que peu développé (peu de racines latérales). Aucun problème de pH n'a été relevé et il n'a pas été ajusté. Lors des études du stress potassique, les plantules étaient cultivées pendant 30 jours et la température dans le phytotron était plus élevée. Dans ces conditions, le développement plus rapide des racines entraînait dès la deuxième semaine de culture une acidification de la solution nutritive. Le pH a donc été ajusté tous les jours pour le maintenir dans la fourchette 4,4-5,5. La soude a été utilisée comme neutralisant dans une expérience préliminaire, puis, du fait de la toxicité possible du sodium, le pH a finalement été ajusté avec de l'ammoniaque (NH_4OH) 1N. L'apport d'azote par cet ajustement du pH était négligeable par rapport à l'azote fourni dans la solution nutritive. A chaque ajustement, il était ajouté de 30 à 90 μmoles de NH_4OH dans les 2,4 l de solution nutritive où la concentration initiale en NH_4 était de 4 mM.

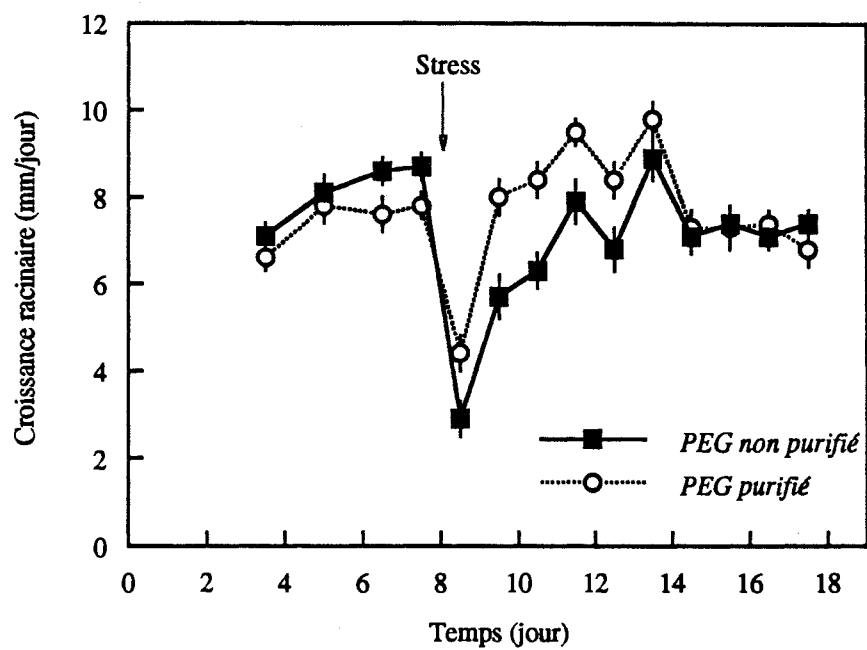


Figure 11 : Croissance racinaire de la racine principale de plantules de pin maritime à la suite d'un stress osmotique de -0.45 MPa, imposé par du polyéthylène glycol de poids moléculaire 3350 g/mol (moyenne $\pm$ erreur standard, $n = 16$). Effet de la purification du PEG par passage sur des résines échangeuses d'ions.

1.3 Conditions de culture

Pendant les expériences de stress osmotique qui se sont déroulées à l'université de Bangor, les conditions dans le phytotron étaient:

	<i>Jour</i>	<i>Nuit</i>	
<i>Période</i>	16	8	h
<i>Humidité</i>	70	70	%
<i>Température</i>	19	19	°C
<i>Lumière</i>	200	-	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (juste au dessus des plants)

Lors des expériences concernant la carence en potassium qui se sont déroulées à Nancy:

	<i>Jour</i>	<i>Nuit</i>	
<i>Période</i>	16	8	h
<i>Humidité</i>	60	95	%
<i>Température</i>	24	19	°C
<i>Lumière</i>	500	-	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (juste au dessus des plants)

1.4 Application des stress

1.4.1 Application du stress osmotique

L'application d'un stress osmotique à des plants cultivés en hydroponie se fait par addition d'un osmoticum à la solution nutritive. La tolérance du pin maritime face à différents osmoticums a été testée. Le mannitol et le sorbitol, à des concentrations correspondant à un potentiel hydrique de -0,5 MPa, ont provoqué la mort des plants, contrairement au polyéthylène glycol (PEG). La pression osmotique de la solution nutritive a donc été ajustée par addition de PEG.

Parmi les différentes masses moléculaires disponibles, le PEG de masse moléculaire 3350 g/mol a été choisi pour deux raisons :

- i) les racines peuvent absorber le PEG de poids moléculaire trop faible, $PM \leq 1000$ g/mol (Lawlor, 1970; Kaufmann et Eckard, 1971).
- ii) un poids moléculaire trop élevé ($PM \geq 8000$ g/mol) rend la solution très visqueuse et difficile à aérer (Lawlor, 1970; N'Guyen, 1986).

La toxicité des solutions de PEG a souvent été mentionnée. Elle serait due à la présence de fortes concentrations d'aluminium et de magnésium. La purification des solutions de PEG sur des résines échangeuses d'ions est recommandée (Lawlor, 1970; Lagerwerff *et al.*, 1961; N'Guyen, 1986). Apparemment, la qualité du PEG varie d'un fournisseur à l'autre (N'Guyen, 1986). Des essais de croissance du pin maritime sur des solutions de PEG à -0,45 MPa, avec ou sans purification (passage sur résines échangeuses d'ions, Dowex 1x8 et Dowex 50Wx8), n'ont pas mis en évidence de toxicité (fig. 11). Les expériences ont finalement été conduites avec du PEG non purifié (Sigma).

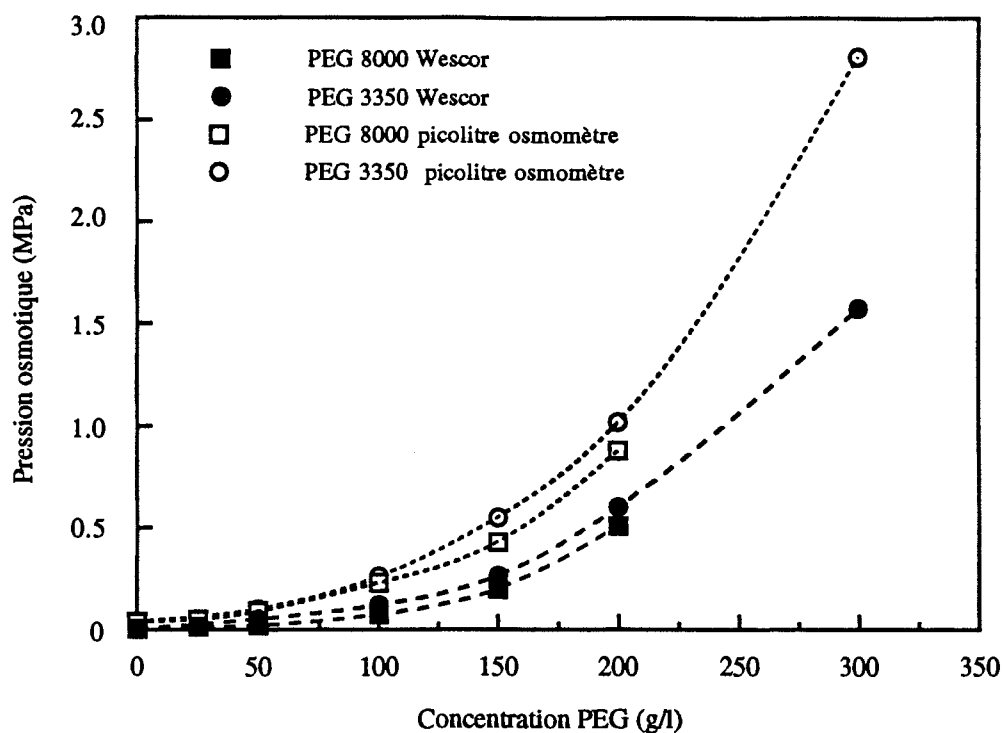


Figure 12 : Pression osmotique de solutions de différentes concentration de PEG 3350 et 8000 g/mol déterminée par deux appareils : le picolitre osmomètre (point de fusion du dernier cristal) et l'osmomètre Wescor 5500 (hygrométrie).

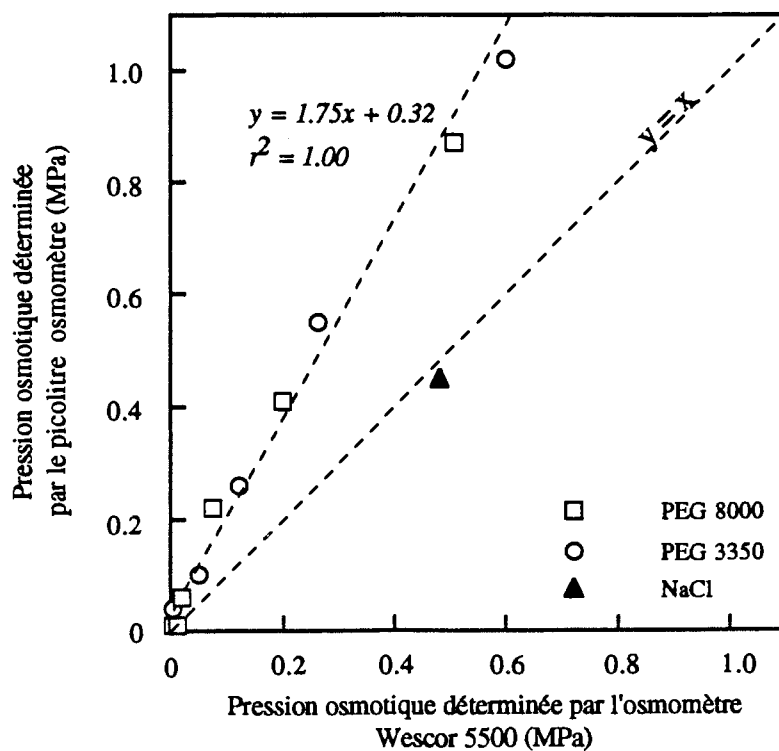


Figure 13 : Relation entre les pressions osmotiques déterminées par les deux méthodes : point de fusion du dernier cristal et hygrométrie.

Les pressions osmotiques de solutions de PEG 3350 et 8000 g/mol de différentes concentrations ont été mesurées par deux appareils, le picolitre osmomètre et un osmomètre Wescor 5500. La relation entre concentration et pression osmotique n'est pas linéaire (fig. 12). D'autre part, la pression osmotique déterminée par le picolitre osmomètre est supérieure à celle mesurée par l'osmomètre Wescor. La différence s'accroît lorsque la concentration de l'osmoticum augmente. La corrélation entre les pressions osmotiques déterminées par les deux méthodes a été établie (fig. 13). On peut remarquer que la différence de pression osmotique obtenue par les deux méthodes existe uniquement pour le PEG. Pour les molécules "simples" comme NaCl, les pressions osmotiques sont identiques.

Le picolitre osmomètre mesure la pression osmotique par détermination de la température de fusion du dernier cristal. Selon Lagerwerff *et al.* (1961), cette méthode n'est pas adaptée à des macromolécules de type PEG, elle surestime la pression osmotique de la solution. L'hygromètre Wescor 5500 utilise la méthode du point de rosée. Selon Michel et Kaufmann (1973), l'hygromètre sous-estime la valeur de la pression osmotique des solutions de types PEG par rapport au psychromètre. La meilleure méthode pour ce type de macromolécules serait la psychrométrie. Cependant, Wood *et al.* (1993), qui constatent la même divergence entre l'hygrométrie et la psychrométrie, et Money (1989) considèrent que le mode hygrométrique donne les meilleures estimations. La détermination du potentiel hydrique d'une solution de PEG reste problématique. L'hygrométrie apparaît cependant comme la méthode majoritairement utilisée et nous avons retenu les valeurs des potentiels hydriques déterminées par l'osmomètre Wescor 5500.

Trois niveaux de contrainte hydrique ont été appliqués. Avec les témoins, les 4 traitements étudiés ont été:

<i>Traitement</i>	<i>PEG 3350 (g/l)</i>	<i>Ψ (MPa) mesuré par le picolitre osmomètre</i>	<i>Ψ (MPa) mesuré par l'hygromètre Wescor 5500</i>
Témoins	0	0	0
Stress faible	100	- 0.3	- 0.15
Stress moyen	180	- 0.8	- 0.45
Stress fort	210	- 1.1	- 0.66

1.4.2 Application de la carence en potassium

La carence a consisté à réduire l'apport en potassium à 1/40ème de l'apport fourni aux témoins. Elle a été appliquée dès le troisième jour après la germination pour épuiser les réserves internes de la graine puis installer la carence.

Pratiquement, pour appliquer la carence *KD*, le sel KH_2PO_4 (1 mM) a été remplacé par (KH_2PO_4 25 μM + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 mM). D'autre part, la concentration en NH_4NO_3 a été réduite de 4 mM à 3 mM afin de conserver la concentration en NH_4^+ (tab. 2). La concentration en NO_3^- a par conséquent été diminuée, mais étant donné la forte préférence d'absorption de l'azote sous forme NH_4^+ du pin maritime, il semblait préférable de conserver l'égalité de l'apport en NH_4^+ entre les traitements plutôt qu'en NO_3^- .

Pour appliquer la carence *MD*, nous avons réduit l'apport de tous les macroéléments (N, P, K, Ca, Mg, Cl, S) sans rien changer aux proportions entre éléments.

2 MESURE DE LA CROISSANCE

2.1 Cinétique de la croissance racinaire

L'élongation racinaire des plantules a été suivie en mesurant la longueur du pivot et des racines latérales à intervalles de temps réguliers. Initialement, le pas de temps choisi était la journée. Cependant des manipulations trop fréquentes réduisaient la croissance. L'intervalle de temps entre deux mesures a ensuite été ajusté à 2-4 jours. Après 4 semaines de culture, la taille finale des racines (pivot et racines latérales) d'un lot de plants ayant subi cette cinétique de mesure (tous les 3 jours environ) n'était pas significativement différente de celle d'un lot de plants n'ayant jamais été mesuré (données non présentées).

Lors de chaque mesure, le plant est sorti de son conteneur et la longueur du pivot est mesurée à ± 1 mm avec une règle graduée. La limite entre l'hypocotyle et la racine est reconnaissable à un changement de diamètre et de couleur. En ce qui concerne les racines latérales, leur nombre et surtout leur fragilité ne permettaient pas de les mesurer toutes, ni même de suivre l'accroissement de quelques unes bien identifiées. En effet, des manipulations répétées les abîmaient et stoppaient leur croissance. Le compromis adopté a consisté à *mesurer les trois plus grandes racines latérales du plant* à chaque date de mesure. La moyenne des trois valeurs a représenté la longueur des racines latérales du plant pour chaque date de mesure.

Il est possible que plusieurs biais aient été introduits en quantifiant la croissance des racines latérales de cette manière. En effet, lorsqu'une racine était abîmée par une mesure, une autre racine était mesurée la date suivante, entraînant une sous-estimation probable de la croissance. De plus, nous avons observé que la vitesse de croissance des racines latérales était hétérogène. Waisel et Eshel (1991) rappellent que ceci a déjà été observé chez *Picea glauca*. Atzmon *et al.* (1994) indiquent que, chez *Pinus pinea*, seuls 10 à 15 % des racines latérales émergentes continuent à grandir. Dans notre étude, la longueur des trois plus grandes racines représenterait les racines à croissance rapide. Il est vrai que cette méthode de quantification de la croissance des racines latérales n'était pas idéale. Cependant, c'est le meilleur compromis que nous avons trouvé.

2.2 Vitesse de croissance locale

La vitesse de croissance locale (VCL) correspond à la *vitesse relative d'élongation en un point donné* et est exprimée en $\text{cm s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ soit en s^{-1} . Pour la calculer, il est nécessaire de connaître la *vitesse de croissance de la racine* et le *profil de longueur des cellules le long de la zone d'élongation*.

Deux méthodes ont été utilisées pour obtenir les profils de longueur des cellules.

- Pour l'expérience de stress osmotique, les apex racinaires ont été récoltés 5 jours après le commencement du stress alors que la vitesse de croissance était stable. Ces tissus ont été fixés dans une solution à 4 % de paraformaldéhyde, puis progressivement déshydratés et enfin inclus dans une résine. Des coupes ultrafines ($4 \mu\text{m}$) ont été réalisées au microtome et colorées avec une solution de bleu de toluidine. La longueur des cellules corticales a été mesurée tous les millimètres le long de l'apex à partir du méristème à l'aide d'un microscope équipé d'un réticule.
- Pour l'expérience de carence minérale, les coupes ont été faites sur du matériel frais, à main levée. La détermination du profil a été moins facile et les longueurs de cellules sont moins précises que sur les coupes ultrafines au microtome. Cependant, cette méthode étant beaucoup plus rapide, un nombre important de répétitions a été réalisé.

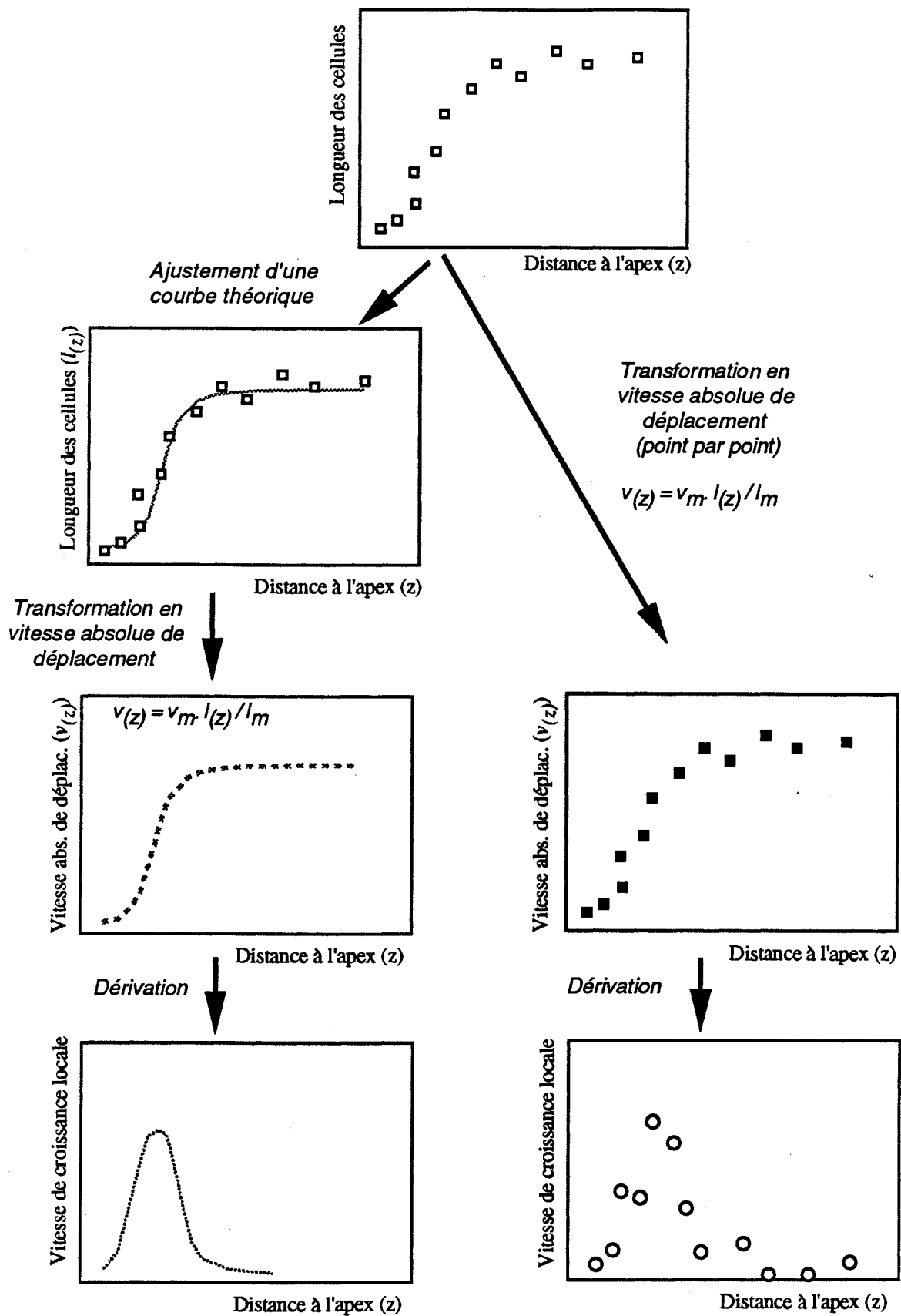


Figure 14 : Protocoles de calcul de la vitesse de croissance locale, avec ajustement théorique (appliqué pour le stress hydrique) ou par calcul manuel (appliqué pour la carence potassique).
 v_m : vitesse de croissance racinaire globale, l_m : longueur des cellules matures.

La *vitesse de croissance locale* a été calculée selon la méthode décrite par Green (1976) et Silk *et al.* (1989) (fig. 14):

(1) La longueur des cellules a été exprimée en fonction de la distance au méristème.

(2) Une courbe de type sigmoïde a été ajustée à ces données: la longueur cellulaire locale ($l(z)$) (fig. 14, colonne de gauche).

(3) A partir de la courbe de la longueur cellulaire locale a été calculée la courbe de "vitesse de déplacement absolue" ($v(z)$) à partir de la relation:

$$v(z) = v_m l(z) / l_m \quad (9)$$

où v_m est la vitesse de croissance racinaire globale et l_m la longueur moyenne des cellules matures.

(4) La vitesse de croissance locale a été calculée par dérivation de la courbe $v(z)$. Pour l'expérience de stress osmotique, cette opération a été menée indépendamment pour chacune des racines et la vitesse de croissance locale a ensuite été calculée avec au moins 5 racines par traitement.

Pour l'expérience de carence minérale, le profil de longueur des cellules a été transformé en vitesse de déplacement absolue sans ajuster de courbe théorique mais en utilisant les points réels (fig. 14, colonne de droite). De même, VCL a été calculé manuellement comme étant la pente de la courbe de vitesse absolue de déplacement. Cette deuxième méthode donne des résultats plus variables car les données n'ont pas été lissées par l'ajustement d'une courbe théorique. De plus, les longueurs de cellules n'ont été mesurées que tous les millimètres. En raison de la faible longueur de la zone d'élongation des racines latérales, la mesure des longueurs tous les demi-millimètres aurait donné une meilleure résolution. Cependant, VCL a été calculé pour un grand nombre de racines (22 pour les témoins, 25 pour les KD), ce qui réduit la variabilité.

2.3 Initiation des racines latérales

Pour déterminer si l'initiation des racines latérales a été perturbée par la carence potassique, nous avons compté le nombre de racines latérales ou primordia de racines latérales par centimètre de racine principale. Trois portions de 4 cm ont été prélevées sur la racine principale, à 8-12 cm, 12-16 et 20-24 cm de la base de la racine. Les racines latérales ont ensuite été enlevées en glissant simplement la racine principale entre deux doigts. Les sections de racine principale ont ensuite été fendues longitudinalement et les insertions de racines latérales, cicatrices ou primordia, ont été comptées sous une loupe binoculaire. Il était impossible de différencier les primordia des racines dont l'élongation avait effectivement commencé mais, laisser les racines latérales insérées sur la racine principale rendait le comptage très difficile.

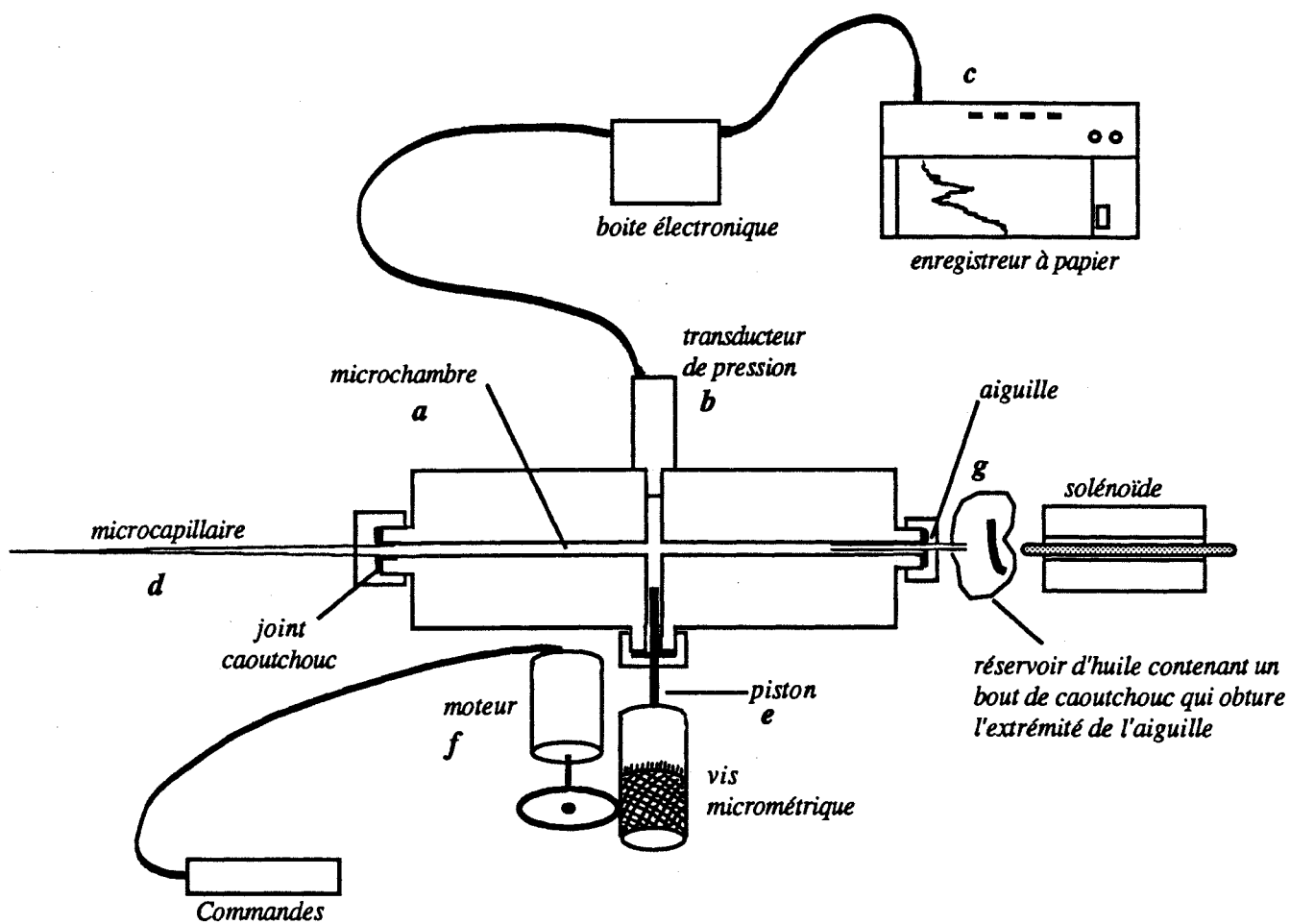


Figure 15 : Schéma de la partie mécanique du micromanomètre intracellulaire.

3 MESURE DE LA PRESSION DE TURGESCECE CELLULAIRE

3.1 Le micromanomètre intracellulaire

Le micromanomètre intracellulaire permet de mesurer la pression de turgescence dans une cellule *directement* et *in vivo* (Hüsken *et al.*, 1978). Cet outil initialement utilisé sur des cellules d'algues géantes a été de plus en plus miniaturisé et perfectionné (Steudle, 1993). Il permet maintenant de faire des mesures sur les petites cellules des plantes supérieures.

Le micromanomètre (fig. 15) est constitué d'une microchambre (a) sur laquelle sont branchés :

- un transducteur de pression (b) relié à un enregistreur à papier (c)
- un microcapillaire de verre (d) qui réalise le pont entre la microchambre et l'intérieur de la cellule
- un piston (e) commandé par un petit moteur électrique (f) qui permet d'augmenter ou de réduire le volume de la microchambre et donc d'y faire varier la pression. On notera que l'huile de silicone qui remplit la microchambre est incompressible tout comme le suc cellulaire. Par contre, le Plexiglas (qui constitue la microchambre) et les différents joints sont des matériaux très légèrement élastiques.
- une vanne d'ouverture rapide (g) de la microchambre, constituée d'un bras actionné par un solénoïde et appuyant sur l'extrémité d'une aiguille. Ce dispositif permet une chute instantanée de la pression dans la chambre et permet de collecter le suc cellulaire sans le diluer (Malone *et al.*, 1989)

La partie mécanique du micromanomètre intracellulaire est fixée sur un micromanipulateur (Leica) qui permet des micromouvements et donc l'empalement d'une seule cellule à la fois (fig. 16). La plantule sur laquelle on veut faire des mesures est fixée dans une plate-forme (fig. 17), elle-même fixée à un second micromanipulateur (Prior). Microcapillaire et racine à sonder sont positionnés avec précision sous l'objectif de la loupe binoculaire grâce à ces manipulateurs. Une lampe à lumière froide dispense l'éclairage par deux bras semi-souples. Micromanomètre, plateforme et loupe binoculaire sont posés sur une table "anti-vibration". De fabrication artisanale, cette table est constituée d'une plaque métallique très lourde posée sur deux chambres à air de vélo gonflées à l'eau, posées elles-mêmes sur la paille (fig. 18). Ce dispositif permet d'absorber une grande partie des vibrations externes. Il est indispensable pour les mesures de turgescence intracellulaire.

3.2 Les mesures

Les microcapillaires (ou micropipettes) sont préparés à l'avance. Un petit tube de verre (16 cm de long, 1 mm et 0,6 mm de diamètre externe et interne, respectivement) est étiré tout en étant chauffé en son milieu. Selon la force de traction et la température appliquées, l'extrémité du capillaire présente des caractéristiques différentes. Il est nécessaire d'adapter la forme de ces capillaires à l'usage que l'on veut en faire (mesure de la turgescence, de la pression osmotique, stockage d'échantillons). Après l'étirage, l'extrémité du capillaire est scellée. On utilise une microforge pour l'ouvrir en le cassant délicatement et proprement au diamètre voulu (de 1 à 3 μm).

La zone de la racine à sonder est délicatement fixée à l'aide de mastic inerte (Terostat VII, Teroson, France) dans une cuve à fond de verre (fig. 17). Le reste du système racinaire est également installé dans la

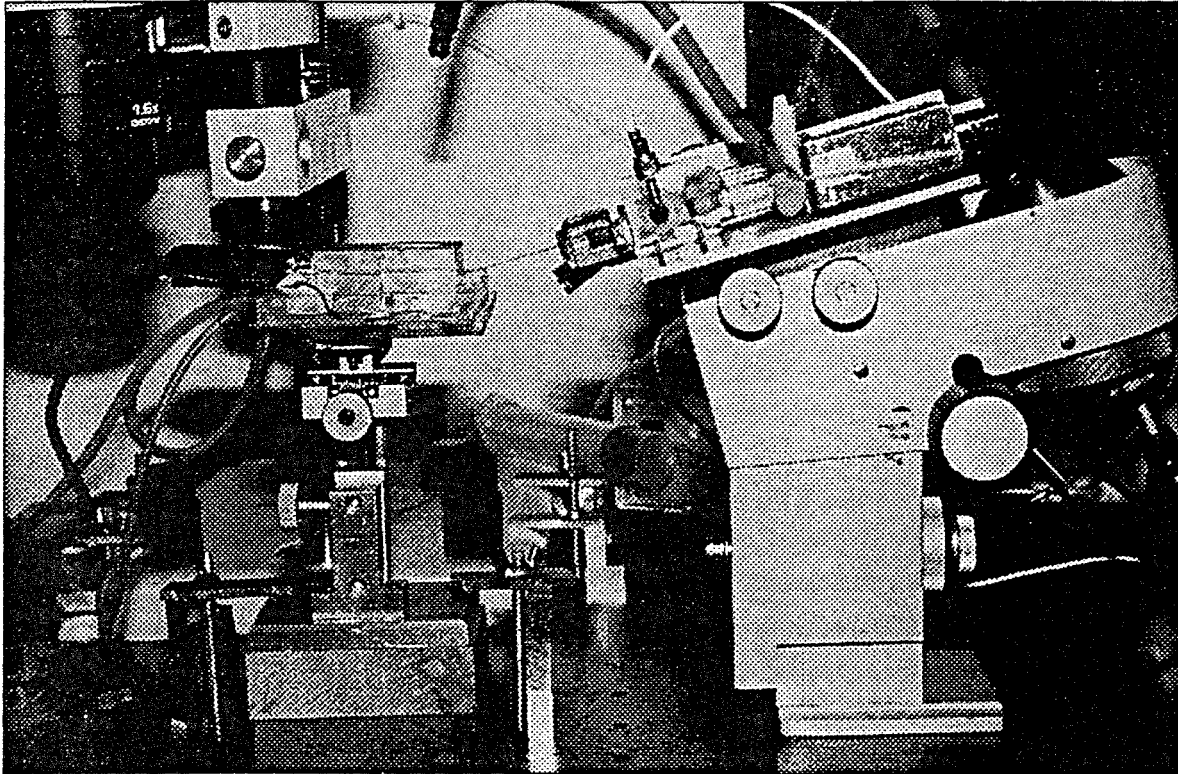


Figure 16 : Partie mécanique du micromanomètre intracellulaire, fixée sur le micromanipulateur.

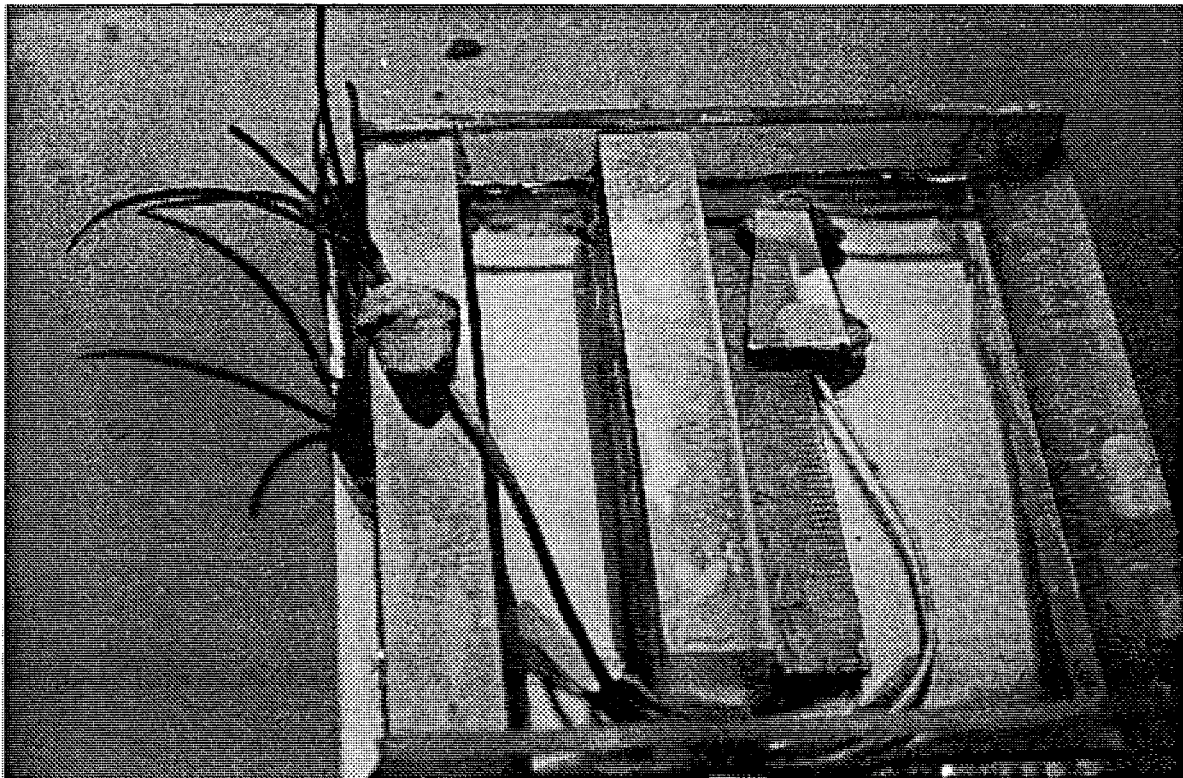


Figure 17 : Plantule fixée dans la cuve de mesure. La racine est maintenue par du mastic inerte. Une lamelle de microscope est posée sur la solution pour faciliter la mise au point de la loupe binoculaire.

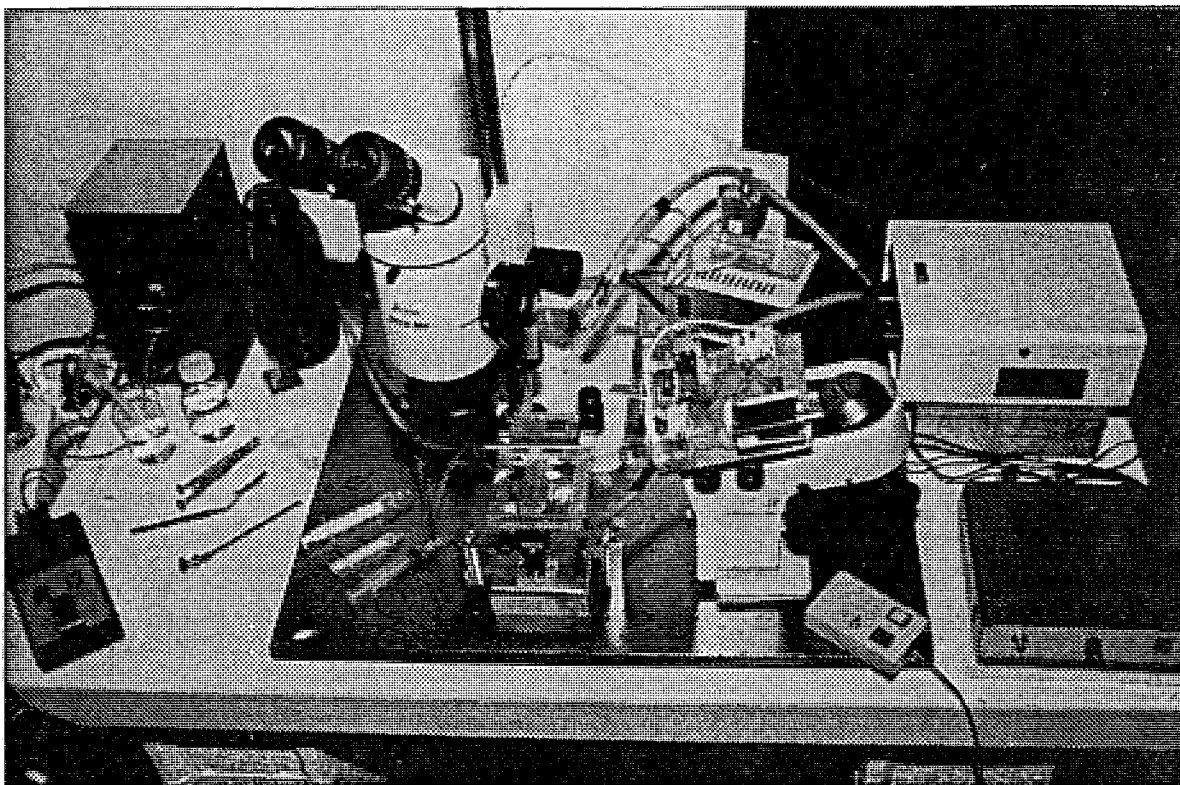


Figure 18 : Table "anti-vibration" avec posés dessus, la loupe binoculaire, le micromanipulateur porte-cuve et le micromanipulateur avec le micromanomètre intracellulaire.

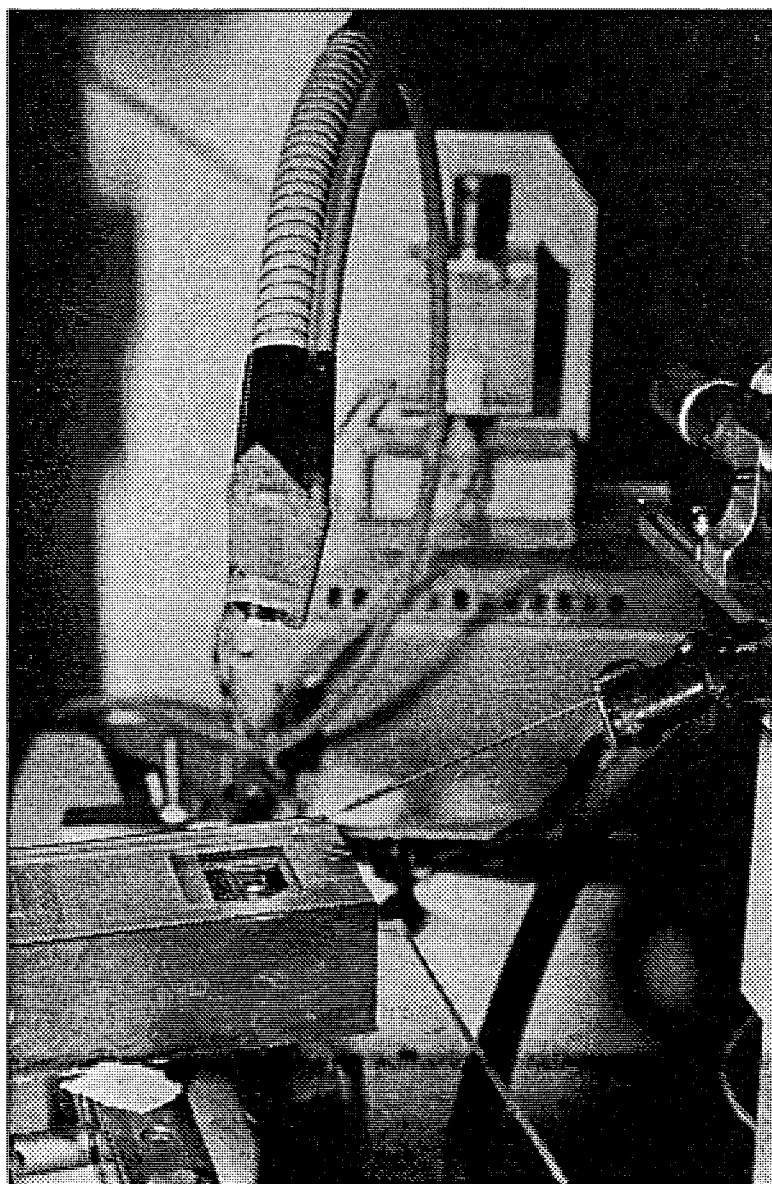


Figure 19 : Chambre de mesure du picolitre osmomètre.

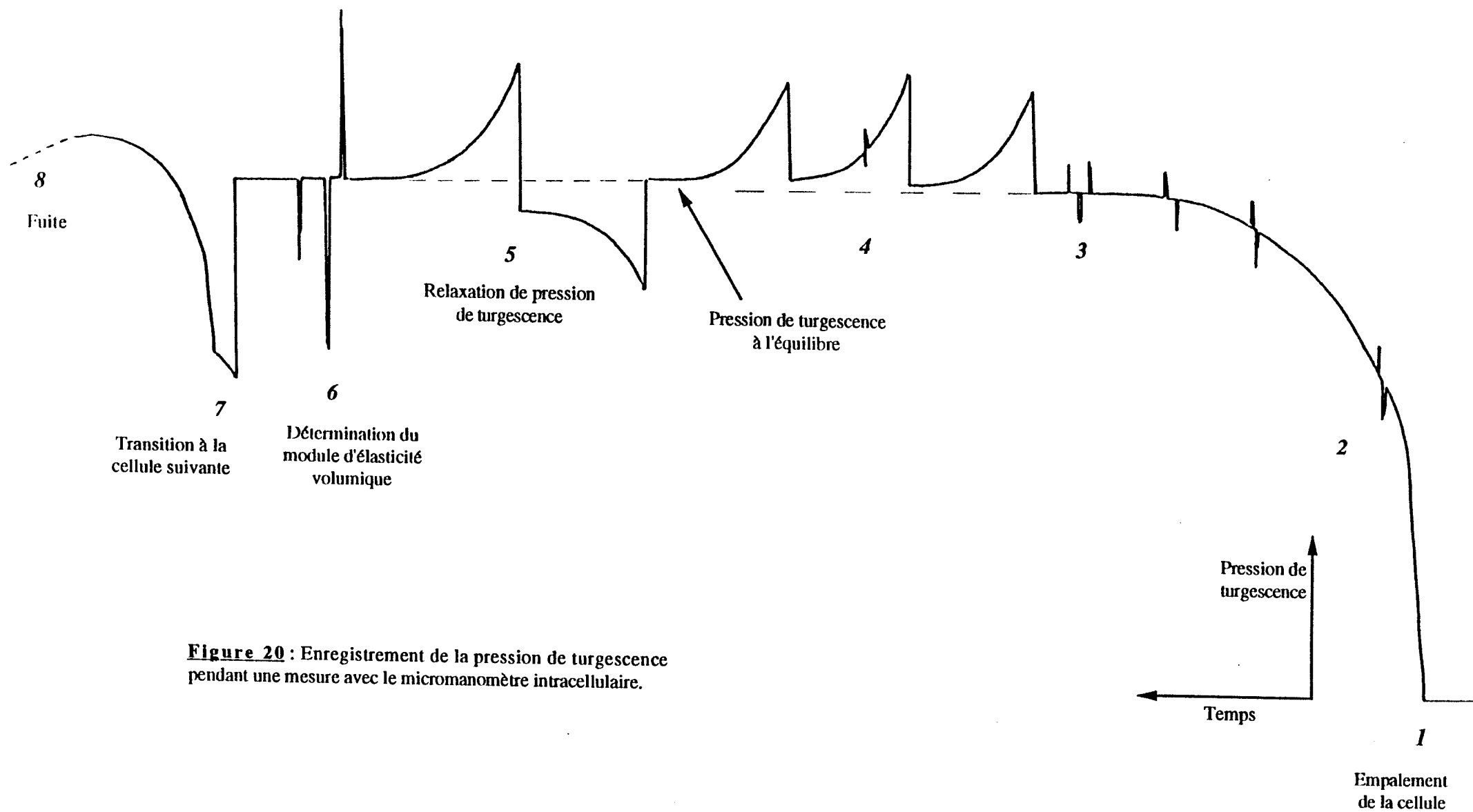


Figure 20 : Enregistrement de la pression de turgescence pendant une mesure avec le micromanomètre intracellulaire.

Tableau 3 : Mesure de la pression de turgescence dans une cellule à l'aide du micromanomètre intracellulaire. Observations au microscope et enregistrement de la pression.

Les différentes phases d'une mesure de pression de turgescence	Les observations au microscope	Les observations sur l'enregistreur à papier (cf. fig. 20)
Positionnement du capillaire avec le micromanipulateur. Fermeture de la vanne arrière avec le solénoïde.	Le capillaire est positionné près de la surface de la racine.	1 La pression est à 0.
Empalement de la cellule. Le suc vacuolaire "s'engouffre" dans le capillaire où la pression est plus faible. Par action sur le piston, la pression est augmentée progressivement et délicatement dans la chambre, l'entrée du suc vacuolaire dans le capillaire est freinée puis stoppée.	Un ménisque se crée entre le suc vacuolaire et l'huile. Il se déplace très vite en direction de la base du capillaire, l'action sur le piston le ralentit puis l'arrête dans une position donnée.	2 La pression augmente très vite, proportionnellement à l'action sur le piston puis tend à se stabiliser.
Equilibre des pressions entre l'intérieur de la cellule et la microchambre. Des mini aller-retour du piston permettent de vérifier que l'extrémité du capillaire n'est pas bouchée et que la pression enregistrée est bien celle existant dans la cellule. Ces va-et-vient sont nécessaires en permanence pour s'assurer que le capillaire n'est pas obstrué.	Le ménisque oscille légèrement autour d'une position fixe.	3 Un "bruit de fond" se dessine, on observe des petites variations de pression, positives puis négatives.
Renvoi du suc vacuolaire vers la cellule. Une légère augmentation de la pression dans la chambre, par action sur le piston, repousse une partie du suc dans la cellule. Le respect de l'équilibre des potentiels hydriques dans la racine entraîne une sortie d'eau de la cellule et donc un retour vers une pression hydrostatique d'équilibre. Il faut faire reculer le piston pour contrebalancer cette sortie d'eau et maintenir le ménisque dans sa nouvelle position. En procédant en plusieurs étapes, on ramène le ménisque à sa position avant empalement; c'est la <i>pression de turgescence réelle de la cellule</i> . Si le ΔV est grand relativement au volume de la cellule, π d'équilibre, et donc P , seront légèrement augmentés. Cependant ce ΔP est souvent négligeable.	Le ménisque est déplacé vers la cellule, puis stabilisé dans sa nouvelle position tout en continuant d'osciller.	4 La pression augmente fortement puis décroît exponentiellement vers une nouvelle position d'équilibre.

Les différentes phases d'une mesure de pression de turgescence	Les observations au microscope	Les observations sur l'enregistreur à papier (cf. fig. 20)
Etude de relaxation de pression. Ces "exercices" sont identiques à la phase 4 mais peuvent consister en un ΔV positif ou négatif, i.e. une augmentation ou une diminution de pression. L'étude de la cinétique du retour de P à sa valeur d'équilibre (de type exponentiel) permet de calculer la conductance hydraulique membranaire.	Le ménisque est déplacé vers la cellule ou vers la base du capillaire, puis stabilisé dans sa nouvelle position.	5 Identique au cas 4, ou bien, diminution de la pression puis remontée exponentielle.
Etude du module d'élasticité volumique. La détermination du dP engendré par un dV connu permet de déterminer le module d'élasticité volumique. Un aller-retour du piston génère un dV (calculé grâce au diamètre interne du capillaire et au déplacement enregistré le long du capillaire), le dP associé est enregistré par le transducteur de pression.	Le ménisque, sous l'impulsion des mouvements du piston, fait un aller-retour dans l'une ou l'autre des directions.	6 La pression augmente puis diminue instantanément ou l'inverse.
Transition à la cellule suivante. Une fois P déterminée dans une cellule, la pression est abaissée dans la microchambre (et donc dans la cellule) de 1 à 2 bars par recul du piston. En poussant légèrement sur le bras du micromanipulateur, la cellule suivante est empalée, la pression remonte, on agit alors de façon identique à l'étape 2.	Le ménisque est déplacé en direction de la base du capillaire (dépression) puis montre un saut au moment de l'empalement de la cellule suivante. L'augmentation de la pression dans la chambre le ralentit puis l'arrête, etc ... (cf. 2).	7 La pression diminue lors du recul du piston puis augmente brusquement lors de l'empalement puis se stabilise comme en phase 2.
Fuite ... Durant une phase d'équilibre ou à la suite d'une variation de pression induite par un mouvement du piston, l'étanchéité entre la membrane plasmique et le capillaire n'est plus parfaite, la pression chute.	Le ménisque se "sauve" en direction de la cellule en dépit d'une réduction de la pression dans la microchambre.	8 La pression chute irrémédiablement avec une vitesse dépendant de la taille de la fuite.

cuve sans gêner la zone de travail et est recouvert de solution nutritive. Une lamelle est posée sur les plots en mastic juste au dessus de l'endroit à sonder, de façon à créer une surface plane qui facilitera la mise au point de la loupe binoculaire.

La préparation du micromanomètre consiste tout d'abord à vérifier qu'il n'y a pas de bulle d'air dans la microchambre, sans quoi une purge est nécessaire. Un microcapillaire, dont l'extrémité a été préalablement cassée au diamètre adéquat (environ 1 μm), est ensuite fixé, toujours sans introduire de bulle, à la microchambre (le solénoïde est en position ouvert, la pression dans la chambre est donc la pression atmosphérique). L'extrémité du capillaire est amenée à la surface de la racine grâce au micromanipulateur par des "macrodéplacements". Le contrôle visuel de la suite des opérations s'effectue à travers une puissante loupe binoculaire à zoom continu (M8, Leica). La lumière est amenée par le bas, à travers le socle en verre de la cuve.

Une fois que tous les préparatifs sont terminés, un petit mouvement du capillaire, par "microdéplacements", empale la cellule et la pression de turgescence cellulaire s'affiche sur l'enregistreur à papier. Les mesures s'effectuent *en aveugle*, au sens où on ne voit pas la cellule empalée, seulement le capillaire et la surface de la racine. Les "événements" sont détectés et décodés par les observations du ménisque eau-huile dans le capillaire et par la pression affichée sur l'enregistreur. Les différentes phases d'une mesure sont décrites dans la figure 20 et le tableau 3.

3.3 Avantages et limites

Le micromanomètre intracellulaire possède des avantages importants. Il permet des *mesures directes de la pression de turgescence, in vivo*. Les dérives de mesure rencontrées classiquement avec les mesures indirectes sont supprimées. En effet, la détermination de la turgescence par différence entre le potentiel hydrique et le potentiel osmotique (mesurés par psychrométrie) peut conduire à des valeurs erronées, le potentiel hydrique de l'apoplasme et les phénomènes de relaxation n'étant pas pris en compte (Cosgrove, 1985). Il en est de même pour l'utilisation de la chambre à pression de Scholander. De plus, ces deux méthodes sont destructives. Le micromanomètre intracellulaire peut abîmer quelques cellules mais la *plante reste intacte*. Il fournit une *mesure précise à ± 0.01 MPa*. La mesure sur des cellules individuelles permet une *résolution spatiale très fine* et permet ainsi d'étudier la croissance de façon très précise.

Les avantages de cette méthode sont cependant à pondérer par quelques inconvénients. D'une part, les *mesures sont longues et difficiles*. L'étanchéité entre le capillaire et la cellule est très fragile et la moindre vibration conduit à une fuite et à l'échec de la mesure. D'autre part *la taille de la cellule reste limitante*. Les mesures sont très difficiles si le diamètre cellulaire est inférieur à 10 μm . De plus, si la cellule n'est pas très vacuolisée comme c'est le cas des très jeunes cellules en croissance, le risque que l'extrémité du capillaire se bouche (obstruction par un composé du cytoplasme) augmente très fortement. Il faut noter que *la difficulté de la mesure varie avec les espèces et les tissus*. En effet, les essais de mesure de turgescence cellulaire que nous avons conduits sur des racines de plantules de chêne pédonculé (*Quercus robur*) se sont montrés peu concluants. Pour des raisons encore indéterminées, la cellule a toujours fuit avant la fin de la mesure. L'étude anatomique a montré que la taille des cellules ne limitait pas la mesure dans ce cas. Peut-être la structure du tissu (il existe beaucoup d'espaces intercellulaires) est-elle responsable des problèmes rencontrés. Par ailleurs, la présence de résine dans les aiguilles, mais aussi dans certains cas dans les très jeunes racines, pose également des problèmes pour l'utilisation du micromanomètre intracellulaire chez les conifères.

Il faut également être conscient que *cette méthode peut sous-estimer la turgescence mais ne la surestime jamais*. En effet, une très faible fuite peut ne pas être détectée. Il est également possible que la cellule, après la perte d'une partie de son suc cellulaire, retrouve une étanchéité qui masque la fuite. La pression de turgescence sera alors réduite par rapport à la situation avant empalement.

4 MESURE DE LA PRESSION OSMOTIQUE CELLULAIRE

4.1 Le picolitre osmomètre

Cet osmomètre a été mis au point pour mesurer la pression osmotique d'échantillons de très faible volume, jusqu'à une dizaine de picolitres (10^{-12} l) (Malone et Tomos, 1992). Il permet la mesure de la pression osmotique du contenu d'une seule cellule.

La pression osmotique est déterminée par mesure du point de fusion du dernier cristal. Cette méthode consiste à congeler l'échantillon puis, lors d'un réchauffement lent, à mesurer avec précision la température de fusion du dernier cristal. Cette température est proportionnelle à l'osmolalité de l'échantillon (loi de Van't Hoff). Il suffit d'étalonner l'osmomètre avec des solutions de NaCl d'osmolalité connue.

Le picolitre osmomètre est constitué de plusieurs éléments :

- L'appareil de mesure, constitué d'une petite chambre où se trouve une petite plateforme de cuivre (1,5 cm x 1,5 cm) qui reçoit les échantillons (fig. 19). Cette chambre est couverte par une lamelle de microscope coulissant au dessus de la fenêtre.
- Un groupe électrique qui permet de refroidir la plateforme de cuivre, par effet Peltier, jusqu'à -40°C en une minute.
- Un circuit d'eau permettant de dissiper la chaleur du groupe froid.
- Un système de tubes amenant un flux d'air sec au dessus et dans la chambre de mesure.
- Un boîtier de contrôle de la température (avec une précision de $0,02^{\circ}\text{C}$) et de déclenchement des cycles de congélation.

4.2 Les mesures

La silanisation des microcapillaires. Avant tout il est nécessaire de silaniser les microcapillaires utilisés pour pipetter les échantillons dont on veut mesurer la pression osmotique. Les surfaces interne et externe sont rendues hydrophobes par fixation de groupements silane sur le verre. Grâce à ce traitement, on peut pipetter plusieurs échantillons en même temps (séparés par des gouttelettes d'huile de silicone) dans un même capillaire. En effet, ce traitement empêche l'échantillon hydrophile aspiré d'adhérer aux parois et de laisser un dépôt.

Les microcapillaires sont disposés sur un support qui est placé dans un bécher. Celui-ci est recouvert de papier aluminium où un petit trou est percé (fig. 21), avant d'être placé dans un four à 180°C , sous une hotte aspirante (les vapeurs du produit de silanisation sont toxiques). Une demi-heure après, 70 μl de diméthylchlorosilane (Sigma) sont injectés dans le becher à travers le petit trou. La vaporisation est quasi instantanée et la réaction très rapide. Un délai minimum de 15 minutes est observé avant de sortir les capillaires.

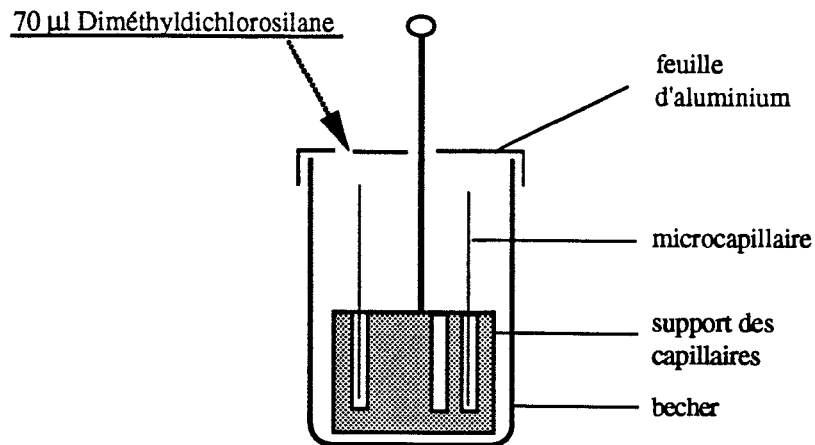


Figure 21 : Dispositif de silanisation des capillaires nécessaire à la mesure de la pression osmotique.

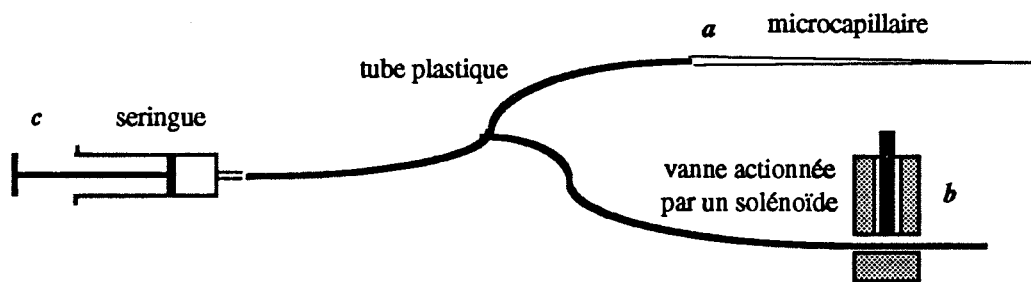


Figure 22 : Dispositif de prélèvement et de dépôt de microgouttelettes pour la mesure de la pression osmotique avec le picolitre osmomètre.

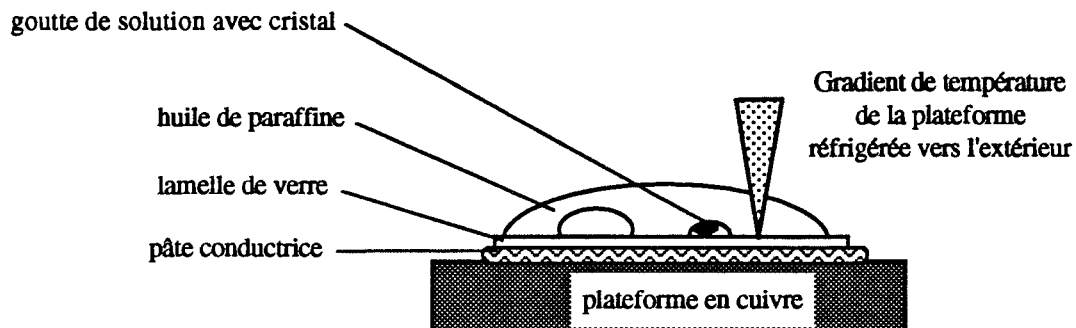


Figure 23 : Mesure de la pression osmotique par point de fusion du dernier cristal. Effet du gradient de température sur la fonte de gouttelettes de même pression osmotique mais de taille différente.

Préparation de l'osmomètre. Une lamelle de microscope est préalablement préparée en deux étapes. La face supérieure est abrasée puis dégraissée. La face inférieure est ensuite noircie au marqueur puis rayée avec une pointe d'épingle. La lamelle est posée sur la plateforme de l'osmomètre avec, entre les deux, une pâte à haut degré de conduction thermique (RS Composants). Cette lamelle offre un support propre et lisse pour les échantillons, le marquage de sa face inférieure permet de repérer les gouttelettes pendant la phase de mesure et facilite la lecture. Une goutte d'huile de paraffine hydratée est déposée sur la lamelle. Les échantillons seront déposés sur la lamelle, sous l'huile, ce qui évitera leur évaporation (qui, sinon, serait instantanée étant donné leur très faible volume). Avant de mettre en marche l'osmomètre, un flux d'air sec (déshydraté par passage sur du silicagel) est envoyé sur la plateforme par l'intérieur de l'osmomètre et par la fenêtre d'ouverture au dessus de la lamelle. Il est également impératif de faire circuler un courant d'eau froide à travers la base de l'osmomètre pour le refroidir tout au long de la période de fonctionnement. L'osmomètre peut maintenant être mis en marche.

Mesure. La première étape consiste à étalonner l'osmomètre. On utilise des solutions de NaCl de 0, 100 mM, 200 mM et 300 mM (correspondant à une pression osmotique de 0; 0,46; 0,92 et 1,31 MPa respectivement). Une gouttelette de chaque solution étalon est aspirée dans un microcapillaire dont l'extrémité est d'environ 2-3 μm . Un dispositif de tubes en T permettant d'aspirer et de repousser les échantillons dans et en dehors du capillaire est présenté figure 22.

Les échantillons sont ensuite déposés sur la lamelle de l'osmomètre sous l'huile de paraffine. La fenêtre est aussitôt refermée pour éviter la condensation à la surface de l'huile, ce qui réduirait beaucoup la visibilité. Le cycle de congélation est déclenché, la température est abaissée jusqu'à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en une minute puis remonte assez rapidement jusqu'à environ $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La température, de nouveau sous contrôle de l'expérimentateur, est ensuite remontée très progressivement tout en relevant la température de disparition du dernier cristal de chacun des étalons. Une courbe d'étalonnage peut ainsi être établie entre osmolalité ou pression osmotique et point de fusion du dernier cristal. Pratiquement, on utilise l'échelle arbitraire associée à la température plutôt que la température elle-même.

La racine où les échantillons doivent être prélevés est installée dans la plateforme de mesure sous la loupe binoculaire comme pour les mesures de turgescence (cf. § 3.2). Le prélèvement d'échantillons peut s'effectuer de deux manières différentes.

- A la fin d'une session de mesure de pression de turgescence, alors que le capillaire est encore inséré dans la cellule, l'ouverture de la vanne arrière du micromanomètre intracellulaire (g, fig. 15) ramène la pression dans le capillaire à la pression atmosphérique en une fraction de seconde. Le contenu cellulaire s'engouffre très vite dans le capillaire qui est alors retiré rapidement de la cellule pour éviter tout phénomène de dilution (Malone *et al.*, 1989). Il n'y a pas contamination de l'échantillon lorsque le capillaire est encore sous la solution baignant la racine. En effet, les parois du capillaire étant hydrophobes, l'échantillon a tendance à sortir de la micropipette. Il faut retirer l'extrémité du capillaire de la solution nutritive rapidement. Le capillaire est ensuite amené au dessus de la fenêtre de l'osmomètre et l'échantillon peut être déposé sur la lamelle, à côté des étalons. Il est important de respecter cette proximité entre étalons et échantillons car une variabilité peut exister selon la position sur la plateforme de mesure, due, par exemple, à l'épaisseur de pâte de conduction thermique entre plateforme et lamelle.

- Si on souhaite ne mesurer que la pression osmotique, on utilise le dispositif de la figure 22 pour prélever les échantillons. Le microcapillaire est directement connecté sur une branche du T (a). La vanne (b) est en position ouverte lors de l'empalement, le suc cellulaire s'engouffre dans le capillaire. Il faut retirer le capillaire très rapidement pour éviter une dilution de l'échantillon. Ce dernier est ensuite déposé sur la lamelle à côté des gouttelettes étalons en pressurant légèrement le réseau de tubes par action sur le piston de la seringue (c), vanne fermée.

La température de fusion du dernier cristal des échantillons est ensuite mesurée comme il a été fait pour les étalons. On procède à une lecture de plusieurs gouttelettes à la fois (4 à 10). Il est possible de récupérer ces échantillons et de les stocker dans des capillaires en vue de microdosages par analyse des émissions de rayons X. L'échantillon est aspiré dans une micropipette de stockage (ouverture relativement large et extrémité très effilée) et coincé entre deux gouttes d'huile de paraffine qui empêchent son évaporation. La pipette contenant les échantillons est stockée au réfrigérateur temporairement (1 à 2 semaines).

4.3 Avantages et limites

La miniaturisation de l'osmomètre permet de *mesurer la pression osmotique du contenu d'une seule cellule*. Le picolitre osmomètre se distingue des autres méthodes (psychrométrie, hygrométrie) qui procèdent sur des échantillons tissulaires et donc sur un mélange de suc cellulaire et d'apoplasme. De plus, comme pour le micromanomètre intracellulaire, *la résolution spatiale très fine* est un atout pour l'étude de la croissance. La *précision de la mesure* est bonne (± 0.02 MPa). *La taille des cellules n'est en général pas limitante*. De plus, il est toujours possible d'empaler 2 ou 3 cellules contiguës pour augmenter la taille de l'échantillon.

De même que pour le micromanomètre intracellulaire, l'échelle à laquelle nous avons travaillé suppose que toutes les manipulations et les observations se fassent sous microscope. Il faut être conscient que *ces mesures sont longues et demandent beaucoup de rigueur*. D'autre part, *les gouttelettes, étalons et échantillons doivent avoir une taille très voisine* sans quoi la précision diminue. En effet, il existe un gradient de température entre la lamelle et le sommet de la gouttelette (fig. 23). Pour une même osmolalité, le dernier cristal dans une grosse gouttelette fondra à une température affichée plus faible que celui qui se trouve dans une petite gouttelette. *La présence de résine* qui parfois obstruait l'extrémité du capillaire constitue le dernier point limitant rencontré sur le pin maritime.

5 ANALYSE DES PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES

Comme expliqué dans l'étude bibliographique, §1.3, nous avons considéré que la conductance hydraulique ne limitait pas la croissance. Le grandissement cellulaire a été étudié à travers le modèle simplifié (équation 7) où la variation relative de la longueur cellulaire est exprimée en fonction de la pression de turgescence et de l'extensibilité pariétale (au sens le plus générale du terme).

Les modifications de l'extensibilité pariétale des cellules de l'apex racinaire au cours de leur maturation ont été déduites de l'analyse comparative des variations de la vitesse relative d'élongation et de la pression de turgescence comme indiqué dans l'étude bibliographique, § 1.3.3 (fig. 5).

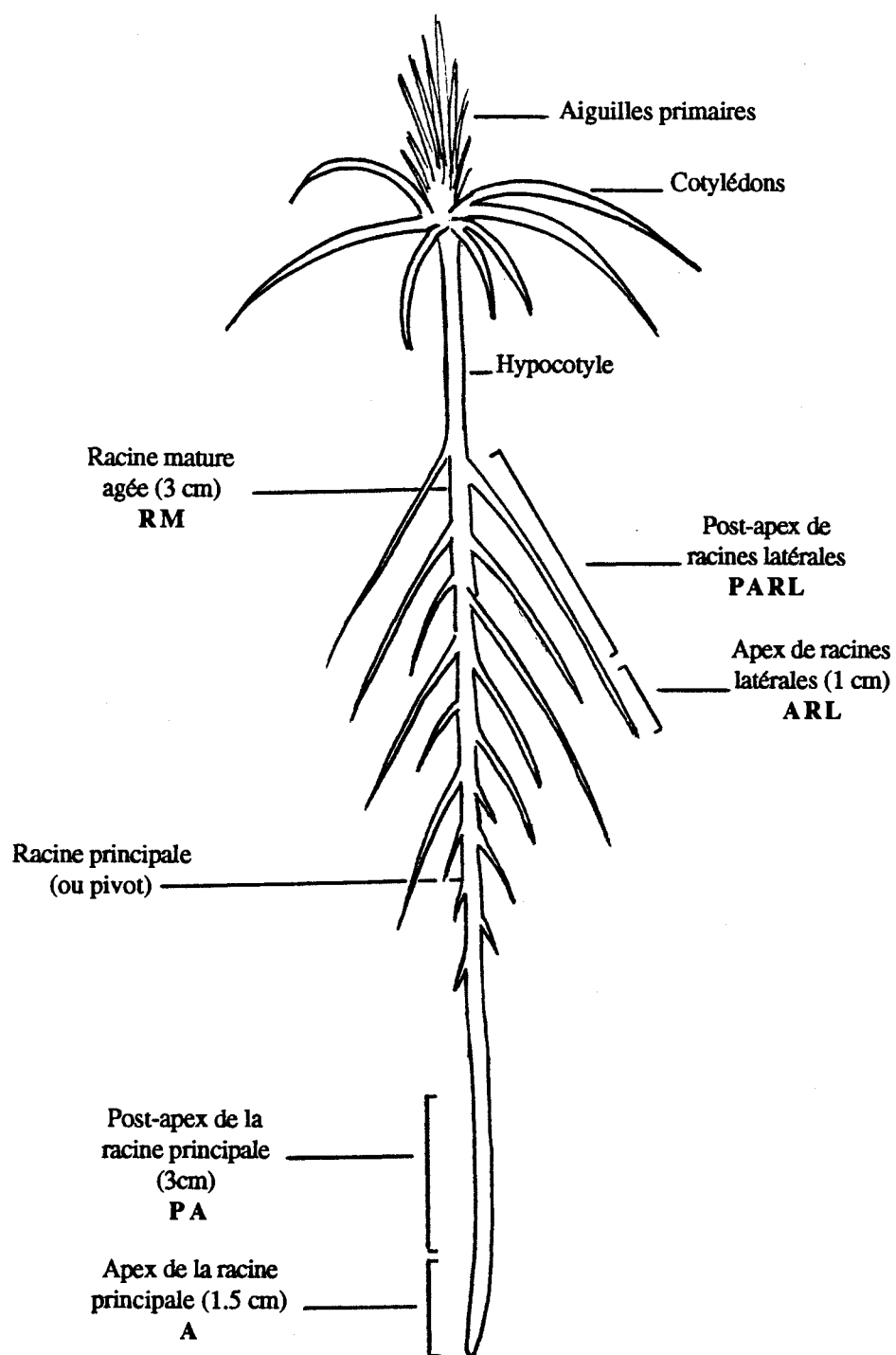


Figure 24 : Schéma des différents tissus collectés sur chaque plantule de pin maritime (âgée de 4 semaines) pour les analyses d'éléments minéraux, de sucres et d'acides aminés.

6 ANALYSES MINÉRALES ET ORGANIQUES

6.1 Récolte des tissus

Les différentes analyses ont été menées sur des plantules récoltées 27 à 30 jours après la germination. Les systèmes racinaires ont été rincés par une rapide immersion dans de l'eau désionisée puis délicatement tamponnés entre deux lits de papier absorbant avant d'être découpés en différentes parties (fig. 24) :

- l'apex (A) : le premier centimètre et demi de la racine principale
 - le "post-apex" (PA) : les 3 cm suivant l'apex, constitué de tissu mature jeune
 - la "racine mature âgée" (RM) : 3 cm prélevés à la base de la racine principale (sans les racines latérales)
 - l'apex des racines latérales (ARL) : le premier cm des racines latérales
 - le "post-apex" des racines latérales (PARL) : la partie complémentaire de l'apex des racines latérales.
- Pour les plants carencés en potassium, dont les racines latérales étaient très courtes, cette partie n'a pas pu être prélevée.

Des études anatomiques ont montré que les parties appelées apex (A et ARL) contenaient la zone d'élongation, dans les deux types de racine.

Les portions de tissu ont été placées dans des seringues à insuline (analyse des éléments minéraux) ou dans des microtubes de 1,5 ml (analyses des sucres et des acides aminés) puis immédiatement congelées dans l'azote liquide puis stockées à -20°C jusqu'à l'analyse. Les portions identiques de 3 à 4 plants ont été regroupées dans une seule seringue (ou un seul microtube) afin obtenir assez de matière fraîche pour effectuer les analyses. Un segment de 1,5 cm de racine principale pèse environ 12 mg (matière fraîche). Toutes ces analyses ont été conduites sur des échantillons de 35 à 150 mg de matière fraîche.

Les analyses ont été faites sur des extraits tissulaires, *i.e.* un mélange de vacuole, de cytoplasme et d'apoplasme. Cependant, selon Leigh et Wyn Jones (1984), ce type d'extrait contient au moins 90 % de vacuole. Dans les apex racinaires, les cellules étaient bien vacuolisées excepté dans le premier mm suivant le méristème.

6.2 Analyse des éléments minéraux

Des seringues à insuline (volume mort très restreint) ont été utilisées pour extraire la solution tissulaire. De la laine de verre, préalablement traitée à HCl 1N, rincée abondamment puis séchée, a été placée au fond de chaque seringue. Les échantillons ont été déposés dans le corps de la seringue et le piston repoussé pour laisser le minimum d'espace vide mais sans compresser les tissus. Lors de l'analyse, après décongélation, il a suffi de pousser sur le piston pour obtenir la solution tissulaire.

L'extrait tissulaire a été directement expulsé dans un pilulier contenant environ 4 ml d'eau ultrapure dont le volume avait été déterminé précisément par pesée. Une nouvelle pesée (eau + échantillon) a permis de calculer le volume de l'extrait, supposant que la densité du suc tissulaire était proche de 1. En général, nous avons extrait au moins 40 µl de suc; lorsque nous obtenions beaucoup plus, nous avons rajouté de l'eau ultrapure afin d'atteindre un coefficient de dilution d'environ 100, ce qui amenait les concentrations ioniques du suc dilué dans la gamme de meilleure précision des méthodes d'analyse.

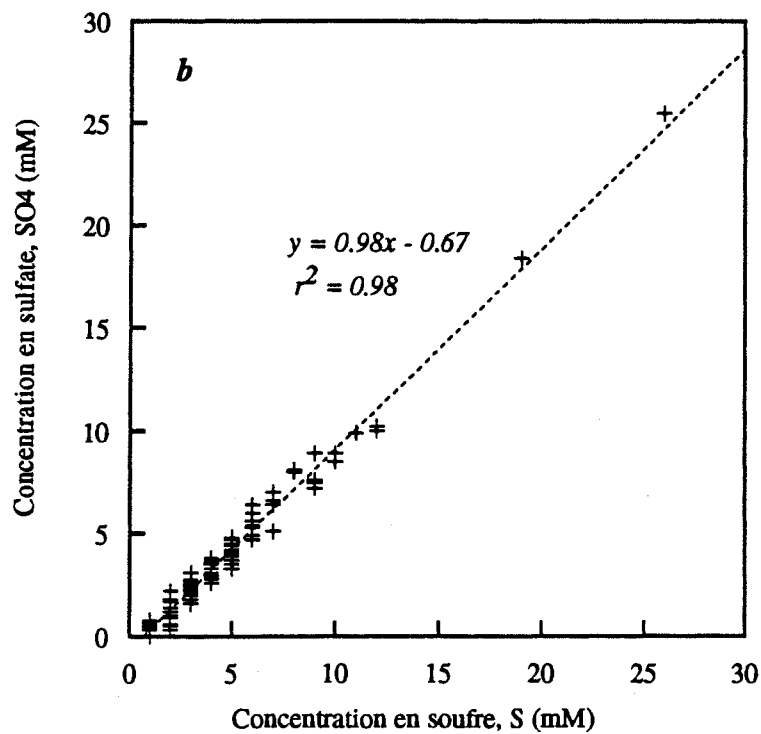
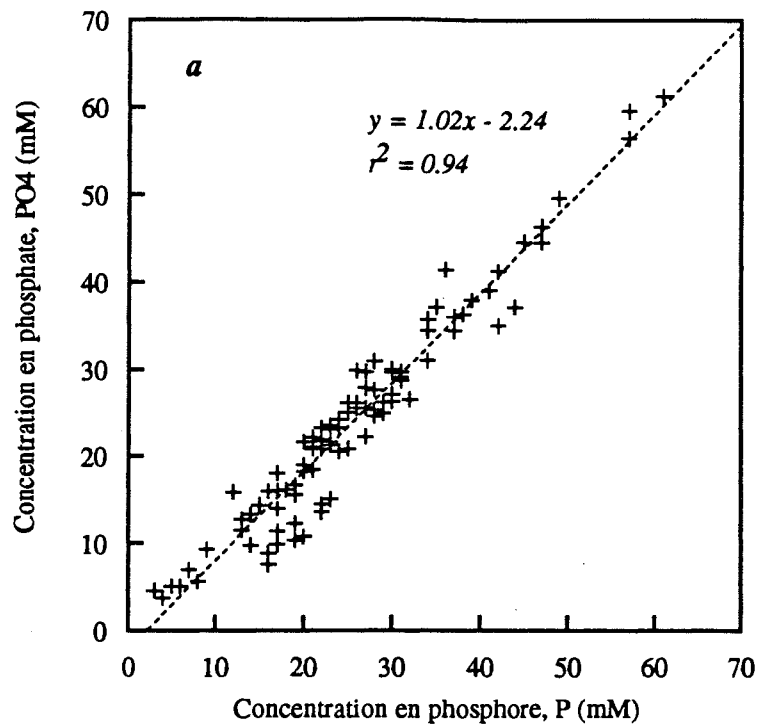


Figure 25 : *a*) Corrélation entre concentration en phosphate mesurée par chromatographie ionique et concentration en phosphore mesurée par ICP. *b*) Corrélation entre concentration en sulfate mesurée par chromatographie ionique et concentration en soufre mesurée par ICP.

La concentration des éléments S, P, Mg, Ca, Na et K a été déterminée, directement dans le suc dilué, à l'aide d'un spectromètre d'émission à plasma induit (ICP-OES) (JY 38+, Jobin Yvon). Etant donné le faible volume des échantillons (de 4 à 8 ml), nous avons utilisé la méthode du "direct-picking", avec 3 répétitions pour chaque élément. Les longueurs d'onde utilisées correspondant aux éléments S, P, Mg, Ca, Na et K ont été 180,676; 213,618; 285,213; 422,673; 588,995 et 766,491 nm, respectivement.

La concentration des anions Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} et SO_4^{2-} a été déterminée dans le suc dilué par chromatographie ionique équipée d'une détection conductimétrique et d'un mode d'autosuppression recyclée (Dionex DX 300). Ce système était couplé à un passeur automatique Gilson 222 XL. Nous avons utilisé les précolonne AG12A et colonne AS12A (Dionex) avec l'éluant (Na_2CO_3 2,7 mM / NaHCO_3 0,3 mM) dont le débit était de 1,5 ml/min. Le volume d'injection était 50 μl . Les échantillons ont été filtrés à 0,45 μm (filtres à usage unique, diam. 13 mm, membrane hydrophile de polysulfone, Acrodisc Gelman).

Les concentrations en phosphore mesurées par ICP étaient parfaitement corrélées aux concentrations en phosphates mesurées par chromatographie ionique sur toute la gamme de concentration (fig. 25a). De plus, le coefficient de la pente de la droite de régression était de 1. Une même corrélation a été observée entre soufre et sulfates (fig. 25b). Il apparaît donc que le phosphore et le soufre solubles étaient essentiellement présents sous forme inorganique.

6.3 Analyse des sucres solubles

Les tissus congelés, stockés dans les microtubes, ont été directement placés, sans décongélation intermédiaire, dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml d'éthanol 80 %, le tout étant placé dans un bain marie à 80 °C. Ces conditions d'extraction des sucres permettent de neutraliser l'invertase avant qu'elle ne décompose le saccharose en fructose et glucose. Le microtube de stockage a été rincé avec 0,5 ml d'éthanol 80 %. Les tissus ont été broyés avec un pilon de verre directement dans le tube à hémolyse. Après les 30 min. d'extraction, le surnageant a été récupéré et le culot rincé deux fois avec 0,5 ml d'éthanol 80 %. Les 2 ml de solution d'éthanol 80 %, récupérés dans un second tube à hémolyse, ont été évaporés à sec sous un flux d'air dans une étuve à 60 °C.

Une fois secs, les sucres ont été redissous dans 1 ml d'eau ultrapure pour être purifiés sur des microcolonnes de résines échangeuses d'ions. Ces microcolonnes ont été fabriquées dans des embouts bleus de pipette automatique (1 ml). De la laine de verre, préalablement traitée avec HCl 1N, rincée et séchée, a été placée au fond de l'embout, puis y ont été versés 0,5 ml de résine cationique (Amberlite, IRN77, Prolabo) puis 0,5 ml de résine anionique (Ag1x8, formate, Biorad). Avant utilisation, les microcolonnes ont été rincées par 4 fois 0,5 ml d'eau ultrapure. Ensuite, sur la microcolonne ont été déposés l'échantillon (1 ml), puis 2 fois 0,5 ml d'eau (rincage du tube), puis 0,5 ml d'eau (rincage de la colonne). Les 2,5 ml de solution de sucres purifiés ont été évaporés à sec. Au moment de l'analyse, l'extrait sec a été repris dans 400 μl d'eau, filtré à 0,45 μm (Acrodisc, Gelman) avant d'être injecté sur une HPLC couplée à un détecteur à diffusion de lumière. La phase solide était constituée d'une précolonne et d'une colonne Polysphère Pb (Merk), l'éluant était de l'eau ultrapure. Deux chromatogrammes typiques sont présentés figures 26a (standards) et 26b (échantillon).

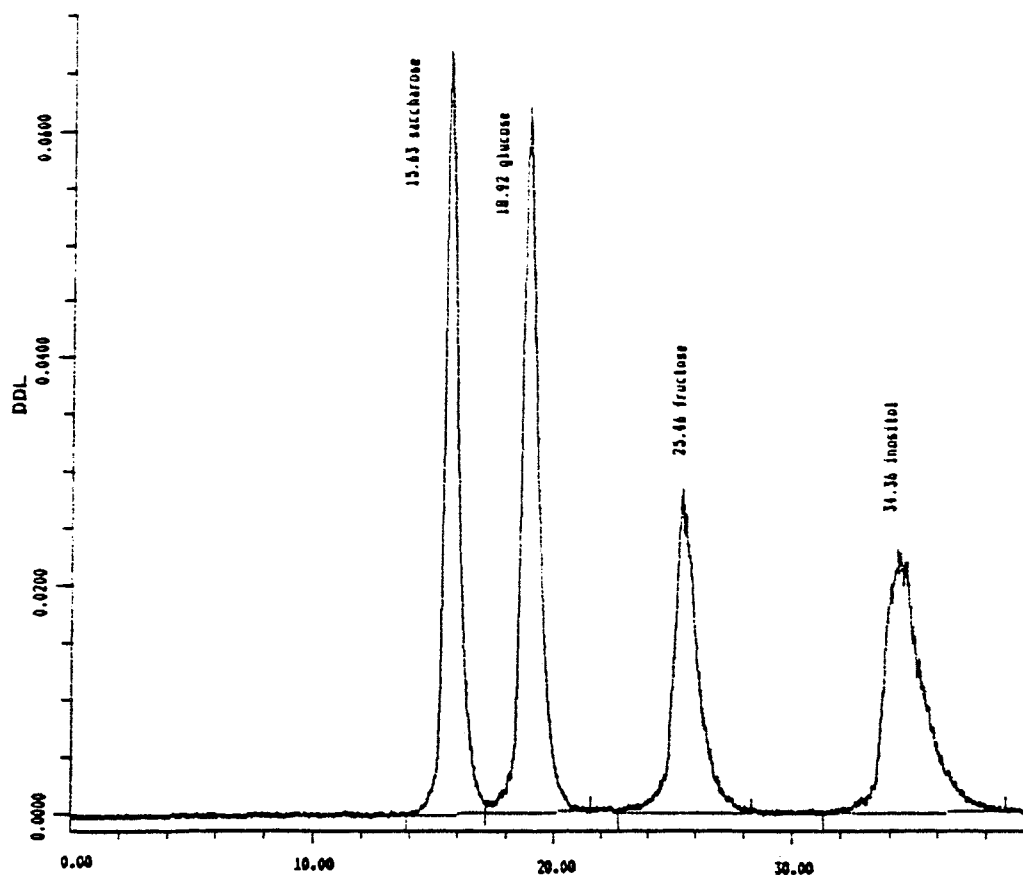


Figure 26a : Chromatogramme d'une solution étalon de 4 sucres solubles: saccharose, glucose, fructose et inositol.

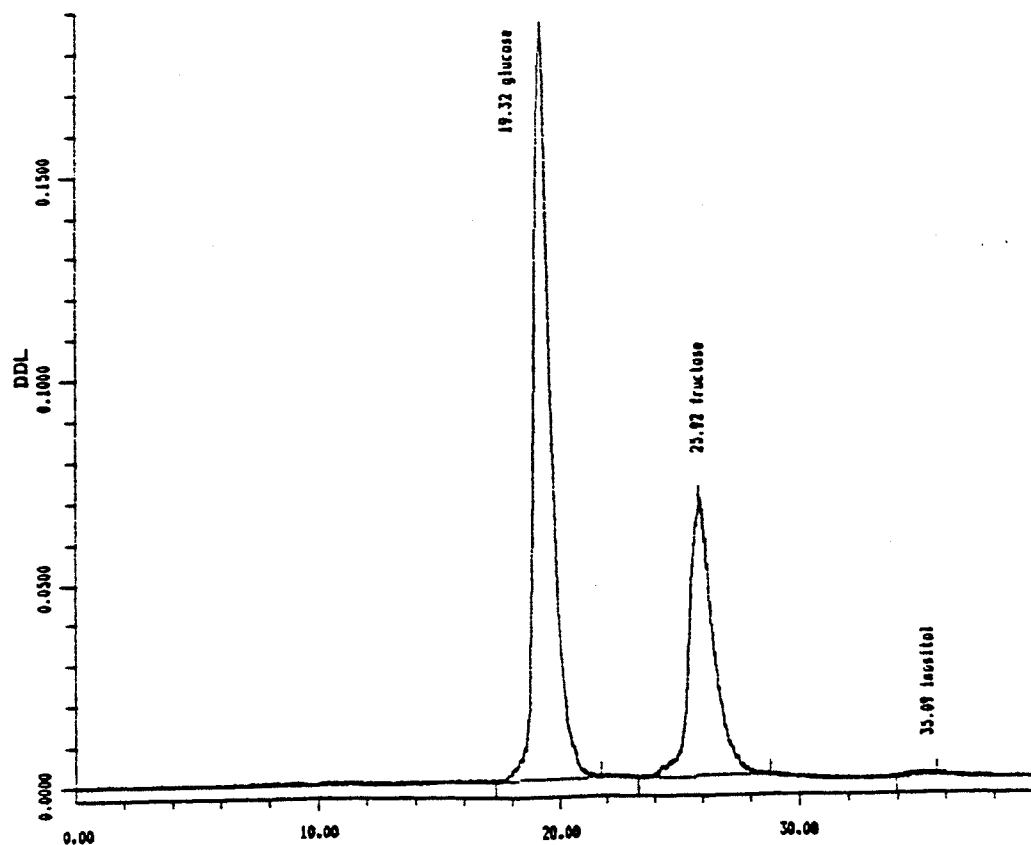


Figure 26b : chromatogramme d'analyse des sucres solubles d'un échantillon de pin maritime (post-apex d'un plant carencé KD).

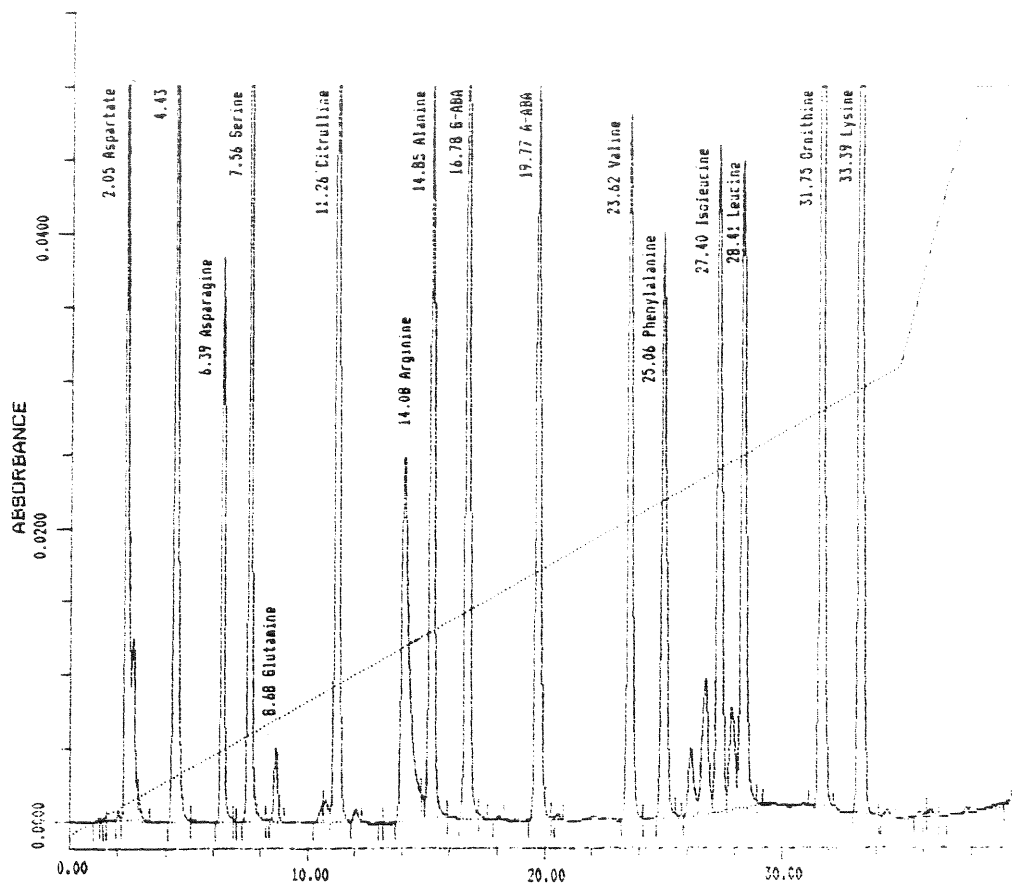


Figure 27a : Chromatogramme d'analyse d'une solution étalon d'acides aminés. Le pic de glutamine est anormalement faible car une dégradation s'était produite dans cette solution.

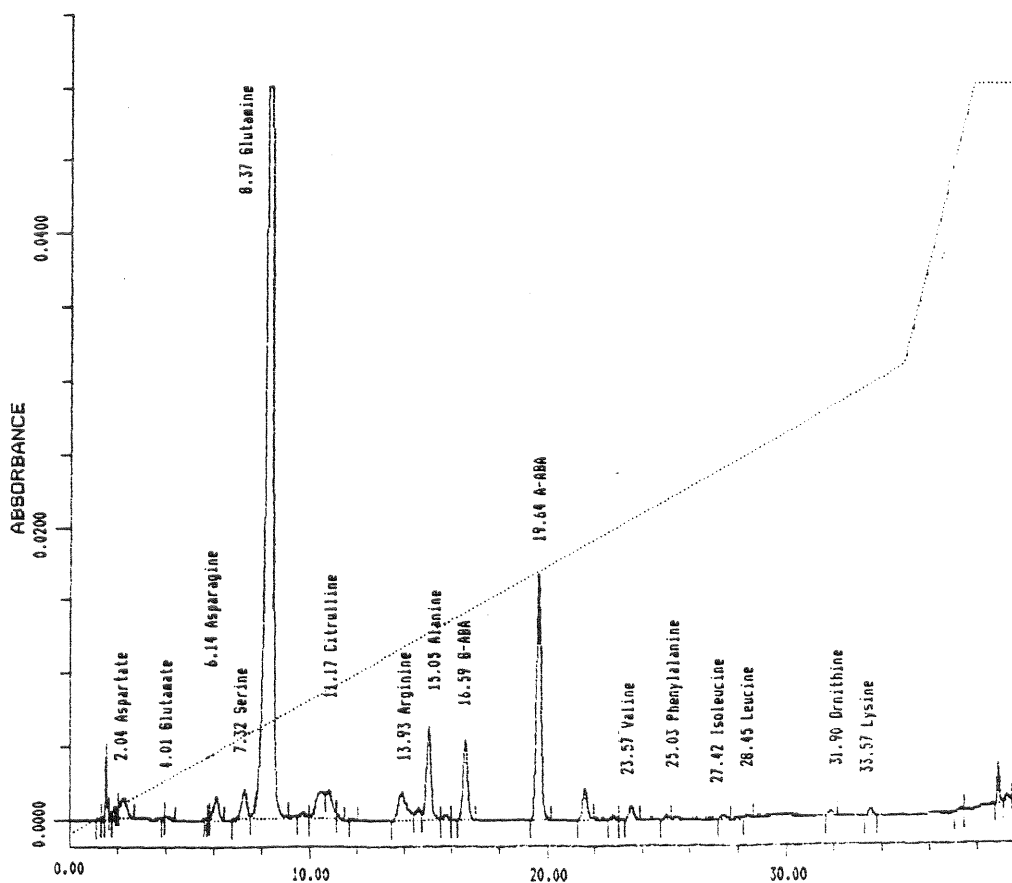


Figure 27b : chromatogramme d'analyse des acides aminés d'un échantillon de pin maritime (apex d'un plant carencé KD). Le pic d' α -ABA correspond au standard interne.

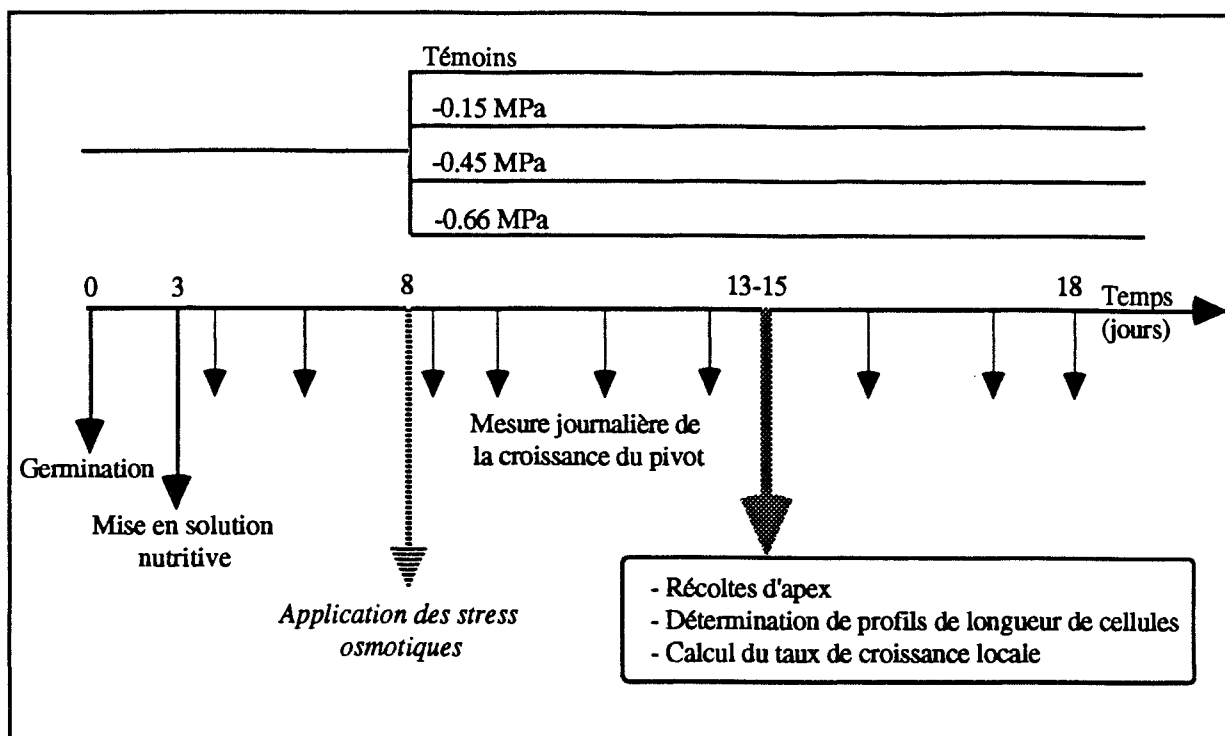


Figure 28a : Protocole de la première expérience de stress osmotique.

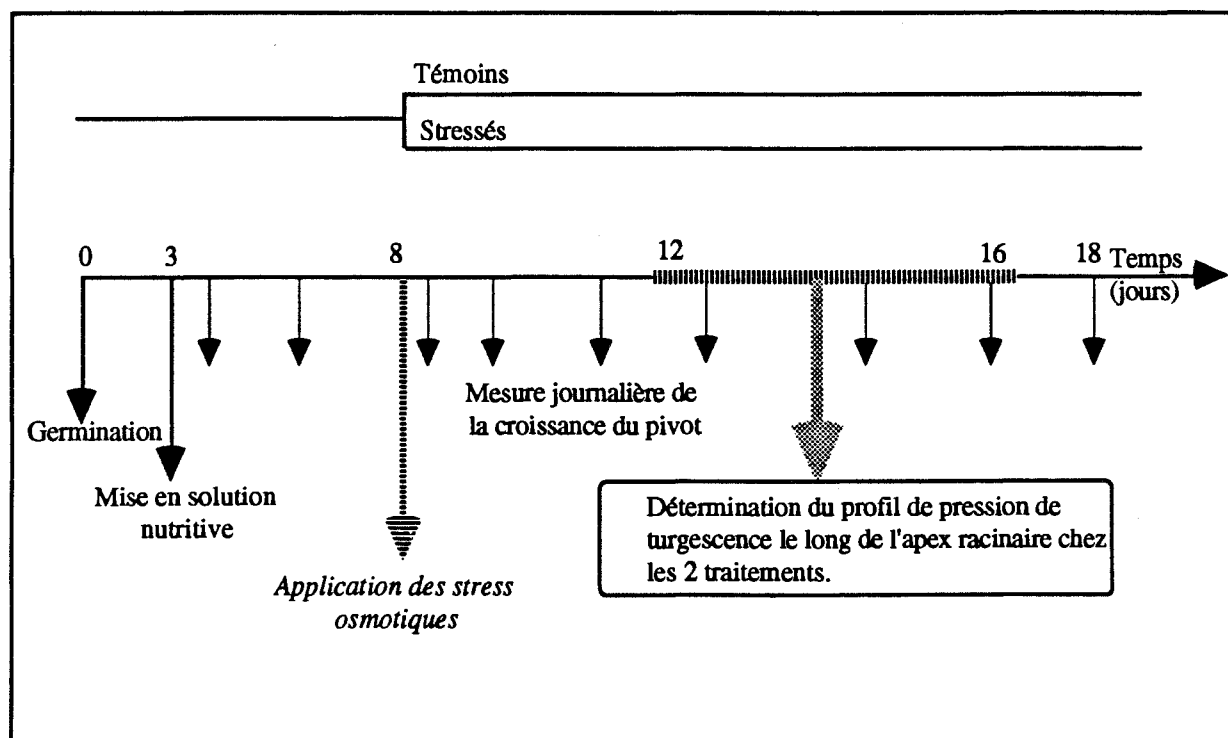


Figure 28b : Protocole du deuxième type d'expérimentation de stress osmotique. Il a été appliqué aux trois couples Témoins-0,15 MPa, Témoins-0,45 MPa et Témoins-0,66 MPa.

6.4 Analyse des acides aminés

L'extraction des acides aminés s'est faite dans une chambre froide à 4 °C. Dans le microtube de stockage ont été ajoutés :

- 150 à 300 µl de méthanol 70 % (selon la quantité de matière fraîche),
- une pincée de sable de Fontainebleau,
- 40 µl de standard interne, l'acide α -butirique, qui a permis de calculer le rendement de l'extraction.

Les tissus congelés ont été broyés directement dans le microtube à l'aide d'un pilon adapté. Après 15 min. d'incubation, les microtubes ont été centrifugés 10 min. à 14000 tr/min. Le surnageant a été récupéré dans un second microtube. Du méthanol 70 % (150 µl) a été ajouté au culot et, après agitation et 15 min. d'incubation, le microtube a été de nouveau centrifugé. Le second surnageant a été mixé avec le premier.

Le volume de l'extrait a été déterminé par pesée, la densité du méthanol 70 % étant 0,88. La solution d'extraction a été filtrée à 0,45 µm (Acrodisc, Gelman) puis au besoin diluée avant d'être injectée en HPLC. Pour rendre les acides aminés détectables en UV, 10 µl d'orthophtaldialdéhyde (OPA) ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon. Cette réaction génère des dérivés détectables à 340 nm. Le mélange a été injecté 90 s après l'addition de l'OPA à l'échantillon. La phase solide était constituée d'une colonne RP18 (150 x 4,6 mm, taille des particules 5 µ, Biorad). La phase mobile était constituée d'un gradient de (méthanol 20%, acétate de sodium 80%) et de méthanol 100%. Deux chromatogrammes typiques sont présentés figures 27a (standards) et 27b (échantillon).

7 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

7.1 Croissance racinaire et stress osmotique

Les expériences ont été menées sur les plantules de pin maritime cultivées en hydroponie. Le stress a été appliqué à partir du 8^{ème} jour, alors que la racine principale était longue de 5 à 7 cm et que les cotylédons étaient libérés des téguments de la graine. La croissance racinaire était stable. Quatre niveaux de stress osmotique ont été appliqués : 0; 0,15; 0,45 et 0,66 MPa (cf. § 1.4.1).

Ces expériences avaient pour objectifs de :

- définir les effets de différents niveaux de stress osmotique sur la croissance du système racinaire.
- expliquer les éventuelles modifications de la croissance par des considérations biomécaniques (rôle de la turgescence et des propriétés rhéologiques).

Les données ont été acquises en deux temps :

1) Lors d'une première étude (fig. 28a), la *croissance de la racine principale* a été mesurée journalièrement sur les 4 traitements, pendant les 18 jours suivant la germination des graines. Chaque traitement comportait au minimum 16 plantules. Cinq jours après le début de l'application du stress, alors que les racines avaient retrouvé un taux de croissance constant (retour à un régime permanent), 5 à 8 apex racinaires, selon les traitements, ont été récoltés. Le *profil de longueur de cellules* a été déterminé sur des coupes ultra-minces après fixation et inclusion en résine. De ces profils et de la croissance racinaire, nous avons calculé la *vitesse de croissance locale* le long de l'apex racinaire.

2) Dans un deuxième temps, chaque niveau de contrainte a de nouveau été étudié en couple avec un lot de plants témoins (fig. 28b). La *croissance racinaire* a de nouveau été mesurée tout au long de l'expérience. Le

profil de pression de turgescence a été déterminé le long de l'apex racinaire à une période plus ou moins variable (entre le 9^{ème} et le 18^{ème} jour) pour les témoins, entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour pour les plantules stressées. Lors de l'étude du couple *Témoin* - (-0,66 MPa), la pression osmotique le long de l'apex racinaire a également été mesurée.

7.2 Croissance racinaire et carence en potassium

Les expériences ont également été menées sur les plantules de pin maritime cultivées en hydroponie. Le premier type de carence a consisté à réduire l'apport en potassium à 1/40^{ème} de celui des témoins (*KD*), le second à réduire l'apport de tous les macroéléments au même niveau, 1/40^{ème} (*MD*). Ces carences ont été appliquées dès le troisième jour afin que la carence s'installe rapidement.

Ces expériences avaient pour objectifs de :

- définir les effets de la carence en potassium sur la croissance du système racinaire.
- expliquer les éventuelles modifications de la croissance par des considérations biomécaniques (rôle de la turgescence et des propriétés rhéologiques).
- identifier les solutés remplaçant le potassium en situation de carence unique et en situation de carence multiple.

Le protocole idéal de cette expérience aurait pu être celui présenté dans la figure 29. Cependant tous les paramètres ne pouvaient pas être obtenus en même temps, ni sur les mêmes plants. Les résultats ont finalement été obtenus en réalisant 5 fois l'expérience et en ne mesurant que certains paramètres à chaque fois:

- *expérience a* :

- Mesure de la croissance de la racine principale et des racines latérales pendant les 4 semaines expérimentales.
- Sur la moitié des plants de chaque traitement, dosage des éléments minéraux.
- Sur l'autre moitié des plants, mesure de la pression de turgescence et de la pression osmotique au milieu de la zone de croissance des deux types de racines (pivot et racine latérale).

- *expérience b* :

- Mesure de la longueur de la racine principale et des racines latérales à la fin des 4 semaines expérimentales.
- Détermination des biomasses aérienne (*S*) et racinaire (*R*), du rapport *R/S*.
- Dosage des éléments minéraux N, K, Na, Ca, Mg, P et S dans la matière sèche.

- *expérience c* :

- Mesure de la croissance de la racine principale et des racines latérales pendant les 4 semaines expérimentales.
- Dosage des éléments minéraux, des acides aminés et des sucres.

- *expérience d* :

- Répétition de l'*expérience c* pour obtenir un plus grand nombre d'échantillons.
- Détermination de la densité de racines latérales sur la racine principale.

- *expérience e* : sur les traitements *Témoin* et *KD* seulement :

- Détermination des profils de croissance locale sur les apex des deux types de racine.
- Mesure de la pression de turgescence le long de l'apex des racines latérales seulement.

Résultats

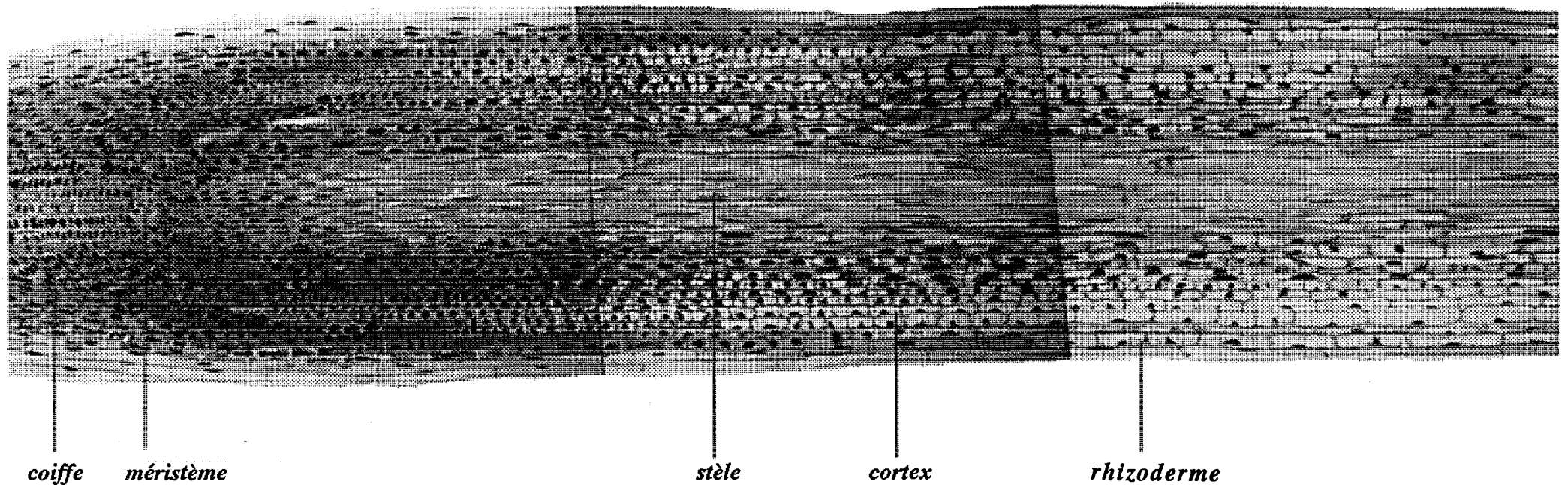
Chapitre 1 : Analyse de la croissance racinaire en conditions optimales

Cette étude a été conduite sur des plantules de pin maritime, âgées de 1 à 2 semaines, cultivées en hydroponie. Les résultats présentés ici sont issus de trois séries distinctes de mesures. Certains paramètres ont été mesurés dans chaque série. Les trois répétitions étant identiques, nous n'en avons présenté qu'une seule.

Cette étude avait pour objet de :

- décrire l'anatomie de l'apex racinaire du pin maritime,
- caractériser la zone de croissance et y mesurer la pression de turgescence et la pression osmotique avec une résolution cellulaire,
- étudier les aspects biomécaniques de la croissance,
- étudier les relations hydriques cellulaires dans l'apex racinaire.

Figure 30 : Coupe longitudinale le long de l'apex de la racine principale de plantules de pin maritime cultivées en hydroponie. Cette coupe représente environ les 3 mm prolongeant le méristème. La zone d'élongation n'est pas incluse totalement sur cette photo.



100 μ m

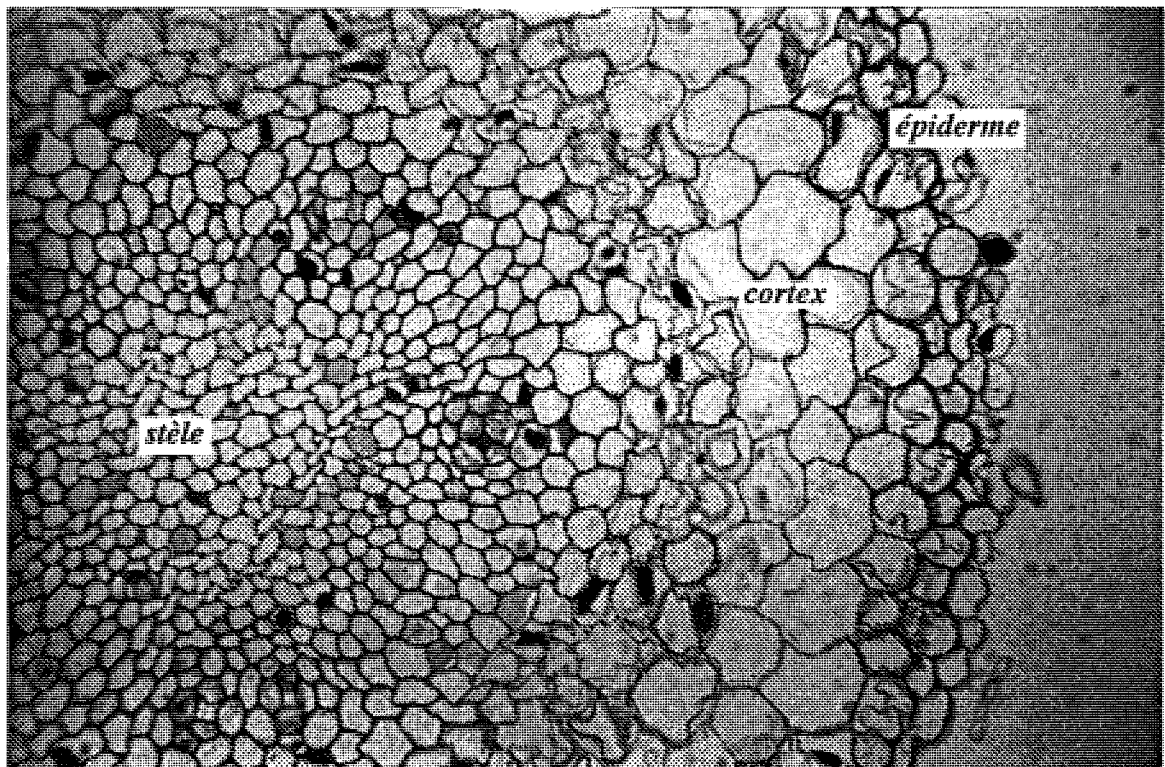


Figure 31a : Coupe transversale à 7 mm de l'apex de la racine principale de plantule de pin maritime cultivée en hydroponie.

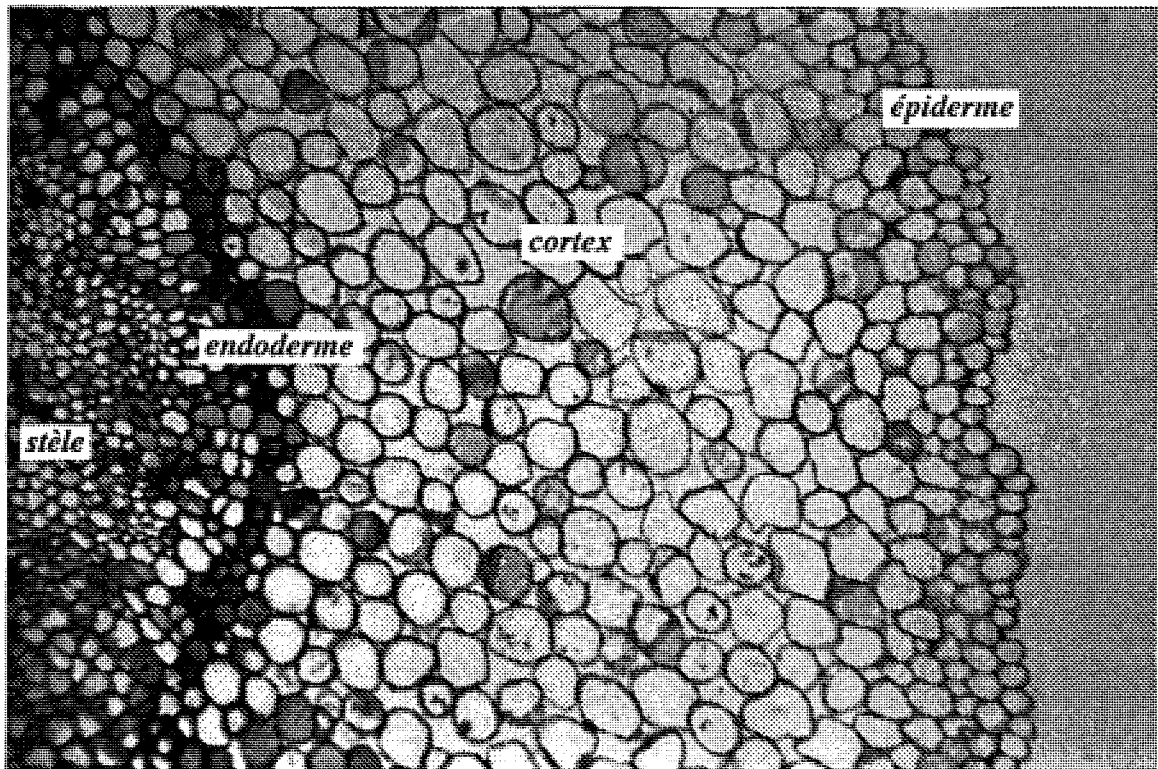


Figure 31b : Coupe transversale à environ 1 cm de l'apex de la racine principale de plantule de chêne pédonculé cultivée en hydroponie.

100 μ m

1.1 ANATOMIE DE L'APEX DE LA RACINE PRINCIPALE

1.1.1 Coupe longitudinale

Chaque racine s'allonge au niveau de son apex grâce à l'activité combinée de la mitose et du grandissement cellulaire. La figure 30 présente une coupe longitudinale effectuée le long de l'apex de la racine principale de pin maritime. Cette coupe correspond aux trois premiers millimètres de l'apex racinaire et ne présente donc que la partie apicale de la zone de croissance. Le méristème apical, situé juste sous la coiffe, produit des cellules qui vont s'agrandir au cours de leur maturation dans la région contiguë au méristème, la zone d'élongation (fig. 30).

L'augmentation du volume de chaque cellule s'est faite essentiellement grâce à un grandissement dans la direction axiale. La longueur des cellules est passée de 10-20 μm dans le méristème à une longueur finale d'environ 320 μm (zone mature non visible sur la coupe de la figure 30). Un grandissement de la cellule s'est produit également dans la direction radiale; cependant l'augmentation du diamètre était faible ($\times 2-2,5$). Considérons que la cellule fille issue du méristème était un cube de 15 μm de côté et la cellule mature un cylindre de 320 μm de long pour un diamètre de 40 μm . On constate qu'au cours de la maturation, son volume a été multiplié par 120. Sur la coupe de la figure 30, on a observé une assez grande hétérogénéité au sein d'un même tissu. La vitesse d'élongation variait d'une file de cellules à l'autre. Pour établir le profil de longueur de cellules le long de l'apex racinaire, nous n'avons utilisé que les files de cellules du milieu du cortex.

Dans le modèle de Lockhart, le grandissement cellulaire est décrit comme une augmentation de *volume*. Cette section longitudinale a mis en évidence combien la variation de dimension dans la direction radiale était inférieure à celle dans la direction axiale. Ceci justifie l'utilisation du modèle simplifié de Lockhart où l'augmentation de *volume* a été remplacée par l'augmentation de la *longueur* cellulaire.

1.1.2 Coupe transversale

La coupe transversale présentée figure 31a a été effectuée à 7 mm de l'apex, c'est-à-dire à la sortie de la zone de croissance où les cellules ont presque atteint leur taille définitive. A la périphérie de la racine, nous avons observé 2 couches de cellules dont le diamètre était relativement faible, de 10 à 20 μm , comparé à celui des cellules plus internes. Elles pouvaient correspondre soit à 2 couches de cellules épidermiques, soit à une couche de cellules épidermiques (la plus interne) plus ou moins recouverte par la coiffe qui était très enveloppante (fig. 30). Sur la face interne de ces 2 couches périphériques se trouvaient environ 5 couches de cellules corticales dont le diamètre était beaucoup plus large, de 30 à 50 μm . Ni péricycle ni endoderme n'étaient reconnaissables sur cette coupe. La différenciation de ces éléments se produisait plus en aval. La transition entre le cortex et la stèle était floue. Au sein de la stèle, des éléments conducteurs se mettaient en place.

Nous avons comparé l'anatomie du pin maritime à celle du chêne pédonculé à partir des coupes transversales dans l'apex de la racine principale (fig. 31a et 31b). Comme pour le pin maritime, la coupe de chêne a été effectuée sur des racines de plantules cultivées en hydroponie. Chez le chêne, le diamètre de la racine était plus élevé et les types cellulaires mieux différenciés. Comme pour le pin, le diamètre cellulaire des 2 couches périphériques était nettement inférieur à celui des cellules plus internes. Par contre, la structure

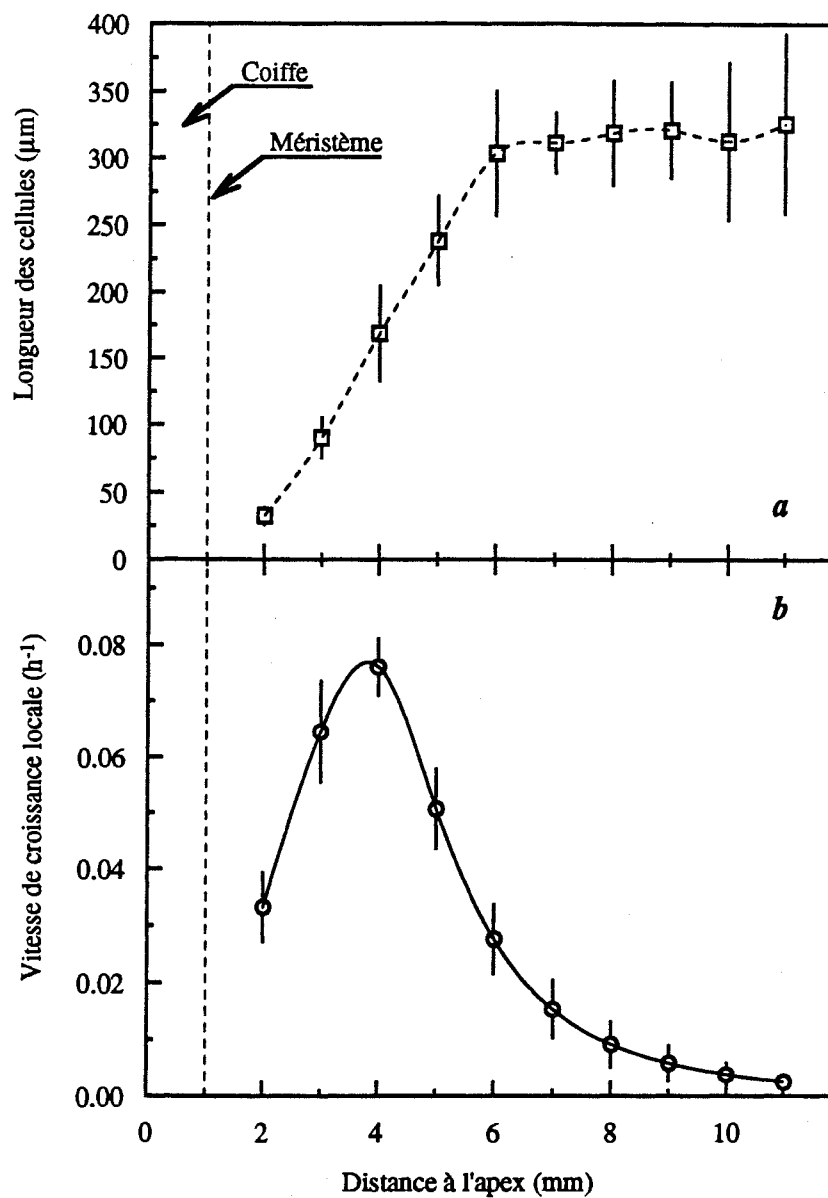


Figure 32 : *a)* Longueur des cellules corticales (moyenne $\pm$ écart type, $n = 8$) et *b)* vitesse de croissance locale (moyenne $\pm$ erreur standard, $n = 8$) en fonction de la distance à l'apex de la racine principale de plantules de pin maritime élevées en conditions optimales. Le méristème apical se trouve à environ 1 mm de l'apex, juste sous la coiffe racinaire.

du tissu cortical était très différente chez les 2 espèces. Chez le chêne, le tissu était très lâche, très aéré, avec de nombreux espaces intercellulaires. Le tissu cortical du pin présentait une très forte cohésion, sans espace intercellulaire visible. Dans la racine de chêne, un endoderme, dont les cellules formaient une ceinture très cohésive, séparait la stèle du cortex.

Le pin maritime a montré une structure racinaire classique avec des types cellulaires encore peu différenciés. La faible cohésion entre les cellules du cortex dans la racine de chêne est peut-être responsable des difficultés rencontrées pour la mesure de la pression de turgescence sur cette espèce.

1.2 ETUDE DE LA ZONE DE CROISSANCE

1.2.1 Longueur des cellules et vitesse de croissance locale

Le profil des longueurs de cellules corticales en fonction de la distance au méristème (fig. 32a), a été établi à partir de 8 coupes longitudinales d'apex de racine principale prélevés sur des plantules âgées de 2 semaines. La longueur des cellules a augmenté progressivement avec l'éloignement à l'apex puis s'est stabilisée assez rapidement à 7 mm de l'apex, où les cellules avaient atteint leur taille définitive. Ce profil, établi à partir de données de l'expérience sur le stress osmotique, a été déterminé deux autres fois, toujours sur des plantules élevées en conditions optimales. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les trois répétitions.

La vitesse de croissance locale (VCL) a été calculée à partir du profil de longueur de cellules et de la vitesse de croissance de chaque racine (fig. 32b). Le mode de calcul a fait intervenir un ajustement d'une courbe théorique (cf. Matériel et méthodes, fig. 14). Cette procédure, en lissant les données, a engendré deux artefacts. D'une part, l'ajustement d'une sigmoïde a rendu symétrique la courbe de VCL qui ne l'était pas forcément. D'autre part, cet ajustement a anormalement adouci la pente à la "sortie" de la zone de croissance. Il a été nécessaire de tenir compte de ces remarques pour analyser ces données.

La vitesse de croissance locale décrit la *vitesse relative d'élongation des cellules en un point donné* de la zone d'élongation. Les variations observées le long de la zone d'élongation reflètent celles se produisant au cours de la maturation cellulaire. En effet, l'éloignement spatial du méristème correspond également à un déplacement temporel, donc au développement de chaque cellule. Une cellule, issue d'une division au sein du méristème, entame sa phase d'élongation. Sa vitesse de croissance est relativement faible puis augmente et atteint un maximum. La cellule est alors au "milieu" de la zone de croissance, déplacée sous l'effet de l'allongement des cellules issues du méristème apical après elle. Après ce maximum, la vitesse de croissance de cette cellule diminue pour s'annuler lorsque la taille mature est atteinte. La diminution progressive présentée figure 32b, est un artefact de calcul. L'observation de la figure 32a montre que l'arrêt de l'élongation a été assez net. Au-delà de 8 mm, la vitesse relative d'élongation était nulle.

Au cours de sa maturation, une cellule présente une vitesse relative d'élongation très variable. Le profil de croissance locale met en évidence une phase "d'accélération" puis une phase de "décélération".

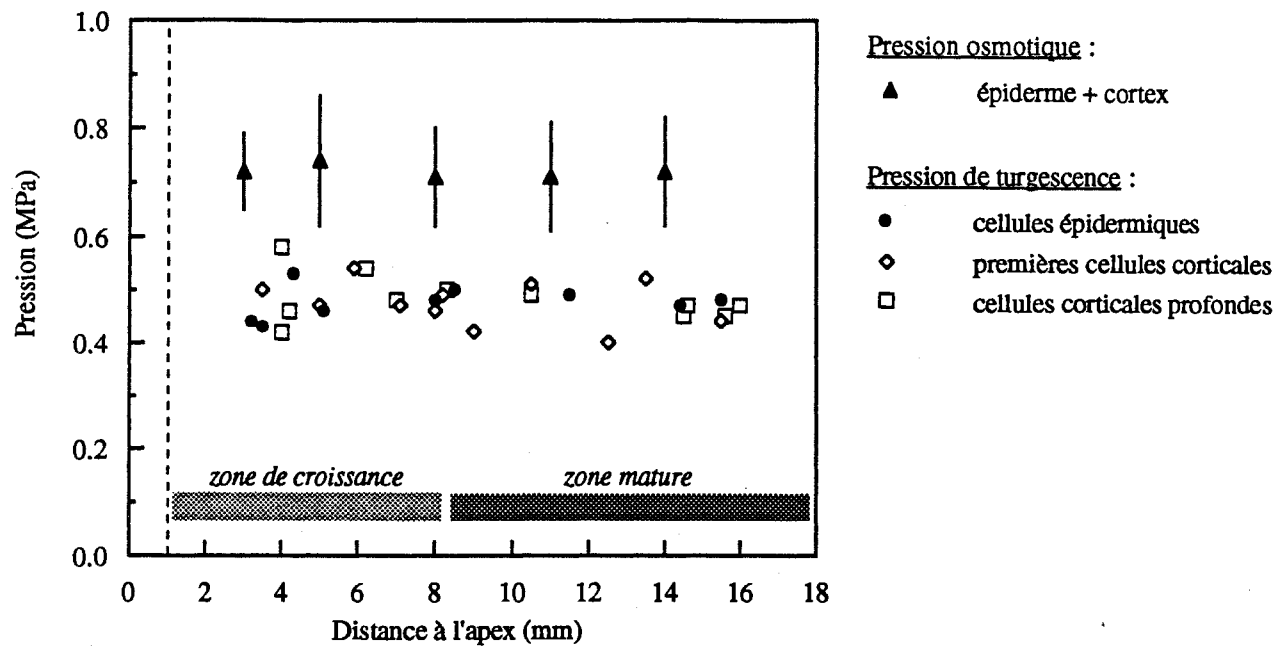


Figure 33 : Pression osmotique et pression de turgescence le long des 2 premiers centimètres de la **racine principale** de plantules de pin maritime âgées d'une semaine. La pression osmotique a été mesurée sur un pool d'une cellule épidermique + 1 ou 2 cellules corticales. Moyenne $\pm$ écart type (nbre de racines = 4; nbre de mesures par point = 8). Chaque point de pression de turgescence est une mesure dans une cellule individuelle (nbre de racines = 13).

1.2.2 Pression de turgescence et pression osmotique

La pression de turgescence (P), mesurée sur des cellules individuelles à l'aide du micromanomètre intracellulaire, était uniforme le long des 18 premiers mm de l'apex du pivot (fig. 33). Que la vitesse de croissance de la cellule ait été rapide, lente, ou nulle (cellule mature), la pression de turgescence était stable à environ 0,48 MPa. De plus, la pression de turgescence n'était pas dépendante du type de cellule, qu'elle soit épidermique, corticale de surface ou corticale plus profonde (fig. 33). Aucun gradient de pression de turgescence n'est apparu radialement, de l'épiderme vers la stèle.

La pression osmotique (π), mesurée sur des cellules individuelles ou des pools de 2 ou 3 cellules adjacentes sur le rayon d'une racine, était également uniforme le long de l'apex (fig. 33). La pression osmotique était stable à environ 0,73 MPa. La pression osmotique cellulaire, comme la pression de turgescence, n'étaient pas corrélées à la vitesse de croissance des cellules.

La pression de turgescence et la pression osmotique ont été mesurées sur les mêmes plants mais sur des cellules différentes. Le potentiel hydrique cellulaire a été estimé à partir des profils de π et P. Le potentiel hydrique était d'environ -0,25 MPa tout au long des deux premiers cm de l'apex. Le potentiel hydrique de la solution nutritive baignant les racines était de -0,03 MPa. Un gradient de potentiel hydrique existait donc entre le milieu extérieur et le milieu intracellulaire.

1.2.3 Propriétés rhéologiques

Bien qu'issus d'une seule série de données, ces résultats ont été vérifiés chaque fois que la pression de turgescence et la vitesse de croissance locale ont été mesurées.

Les propriétés mécaniques des parois ont été déduites de l'analyse comparative des variations de la pression de turgescence et de la vitesse relative d'élongation (fig. 34). Dans la partie apicale de la zone de croissance, la vitesse relative d'élongation a augmenté alors que la pression de turgescence est restée constante: l'extensibilité des parois a augmenté. Dans la partie distale de la zone d'élongation, la vitesse relative d'élongation a diminué puis s'est annulée et la pression de turgescence est toujours restée inchangée: l'extensibilité des parois a diminué.

Les variations de la vitesse relative d'élongation des cellules au cours de leur maturation ont été contrôlées par des changements des propriétés mécaniques de leur paroi et non par des variations de la pression de turgescence.

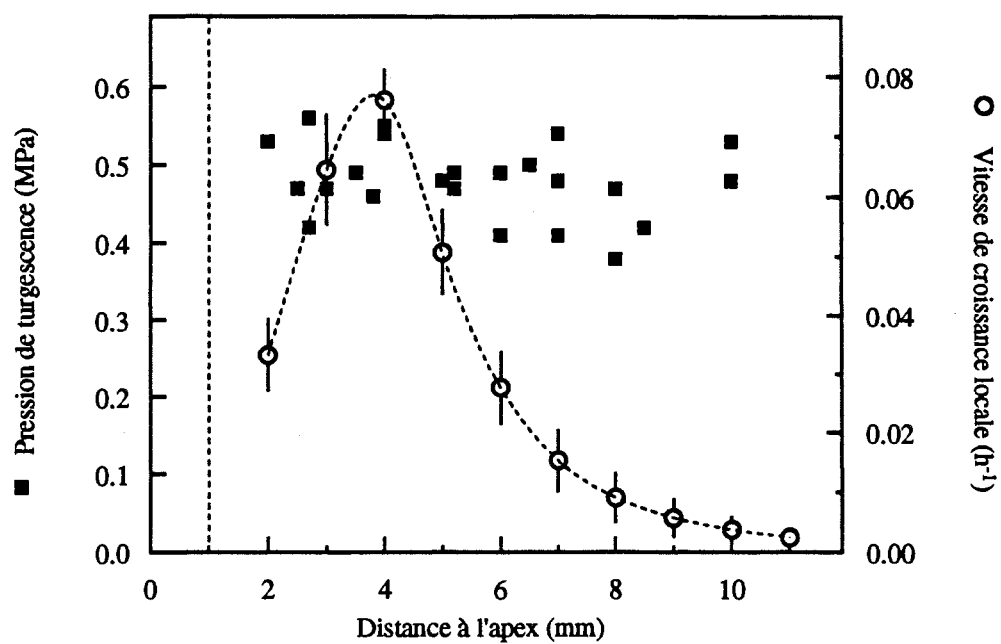


Figure 34 : Pression de turgescence et vitesse de croissance locale en fonction de la distance à l'apex de la **racine principale** de plantules de pin maritime élevées en conditions hydriques optimales (moyenne $\pm$ erreur standard, $n = 8$ racines). Chaque point de turgescence est une mesure dans une cellule individuelle ($n = 13$ racines).

1.3 DISCUSSION

1.3.1 Gradient radial: turgescence et propriétés rhéologiques

L'absence de gradient radial de pression de turgescence dans la racine de pin maritime est sans doute liée à l'absence de transpiration et de flux d'eau conséquent dans ces plantules. Pritchard *et al.* (1989), ont obtenu des résultats analogues sur la racine de blé. De même, Spollen et Sharp (1991) et Steudle *et al.* (1987) n'ont pas décelé de gradient de turgescence sur la racine de maïs. Sur les racines de *Mesembryanthemum crystallinum* et sur *Aster tripolium*, Rygol et Zimmermann (1990) et Zimmermann *et al.* (1992) ont mis en évidence une augmentation marquée de la pression de turgescence de l'épiderme vers les couches internes. Les plantules utilisées par ces derniers auteurs étaient à un stade de développement plus avancé et transpiraient probablement. En ce qui concerne les travaux de Steudle *et al.* (1987), l'excision de la racine peut également expliquer l'absence de gradient radial de turgescence.

L'analyse anatomique de l'apex racinaire a mis en évidence l'hétérogénéité structurale des types cellulaires. Ces différences sont présentes dans toutes les espèces (Pritchard, 1994) et reflètent des différences fonctionnelles. La relation entre le type cellulaire et ses potentialités d'élongation a été analysée par Pritchard (1994) afin de déterminer si un type cellulaire contrôlait la vitesse de croissance de toute la racine. L'absence de gradient radial de pression de turgescence implique que, si un type cellulaire particulier contrôle la croissance racinaire, ce sont ses propriétés rhéologiques qui diffèrent. Pritchard (1994) exclut un rôle de l'épiderme dans le contrôle de l'élongation racinaire. En effet, les deux demi-cylindres d'un apex racinaire fendu longitudinalement le long de la zone de croissance, se courbent vers "l'intérieur". Les cellules rhizodermiques auraient une meilleure capacité d'élongation que les cellules plus internes. D'autre part, les tissus de la stèle ont une extensibilité (mesurée par l'extensiomètre d'Instron) supérieure aux tissus du cortex (Pritchard et Tomos, 1993). Pritchard (1994) conclut que l'élongation racinaire dépend de la vitesse d'élongation des cellules corticales internes.

1.3.2 Gradient longitudinal: vitesse relative d'élongation, turgescence et propriétés rhéologiques

Le profil de la vitesse de croissance locale le long de l'apex de la racine principale de pin maritime présente une forme classique, en cloche, similaire à celui de la racine de blé (Pritchard *et al.*, 1991) et de la racine de maïs (Sharp *et al.*, 1988; Spollen et Sharp, 1991; Pritchard *et al.*, 1993). La longueur de la zone d'élongation varie cependant avec l'espèce: 10 mm pour le maïs, 6 mm pour le blé et 8 mm pour le pin maritime.

Aucune dissymétrie n'était évidente sur le profil de longueur de cellules. Cependant, la méthode de calcul est responsable de la parfaite symétrie de la courbe de vitesse de croissance locale présentée dans le cas du pin maritime. Dans une autre expérience, ce profil a été déterminé manuellement (présenté dans le chapitre 3, § 3.2.1, fig. 43b): la courbe de vitesse de croissance locale n'a pas présenté de dissymétrie. Dans le cas présent, le lissage des données n'a donc pas induit d'erreur majeure.

Comme il a été trouvé pour les racines de blé et de maïs (Pritchard *et al.*, 1991; Spollen et Sharp, 1991), la pression de turgescence cellulaire était uniforme le long de la zone d'élongation de la racine du pin

maritime. Comme dans ces précédents travaux, l'extensibilité des parois a pu être déduite de la corrélation entre la vitesse relative d'élongation et la pression de turgescence. Les conclusions quant au déterminisme de la vitesse relative d'élongation le long de l'apex racinaire sont identiques à celles tirées des espèces annuelles comme le blé ou le maïs. La vitesse relative d'élongation des cellules racinaires au cours de leur maturation est contrôlée par l'extensibilité des parois. Ce type d'étude, à l'échelle cellulaire, a été réalisé ici pour la première fois sur une espèce ligneuse.

Les variations de l'extensibilité des parois le long de la zone d'élongation supposent que σ et/ou Y varient au cours du développement cellulaire. Cependant nos données ne permettaient pas de discriminer le rôle des deux paramètres. Selon Pritchard *et al.* (1990), dans des plants de maïs non stressés, une diminution de Y serait responsable de la phase accélératrice de vitesse relative d'élongation et une augmentation de Y responsable de la phase décélératrice.

1.3.3 Relations hydriques cellulaires

Le long des deux premiers centimètres de l'apex racinaire, les pressions de turgescence et osmotique étaient constantes à environ 0,48 et 0,73 MPa respectivement. Le potentiel hydrique des cellules racinaires de plantules cultivées en conditions hydriques non limitantes était de -0,25 MPa, alors que le potentiel hydrique de la solution baignant les racines était de -0,03 MPa. Une différence de potentiel hydrique entre milieu extérieur et milieu intracellulaire du même ordre a été mise en évidence dans l'apex racinaire de plantules de maïs (Pritchard et Tomos, 1993). Plusieurs hypothèses sont susceptibles d'expliquer une telle différence de potentiel hydrique entre racine et milieu extérieur.

- Une transpiration élevée pourrait réduire le potentiel hydrique du xylème et donc affecter celui des cellules racinaires. Ce n'est probablement pas le cas pour les plantules de pin maritime que nous avons utilisées car les parties aériennes étaient de faible taille et placées dans des conditions de transpiration très limitée. De plus, aucun gradient de turgescence radial n'a été détecté.
- Ce gradient de potentiel hydrique pourrait également être interprété comme étant induit par la croissance (Wesgate et Boyer, 1984). Cependant, d'après la figure 33, la différence de potentiel hydrique dans les tissus matures, entre 10 à 18 mm de l'apex, est du même ordre que celle existant dans les tissus en croissance. Ce gradient de potentiel hydrique, d'environ -0,25 MPa, n'est donc certainement pas lié à la croissance. Au contraire, l'absence de différence de potentiel entre tissus matures et tissus en croissance est un argument en faveur de l'hypothèse d'une conductance hydraulique membranaire non limitante pour le grandissement cellulaire.
- Un coefficient de réflectivité σ significativement inférieur à 1 pourrait également expliquer le faible potentiel hydrique mesuré dans les cellules racinaires. Le gradient de potentiel hydrique entre deux milieux séparés par une membrane semi-perméable est déterminé par :

$$\Psi_o - \Psi_i = \sigma \Delta \pi_{i,o} - \Delta P_{i,o} \approx \sigma \Delta \pi_{i,o} - P$$

La différence de potentiel hydrique entre le milieu intracellulaire et le milieu extérieur était de : $[\sigma (0,73-0,03)-0,48]$. Si σ était égal à 0,68, l'équilibre des potentiels était bien réalisé. Cependant, Steudle (1993), sur des cellules épidermiques de feuilles de *Tradescantia*, et Zimmermann *et al.* (1992), sur des cellules corticales de racines d'*Aster tripolium*, mesurent des coefficients de réflectivité membranaire proches de 1. A l'échelle de l'organe, Steudle (1994) a montré que le coefficient de réflectivité racinaire est significativement inférieur à 1.

- La présence de solutés dans l'apoplasme est aussi susceptible d'expliquer le faible potentiel hydrique cellulaire. Cosgrove et Cleland (1983) indiquent que l'apoplasme d'une tige en croissance contient des solutés en quantité non négligeable, générant un potentiel osmotique de -0,1 à -0,3 MPa. Meinzer et Moore (1987) mettent en évidence un potentiel osmotique de l'apoplasme du même ordre, dans des feuilles de canne à sucre en élongation. Par contre, Nonami et Boyer (1987) estiment le potentiel osmotique à -0,03 MPa seulement. Pritchard et Tomos (1993) suggèrent qu'un phénomène de couche limite pourrait exister dans la paroi cellulaire. La pression osmotique dans la paroi immédiatement adjacente à la membrane plasmique serait plus élevée, expliquant ainsi le gradient de potentiel hydrique entre milieu intracellulaire et milieu extérieur.

Les deux premières hypothèses sont peu vraisemblables, les deux dernières sont tout à fait plausibles. Une meilleure connaissance des flux d'eau dans la racine est nécessaire pour expliquer l'existence de ce type de gradient de potentiel hydrique.

1.4 CONCLUSION

Le contrôle biophysique de la croissance racinaire du pin maritime est identique à celui mis en évidence chez les espèces annuelles. La pression de turgescence est constante que la vitesse relative d'élongation cellulaire soit forte, faible ou nulle. On peut en déduire que les propriétés mécaniques des parois varient au cours de la maturation et contrôlent la vitesse relative d'élongation des cellules.

Le potentiel hydrique dans les cellules matures est identique à celui des cellules en croissance, indiquant que le gradient de potentiel hydrique induit par la croissance est faible, inférieur à la précision de mesure des pressions de turgescence et osmotique. Le gradient de potentiel hydrique entre milieu intracellulaire et milieu extérieur pourrait s'expliquer par un coefficient de réflectivité inférieur à 1 ou par la présence de solutés dans l'apoplasme.

Chapitre 2 : Effets de différents niveaux de stress osmotique sur la croissance racinaire

Trois niveaux de stress osmotique ont été appliqués à des plantules de pin maritime cultivées en hydroponie. Le 8^{ème} jour après la germination, le potentiel hydrique de la solution nutritive a été ajusté à -0,15; -0,45 et -0,66 MPa par addition de PEG. Les résultats ont été obtenus à partir de 4 expériences consécutives complémentaires.

Cette étude avait pour objet de :

- définir les effets de différents niveaux de stress hydrique sur la croissance racinaire du pin maritime,
- déterminer le rôle respectif de la pression de turgescence et des propriétés rhéologiques dans la réponse de la croissance racinaire à un niveau de stress hydrique donné,
- étudier les relations hydriques cellulaires en conditions hydriques limitantes.

2.1 CROISSANCE RACINAIRE

Dans les quatre expériences menées séparément, la racine principale des plantules de pin maritime *Témoin* s'est allongée à une vitesse d'environ 0,3-0,35 mm h⁻¹ pendant les trois semaines d'expérimentation (fig. 35 et 36a, 36b, 36c). Nous avons observé une forte variabilité de la croissance au cours des expériences. Cependant, la valeur moyenne, autour de laquelle la vitesse de croissance fluctuait, était identique dans toutes les répétitions.

Dans les deux répétitions réalisées, l'application d'un stress osmotique modéré, -0,15 MPa, a induit une augmentation significative de la vitesse d'élongation à 0,4-0,45 mm h⁻¹ (fig. 35 et 36a). Par exemple, le jour 12, les racines témoins poussaient à $0,35 \pm 0,06$ mm h⁻¹ alors que les racines des plants stressés poussaient à $0,41 \pm 0,06$ mm h⁻¹ ($P \leq 0,05$) (fig. 36a). Dans les deux répétitions, vers le 18^{ème} jour, les plants soumis au stress de -0,15 MPa ont retrouvé une croissance comparable à celle des témoins sans que les conditions de croissance aient été changées.

Les deux expériences où nous avons appliqué un stress osmotique de -0,45 MPa, ont conduit à deux résultats différents. La première a montré que la croissance racinaire de plantules soumises à -0,45 MPa, a été fortement réduite le jour suivant l'application, a récupéré un peu puis s'est maintenue à 0,2-0,25 mm h⁻¹ jusqu'à la fin de l'expérience (fig. 35). Lors de la seconde expérience, après la forte inhibition du premier jour, la croissance est revenue à sa vitesse initiale, 0,3-0,35 mm h⁻¹ (fig. 36b).

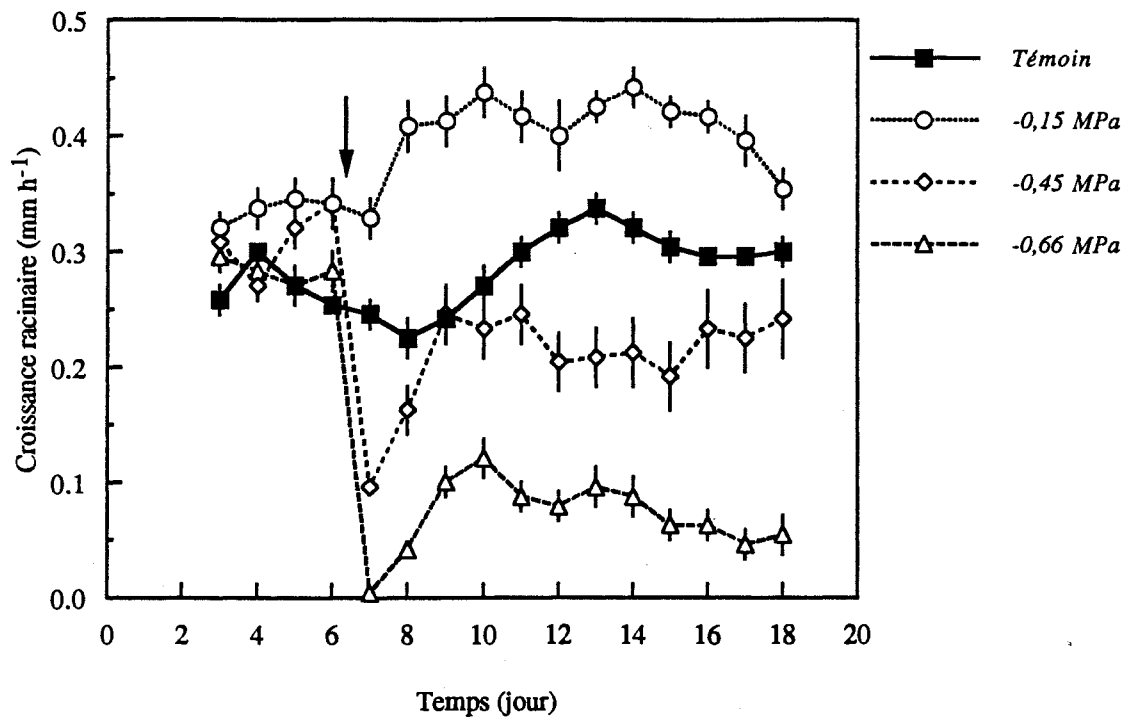


Figure 35 : Croissance de la racine principale de plantules de pin maritime soumises à trois niveaux de stress osmotique au cours des 18 jours suivant la germination (moyenne $\pm$ erreur standard, $n \geq 16$). La flèche correspond au commencement de l'application du stress.

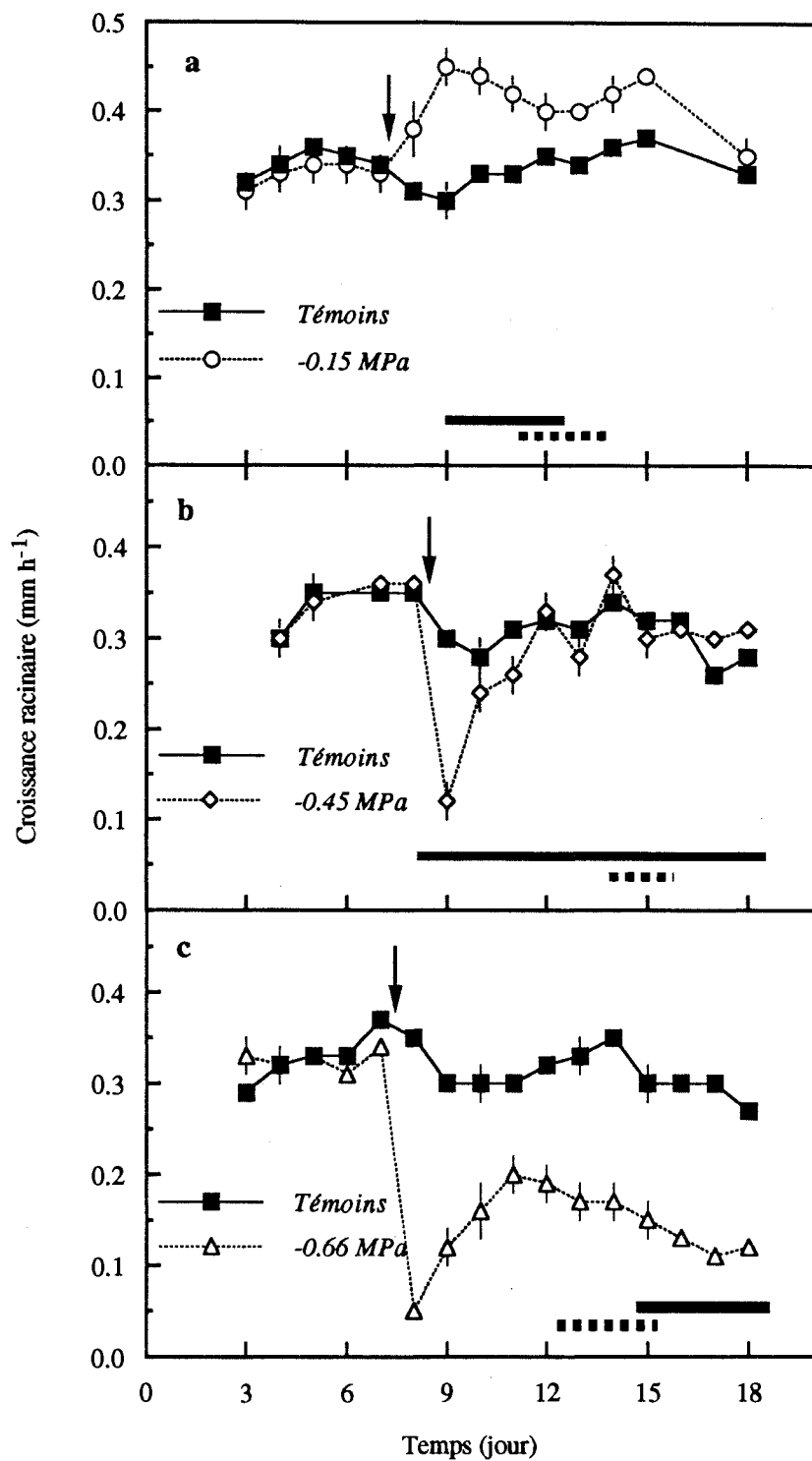


Figure 36 : Croissance de la **racine principale** de plantules de pin maritime soumises à trois niveaux de stress osmotique au cours des 18 jours suivant la germination (moyenne $\pm$ erreur standard, $16 \leq n \leq 20$). La flèche correspond au commencement de l'application du stress. La barre pleine et la barre en pointillé indiquent les périodes durant lesquelles les mesures de pression de turgescence ont été réalisées sur les plants témoins et sur les plants stressés, respectivement.

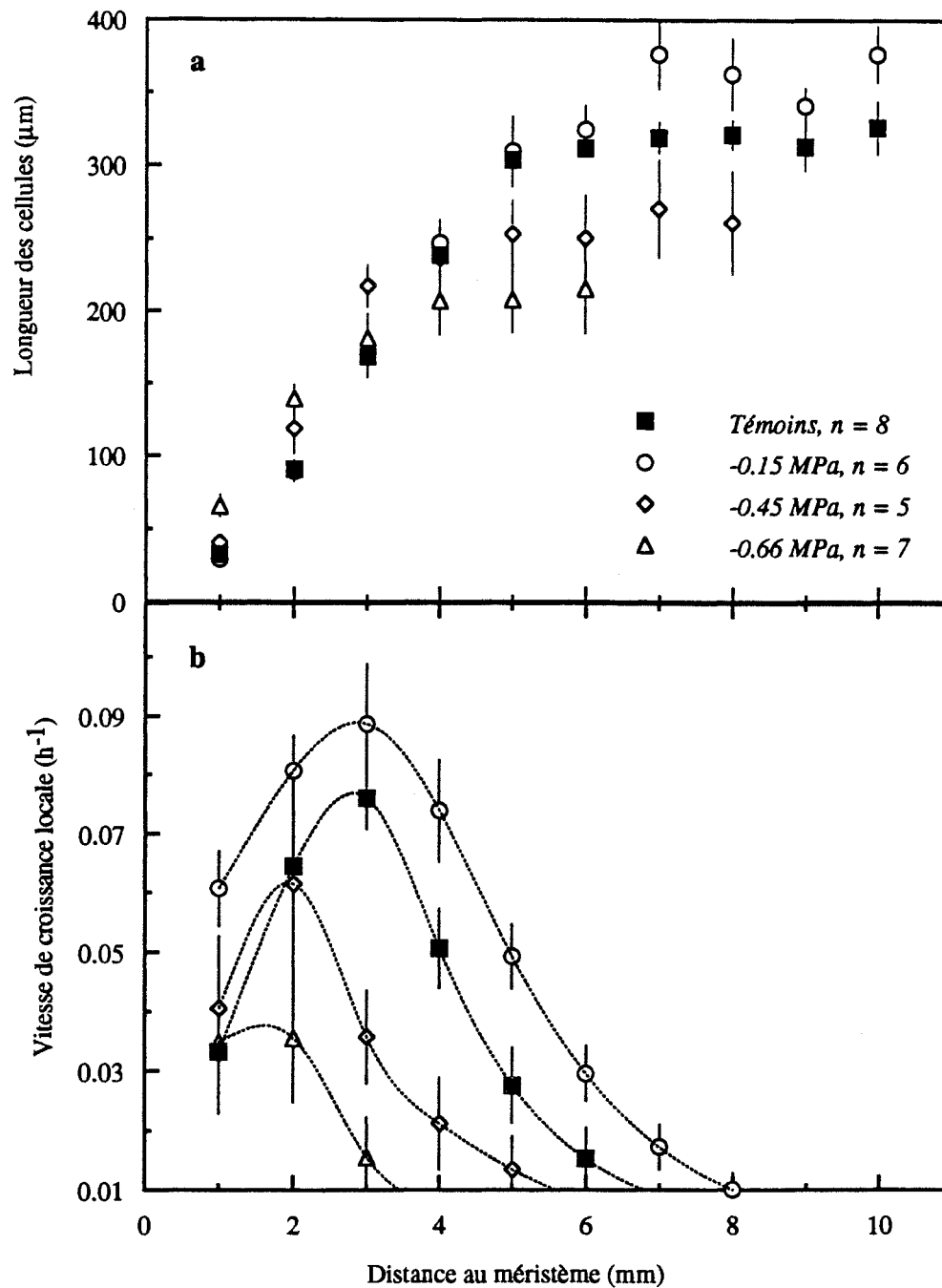


Figure 37 : *a*) Longeur des cellules et *b*) Vitesse de croissance locale en fonction de la distance au méristème. Ces profils ont été déterminés sur la racine principale de plantules de pin maritime. Moyenne $\pm$ erreur standard.

Lors de l'application du stress osmotique le plus fort, $-0,66 \text{ MPa}$, la croissance racinaire a été très fortement réduite. Après une phase de récupération de 3 jours, la croissance a de nouveau diminué progressivement jusqu'à la fin de l'expérience (fig. 35 et 36c).

2.2 LONGUEURS DES CELLULES

Dans le traitement *Témoin*, le profil de longueur de cellules le long de l'apex a été déterminé sur 8 plantules. Ce profil a montré que l'élongation cesse à environ 7 mm du méristème (i.e. 8 mm de l'apex) et que les cellules matures avaient une longueur moyenne de $310 \mu\text{m}$ (fig. 37a).

Le profil des longueurs de cellules en fonction de la distance à l'apex, établi sur 6 plantules ayant subi le stress osmotique de $-0,15 \text{ MPa}$, était similaire à celui des témoins dans les 5 premiers millimètres de la zone de croissance. Plus en aval, la taille des cellules a continué d'augmenter fortement jusqu'au 7^{ème} mm pour atteindre une longueur finale de $360 \mu\text{m}$.

Le profil de longueur de cellules établi sur 5 plantules soumises au stress de $-0,45 \text{ MPa}$, a montré deux modifications majeures par rapport à celui des témoins. La longueur finale des cellules racinaires a été réduite à $250 \mu\text{m}$. De plus, dans les premiers millimètres de la racine, la taille des cellules était supérieure à celle des témoins. Par exemple, à 3 mm du méristème, la longueur des cellules des plants témoins était de $170 \mu\text{m}$ alors que celle des plants stressés était de $210 \mu\text{m}$ environ. Spatialement, la vacuolisation et l'allongement des cellules se sont produits plus tôt.

L'application du stress de $-0,66 \text{ MPa}$ a induit les mêmes effets sur la longueur des cellules que le précédent avec une intensité plus grande. La longueur des cellules matures a été réduite à $210 \mu\text{m}$. Le phénomène de "vacuolisation précoce" (par rapport à une échelle dans l'espace) décrit ci-dessus pour le stress de $-0,45 \text{ MPa}$, était également observable à ce niveau de déficit hydrique.

Dans les différents traitements, la longueur des cellules en fonction de la distance à l'apex représente, en quelque sorte, la longueur des cellules au cours de leur maturation, c'est-à-dire au cours du temps. Mais il faut souligner que la vitesse de croissance de la racine était différente dans chacun des traitements. La position relative des profils de longueur de cellules en fonction du temps serait donc différente.

2.3 VITESSE DE CROISSANCE LOCALE

Les profils de vitesse de croissance locale ont été déterminés à partir des longueurs de cellules et de la vitesse de croissance globale de la racine. Comme il a déjà été dit au § 1.2.1, il faut être conscient que la méthode utilisée a artificiellement lissé, symétrisé les courbes et allongé la zone d'élongation. Pour réduire ce dernier effet, nous avons considéré qu'une vitesse de croissance locale inférieure à $0,01 \text{ h}^{-1}$ était négligeable.

Pour le traitement *Témoin*, la vitesse de croissance locale le long de la racine principale a augmenté jusqu'à 3 mm du méristème où elle présentait un maximum de $0,075 \text{ h}^{-1}$. De 3 à 7 mm du méristème, la vitesse de croissance locale a diminué et s'est annulée à 7 mm du méristème (fig. 37b).

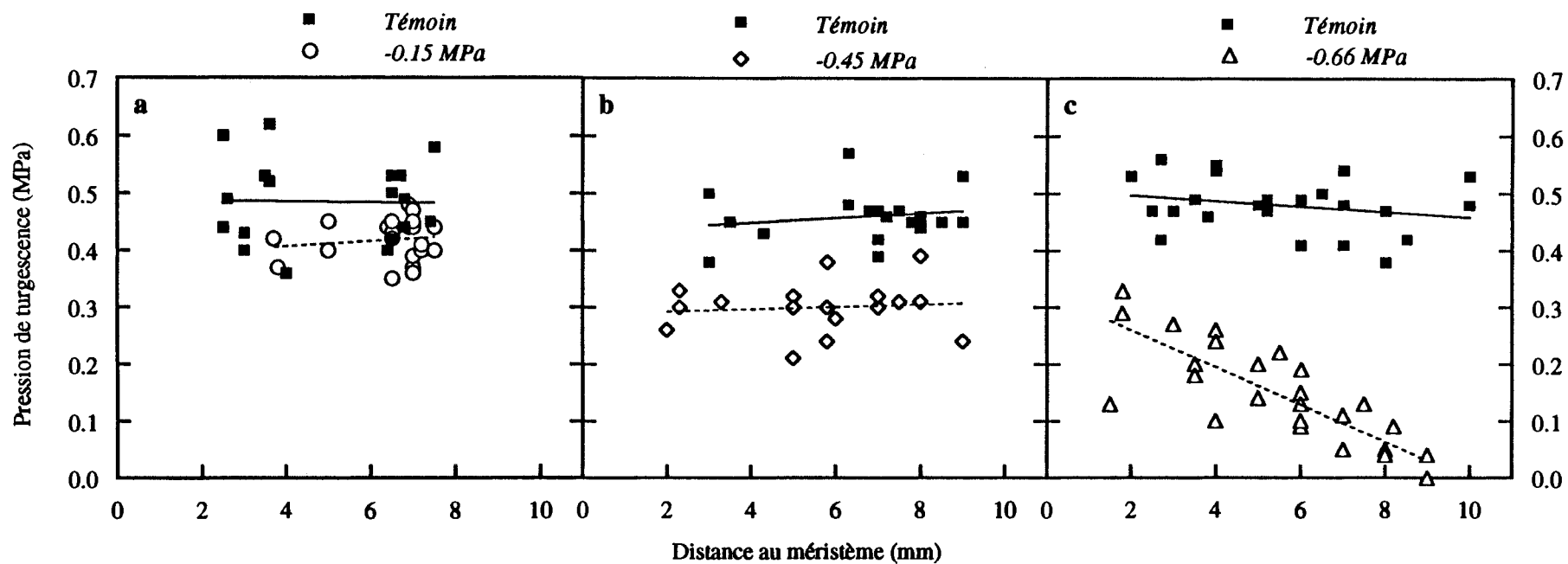


Figure 38 : Effets de trois niveaux de stress osmotique sur la pression de turgescence cellulaire en fonction de la distance au méristème de la racine principale de pin maritime. Chaque point est une mesure sur une cellule individuelle. Tous les coefficients de regression sont non significatifs excepté pour le traitement -0,66 MPa où $r^2 = 0,69$ ($P < 0,001$).

Le stress osmotique modéré a augmenté la vitesse de croissance locale sur toute la zone d'élongation, portant le maximum à $0,09 \text{ h}^{-1}$ mais n'a pas déplacé la position de ce maximum. La zone d'élongation a été allongée d'un millimètre par rapport à celle des témoins.

Le stress de $-0,45 \text{ MPa}$ a réduit la longueur de la zone d'élongation aux 5 premiers millimètres suivant le méristème. Ce stress a abaissé le maximum de la vitesse de croissance locale à $0,06 \text{ h}^{-1}$ et a rapproché la position de celui-ci à 2 mm du méristème. Cependant, la vitesse de croissance locale est restée identique à celle des plantules non stressées dans la partie apicale de la zone d'élongation.

On notera que ce profil est cohérent avec la croissance racinaire présentée figure 35 (réduite par le stress osmotique), ce qui est normal car ces deux résultats sont issus du même lot de plants. *Par contre, le profil de la vitesse de croissance locale ne doit pas être associé à la vitesse de croissance racinaire présentée figure 36b* (revenue à sa valeur initiale après une phase de transition). Ces deux résultats sont issus d'expériences où les plants ont présenté des réponses différentes.

L'application du stress osmotique $-0,66 \text{ MPa}$ a induit les mêmes modifications que le stress $-0,45 \text{ MPa}$ mais avec une intensité plus forte. La zone d'élongation a été réduite aux 3 premiers mm prolongeant le méristème. La vitesse de croissance locale n'a pas été affectée dans la partie très apicale de la zone d'élongation mais son maximum a été réduit à $0,035 \text{ h}^{-1}$.

2.4 PRESSION DE TURGESCEANCE CELLULAIRE LE LONG DE LA ZONE DE CROISSANCE

Les résultats présentés dans les figures 38a, b et c ont été obtenus dans les expériences qui ont donné les résultats de croissance présentés figures 37a, b et c. Les mesures ont été effectuées sur les plants stressés, lorsque les racines avaient retrouvé un régime de croissance permanent. Les périodes de mesure sont indiquées par une barre pleine (*Témoin*) ou pointillée (stressés) sur les figures 37a, b et c.

Dans les 3 expériences, la pression de turgescence des plantules du traitement *Témoin* était uniforme, à environ $0,5 \text{ MPa}$, le long des 10 premiers millimètres de l'apex de la racine principale (fig. 38a, 38b et 38c). D'une expérience à l'autre, l'âge des plants était légèrement différent, de 8 à 18 jours. La pression de turgescence était stable au cours du temps.

Le stress osmotique de $-0,15 \text{ MPa}$ a, légèrement mais significativement ($P < 0,01$), abaissé la pression de turgescence à environ $0,4 \text{ MPa}$. La stabilité de P le long de l'apex n'a cependant pas été affectée (fig. 38a). Peu de mesures ont été effectuées dans la partie apicale de la zone de croissance. Cependant, au vu de l'uniformité du profil dans les autres traitements où des mesures ont été faites plus en amont, il est fort probable que P soit également d'environ $0,4 \text{ MPa}$ dans les 3 premiers millimètres de la zone de croissance.

Le stress osmotique moyen, $-0,45 \text{ MPa}$, a abaissé la pression de turgescence plus fortement à $0,3 \text{ MPa}$ (fig. 38b). La pression de turgescence est restée uniforme dans toute la zone de croissance et les tissus matures voisins.

Lors de l'application du stress $-0,66 \text{ MPa}$, la pression de turgescence a été réduite encore plus fortement et un gradient est apparu, décroissant de l'apex vers les cellules matures. A 9-10 mm de l'apex, les cellules avaient perdu toute turgescence (fig. 38c). Ce type de réponse de la pression de turgescence au déficit hydrique met en évidence la précision spatiale que permet le micromanomètre intracellulaire. Ce type de gradient n'aurait pu être décelé si la pression hydrostatique avait été mesurée globalement sur une portion de tissu.

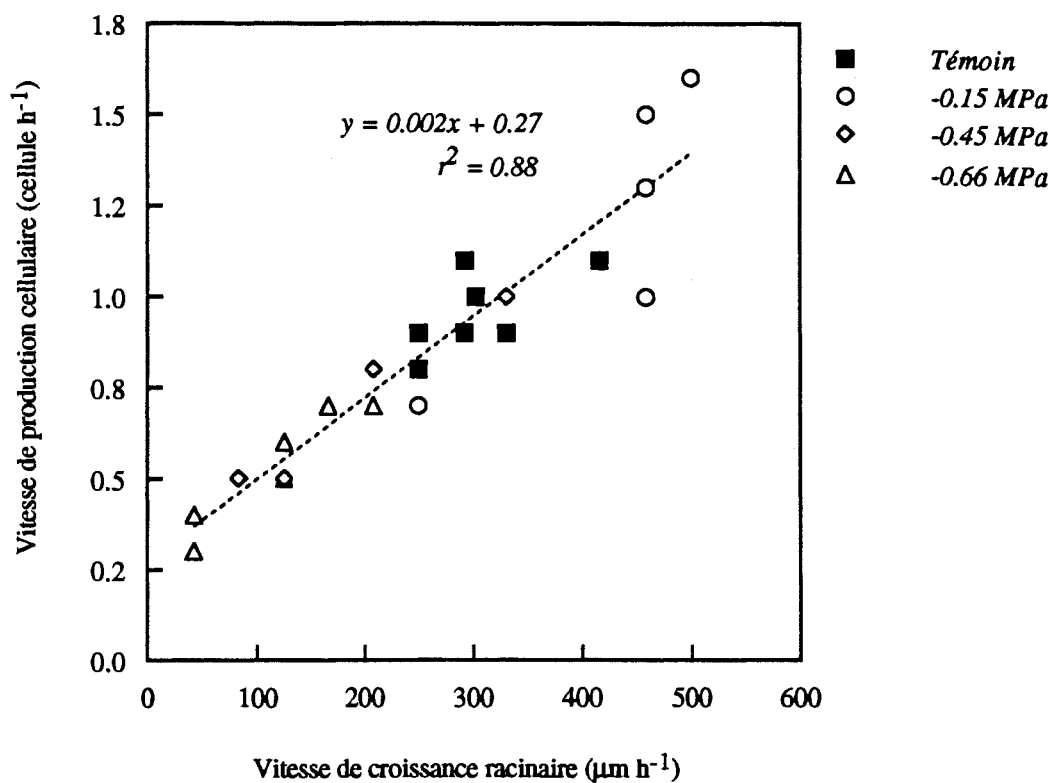


Figure 39 : Corrélation entre la vitesse de production cellulaire et la vitesse de croissance de la racine principale de pin maritime dans les 4 traitements, *Témoin*, -0,15; -0,45 et -0,66 MPa. Chaque point représente un plant.

2.5 PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES

Stress osmotique modéré, -0,15 MPa.

De façon surprenante, l'application d'un stress osmotique de $-0,15 \text{ MPa}$ a stimulé la croissance racinaire mais a réduit la pression de turgescence cellulaire. Dans toute la zone de croissance, la vitesse de croissance locale des plants stressés était supérieure à celle des témoins alors que la turgescence était plus faible. D'après l'équation simplifiée du modèle de Lockhart (équation 6), cette augmentation de la vitesse relative d'élongation n'est possible que si les parois deviennent plus extensibles. Cette augmentation de l'extensibilité des parois s'est produite dans toute la zone d'élongation.

Stress osmotique moyen, -0,45 MPa.

Contrairement à ce qui s'est passé pour le stress modéré, selon les répétitions, le stress de $-0,45 \text{ MPa}$ a soit inhibé, soit non affecté la croissance racinaire.

La pression de turgescence cellulaire, mesurée dans l'expérience dans laquelle la croissance est revenue à son taux initial, a été réduite d'environ $0,2 \text{ MPa}$. Par conséquent, on peut supposer que la pression de turgescence (non mesurée) a également été réduite dans l'expérience où la croissance a été inhibée durablement. Ainsi, dans ce dernier cas, la vitesse relative d'élongation a été maintenue identique à celle des plants témoins dans la partie apicale de la zone de croissance alors que la pression de turgescence était réduite. Dans cette région, il y a donc eu augmentation de l'extensibilité des parois. Dans la partie distale de la zone d'élongation, la pression de turgescence et la vitesse de croissance relative ont été toutes les deux diminuées. On ne peut donc pas conclure quant aux variations éventuelles des propriétés plastiques des parois dans cette région de la zone de croissance.

Une autre interprétation de ces données de croissance et de turgescence est possible. Dans le cas où la croissance racinaire est revenue au niveau du traitement *Témoin*, il est probable que le profil de la vitesse de croissance locale (non mesuré) ait été identique à celui des témoins. Dans ce cas, toute la zone d'élongation aurait été caractérisée par une vitesse relative d'élongation identique à celle des témoins et par une pression de turgescence réduite. L'extensibilité des parois aurait été augmentée dans toute la zone d'élongation.

Globalement, la contrainte hydrique de $-0,45 \text{ MPa}$ a réduit la turgescence dans tout l'apex racinaire et a augmenté l'extensibilité au moins dans la partie apicale, et peut-être dans la partie distale de la zone d'élongation.

Stress osmotique fort, -0,66 MPa.

Le stress osmotique le plus intense a fortement réduit la croissance racinaire. La vitesse de croissance locale a tout de même été maintenue dans la partie la plus apicale de la zone de croissance. Dans cette position, la turgescence était abaissée de $0,2 \text{ MPa}$ par rapport à celle des témoins. Là encore, l'extensibilité des parois a été augmentée. Dans la partie distale de la zone de croissance, la vitesse relative d'élongation et la pression de turgescence ont été fortement réduites toutes les deux. Dans ces conditions, on ne peut pas conclure quant à l'extensibilité des parois: elle a pu être réduite, maintenue ou augmentée.

Quelle que soit l'intensité du stress osmotique appliqué, les études du taux de croissance locale ont mis en évidence une augmentation de l'extensibilité des parois dans toute la zone d'élongation (stress $-0,15 \text{ MPa}$) ou au moins dans sa partie apicale (stress $-0,45 \text{ MPa}$ et $-0,66 \text{ MPa}$). Dans ces derniers cas, les effets du déficit hydrique sur les propriétés mécaniques des parois cellulaires dans la partie distale de la zone d'élongation n'ont pu être déterminés.

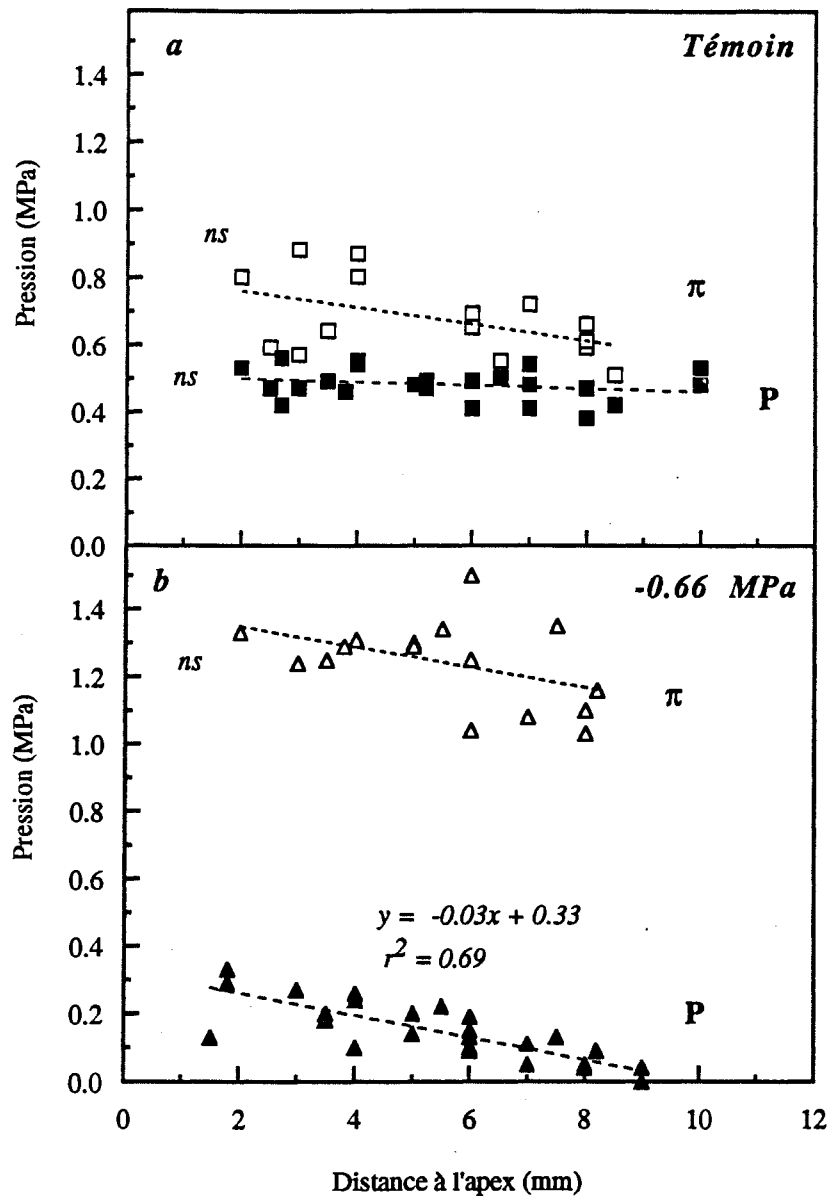


Figure 40 : Pressions osmotique et de turgescence le long de la zone de croissance de la racine principale de plantules de pin maritime *a*) élevées en conditions optimales et *b*) soumises à un stress osmotique de *-0,66 MPa*. Le méristème se trouve à environ 1 mm de l'apex. Chaque point est une mesure individuelle. Aucun des coefficients de régression n'est significativement différent de zéro excepté celui de la pression de turgescence du traitement *-0,66 MPa* ($P < 0,001$).

2.6 ACTIVITÉ MITOTIQUE

Les variations de la longueur des cellules matures ainsi que les modifications de la distribution de la vitesse de croissance locale ont montré que le grandissement cellulaire a été affecté par les stress appliqués. Nous n'avons pas étudié spécifiquement l'effet du stress osmotique sur l'activité mitotique cellulaire mais un calcul rapide permet d'en obtenir une idée. En divisant la vitesse de croissance racinaire (exprimée en $\mu\text{m h}^{-1}$) par la longueur des cellules matures (en μm par cellule), on obtient la vitesse de production cellulaire en cellule h^{-1} . Les données présentées ici ne donnent qu'un indice et il faudrait une étude anatomique poussée pour réellement analyser les effets du déficit hydrique sur l'activité mitotique.

Quelle que soit l'intensité du stress appliqué, la production cellulaire a été positivement corrélée à la vitesse de croissance de la racine (fig. 39). Le stress osmotique de $-0,15 \text{ MPa}$ a stimulé la production cellulaire, les stress de plus forte intensité l'ont inhibée. L'augmentation de la longueur de la racine étant due uniquement au grandissement cellulaire (la mitose ne fait que scinder une cellule en deux sans changer le volume total), on peut conclure que production et grandissement cellulaires étaient fortement et positivement corrélés.

2.7 EFFET D'UN STRESS OSMOTIQUE DE $-0,66 \text{ MPa}$ SUR LES RELATIONS HYDRIQUES CELLULAIRES DANS LA ZONE D'ÉLONGATION

Lors de l'expérience où un stress de $-0,66 \text{ MPa}$ a été appliqué, nous avons mesuré, en plus de la pression de turgescence, la pression osmotique le long de l'apex racinaire. Ces mesures ont permis de déterminer précisément les relations hydriques cellulaires dans la zone d'élongation et les tissus matures voisins.

En ce qui concerne les plantules non-stressées, les profils des pressions osmotique et de turgescence, comme décrits dans le § 1.2.2, étaient uniformes le long de l'apex racinaire (fig. 40a). La pression de turgescence était d'environ $0,5 \text{ MPa}$, la pression osmotique d'environ $0,75 \text{ MPa}$ et donc le potentiel hydrique de l'ordre de $-0,25 \text{ MPa}$ dans le premier centimètre de la racine principale de pin maritime. La régression de π en fonction de la distance à l'apex était à la limite d'être significative pour un seuil de 5% ($P = 0,065$).

Suite à l'application de la contrainte de $-0,66 \text{ MPa}$, la pression de turgescence a été fortement réduite (fig. 40b). Maintenue au maximum à $0,3 \text{ MPa}$ dans les cellules en croissance, elle était de plus en plus faible au fur et à mesure de l'éloignement de l'apex, s'annulant dans les cellules situées au-delà de 10 mm de l'apex. La régression de P en fonction de la distance à l'apex était significative ($P < 0,001$). La pression osmotique a présenté le long de l'apex racinaire un profil similaire à celui de la pression de turgescence, décroissante de $1,4 \text{ MPa}$ dans les cellules en croissance à $1,1 \text{ MPa}$ dans les cellules situées à 10 mm de l'apex. La régression de π en fonction de la distance à l'apex était, comme dans le traitement *Témoin*, à la limite d'être significative ($P = 0,08$). Le potentiel hydrique cellulaire était donc constant et d'environ $-1,1 \text{ MPa}$ dans toute la zone d'élongation et même au-delà, dans les premiers millimètres de la zone mature. La différence de potentiel entre la solution nutritive et les cellules racinaires était donc de l'ordre de $0,45 \text{ MPa}$, quelle que soit la distance à l'apex.

2.8 DISCUSSION

2.8.1 Variabilité de la croissance

Dans chaque traitement, la croissance racinaire était très variable d'une plantule à l'autre. Cette forte variabilité intraspécifique peut s'expliquer en partie par le fait qu'il existe une grande variabilité génétique dans les espèces arborescentes. De plus, les plantules sur lesquelles nous avons conduit nos expériences n'ont pas été sélectionnées pour leur homologie de développement. Cette forte variabilité a été partiellement compensée par le grand nombre de plantules par traitement (au moins 16) et par la répétabilité des résultats au cours des expériences.

Les cinétiques de croissance racinaire présentées figures 35 et 36, ont montré que, même pendant les phases de croissance en régime permanent, la croissance journalière d'un traitement fluctuait autour d'une valeur moyenne. Cette variabilité dans le temps pourrait être due à des variations des conditions de culture. En particulier, le pH n'a pas été ajusté au cours de ces expériences et il est possible que les fluctuations observées en soient directement la conséquence. D'autre part, nous avons remarqué (ultérieurement) qu'une fréquence trop importante de mesures de longueur des racines pouvait altérer la croissance. Cependant, l'importance de ces variabilités est relative car, même en leur présence, les effets des différents niveaux de stress osmotique se sont distingués clairement.

2.8.2 Stress osmotique et grandissement cellulaire

La réponse de la croissance racinaire au déficit hydrique a été dépendante de l'intensité du stress appliqué. Un abaissement de 0,15 MPa du potentiel hydrique de la solution nutritive a stimulé la croissance racinaire. Par contre, lorsque l'intensité du stress était égale ou supérieure à 0,45 MPa, l'élongation racinaire a été inhibée.

La stimulation de la croissance par une réduction de la disponibilité en eau est surprenante. Cependant, plusieurs études antérieures ont relaté des faits similaires. Au cours de la première phase d'application d'un déficit hydrique progressif, la croissance racinaire de plantules de maïs a dépassé celle des témoins (Sharp et Davies, 1979). Dans cette dernière étude, le déficit hydrique était appliqué par un dessèchement du sol. Une augmentation de la croissance racinaire par la contrainte hydrique a donc été observé même en l'absence d'utilisation de polyéthylène glycol, osmoticum qui aurait pu être suspecté d'induire un artefact. Chez le pin maritime, N'Guyen et Lamant (1989b) ont mis en évidence une augmentation de la croissance racinaire de plantules en réponse à un stress osmotique de -0,2 MPa. Enfin, Meyer et Boyer (1981) ont observé le même phénomène sur des plantules de soja. Dans aucune de ces études, on n'a élucidé les raisons biomécaniques de cette augmentation de la croissance. Dans notre étude, les déterminations de la pression de turgescence cellulaire et de la vitesse relative d'élongation ont permis d'étudier les variations de l'extensibilité des parois avec une résolution spatiale très précise. Une augmentation de l'extensibilité des parois cellulaires a été mise en évidence dans toute la zone d'élongation alors que la pression hydrostatique était significativement réduite. La stimulation de croissance a donc été attribué à une augmentation de l'extensibilité des parois. Cette conclusion pourrait être controversée étant donné que la pression de turgescence n'a été mesurée que dans les cinq couches externes de la racine et les cellules régulant la croissance de la racine pourraient être plus internes. Il est cependant peu probable qu'il existe un gradient de turgescence transversal dans la racine. En

effet, Pritchard *et al.* (1991) et Spollen et Sharp (1991) ont montré que la pression de turgescence, après l'ajustement osmotique, était stable le long du rayon de la racine.

La distribution de la vitesse de croissance locale observée par Sharp *et al.* (1988) dans l'apex de la racine de plantules de maïs soumises à un stress de $-0,2$ MPa, ne correspond pas à celle observée sur le pin. Il y a eu réduction de la zone d'élongation et abaissement du maximum de la vitesse de croissance locale comme pour les stress plus élevés. Un stress modéré ne conduit donc pas systématiquement à une stimulation de la croissance racinaire. Les différentes réponses observées sont certainement liées au type de contrainte, à la rapidité de son application, à l'espèce et/ou au stade de développement de la plante. En particulier, on peut se demander si les résultats obtenus sont applicables aux arbres adultes.

A la suite du stress de $-0,45$ MPa, selon l'expérience, la croissance racinaire est soit restée inhibée durablement, soit a retrouvé sa vitesse initiale. Ces réponses différentes sont difficilement explicables. Il est possible que l'intensité du stress appliqué ait été légèrement différente dans ces deux répétitions. Apparemment, ce niveau de contrainte correspondrait à un seuil de "tolérance". En deçà de ce seuil, les plantules de pin maritime ont été capables de maintenir, voire d'augmenter, leur croissance racinaire. Au-delà de ce seuil, la contrainte était trop forte et la croissance a été inhibée.

La distribution de la vitesse de croissance locale met en évidence un raccourcissement de la zone d'élongation mais aussi le maintien de la vitesse relative d'élongation dans la partie apicale par rapport à celle des témoins. Ces modifications du profil de la vitesse de croissance locale en réponse à un déficit hydrique sont identiques à celles trouvées par Pritchard *et al.* (1991) sur des plantules de blé (contrainte de $-0,5$ MPa). Les cellules très jeunes semblent mieux capables de maintenir la vitesse relative de croissance en situation hydrique limitante en dépit d'une baisse de la pression de turgescence. De la même façon que Pritchard *et al.* (1991) sur le blé, nous avons conclu que l'extensibilité des parois a augmenté dans la partie apicale de la zone d'élongation.

Les effets de la contrainte de $-0,66$ MPa ont été similaires à ceux de la contrainte de $-0,45$ MPa avec une plus forte intensité. La zone d'élongation a été raccourcie de moitié mais la vitesse de croissance locale n'a pas été affectée dans la partie apicale de la zone de croissance. Des stress d'intensité semblable ou supérieure ont conduit au même type de profil de la vitesse relative d'élongation (Sharp *et al.*, 1988, stress de $-0,8$ et $-1,6$ MPa sur le maïs; Spollen et Sharp, 1991, stress de $-1,6$ MPa sur le maïs, Pritchard *et al.*, 1991, stress de $-0,7$ et $-0,96$ MPa sur la racine de blé; Pritchard *et al.*, 1993, stress de $-0,96$ MPa sur la racine de maïs). L'augmentation de l'extensibilité des parois, mise en évidence dans la partie apicale de la zone de croissance, est en accord avec celle trouvée par Spollen et Sharp (1991) sur le maïs. Cependant, une situation inverse a été observée par Pritchard *et al.* (1993), toujours sur des plantules de maïs. Suite à l'application d'une contrainte de $-0,96$ MPa, la vitesse de croissance locale était typiquement affectée comme dans le stress $-0,66$ MPa sur le pin maritime. Cependant, la pression de turgescence était rétablie, identique à celle des témoins dans tout l'apex racinaire. Il a été conclu que l'extensibilité des parois avait été réduite dans la partie distale de la zone d'élongation, entraînant la réduction de la vitesse relative d'élongation. Il apparaît ainsi que l'augmentation de l'extensibilité n'est pas nécessairement une réaction typique des propriétés pariétales des tissus racinaires en réponse au stress hydrique.

Lors des stress de $-0,45$ MPa et de $-0,66$ MPa, dans la partie distale de la zone de croissance, l'extensibilité des parois a pu être augmentée, maintenue ou diminuée. Il est possible que l'extensibilité ait été réduite et soit responsable de la réduction de la vitesse de croissance locale dans cette région. Cependant, il

est plus probable que l'extensibilité ait augmenté dans toute la zone de croissance. En effet, la diminution de la pression de turgescence enregistrée dans la partie distale de la zone d'élongation était suffisante pour expliquer la réduction de la vitesse relative d'élongation.

2.8.3 Stress osmotique et activité mitotique

les variations de l'activité mitotique induites par les différents niveaux de contrainte hydrique étaient positivement corrélées aux variations du grandissement cellulaire. Ceci est en accord avec les résultats de Meyer et Boyer (1972) qui ont montré que, dans les tissus en croissance de l'hypocotyle de soja soumis à un déficit hydrique, le taux de division cellulaire diminuait avec la même intensité que le grandissement cellulaire.

On ne sait si une relation de cause à effet existe entre ces deux phénomènes. La corrélation positive entre l'activité mitotique et le grandissement cellulaire est en accord avec l'hypothèse émise par Hsiao (1973) selon laquelle le déficit hydrique pourrait altérer l'activité mitotique via le grandissement cellulaire, en agissant sur le temps nécessaire à la cellule mère pour atteindre la taille minimum pour entamer son cycle de division.

2.8.4 Relations hydriques cellulaires

Quelle qu'ait été l'intensité de la contrainte, la pression de turgescence a été affectée négativement. La racine de pin maritime a montré une faible capacité à osmoréguler et un maintien de la turgescence de moins en moins efficace avec l'augmentation de la contrainte. Des plantes annuelles telles que le blé et le maïs ont montré une régulation parfaite de la turgescence jusqu'à des intensités de stress de -0,72 MPa pour le blé (Pritchard *et al.*, 1991) et -0,96 MPa pour le maïs (Pritchard *et al.*, 1993). Cependant, une limite à l'ajustement existe pour ces espèces également. Un stress de -1,6 MPa a réduit la turgescence de 0,2 MPa dans des plantules de maïs (Spollen et Sharp, 1991). L'osmorégulation induite par un stress hydrique se fait essentiellement via l'accumulation de composés organiques tels que des hexoses (Pritchard, 1994). Les plants de pin maritime étaient peut-être trop jeunes (parties aériennes peu développées) pour maintenir totalement la pression de turgescence. L'application du stress a peut-être été trop rapide et l'abaissement du potentiel hydrique trop important pour qu'une osmorégulation ait eu le temps de se mettre en place. Meier *et al.* (1992) ont montré que la vitesse de diminution du potentiel hydrique était déterminante pour l'intensité de l'osmorégulation chez *Pinus taeda*.

Comme Pritchard *et al.* (1991) l'avaient noté chez le blé, les cellules apicales des racines de pin maritime ont présenté une meilleure capacité à maintenir la pression de turgescence (stress de -0,66 MPa), même si la régulation n'était pas complète. C'est aussi dans cette partie de la zone d'élongation que les capacités d'ajustement des propriétés rhéologiques étaient les plus importantes.

Dans les plants *Témoin*, nous avons montré que le potentiel hydrique cellulaire était inférieur d'environ 0,25 MPa à celui de la solution baignant les racines. Dans les plants soumis au stress -0,66 MPa, la différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et la solution nutritive était de l'ordre de 0,45 MPa. Cette augmentation de la différence de potentiel hydrique pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses. N'Guyen (1986) mentionne que le PEG peut former un manchon autour de la racine. Un phénomène de couche limite aurait pu se développer en périphérie de la racine. D'autre part, les conditions hydriques limitantes auraient pu réduire le coefficient de réflectivité σ . Enfin, une erreur (surestimation) dans la détermination du potentiel

hydrique de la solution de PEG n'est pas exclue (Michel et Kaufmann, 1973) et pourrait aussi expliquer ce déséquilibre des potentiels.

Dans le traitement $-0,66 \text{ MPa}$, le potentiel hydrique cellulaire était uniforme le long des 10 premiers millimètres de l'apex, identique dans la zone de croissance et dans la zone mature. Contrairement à ce qu'ont montré Matyssek *et al.* (1991) nous n'avons pas mis en évidence de gradient de potentiel entre tissus matures et tissus en croissance. La conductance hydraulique serait donc forte, même en conditions de déficit hydrique, et ne limiterait pas la croissance. Frensch et Hsiao (1994), en étudiant la réponse à très court terme de la pression de turgescence et de la croissance de racines de maïs soumises à un stress hydrique, ont également conclu que la conductance hydraulique ne limitait probablement pas la croissance. Par contre, ces auteurs ont montré que, dans cette réponse à très court terme, le flux de solutés nécessaire à l'osmorégulation limitait vraisemblablement la vitesse de récupération de l'élongation racinaire.

2.9 CONCLUSION

La croissance racinaire du pin maritime a été stimulée par un stress osmotique modéré mais inhibée par un stress osmotique supérieur à $-0,45 \text{ MPa}$. Les plantules ont montré une faible capacité à osmoréguler, ce qui a induit une diminution de la pression de turgescence de plus en plus forte avec l'intensité croissante de la contrainte. Cependant, une augmentation de l'extensibilité des parois dans tout ou partie de la zone d'élongation a permis la stimulation ou a limité l'inhibition de la croissance racinaire, en dépit de la réduction de la pression de turgescence. L'absence de gradient de potentiel hydrique entre tissu en croissance et tissu mature tend à montrer que la conductance hydraulique ne limitait pas la croissance, même en conditions hydriques limitées.

Chapitre 3 : Effets de la carence en potassium sur la croissance du système racinaire

Les différents résultats présentés dans ce chapitre sont issus de plusieurs expériences réalisées sur des plantules de pin maritime, cultivées en hydroponie pendant les 4 semaines suivant la germination. Deux types de carences ont été appliquées. Une carence en potassium uniquement (*KD*) a consisté à réduire l'apport en potassium au quarantième de l'apport aux témoins. La deuxième carence a réduit l'apport de tous les macro-éléments (N, P, K, Ca, Mg, Cl, S) à ce même niveau (*MD*).

Les objectifs de cette série d'expériences étaient de :

- définir les effets de la carence en potassium sur la croissance du système racinaire du pin maritime, pivot et racines latérales,
- déterminer le rôle respectif de la pression de turgescence et des propriétés rhéologiques dans les perturbations de la croissance racinaire induites par la carence potassique,
- déterminer la nature des solutés générant le potentiel osmotique cellulaire dans les racines soumises ou non soumises à la carence potassique.

3.1 DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME RACINAIRE

3.1.1 Biomasse et rapport R/S

Après 4 semaines de culture en milieu carencé, les différences de biomasse entre traitements sont restées faibles (tab. 4). La biomasse des parties aériennes n'a été diminuée significativement par aucun des deux traitements alors que celle des racines l'a été par la carence *KD* uniquement.

Le rapport des biomasses partie aérienne/partie racinaire (Root/Shoot: R/S) des plants carencés *KD* était à la limite d'être significativement plus faible que celui des *Témoin* ($P = 0,055$). Une forte variabilité inter-individu a probablement masqué certains effets sur la croissance. Le stress multi-minéral n'a pas affecté le rapport R/S. Il apparaît donc qu'un déséquilibre dans l'apport des macroéléments, sous la forme d'une carence potassique, a été plus perturbant pour la croissance racinaire qu'une réduction de tous les macroéléments en respectant les proportions entre éléments.

Tableau 4 : Effet de la carence potassique (*KD*) et de la carence multiminérale (*MD*) sur la répartition de la biomasse sèche entre les parties aériennes et les parties racinaires de plantules de pin maritime après 4 semaines de culture hydroponique. Moyenne $\pm$ écart type, $n = 8$. Seuil de signification des différences: 5%.

	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
Biomasse des parties aériennes (mg)	105.0 ^a ± 17.0	88.3 ^a ± 18.8	97.0 ^a ± 21.7
Biomasse des parties racinaires (mg)	43.1 ^a ± 4.6	32.8 ^b ± 8.1	41.3 ^a ± 9.9
R/S	0.42 ^{ab} ± 0.04	0.37 ^b ± 0.04	0.43 ^a ± 0.05

Tableau 5 : Effet de la carence potassique (*KD*) et de la carence multiminérale (*MD*) sur le nombre de racines latérales ou de primordia de racines latérales le long d'un cm de pivot, à différentes distances du collet de la racine. Moyenne $\pm$ écart type. $n = 12$.

<i>Distance au collet</i>	<i>10 cm</i>	<i>14 cm</i>	<i>22 cm</i>
<i>Témoin</i>	12.4 ± 2.2	11.8 ± 2.0	11.3 ± 3.1
<i>KD</i>	12.0 ± 2.0	11.8 ± 2.4	11.7 ± 2.7
<i>MD</i>	12.3 ± 1.4	10.6 ± 1.3	10.9 ± 1.9

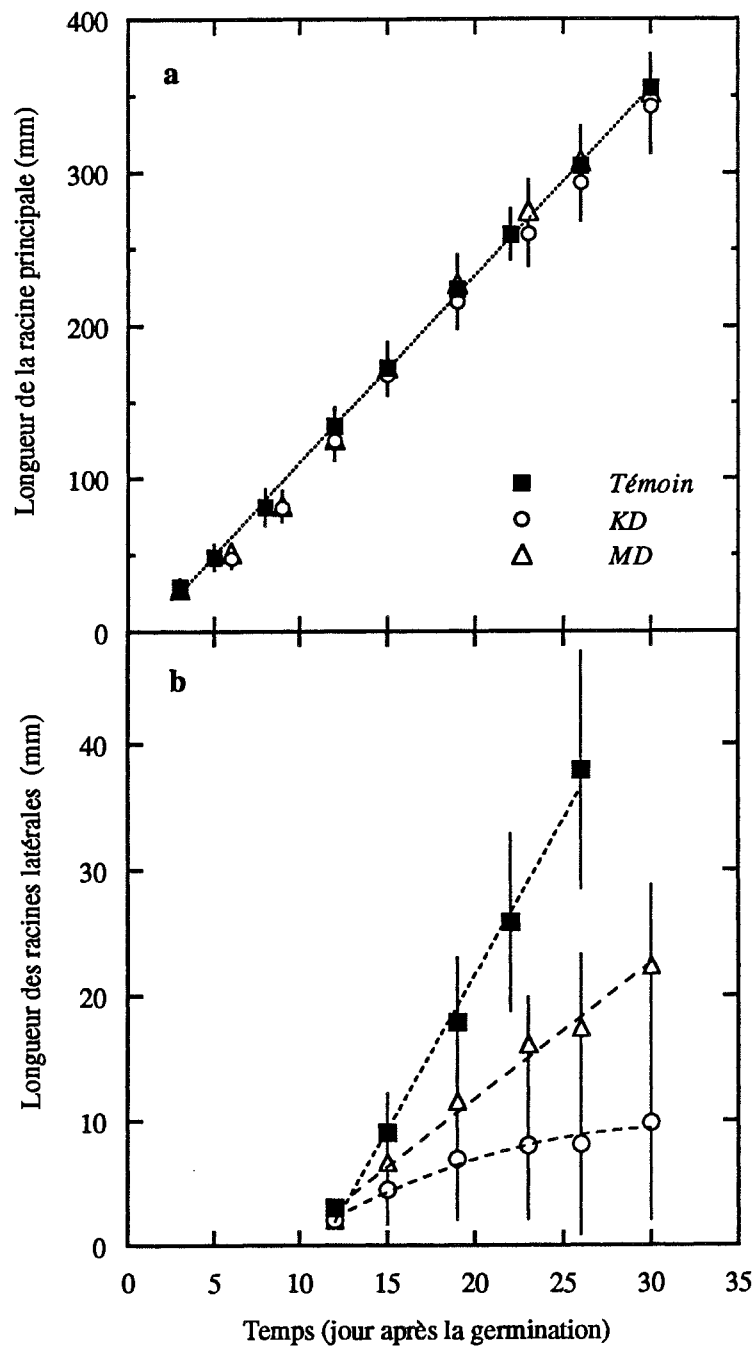


Figure 41 : Effet de la carence potassique (*KD*) et de la carence multiminérale (*MD*) sur la croissance *a*) de la racine principale (pivot) et *b*) des racines latérales de plantules de pin maritime, au cours des 30 jours suivant la germination. Moyenne $\pm$ écart type, $n = 12$.

Figure 42a : Plantules de pin maritime, après 4 semaines de culture hydroponique, représentatives des trois traitements.

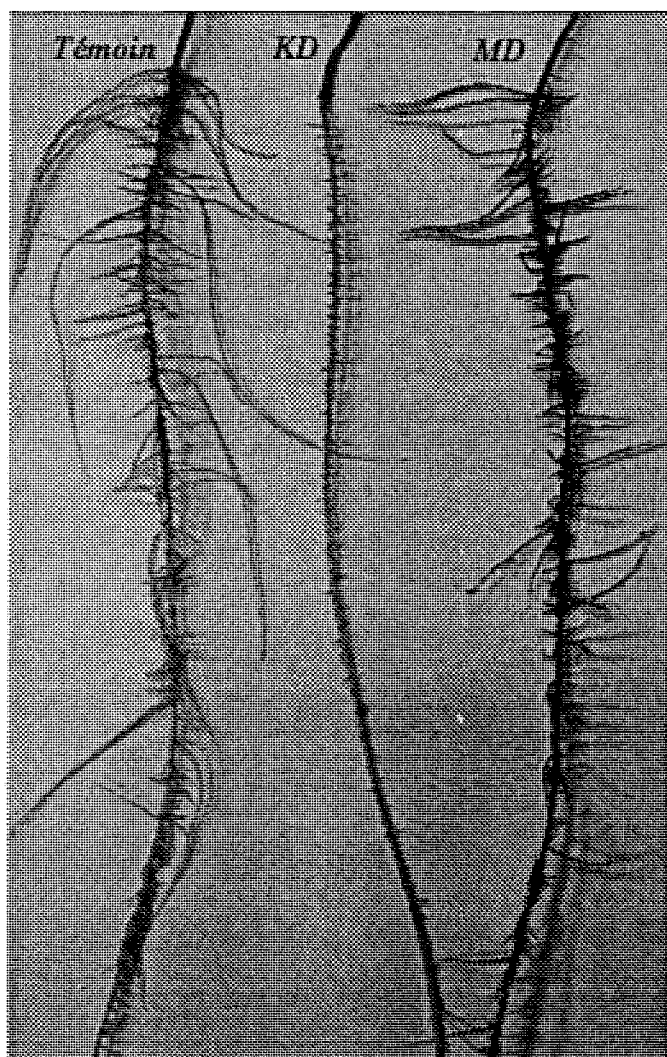
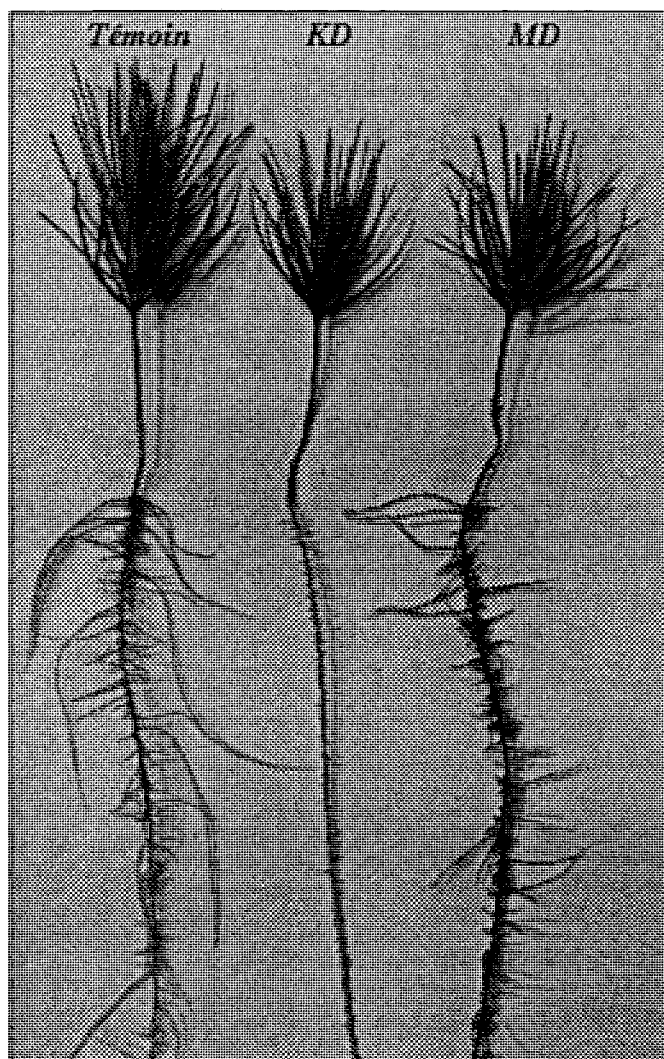


Figure 42b : Détails du système racinaire des plantules de pin maritime.

3.1.2 Croissance des racines principale et latérales

Les cinétiques de croissance présentées dans les figures 41a et 41b sont issues de la première expérience mais sont représentatives des 3 répétitions menées dans le cadre de cette étude.

Pendant les 4 semaines expérimentales, la croissance de la racine principale des plants *Témoin* est restée constante à environ $0,51 \text{ mm h}^{-1}$ (fig. 41a). Aucun des deux traitements, carence en potassium seulement ou carence multi-minérale, n'a affecté l'élongation de la racine principale au cours de ces 4 semaines.

Dans les 3 traitements, les racines secondaires sont apparues vers le 10^{ème} jour après la germination (fig. 41b). Chez les plants non-carencés, la vitesse de croissance des racines latérales est restée constante à environ $0,10 \text{ mm h}^{-1}$ pendant toute l'expérience. La croissance des racines latérales était très inférieure à celle du pivot.

La carence en potassium a induit une forte réduction de la vitesse de croissance des racines latérales (fig. 41b, 42a et 42b). Déjà plus faible dès les premiers jours suivant l'émergence, la vitesse de croissance racinaire a encore diminué puis s'est stabilisée autour de $0,01 \text{ mm h}^{-1}$.

La carence multi-minérale a réduit la vitesse de croissance des racines latérales à $0,05 \text{ mm h}^{-1}$. Bien que l'intensité de la carence en potassium ait été la même dans les deux traitements, l'élongation des racines latérales a été plus fortement inhibée par la mono-carence que par la carence multi-minérale.

3.1.3 Initiation des racines latérales

Dans le traitement *Témoin*, la densité de (racines latérales + primordia de racine latérale) était identique à 10, 14 ou 22 cm du collet de la plantule, soit environ 12 racines, naissantes, avortées ou développées par centimètre de racine principale (tab 5). Le rythme d'initiation des racines latérales n'a donc pas varié au cours des 4 semaines expérimentales.

Ni la carence *KD*, ni la carence *MD* n'ont changé la densité de (racines latérales + primordia de racines latérales) le long des 22 premiers cm de la racine principale. Les carences en potassium et en macroéléments n'ont eu aucun effet sur l'initiation des racines latérales.

3.2 ANALYSE BIOMÉCANIQUE DE LA CROISSANCE DE LA RACINE PRINCIPALE

3.2.1 Longueur des cellules et vitesse de croissance locale

Ces mesures n'ont été faites que sur les traitements Témoin et KD.

La racine principale des plantules témoins a montré un profil de longueur de cellules "classique" (figure 43a), identique à ceux présenté dans les chapitres 1 et 2. La longueur des cellules matures était d'environ 310 μm et a été atteinte à 7 mm du méristème. Le profil des longueurs de cellules des plants carencés en potassium a été similaire à celui des témoins.

La vitesse de croissance locale a été calculée manuellement, sans ajustement théorique (cf. Matériel et méthodes). Cette méthode de calcul et le faible nombre de racines analysées (6/7 racines par traitement) ont conduit à une forte variabilité de la vitesse de croissance locale. La courbe en cloche était tout de même reconnaissable dans les 2 traitements (figure 43b). Etant donné que la croissance de la racine principale et les

Racine principale

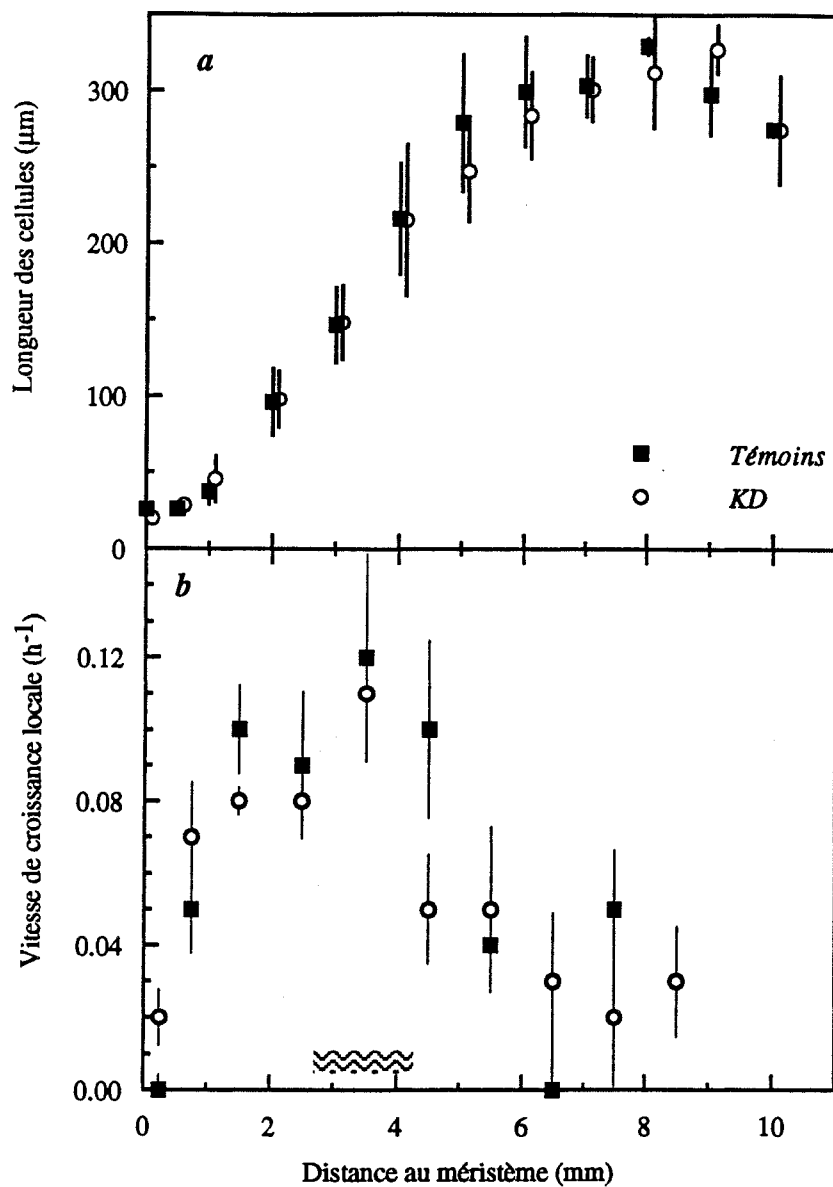


Figure 43 : Effet de la carence en potassium (*KD*) sur *a*) la longueur des cellules (moyenne $\pm$ écart type) et *b*) la vitesse de croissance locale (moyenne $\pm$ erreur standard) en fonction de la distance au méristème de la **racine principale** de pin maritime. *Témoin*, $n = 7$; *KD*, $n = 6$. La zone hachurée correspond à la position où les mesures de pressions de turgescence et osmotique ont été effectuées.

Racine principale

Tableau 6 : Effets de la carence potassique (*KD*) et de la carence multi-minérale (*MD*) sur la pression de turgescence et la pression osmotique cellulaire mesurées en 2 positions caractéristiques le long de la racine principale de plantules de pin maritime :

1) à 3-4 mm du méristème, c'est-à-dire au milieu de la zone d'élongation (cf. fig 43), dans les cellules en croissance rapide.

2) à 30 mm de l'apex, loin de la zone de croissance, dans les cellules matures.

	<i>Pression de turgescence (MPa)</i>			<i>Pression osmotique (MPa)</i>		
	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
Zone d'élongation (3-4 mm du méristème)	0.54 ^c	0.54 ^c	0.53 ^c	0.91 ^a	0.92 ^a	0.88 ^a
	± 0.05 n = 18	± 0.04 n = 10	± 0.06 n = 12	± 0.12 n = 21	± 0.10 n = 14	± 0.15 n = 18
Zone mature (30 mm de l'apex)	0.46 ^d	0.41 ^d	0.43 ^d	0.80 ^b	0.75 ^b	0.74 ^b
	± 0.04 n = 10	± 0.04 n = 10	± 0.08 n = 17	± 0.12 n = 15	± 0.07 n = 9	± 0.13 n = 12

Tableau 7 : Potentiel hydrique cellulaire en 2 positions caractéristiques le long de la racine principale de plantules de pin maritime. Le potentiel hydrique a été calculé par différence des moyennes de pression de turgescence et de pression osmotique du tableau 6.

	<i>Potentiel hydrique (MPa)</i>		
	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
Zone d'élongation	-0.37	-0.38	-0.35
Zone mature	-0.34	-0.34	-0.31

profils de longueur des cellules étaient similaires dans les deux traitements, on peut considérer que la distribution de la vitesse de croissance locale était également identique dans les plants témoins et carencés.

3.2.2 Pression de turgescence et pression osmotique

La pression de turgescence cellulaire (P) et la pression osmotique (π) ont été mesurées en 2 positions caractéristiques de la racine principale : à 4-5 mm de l'apex, c'est-à-dire dans les cellules en croissance rapide (zone hachurée dans la figure 43b) et à 30 mm de l'apex, dans des cellules matures éloignées de la zone de croissance.

Dans les plants non carencés, la pression de turgescence était de 0,54 MPa dans les cellules en croissance rapide (tab. 6). Dans les cellules matures (à 30 mm de l'apex), P était significativement plus faible, à 0,46 MPa ($P \leq 0,001$). Les carences minérales KD et MD n'ont affecté la pression de turgescence dans aucune des 2 positions.

La pression osmotique cellulaire des plants témoins était de 0,91 MPa dans les cellules en croissance rapide et de 0,80 MPa à 30 mm de l'apex (tab. 6). Comme pour la pression de turgescence, les carences minérales KD et MD n'ont pas changé significativement la pression osmotique ni dans les cellules en croissance (0,92 et 0,88 MPa respectivement) ni dans les cellules matures (0,75 et 0,74 MPa, respectivement).

Comme pour la pression de turgescence, une différence de pression osmotique d'environ 0,1 MPa a été observée entre zone de croissance et zone mature (30 mm de l'apex). La décroissance de la pression de turgescence et de la pression osmotique cellulaire avec l'éloignement par rapport au méristème n'était pas visible dans les 10 premiers millimètres de l'apex (§ 1.2.2). Les mesures à 30 mm de l'apex ont montré que P et π diminuaient effectivement avec l'éloignement par rapport au méristème.

Le potentiel hydrique des cellules en croissance et des cellules matures a été calculé par différence entre les moyennes de P et π (tab. 7). Dans les 3 traitements, le potentiel hydrique était de l'ordre de -0,35 MPa dans la zone de croissance et à peine plus faible dans la zone mature, à 30 mm de l'apex. La différence de potentiel hydrique entre ces 2 positions sur la racine principale était au maximum de 0,04 MPa.

Dans le traitement *Témoin*, la pression de turgescence dans la zone de croissance était très voisine de celle mesurée dans l'expérience de stress osmotique, soit 0,5 MPa. Par contre, la pression osmotique mesurée dans cette expérience était supérieure de 0,15 MPa à celle mesurée dans l'expérience précédente. Le potentiel hydrique des plants non stressés a donc été 0,15 MPa plus faible dans cette expérience sur le stress minéral que dans l'expérience sur le stress osmotique. L'origine de cette différence est discutée dans le § 3.5.

3.2.3 Extensibilité des parois

La croissance de la racine principale (fig. 41a), la distribution de la vitesse relative de croissance dans la zone d'élongation (fig. 43b), la longueur des cellules matures (fig. 43a) et la pression de turgescence dans les cellules en croissance (tab. 6) ont été *identiques* dans les deux traitements *Témoin* et KD . Ainsi, nous pouvons conclure que la carence en potassium n'a pas non plus modifié l'extensibilité des parois dans la zone d'élongation de la racine principale de plantules de pin maritime.

Racines latérales

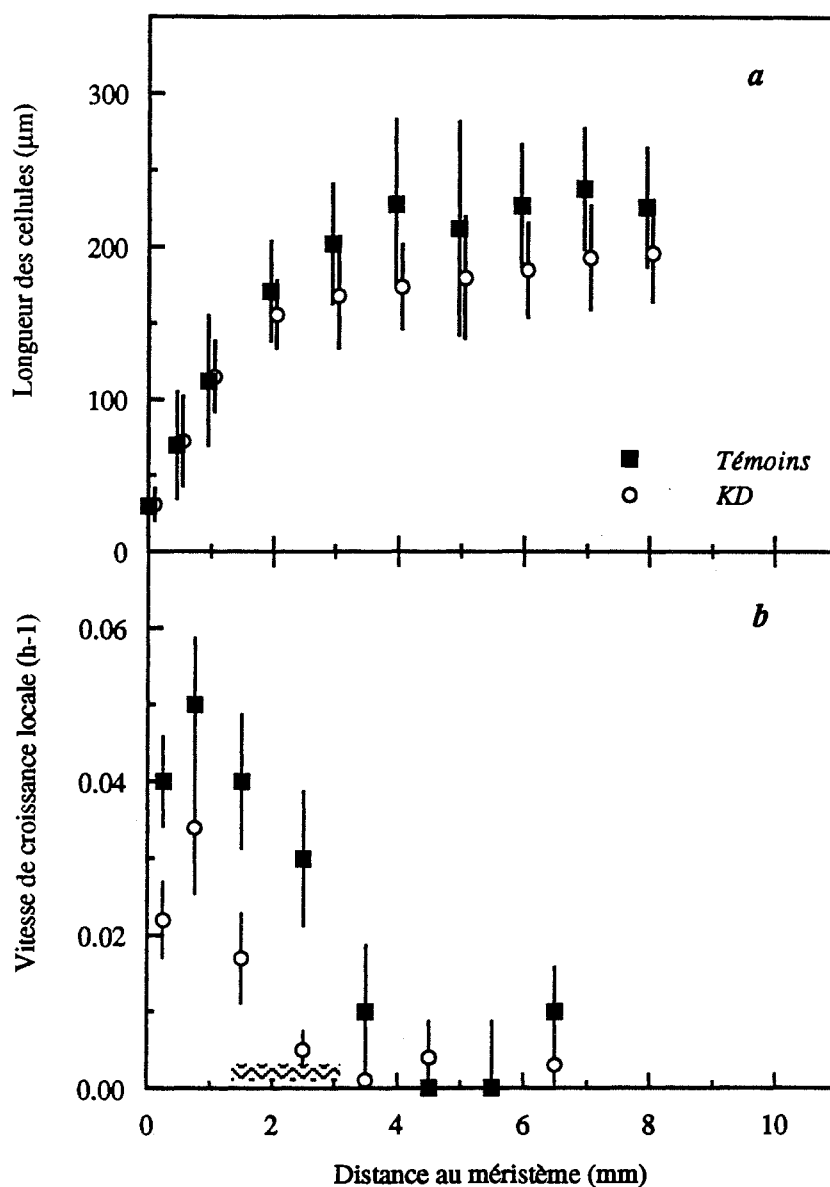


Figure 44 : Effets de la carence en potassium (*KD*) sur *a*) la longueur des cellules (moyenne $\pm$ écart type) et *b*) la vitesse de croissance locale (moyenne $\pm$ erreur standard) en fonction de la distance au méristème des **racines latérales** de pin maritime. *Témoin*, $n = 22$; *KD*, $n = 25$. La zone hachurée correspond à l'endroit où les mesures de pressions de turgescence et osmotique ont été effectuées.

Racines latérales

Tableau 8 : Effets de la carence potassique (*KD*) et de la carence multiminérale (*MD*) sur la pression de turgescence et la pression osmotique cellulaire mesurées dans la zone de croissance des racines latérales de plantules de pin maritime, à 1,5-3 mm du méristème, c'est-à-dire dans la partie distale de la zone d'élongation (cf. fig 44).

	<i>Pression de turgescence (MPa)</i>			<i>Pression osmotique (MPa)</i>		
	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
<i>Zone d'élongation (1.5-3 mm du méristème)</i>	0.44 ^c	0.37 ^d	0.41 ^{cd}	0.82 ^a	0.67 ^b	0.65 ^b
	± 0.04 n = 26	± 0.06 n = 16	± 0.09 n = 11	± 0.07 n = 21	± 0.14 n = 13	± 0.15 n = 18

Tableau 9 : Potentiel hydrique cellulaire dans la partie distale de la zone d'élongation des racines latérales de plantules de pin maritime. Le potentiel hydrique a été calculé par différence des moyennes de pression de turgescence et de pression osmotique du tableau 8.

	<i>Potentiel hydrique (MPa)</i>		
	<i>Témoin</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
<i>Zone d'élongation</i>	-0.38	-0.30	-0.24

3.3 ANALYSE BIOMÉCANIQUE DE LA CROISSANCE DES RACINES LATÉRALES

3.3.1 Longueur des cellules et vitesse de croissance locale

Les profils des longueurs de cellules et de la vitesse de croissance locale ont été déterminés à partir de 22 racines latérales dans le traitement *Témoin* et de 25 racines latérales dans le traitement *KD*. Comme pour les racines principales, nous avons observé une très forte variabilité des profils d'une racine à l'autre dans les deux traitements. En plus des raisons invoquées précédemment, ceci pourrait s'expliquer par la fragilité des racines latérales (la croissance était affectée par la moindre perturbation mécanique) et par une plus grande difficulté de lecture des longueurs de cellules sur les coupes faites à main levée.

Des différences ont tout de même été révélées d'un traitement à l'autre. Dans le traitement *Témoin*, la longueur des cellules, d'environ 30 μm dans le méristème, a augmenté assez rapidement pour atteindre 230 μm , 4 mm plus loin (fig. 44a). La carence en potassium a réduit la longueur des cellules matures à 180 μm , longueur définitive atteinte spatialement plus tôt, à 3 mm du méristème.

Le profil de la vitesse de croissance dans les apex des racines latérales des plants non stressés a montré une forme plutôt dissymétrique (fig. 44b). Le profil était caractérisé par une forte augmentation de la vitesse relative d'élongation dans le premier millimètre de l'apex puis une diminution plus lente dans les 3 mm suivants. La vitesse de croissance locale maximum était de $0,06 \text{ h}^{-1}$. L'élongation cellulaire s'est arrêtée à 4-5 mm du méristème.

La carence en potassium a raccourci la zone d'élongation aux 3 premiers millimètres. La vitesse de croissance locale a été réduite dans toute la zone d'élongation des racines latérales. La vitesse de croissance locale maximum était de $0,035 \text{ h}^{-1}$.

3.3.2 Pression de turgescence et pression osmotique

Mesures ponctuelles à 2-3,5 mm de l'apex

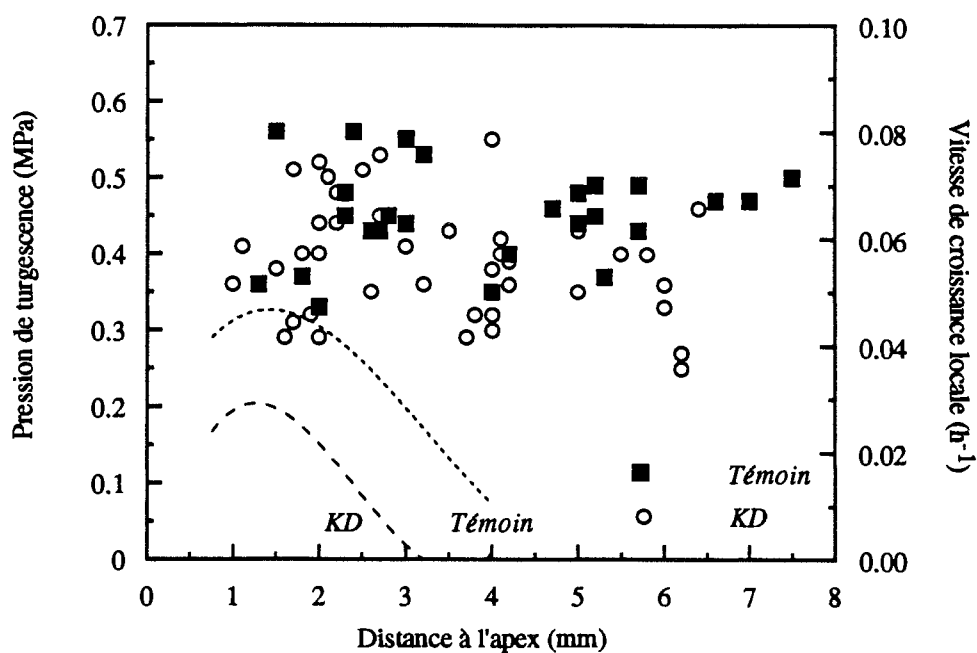
Le tableau 8 présente les valeurs de turgescence cellulaire mesurées ponctuellement à 2-3,5 mm de l'apex des racines latérales, soit à 1,5-3 mm du méristème, dans la partie distale de la zone d'élongation (zone hachurée, fig. 44b). Ces mesures ont été effectuées sur les mêmes plants où P et π ont été mesurés dans la racine principale (tab 6).

Dans la partie distale de la zone d'élongation, la pression de turgescence cellulaire des plants *Témoin* était de 0,44 MPa (tab. 8), c'est-à-dire 0,1 MPa plus faible que dans la zone d'élongation de la racine principale.

La carence potassique a significativement réduit la pression de turgescence à cette position à 0,37 MPa ($P < 0,05$). La carence multi-minérale n'a pas affecté la pression de turgescence (0,41 MPa).

La pression osmotique dans les plants non stressés était de 0,82 MPa (tab. 8). Les deux carences minérales ont significativement réduit la pression osmotique à 0,67 et 0,65 MPa, respectivement.

A 3 mm de l'apex des racines latérales, les potentiels hydriques étaient de -0,38, -0,30 et de -0,24 MPa dans les traitements *Témoin*, *KD* et *MD*, respectivement (tab. 9). Le potentiel hydrique des plants *Témoin* était du même ordre dans les racines latérales que dans la racine principale. Les carences minérales n'avaient pas affecté le potentiel hydrique dans la racine principale. Dans les racines latérales, le potentiel hydrique a été



Zone de croissance + zone mature				
Témoin	:	$P = 0.45 \pm 0.06$	*	
KD	:	$P = 0.40 \pm 0.07$		
Zone de croissance		Zone mature		
Témoin	:	$P = 0.44 \pm 0.08$	ns	$P = 0.46 \pm 0.05$ MPa
KD	:	$P = 0.42 \pm 0.08$		$P = 0.38 \pm 0.07$ MPa *

Figure 45 : Effet de l'application d'une carence potassique (KD) sur la pression de turgescence cellulaire le long des 8 premiers mm de l'apex des racines latérales de pin maritime. Chaque point est une mesure dans une cellule individuelle. Les profils des vitesses de croissance locale des deux traitements sont rappelés en pointillés. Pression de turgescence moyenne pour chaque traitement dans les différentes zones définies de l'apex (moyenne $\pm$ écart type). ns: non significatif, * : $P < 0.05$.

sensiblement réduit par la carence potassique et encore plus par la carence multi-minérale. Ces valeurs ne sont pas des moyennes mais des différences de moyennes, il n'est pas possible de savoir si les écarts sont significatifs.

Profils le long de l'apex

D'après les profils de vitesse de croissance locale, l'endroit où P et π ont été mesurés ponctuellement s'est révélé mal choisi (fig. 44). En effet, cette position, de 1,5 à 3 mm du méristème correspond à la partie très distale de la zone de croissance, où la vitesse relative d'élongation des cellules diminue fortement dans les traitements *Témoin* et *KD*. Aussi, pour ces deux traitements, nous avons établi le profil de pression de turgescence le long des 8 premiers millimètres de l'apex des racines latérales (fig. 45).

Comme il a été mis en évidence dans la racine principale, la pression de turgescence était uniforme le long de l'apex des plants non stressés, indépendante de la vitesse relative d'élongation des cellules. La pression de turgescence était d'environ 0,45 MPa.

Dans les plants carencés en potassium, la pression de turgescence était également assez uniforme dans les 8 premiers millimètres de l'apex racinaire. Le coefficient de régression linéaire n'était pas significativement différent de zéro ($P = 0,15$) et nous avons comparé les pressions de turgescence moyennes des deux traitements (fig. 45). Dans les plants carencés, P était significativement plus faible (0,40 MPa) que dans les plants témoins: 0,45 MPa ($P \leq 0,05$). Ce résultat était donc en accord avec les valeurs ponctuelles présentées dans le tableau 8. Cependant, la pression de turgescence des plants carencés tendait à décroître avec l'éloignement au méristème. Pour cette raison, nous avons analysé la situation après avoir scindé l'apex racinaire en deux régions physiologiquement différentes, la zone d'élongation (de 0 à 3 mm de l'apex) et la zone mature (fig. 45). La pression de turgescence dans la zone mature (3-8 mm) des plants carencés était significativement inférieure à celle des plants non stressés (0,38 et 0,46 MPa, respectivement). Par contre, les valeurs moyennes de P dans la zone de croissance ne différaient pas entre les traitements (0,44 MPa et 0,42 MPa).

3.3.3 Extensibilité des parois

L'étude des profils de pression de turgescence et de vitesse de croissance locale (fig. 45) a montré que la vitesse relative d'élongation a été réduite dans toute la zone de croissance, alors que la pression de turgescence a été maintenue dans cette région. La carence en potassium a donc induit une réduction de l'extensibilité des parois dans toute la zone d'élongation des racines latérales.

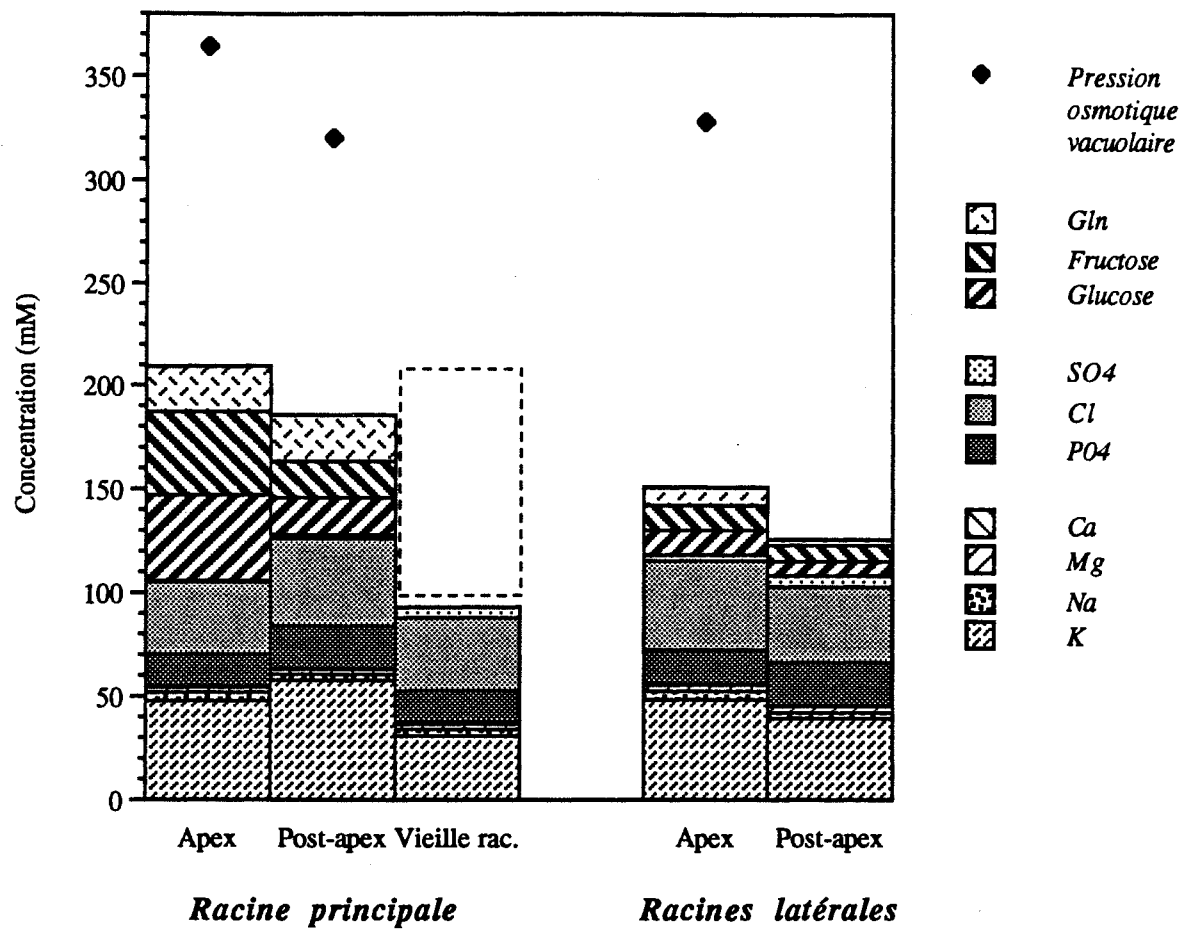


Figure 46 : Concentrations tissulaires en ions inorganiques, glucose, fructose et glutamine et pression osmotique vacuolaire (exprimée en millimolaire, mM) dans différentes parties du système racinaire de plantules de pin maritime cultivées en conditions optimales. Les solutés organiques n'ont pas été dosés dans la partie âgée de la racine principale. Chaque concentration est la moyenne de 4 à 6 dosages. L'écart type était toujours inférieur à 10% de la valeur moyenne.

3.4 TENEUR EN POTASSIUM ET PRESSION OSMOTIQUE

Les données présentées dans ce chapitre sont le résultat des dosages effectués dans les expériences *a*, *b*, *c* et *d*. Les pressions osmotiques ont été mesurées sur des échantillons de *suc vacuolaire*. Par contre, les éléments minéraux, les sucres solubles et les acides aminés ont été dosés sur des *extraits tissulaires*, comprenant apoplasme, cytoplasme et vacuole. Compte tenu du fait que le volume vacuolaire représente plus de 90% de celui du tissu, les concentrations tissulaires sont probablement assez voisines des concentrations vacuolaires. N'ayant tenu compte ni de la dilution par l'apoplasme, ni des coefficients osmotiques, les valeurs calculées de la participation des solutés à la pression osmotique sont *semi-quantitatives* seulement.

NB: Les différents ions inorganiques ont été symbolisés par des lettres sans faire mention des charges. Nous avons choisi cette écriture par soucis de clarté et d'homogénéité. En effet, la spectrométrie ICP-EOS dose des éléments et non des ions. De plus, la chromatographie ionique ne renseigne pas sur la forme ionique initiale PO_4^{3-} ou HPO_4^{2-} , etc. Ces différents éléments sont cependant sous forme cationique ou anionique.

3.4.1 Solutés générant la pression osmotique dans les différentes parties du système racinaire

Dans les différentes parties du système racinaire de pin maritime, les ions inorganiques représentaient de 30% à 40% de la pression osmotique totale (fig. 46). Le potassium était le cation essentiel (48 à 58 mM). Le sodium, le magnésium et le calcium étaient présents en très faible quantité (0 à 2,5 mM). Les anions inorganiques étaient représentés par les chlorures (35-40 mM) et les phosphates (15-20 mM). La concentration en sulfate était très faible. Elle était légèrement plus élevée dans les parties plus âgées de la racine principale et dans les racines latérales (de 0,6 à 5 mM). Les nitrates étaient présents sous forme de traces seulement.

Parmi les sucres solubles dosés, seuls le fructose et le glucose étaient présents en quantité non négligeable. Saccharose, inositol et pinitol n'étaient présents que sous forme de traces. Glucose et fructose étaient en concentration équivalente dans toutes les parties dosées mais à des niveaux différents : 40 mM chacun dans l'apex, 18 mM dans le post-apex de la racine principale et environ 10-12 mM dans les racines latérales.

Parmi les acides aminés dosés, la glutamine était présente à des concentrations 10 à 100 fois supérieures aux autres. La concentration de cet acide aminé de stockage et de transport de l'azote était de 22 mM dans l'apex de la racine principale et 9 mM dans les racines latérales.

La pression osmotique dans l'apex de la racine principale de pin maritime était due pour 15% au potassium, 15% aux anions inorganiques, 22% aux sucres solubles et 6% à la glutamine. Plus de 40% des solutés générant la pression osmotique n'ont pas été identifiés. Dans le post-apex de la racine principale, la fraction minérale était légèrement plus importante (40%). La fraction (sucres solubles + glutamine) était par contre plus faible, 18% seulement.

Dans l'apex des racines latérales, seuls 46% des solutés générant la pression osmotique ont été identifiés. La fraction minérale était importante: 36% de la pression osmotique.

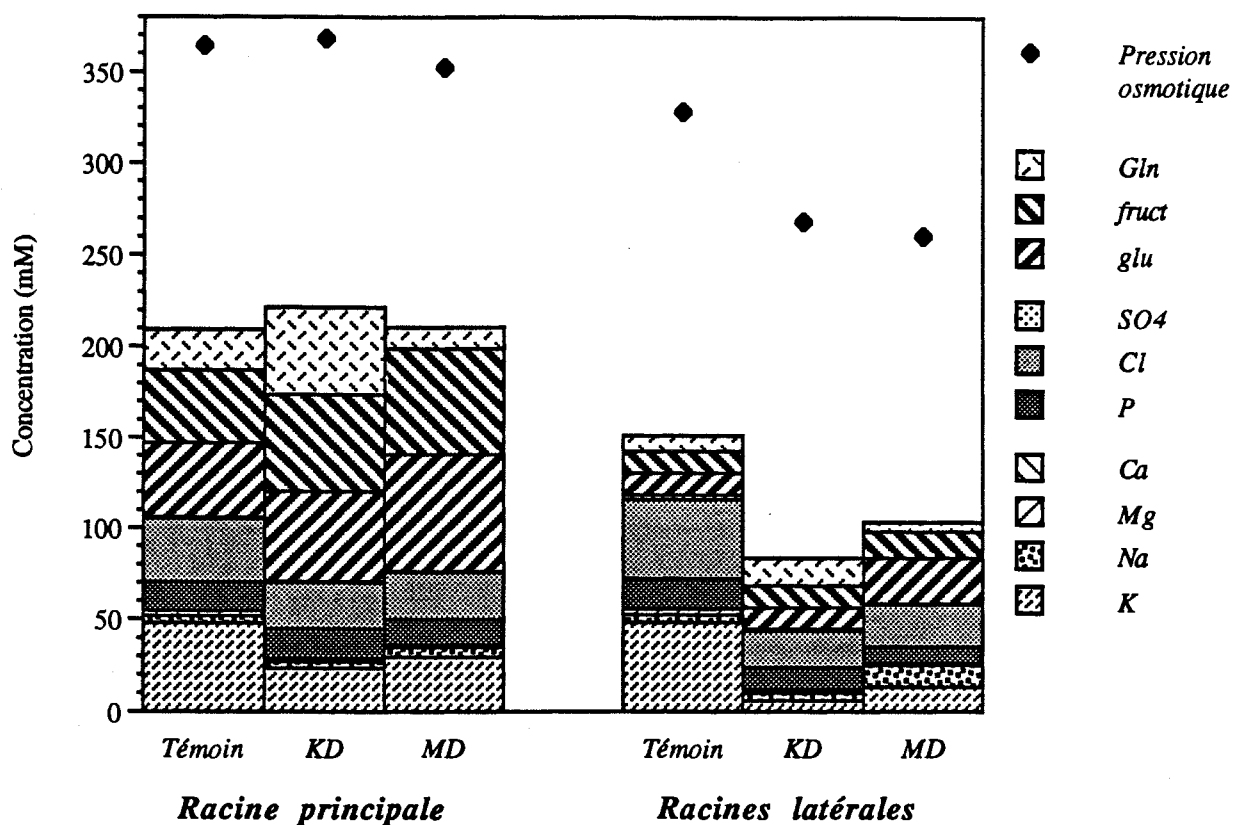


Figure 47 : Effets de la carence en potassium (KD) et de la carence multi-minérale (MD) sur la concentration en ions inorganiques, sucres solubles et glutamine et sur la pression osmotique dans les apex de la racine principale et des racines latérales. Chaque valeur est une moyenne de 4 à 6 dosages. L'écart type était toujours inférieur à 10% de la valeur moyenne.

3.4.2 Effet des carences minérales sur les solutés générant la pression osmotique dans l'apex de la racine principale et des racines latérales

Apex de la racine principale

Dans l'apex de la racine principale, la carence potassique a réduit la concentration en potassium de moitié (de 48 mM dans les *Témoin* à 24 mM dans les *KD*) (fig. 47). La carence *KD* a également induit une réduction de la teneur totale en ions inorganiques (de 106 à 71 mM). Non seulement le déficit en potassium n'a pas été compensé par d'autres cations mais il a entraîné une réduction de la teneur en chlorure. La concentration en sucres solubles a augmenté de 81 à 103 mM et celle de glutamine de 22 à 48 mM. La somme des concentrations en (ions inorganiques + sucres solubles + glutamine) était identique dans les traitements *Témoin* et *KD*. L'augmentation de la concentration des solutés organiques a compensé la diminution de la concentration en ions inorganiques. Le pourcentage de la pression osmotique expliqué par l'ensemble de ces solutés est resté constant : 60 % (tab. 10).

La carence multi-minérale a réduit la teneur en potassium de 48 à 30 mM, c'est-à-dire moins que la carence en potassium seulement (fig. 47). Pourtant l'apport de ce minéral était identique dans les deux traitements carencés. L'apport en azote ayant été réduit dans la carence *MD*, la teneur en glutamine a été réduite de 22 à 12 mM. Une augmentation de la teneur en sucres solubles, de 81 à 123 mM, a compensé la réduction de la teneur en ions inorganiques et en glutamine. Ainsi, le pourcentage de la pression osmotique expliqué est également resté constant dans ce traitement *MD* (tab. 10).

Dans les deux traitements *KD* et *MD*, la pression osmotique générée par les (ions inorganiques + sucres solubles + glutamine) n'a pas été modifiée par rapport au traitement *Témoin* (tab. 10). Cette stabilité était cohérente avec la constance de la pression osmotique dans la région apicale d'un traitement à l'autre.

Apex des racines latérales

La carence potassique a induit une très forte réduction de la teneur en potassium dans les apex des racines latérales, de 48 à 6 mM, soit 8 fois moins que dans le traitement *Témoin* (fig. 47). Comme dans la racine principale, aucune accumulation de cations n'a remplacé le potassium. Au contraire, les teneurs en chlorure et en phosphate ont diminué, réduisant la part minérale de la pression osmotique de 36 à 17 % (tab. 10).

La carence potassique n'a pas affecté la teneur en sucres et, même si la concentration en glutamine a presque doublé (de 9 à 16 mM), la somme des concentrations en (ions inorganiques + sucres solubles + glutamine) a été réduite de 67 mM. Cette réduction était très voisine de la réduction de la pression osmotique mesurée dans les cellules de l'apex des racines latérales, 60 mM (tab. 10). Par ailleurs, le pourcentage de la pression osmotique expliqué par les trois types de solutés dosés a été réduit de 46 à 31 %.

La carence multi-minérale a réduit la teneur en potassium dans l'apex des racines latérales de 48 à 13 mM, environ 2 fois moins que la mono-carence (fig. 47). La concentration en sodium a été multipliée par 4, compensant partiellement la réduction en potassium. Globalement, la concentration en ions inorganiques a été tout de même réduite de 36 à 23 % (tab. 10). La teneur en glutamine a diminué de 9 à 5 mM. Une augmentation de la concentration en sucres solubles, de 15 à 27 mM, a compensé une partie de la réduction de la concentration en ions inorganiques. Cependant, la somme des concentrations en (ions inorganiques + sucres solubles + glutamine) a été réduite de 40 mM. Par contre, la réduction de la pression

Tableau 10 : Effets de la carence en potassium (KD) et de la carence multi-minérale (MD) sur la contribution des ions inorganiques, des sucres solubles et de la glutamine à la pression osmotique et sur le pourcentage de la pression osmotique expliquée. Chaque valeur est une moyenne de 4 à 6 dosages. L'écart type était toujours inférieur à 10% de la valeur moyenne.

	<i>Racine principale</i>			<i>Racine principale</i>			<i>Racines latérales</i>		
	<i>Apex</i>			<i>Post-apex</i>			<i>Apex</i>		
	<i>Tém.</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>	<i>Tém.</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>	<i>Tém.</i>	<i>KD</i>	<i>MD</i>
π total (MPa)	0.91	0.92	0.88	0.8	0.75	0.74	0.82	0.67	0.65
(mM)	364	368	352	320	300	296	328	268	260
<i>Contribution des différents solutés à la pression osmotique</i>									
[K] (mM)	48	24	30	58	11	25	48	6	13
Ions inorganiq. (mM)	106	71	76	128	55	71	119	45	59
Sucres solubles (mM)	81	103	123	35	64	62	24	24	39
Glutamine (mM)	22	48	12	22	48	13	9	16	5
Somme (mM)	209	221	210	186	167	146	151	84	104
<i>Pourcentage de la pression osmotique expliquée par :</i>									
K (%)	13	6	8	18	4	9	15	2	5
Ions inorganiq. (%)	29	19	22	40	18	24	36	17	23
Sucres solubles (%)	22	28	35	11	21	21	7	9	15
Glutamine (%)	6	13	3	7	16	5	3	6	2
Somme (%)	58	60	60	58	56	49	46	31	40
<i>Variation de la contribution des solutés à la pression osmotique par rapport au traitement Témoin:</i>									
Ions inorganiq. (mM)	-35	-30		-73	-57		-74	-60	
Sucres + Gln (mM)	+46	+32		+53	+18		+7	+19	
Somme (mM)	+11	+2		-20	-39		-67	-40	
π total (mM)	+4	-12		-20	-24		-60	-68	

osmotique dans les cellules de l'apex était de 68 mM. Il est probable que la concentration d'autres solutés, non analysés, ait également diminué. Le pourcentage de la pression osmotique expliqué par les trois types de solutés n'a été réduit que de 46 à 40%.

Bilan

Dans l'apex de la *racine principale* des plants *KD* et *MD*, le déficit en ions inorganiques, d'environ 35 mM, a été totalement compensé par une augmentation de la teneur en solutés organiques, sucres solubles et glutamine. Dans la mono-carence, glutamine et sucres ont tous deux contribué au maintien de la pression osmotique. Dans la carence multi-minérale, la réduction de l'apport en azote a conduit à une compensation par les sucres solubles uniquement.

Dans l'apex des *racines latérales* des plants *KD*, le déficit en ions inorganiques, d'environ 75 mM, n'a quasiment pas été compensé. La réduction de la concentration en ions inorganiques était quasi identique à la réduction de la pression osmotique vacuolaire.

Dans l'apex des *racines latérales* des plants *MD*, le déficit en ions inorganiques, d'environ 60 mM, n'a pas été totalement compensé malgré une augmentation de la teneur en sucres solubles. L'augmentation de la teneur en sucres solubles a certainement été accompagnée d'une réduction d'un ou plusieurs composés non identifiés. Comme dans le traitement *KD*, la réduction de la concentration en ions inorganiques a été quasi identique à la réduction de la pression osmotique vacuolaire.

3.5 DISCUSSION

3.5.1 Intensité de la carence en potassium

Après 4 semaines de culture, la teneur en potassium dans le système racinaire des plants carencés KD était de $0,79 \pm 0,03$ % du poids sec (%PS) contre $2,42 \pm 0,16$ % dans les plants témoins (données non présentées). Dans les parties aériennes (hypocotyle, cotylédons et feuilles primordiales), la teneur en potassium était de $0,84 \pm 0,04$ %PS dans les plants carencés et $1,69 \pm 0,14$ %PS dans les plants témoins. Ces valeurs paraissent encore élevées comparées à la teneur minimale pour une croissance optimale chez le pin sylvestre, 0,4-0,5 %PS (Bonneau, 1992). Cependant ces normes ont été établies sur des aiguilles prélevées sur de jeunes plants, en novembre, c'est-à-dire lorsque le plant est au repos et que la concentration en potassium est la plus faible. Elles ne sont pas directement comparables à nos valeurs. De plus, des nécroses circulaires au sommet des aiguilles, symptômes de carence (Seillac, 1967), commençaient à apparaître sur certains plants. La réduction de l'apport en potassium dans la solution nutritive a donc bien entraîné une carence potassique.

La teneur en potassium dans le système racinaire et dans les parties aériennes des plants MD était de $0,85 \pm 0,05$ %PS. L'intensité de la carence en potassium était donc comparable à celle dans les plants KD. Aucun symptôme de carence n'a été observé sur ces plantules.

3.5.2 Solutés et pression osmotique

Composition de l'extrait tissulaire des témoins

Dans les différentes parties du système racinaire, environ 50 à 60% de la pression osmotique ont été expliqués par la somme des éléments minéraux, K, Mg, Ca, Cl, P et S, plus le glucose et le fructose, plus la glutamine.

La part minérale était de 30 à 40% de π , dont la moitié était due au potassium. La part minérale de la pression osmotique dans les apex racinaires en croissance de chêne pédonculé était de 20% environ dont la moitié était également due au potassium (Vivin *et al.*, 1995). Dans les racines de maïs, à 5 mm de l'apex, les ions K et Cl constituaient environ 50% de la pression osmotique (Pritchard et Tomos, 1993). Par contre, dans les feuilles, la part minérale était plus importante que dans les racines: 45% chez le chêne (Vivin *et al.*, 1995), plus de 90% chez l'orge (K, Ca, NO₃ et Cl) (Fricke *et al.*, 1994).

Parmi les sucres solubles analysés, seuls glucose et fructose étaient présents en concentrations significatives. Ces deux sucres ont généré environ 10 à 20% de π . Les dosages ont été conduits sur les apex de plants très jeunes. Lors de dosages d'extraits de systèmes racinaires entiers, nous avons observé la présence de saccharose parmi les solutés (données non présentées). Il est possible que le saccharose apparaisse plus tard dans les parties plus matures du système racinaire. D'ailleurs, du saccharose a été mis en évidence dans les racines de pin maritime de 2 ans (Catherine Picon, comm. pers.).

Le dernier élément présent en quantité significative dans les racines de pin maritime, la glutamine, a également été mis en évidence par Vivin *et al.* (1995) dans les tissus racinaires de chêne pédonculé.

Environ 40% des solutés participant à la pression osmotique n'ont pas été identifiés. Une partie des solutés non dosés susceptibles de contribuer à π pourraient être d'autres acides aminés. Par exemple, la proline et la glycine bêtaïne sont des acides aminés pouvant être présents à de fortes concentrations dans le cytoplasme sans perturber le métabolisme cellulaire (Voetberg et Sharp, 1991). Les acides organiques tels que malate, quinate et shiquimate participent aussi très probablement de façon importante à la pression osmotique racinaire. Ainsi, Vivin (1995) a montré que les acides organiques quinate, succinate et malate étaient des constituants essentiels de la pression osmotique dans les racines et les feuilles de chêne pédonculé.

Effets de la carence KD

La carence KD a réduit la concentration en potassium dans tous les compartiments du système racinaire mais avec une intensité variable. L'apex de la racine principale a présenté une force de puits pour le potassium nettement supérieure aux parties matures et à l'apex des racines latérales. Cette déposition préférentielle du cation dans l'apex de la racine principale est en accord avec Marschner (1993), qui indique que ce cation est essentiel à la croissance mais peut être remplacé dans les tissus matures. De plus, la réduction de la concentration en potassium dans l'apex des racines latérales a été corrélée à une forte baisse de la croissance.

Alors que calcium et magnésium étaient présents en quantité dans la solution nutritive, ces cations n'ont pas été absorbés à la place du potassium. Le sodium, qui aurait pu également se substituer au potassium (Barracough et Leigh, 1993), n'était pas présent en quantité importante. La baisse de la teneur en anions qui a accompagné la réduction de la teneur en potassium est peut être due à un problème d'équilibre des charges. Globalement la carence KD a réduit la part minérale de la pression osmotique dans tout le système racinaire.

Les solutés de remplacement du potassium ont été le glucose, le fructose et la glutamine. Les sucres solubles sont des osmotocums de remplacement classiques (Marschner, 1993). Le rôle joué par la glutamine était moins prévisible. Les composés azotés "classiques" intervenant dans les réactions physiologiques au stress sont plus généralement la proline, la glycine bêtaïne (acides aminés) (Voetberg et Sharp, 1991) et des polyamines: spermidine, putrescine (Sarjala et Kaunisto, 1993).

3.5.3 Effet de la carence potassique sur la croissance

Croissance de la racine principale

Les deux carences KD et MD n'ont pas affecté les propriétés rhéologiques dans la zone de croissance de la racine principale. De plus, le remplacement du potassium manquant a manifestement contribué au maintien de la pression de turgescence dans cette région et donc à l'absence d'effet de la carence sur la croissance de ce type de racine. Cette constance de la pression de turgescence est certainement liée au maintien d'une concentration en potassium relativement forte dans la zone de croissance. Apparemment, la teneur en potassium (25 mM) est restée au dessus d'un seuil limitant. Barracough et Leigh (1993) ont estimé ce seuil dans les feuilles de *Lolium multiflorum* à environ 126 mM. Malheureusement, nous n'avons trouvé aucune référence concernant les racines.

Croissance des racines latérales

Aucune des deux carences n'a réduit l'initiation des racines latérales. Par contre, la carence en potassium a fortement inhibé leur croissance. La zone d'élongation a été raccourcie et la vitesse relative d'élongation réduite. Les effets de cette carence sur la pression de turgescence ont été moins clairs. Dans la première série

de mesures, la pression de turgescence à 2-3 mm de l'apex (dans la partie très distale de la zone d'élongation) était significativement inférieure à celle des plants témoins. Dans la deuxième série de mesure, la pression de turgescence dans la zone d'élongation était égale dans les deux traitements. Dans la zone mature, la pression de turgescence des plants carencés était plus faible que celle des témoins. Apparemment, la pression de turgescence tendait à être maintenue préférentiellement dans les cellules en croissance. Il est incontestable qu'une réduction de l'extensibilité des parois a participé à l'inhibition de la croissance racinaire. Cependant, il est possible qu'une diminution de la turgescence y ait contribué également. Mengel et Arneke (1982) ont montré que l'expansion foliaire de plants de haricot était réduite par la carence en potassium; parallèlement, une pression de turgescence plus faible de 0,2 MPa a été mesurée dans les feuilles des plants carencés. Barraclough et Leigh (1993) ont montré une décroissance parallèle de la concentration en potassium, de la pression osmotique et de la croissance foliaire de *Lolium multiflorum*. Ainsi, dans le cas des racines latérales de pin maritime, il est possible que l'inhibition de la croissance ait été, partiellement au moins, induite par une réduction de la pression de turgescence.

Le rôle de l'extensibilité des parois dans le contrôle de la croissance a été montré dans plusieurs types de contraintes environnementales. En particulier, Pritchard *et al.* (1987) ont montré que la présence d'une forte concentration en potassium (10 mM) dans la solution nutritive réduisait également l'extensibilité des parois dans les racines de plantules de blé. Dans notre étude, c'est la carence en potassium qui a induit les mêmes conséquences. Il est probable que carence et excès de potassium n'agissent pas au même niveau.

3.5.4 Comparaison des effets des carences KD et MD

La réduction de l'apport en potassium était identique dans les deux traitements KD et MD. Cependant, les effets de ces deux carences sur les paramètres mesurés ont été relativement différents.

Dans la racine principale, ces deux carences ne se sont distinguées que par la nature des solutés qui se sont substitués au potassium. Par contre, dans les racines latérales, les réductions de la concentration tissulaire en potassium, de la pression de turgescence à 2-3 mm de l'apex et de la vitesse de croissance étaient moins prononcées dans le traitement MD que KD.

Le meilleur maintien des concentrations en potassium et autres minéraux était probablement lié au respect de l'équilibre des apports entre les différents constituants de la solution nutritive et donc au respect de l'équilibre entre les teneurs en différents éléments minéraux dans la plante. Il est intéressant de remarquer que les symptômes de carence sont apparus sur certains plants KD mais nous n'en avons pas observés sur les plants MD.

3.5.5 Relations hydriques cellulaires

Dans les expériences précédentes (chapitres 1 et 2), le potentiel hydrique mesuré dans les plants Témoin était de l'ordre de -0,25 MPa. Dans cette série-ci d'expériences, dans la racine principale et les racines latérales, nous avons mesuré un potentiel hydrique de l'ordre de -0,35 MPa. Si on compare la différence de potentiel milieu intracellulaire - milieu extérieur à la vitesse de croissance de la racine, on pourrait être tenté de l'assimiler à un gradient de potentiel hydrique induit par la croissance. En effet, la racine principale a présenté une vitesse de croissance nettement supérieure dans ces dernières expériences (0,5 mm h⁻¹ contre 0,33 mm h⁻¹ en moyenne dans les expériences de stress osmotique). Cependant, aucune différence de potentiel n'a été mise en évidence entre tissu en croissance et tissu mature. De plus, la racine principale et les

racines latérales, qui ont montré des vitesses de croissance très différentes, présentaient la même différence de potentiel hydrique par rapport à la solution nutritive. Cette différence est donc difficilement explicable en terme de relations hydriques. Il n'y a pas de raison pour que le coefficient σ ait été différent dans ces traitements *Témoin* ni pour que la présence de solutés dans l'apoplasme et le phénomène de couche limite évoqués dans les chapitres précédents soient amplifiés.

Les carences n'ont pas affecté le potentiel hydrique cellulaire de la racine principale. Dans les trois traitements *Témoin*, *KD* et *MD*, le potentiel hydrique était environ de 0,04 MPa plus négatif dans la zone de croissance que dans la zone mature. Cette différence pourrait refléter le potentiel hydrique induit par la croissance. Cet ordre de grandeur du potentiel hydrique induit par la croissance est en accord avec celui avancé par Cosgrove (1987b) mais avec pas ceux de Wesgate et Boyer (1985) qui mesurent des gradients de potentiels de l'ordre de 0,2-0,3 MPa entre tissus matures et tissus en croissance.

Dans la zone de croissance des racines latérales, le potentiel hydrique semble avoir été réduit par la carence en potassium et encore plus par la carence multi-minérale. Cependant, ce potentiel hydrique n'était pas lié à la croissance étant donné que la croissance des racines latérales des plants *MD* était supérieure à celle des plants *KD*, contrairement à la différence de potentiel hydrique entre milieu intracellulaire et milieu extérieur.

3.5.6 Différences entre racine principale et racines latérales

Dans les plants *Témoin*, la pression de turgescence et la pression osmotique dans les cellules en croissance étaient supérieures d'environ 0,1 MPa dans la racine principale par rapport aux racines latérales. Cette différence a d'ailleurs été conservée, voire amplifiée, dans les racines des traitements carencés. A notre connaissance, c'est la première fois que de telles différences sont décrites dans un système racinaire. Dans les racines latérales, le plus faible taux de croissance est peut-être corrélé avec la plus faible pression de turgescence. Cependant, nous n'avons pas d'information sur les paramètres rhéologiques ϕ et Y de chaque type de racine et aucune hypothèse ne peut être émise quant à l'origine biophysique de la différence de croissance.

Les deux types de racines différaient également par les solutés qui composaient la pression osmotique vacuolaire dans l'apex racinaire. Les éléments minéraux étaient en concentration voisines mais les teneurs en sucres solubles et en glutamine étaient bien plus faibles dans les racines latérales. Cette différence physiologique est peut-être liée aux fonctions que remplissent ces racines. La racine principale a un rôle de prospection, les racines latérales interviennent dans l'absorption des minéraux du sol et de l'eau.

La carence potassique et la carence multi-minérale ont réduit la croissance des racines latérales mais n'ont pas affecté la croissance de la racine principale. Plusieurs études ont déjà montré que la carence en potassium réduisait la croissance du système racinaire (Qi *et al.*, 1991, chez le peuplier; Seillac, 1967, chez le pin maritime; Ericsson et Kähr, 1993, chez le bouleau). Cependant, seul Seillac (1967) a mentionné une réaction différentielle des racines latérales et du pivot à la carence potassique. Dans ce dernier cas, la croissance du pivot avait aussi été affectée mais moins que celle des racines latérales, probablement parce que l'expérience avait duré plus longtemps que la nôtre et que la carence était plus prononcée.

Peu d'études s'attachent à étudier des différences de comportement entre différents types de racines au sein d'un même système. Waisel et Eshel (1991) mentionnent qu'elles ne sont pas si rares. Par exemple, l'augmentation de la température a réduit la croissance du pivot de plantules de soja mais n'a pas affectée la

croissance des racines latérales (Stone et Taylor, 1983). Il a été postulé que c'était le résultat d'une meilleure allocation du carbone aux racines latérales. Des différences d'allocation pourraient être aussi impliquées dans la régulation de la croissance des racines de haricot entre le jour et la nuit. Par rapport à la phase diurne, la croissance des racines latérales était réduite pendant la nuit alors que celle du pivot restait quasi constante (Waisel et Eshel, 1991). Dans le cas de la carence en potassium, nous avons également montré des différences d'allocations des sucres solubles entre les deux types de racines. Le déterminisme de la croissance différentielle entre racine principale et racines latérales est mal connu. Il y a effectivement une différence d'allocation du carbone mais est-ce la croissance qui contrôle l'apport en carbone ou l'inverse?

Ces réactions différentes entre racine principale et racines latérales en réponse à une variation de température, de la lumière ou de la disponibilité en potassium sont vraisemblablement liées aux paramètres physiologiques différents que présentent les deux types de racines: vitesse de croissance, solutés vacuolaires, pression osmotique et pression de turgescence. Ces résultats illustrent que l'hétérogénéité morphologique d'un système racinaire peut être accompagnée d'une hétérogénéité physiologique, mais aussi de comportements différents face à une contrainte.

3.6 CONCLUSION

La carence en potassium n'a altéré ni la pression de turgescence, ni les propriétés rhéologiques dans l'apex de la racine principale. Par conséquent, sa croissance n'a pas été affectée non plus. Par contre, la croissance des racines latérales a été fortement réduite. Une réduction de l'extensibilité des parois dans toute la zone d'élongation était essentiellement responsable de cette inhibition de l'élongation des racines latérales. Dans ces racines, la pression de turgescence tendait à être maintenue dans les cellules en élongation mais a été réduite dans les cellules matures voisines.

La concentration tissulaire en potassium a été nettement mieux maintenue dans l'apex de la racine principale que dans l'apex des racines latérales. De plus, le potassium manquant a été très efficacement remplacé (par des sucres solubles et la glutamine) dans l'apex de la racine principale. Ceci a contribué au parfait maintien de la pression osmotique dans cette région. Dans les racines latérales, où la teneur en potassium a été considérablement réduite, la teneur en sucres solubles n'a pas augmenté, induisant une réduction de la pression osmotique. Les allocations différentielles du potassium et des sucres solubles dans ces deux types de racines sont à mettre en relation avec les différences de croissance observées.

La carence multi-minérale s'est distinguée de la carence en potassium seulement. Alors que la réduction de l'apport en potassium était identique dans les deux traitements, les réductions de la teneur en potassium, de la pression de turgescence et de la croissance des racines latérales ont été moins prononcées dans le cas de la carence multi-minérale.

Discussion

NB: Les résultats ont fait l'objet d'une discussion à la fin de chaque chapitre. Ne seront discutés dans cette partie que les aspects communs à l'ensemble du travail réalisé dans cette thèse.

1 MÉTHODOLOGIE

1.1 Les nouvelles microméthodologies

Le micromanomètre intracellulaire et le picolitre osmomètre offrent des avantages indiscutables. Ces outils permettent des mesures directes de la pression de turgescence et de la pression osmotique avec une résolution spatiale cellulaire. Ils ont permis de montrer qu'il peut exister des gradients de pression de turgescence et de pression osmotique radialement dans la racine (Rygel et Zimmermann, 1990; Zimmermann *et al.*, 1992) ainsi que longitudinalement, comme nous l'avons montré sur le pin maritime. Les pressions osmotique et de turgescence mesurées jusqu'ici étaient des valeurs moyennes correspondant à une portion de tissu. De plus, un risque de surestimation du potentiel hydrique dans les zones de croissance (et donc de sous-estimation de la pression de turgescence) existe lorsqu'il est mesuré par psychrométrie. Par exemple, la pression de turgescence dans les apex de racines de pin maritime, calculée par différence entre des mesures psychrométriques du potentiel hydrique et de la pression osmotique (N'Guyen et Lamant, 1989b), était d'environ 0,3 MPa dans les plants non stressés cultivés en hydroponique. Dans notre étude, les mesures directes ont montré que P était plus proche de 0,5 MPa.

A la détermination des pressions de turgescence et osmotique à l'échelle cellulaire, il sera intéressant d'associer les teneurs en solutés dans la vacuole. Ce type de dosage est possible pour les éléments minéraux

sur des micro-échantillons de suc vacuolaire (prélevés lors des mesures de pression osmotique par exemple) par analyse d'émission des rayons X (Fricke *et al.*, 1994). La détermination des concentrations en malate, nitrate et sucres solubles est également possible grâce à des microdosages fluorimétriques (Fricke *et al.*, 1994). A l'avenir, il sera intéressant de comparer les teneurs tissulaires aux teneurs vacuolaires de ces différents solutés.

1.2 Mesure de l'extensibilité

Nous avons étudié l'extensibilité des parois cellulaires de façon qualitative. L'analyse des variations de la vitesse relative d'élongation par rapport aux variations de la pression de turgescence nous a permis, dans la plupart des cas, de déterminer les modifications de l'extensibilité, d'une part spatialement le long de la zone d'élongation, d'autre part en fonction des différentes contraintes appliquées. Cependant, lorsque pression de turgescence et vitesse relative d'élongation variaient dans le même sens, il n'est pas possible de conclure.

La méthode utilisée dans cette étude a consisté à évaluer les variations de l'extensibilité pariétale sans distinguer les paramètres ϕ et Y . Pour cela, il aurait fallu étudier la corrélation entre la vitesse de croissance racinaire et la pression de turgescence. Or, cette méthode nécessite de pouvoir déterminer la vitesse de croissance sur un pas de temps très court (inférieur à 5 min). N'ayant pas les moyens de mesurer des variations très fines de la longueur de la racine, nous ne pouvions déterminer ϕ et Y . Cependant, la méthode que nous avons utilisée présentait un autre avantage. Lorsque ϕ et Y sont déterminés par les expériences de relaxation des parois par pressurisation par exemple (Cosgrove, 1987b), c'est une valeur globale pour toute la zone de croissance qui est déterminée. De même, l'étude de la corrélation entre vitesse de croissance et pression de turgescence est souvent pratiquée à l'échelle de la portion de tissu (Pritchard, 1990b). Or, il a été montré que les propriétés rhéologiques des parois varient le long de la zone d'élongation. La méthode que nous avons utilisée était donc spatialement plus précise.

Comme nous l'avons expliqué dans l'étude bibliographique, la détermination de l'extensibilité des parois par le tensiomètre d'Instron ne correspond pas à l'*extensibilité de croissance*, mais plutôt aux propriétés mécaniques du matériau "parois". Nous avons cependant fait des mesures avec ce tensiomètre dans l'expérience du stress hydrique (non présentées). L'élasticité et la plasticité tensiométriques des parois, mesurées sur la section racinaire 2-9 mm de l'apex, ont été significativement augmentées par les deux stress $-0,15$ et $-0,45$ MPa par rapport au traitement *Témoin*. Pour le stress $-0,66$ MPa, élasticité et plasticité ont été réduites. Cependant, la zone d'élongation ayant été fortement raccourcie par le stress $-0,66$ MPa, la section sur laquelle ces paramètres ont été mesurés était composée majoritairement de tissu mature. Cette hétérogénéité peut expliquer la différence de réponse entre les traitements. Ce problème met l'accent sur une des exigences de cette méthode de quantification de l'extensibilité: le tissu sur lequel les mesures sont réalisées doit être homogène et identique dans tous les traitements pour que les résultats soient comparables.

La méthode que nous avons utilisée pour déterminer l'extensibilité des parois n'est pas quantitative. Cependant, elle est précise spatialement et reflète la physique de la croissance et non les propriétés du matériau "parois".

2 EFFET ÂGE SUR LE CONTRÔLE DE LA CROISSANCE RACINAIRE

Les aspects biomécaniques de la régulation de la croissance de la racine de pin maritime ont été étudiés sur de plantules âgées au plus de 4 semaines. Nos conditions de travail étaient assez éloignées des conditions réelles et on peut se demander si nos résultats sont applicables à ce qui se passe dans le milieu naturel. En effet, à 4 semaines, le pin maritime n'est qu'une petite plantule qui n'est pas très représentative de l'arbre adulte. Les dimensions importantes d'un arbre impliquent qu'il dispose de réserves mais aussi exprime des besoins importants en eau, en éléments minéraux, en carbone. De plus, son système racinaire est complexe et étendu. La culture hydroponique a, de surcroît, supprimé de nombreuses contraintes environnementales. En situation réelle, les plantules subissent les contraintes mécaniques du sol, des dessèchements et des déficits minéraux du sol non homogènes, etc. Dans quelle mesure le contrôle biophysique de la croissance de l'apex racinaire mis en évidence dans notre étude est-il représentatif de celui d'un apex appartenant à un arbre adulte?

La structure d'un apex racinaire d'un arbre adulte n'est pas différente de celle d'un apex d'une plantule. Ainsi, chaque apex d'un système racinaire, considéré individuellement, est soumis aux règles biophysiques contrôlant la croissance. Cependant, une racine au sein d'un arbre est intégrée dans un système complexe et donc, est susceptible de recevoir des informations sous diverses formes: messages hormonaux, translocations de solutés inorganiques et organiques. Par exemple, selon les saisons, les conifères présentent des phases physiologiquement plus ou moins actives. Les feuillus présentent des phases de repos. En dehors de tout stress hydrique ou thermique, la croissance racinaire est modulée en fonction de l'activité des parties aériennes de l'arbre. D'autre part, le stade de développement de la plantule conditionne l'état de ses réserves et de sa photosynthèse et donc, certainement ses capacités à osmoréguler. Les jeunes plantules sur lesquelles nous avons travaillé ont montré un faible potentiel d'ajustement osmotique dans les racines. On peut se demander ce qu'il en est des plants plus âgés.

En conditions optimales ou de stress hydrique ou de carence minérale, nos résultats suggèrent que la conductance hydraulique ne limitait pas le grandissement cellulaire dans les racines de pin maritime. La différence de potentiel hydrique entre tissu en croissance et tissu mature était toujours inférieure à 0,04 MPa. Cet ordre de grandeur est en accord avec les résultats de Malone et Tomos (1992) et de Cosgrove (1987b). Cependant, dans un arbre où le système racinaire est plus développé et ramifié, la résistance au transfert de l'eau augmente. De plus, en conditions naturelles les arbres transpirent, réduisant d'autant plus la disponibilité en eau pour la croissance. Le stress hydrique sous la forme du dessèchement d'un sol affecte essentiellement la composante matricielle du potentiel hydrique du sol. Or, la conductance hydraulique à l'interface sol-racine dépend de cette composante matricielle. La culture hydroponique ne prend pas en compte ce phénomène. Bien que nous ayons montré que la conductance hydraulique jouait un rôle négligeable, il est possible qu'elle participe au contrôle de la croissance en situation réelle.

Toutes nos mesures ont été réalisées sur des plantules intactes, sans que les racines soient excisées. Cependant, il serait très utile de procéder à des études biomécaniques de la croissance de racines intégrées dans un système racinaire conséquent, appartenant à une plante dont le fonctionnement se rapproche plus de la réalité. Spollen et Sharp (1991) ont réussi à faire des mesures de pression de turgescence sur des racines de maïs cultivées en pot dans de la vermiculite. Cela demande une logistique importante mais mériterait d'être mis en oeuvre chez une espèce comme le pin maritime, sur des plants plus âgés, dont on connaît les fortes interactions entre organes aériens et racinaires au cours du développement.

3 **STRESS OSMOTIQUE, CARENCE EN POTASSIUM ET FACTEURS CONTRÔLANT LA CROISSANCE RACINAIRE**

La croissance de la racine principale du pin maritime a été sensible au déficit hydrique: en fonction de l'intensité de la contrainte, elle a été stimulée ou inhibée. Face à la carence en potassium, la croissance de la racine principale n'a pas été affectée. Par contre, l'élongation des racines latérales a fortement été réduite par cette carence minérale.

L'augmentation de la croissance racinaire, observée suite au déficit hydrique modéré, a été induite par une augmentation de l'extensibilité, en dépit d'une légère réduction de la pression de turgescence. La réduction de croissance induite par les stress hydriques d'intensité supérieure à $-0,45 \text{ MPa}$ peut avoir été la conséquence soit de la relativement forte réduction de pression de turgescence, soit de l'effet combiné d'une diminution de l'extensibilité des parois et de la réduction de turgescence. En ce qui concerne l'inhibition de la croissance des racines latérales induite par la carence en potassium, c'est la réduction de l'extensibilité des parois qui est responsable des effets observés. Il n'est toutefois pas exclu que la réduction de la pression de turgescence mise en évidence dans les apex n'ait pas participé, à terme, à l'inhibition de l'élongation de ces racines.

Mis en évidence ces dix dernières années grâce aux études biomécaniques de la croissance (Cosgrove, 1987a; Green *et al.*, 1971; Pritchard *et al.*, 1987, 1993; etc.), le rôle central de l'extensibilité des parois dans le contrôle de la croissance est également manifeste dans l'étude de ces deux contraintes. Hormis dans le cas de la contrainte hydrique supérieure à $-0,45 \text{ MPa}$ où l'extensibilité des parois n'a pas été déterminée précisément et où une diminution de pression de turgescence a pu intervenir, la vitesse de croissance racinaire était positivement corrélée à l'extensibilité des parois.

Dans ce type de raisonnement, le rôle de la pression de turgescence dans le contrôle de la croissance apparaît secondaire. Cependant, même si la pression de turgescence fait l'objet d'une régulation qui tend à son homéostasie, il ne faut pas oublier qu'une variation de ce paramètre peut affecter la croissance. D'ailleurs, la réduction de la pression de turgescence a participé, au moins en partie, à la diminution de la vitesse de croissance induite par les stress osmotiques $-0,45$ et $-0,66 \text{ MPa}$. D'autre part, dans le cas de carence potassique, Mengel et Arneke (1982) ont associé la réduction de l'expansion foliaire du haricot à une pression de turgescence réduite.

Cependant, dans la majorité des contraintes étudiées, les propriétés rhéologiques jouent un rôle capital dans le contrôle de la croissance (cf. Etude Bibliographique, § 1.7). Selon Hsiao et Jing (1987), le contrôle de l'extensibilité pariétale pourrait être une des clés de la régulation de la croissance et de la répartition de la croissance entre parties aériennes et parties racinaires. Ils montrent que l'extensibilité des parois des racines de maïs augmente en réponse au déficit hydrique, maintenant la croissance en dépit d'une réduction de la turgescence. Dans les feuilles, c'est l'inverse. La pression de turgescence est revenue à sa valeur initiale mais la croissance est restée inhibée: l'extensibilité pariétale a été réduite. Ces auteurs ont élaboré une hypothèse: la plante adapterait son développement aux nouvelles conditions hydriques via le contrôle de l'extensibilité, en limitant les pertes en eau par les parties aériennes et en développant son potentiel d'absorption. L'augmentation de l'extensibilité des parois que nous avons observée dans les racines de pin maritime est cohérente avec cette séduisante théorie. Cependant, il existe des contre-exemples. Ainsi, Pritchard *et al.* (1991, 1993) ont montré que l'extensibilité des parois dans les racines de blé et de maïs diminuait en réponse à un stress osmotique.

4 CONTRÔLE DE L'EXTENSIBILITÉ PARIÉTALE

Il apparaît ainsi de plus en plus que l'extensibilité des parois serait un facteur par lequel la plante contrôle et adapte son développement aux conditions environnementales. Les études des aspects biochimiques du grandissement cellulaire ont montré que l'activité de diverses enzymes (XET, expansines) sont susceptibles de moduler l'extensibilité pariétale (cf. Etude Bibliographique, §1.5). Cependant, le déterminisme biochimique de l'extension de la surface pariétale n'est pas encore parfaitement connu. Dans le cadre du contrôle de la croissance, quels sont les signaux capables d'induire des modifications de l'extensibilité?

Dans le cas du déficit hydrique, Hsiao et Jing (1987) suggèrent qu'une très faible réduction de la pression de turgescence, induite par la réduction de la disponibilité en eau, pourrait constituer un message capable d'induire une adaptation des propriétés rhéologiques, par exemple une augmentation de l'extensibilité dans les tissus racinaires en croissance. De même, Green et al (1971) ont montré qu'une légère augmentation de la pression de turgescence dans la cellule d'algue géante *Chara* induisait une réduction de l'extensibilité, de façon à maintenir une vitesse d'élongation constante. Frensch et Hsiao (1994) ont étudié la phase de transition lors de l'application d'un stress osmotique à des racines de maïs. Ils ont montré que le seuil de turgescence Y, au delà duquel le grandissement cellulaire est possible, a été réduit de 0,6 MPa à 0,45 MPa dans les 10 minutes qui ont suivi l'application de la contrainte. Ainsi, dans le cas de la réponse à *très court terme* (inférieur à 15 min.), l'extensibilité serait dépendante de la pression de turgescence. Il est possible qu'entre le signal initial, la variation de la pression de turgescence, et l'adaptation des propriétés rhéologiques, d'autres messages interviennent; ils n'ont pas été étudiés jusqu'ici.

A une autre échelle de temps, dans la réponse à plus ou moins long terme des propriétés mécaniques des parois à une contrainte environnementale, plusieurs hypothèses ont été émises.

De nombreux travaux ont montré que les phytohormones peuvent modifier les propriétés rhéologiques des tissus en croissance. Cleland (1986) indique que, dans toutes les études des effets de l'auxine (AIA) sur les propriétés rhéologiques, il a été montré que cette phytohormone augmentait l'extensibilité des parois et, en particulier, le paramètre ϕ . Cependant, ces études n'ont été conduites que sur des tiges et des coléoptiles, jamais sur des racines. Les effets des gibbérellines, des cytokinines, de l'acide abscissique et de l'éthylène ne permettent pas de faire de généralisation, augmentant ou réduisant l'extensibilité selon les organes et les espèces (Cleland, 1986). Par exemple, lorsqu'un déficit hydrique s'installe, la teneur en ABA augmente. Des différences de sensibilité à cette phytohormone seraient responsables de la réduction de croissance des parties aériennes et du maintien de celle du système racinaire via des modifications de l'extensibilité pariétale (Creelman *et al.*, 1990; Sharp *et al.*, 1994). D'autre part, des interactions entre hormones sont probables. Dans les racines de maïs soumises au déficit hydrique, Sharp *et al.* (1995) ont suggéré que l'ABA réduirait la synthèse d'éthylène ou la sensibilité des racines à cette hormone.

Bien que la théorie de la "croissance induite par une acidification de l'apoplasme" soit controversée (Kutschera et Schopfer, 1985), la baisse du pH apoplasmique, qui peut être induite par l'application d'auxine, constitue également un des relais potentiel dans la chaîne d'événements induisant une augmentation de l'extensibilité des parois. Le cation Ca^{2+} serait également un facteur capable de moduler les propriétés mécaniques des parois (Cleland, 1986).

A l'échelle de la plante entière, Thornley (1972) a émis un modèle où les transports du carbone vers les parties racinaires et de l'azote vers les parties aériennes dépendraient essentiellement de la disponibilité de ces

éléments. Ainsi, le rapport C/N jouerait un rôle très important dans la répartition de la croissance entre parties aérienne et racinaire. Lorsque la disponibilité en carbone baisse, le flux de carbone vers les parties racinaires est réduit et la croissance inhibée. Ericsson (1995) a repris cette idée et a montré que les carences minérales qui affectent indirectement les réserves carbonées (K, Mg, Mn) induisent une réduction du rapport R/S. Dans notre expérience de carence en potassium, ce concept se vérifie à l'échelle du système racinaire. Les racines latérales, dont l'extensibilité et la croissance étaient fortement réduites, étaient défavorisées en terme d'allocation des sucres solubles par rapport à la racine principale. D'autre part, la plus faible réduction de la croissance des racines latérales par la carence *MD* (par rapport à la carence *KD*) est associée à un rapport C/N plus élevé dans les plants *MD*. Ainsi, la croissance pourrait être contrôlée par l'équilibre entre carbone et azote dans les différents organes. Y a-t-il une relation de cause à effet entre *équilibre carbone/azote* et *extensibilité des parois* ou sont-ils tous les deux des conséquences communes d'un autre facteur?

Les aspects biochimiques de la régulation de l'extensibilité pariétale sont encore mal connus. De même, l'étude des messagers susceptibles de contrôler l'extensibilité est un domaine encore peu exploré. Il est probable que les paramètres cités ci-dessus, variations de la pression de turgescence, régulateurs de croissance, pH apoplasmique et rapport C/N interviennent dans la régulation des propriétés rhéologiques des parois. Cependant, le mode d'action de ces différents facteurs et leurs interactions sont encore à clarifier.

Conclusion

Jusqu'ici, les études biomécaniques de la croissance n'avaient été conduites que sur des plantes annuelles: blé, maïs, soja. Les études conduites dans le cadre de cette thèse ont permis d'établir des connaissances quant au contrôle biomécanique de la croissance racinaire chez une espèce forestière: le pin maritime. De plus, l'analyse des effets du stress osmotique et de la carence potassique nous a permis de répondre aux interrogations soulevées au début de ce travail.

Chez le pin maritime, le contrôle biomécanique de la croissance racinaire est identique à celui des espèces annuelles étudiées jusqu'ici. La conductance hydraulique ne limite pas le grandissement cellulaire. Les propriétés rhéologiques des parois varient au cours du développement cellulaire et déterminent la vitesse relative d'élongation dans la zone de croissance. La pression de turgescence est uniforme dans cette région de l'apex racinaire.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une hétérogénéité entre les différents types de racines quant à la pression de turgescence dans les cellules en croissance. La pression de turgescence cellulaire dans le pivot était supérieure de 0,1 MPa à celle existant dans les racines latérales. C'est la première fois que ce type de différence au sein d'un système racinaire est décrit. N'ayant pas déterminé quantitativement les paramètres de l'extensibilité ϵ et Y , on ne peut dire si la plus faible pression de turgescence était responsable de la plus faible vitesse de croissance des racines latérales.

Les expériences d'application de stress osmotique ont permis de montrer que le déficit hydrique induit une augmentation de l'extensibilité des parois dans tout ou partie de la zone d'élongation de la racine principale du pin maritime. Lorsque la contrainte est faible, la pression de turgescence est faiblement réduite et l'augmentation de l'extensibilité pariétale induit une augmentation de la vitesse de croissance alors que la disponibilité en eau est réduite. Quand l'intensité du stress est plus élevée, la diminution de turgescence est plus importante et l'augmentation de l'extensibilité pariétale, mise en évidence dans la partie apicale de la

zone d'élongation, ne suffit pas pour maintenir la croissance. Il est toutefois possible que l'extensibilité des parois ait diminué dans la partie distale de la zone d'élongation, contribuant ainsi à la réduction de la croissance.

Le système racinaire a répondu de façon hétérogène à l'application de la carence en potassium. La croissance de la racine principale n'a pas été modifiée par cette contrainte: dans l'apex, ni la pression de turgescence, ni les propriétés rhéologiques n'ont été affectées. La concentration en potassium y a été maintenue à un niveau nettement supérieur à celles existant dans toutes les autres parties du système racinaire. Le déficit en éléments minéraux y a été totalement compensé par une augmentation des teneurs en glutamine et sucres solubles. Les racines latérales ont été, au contraire, très affectées. La concentration en potassium a diminué très fortement. La pression de turgescence a été maintenue dans la zone d'élongation mais a été abaissée dans la zone mature contiguë à la zone d'élongation. L'extensibilité des parois des cellules en croissance a été fortement réduite, inhibant considérablement la croissance des racines latérales.

Ces résultats mettent en valeur le potentiel de résolution des outils utilisés dans cette thèse. La résolution des paramètres du grandissement cellulaire (pression de turgescence, propriétés rhéologiques) à l'échelle de la cellule a permis de mettre en évidence des gradients longitudinaux sur de très faibles distances. Les relations hydriques mesurées directement dans les cellules ont montré l'existence de différences de potentiel hydrique insoupçonnées.

En conditions réelles, les deux contraintes environnementales sont tout à fait envisageables de façon simultanée. Il sera donc très intéressant d'étudier les effets de l'application d'un déficit hydrique à des plants carencés en potassium. En effet, nous avons montré que ces deux contraintes avaient des conséquences opposées sur l'extensibilité des parois dans les tissus racinaires en croissance. Comment l'extensibilité des parois va-t-elle répondre à la superposition de ces deux contraintes? En ce qui concerne la pression de turgescence, les effets sont plus facilement prévisibles. Le stress osmotique a réduit la pression de turgescence. Même si le potassium ne participe pas à l'osmorégulation, la carence en potassium induit une réduction des réserves carbonées. Or, l'ajustement osmotique est réalisé essentiellement grâce à des composés organiques. Il est donc fort probable que la pression de turgescence soit encore plus difficilement maintenue dans des plants carencés soumis à un déficit hydrique. Ainsi, a priori, l'application simultanée des deux contraintes induirait une réduction de la pression de turgescence au moins aussi intense que si les plants n'étaient pas carencés en potassium. Il est donc possible que la croissance racinaire soit fortement inhibée par la superposition des deux contraintes. Ces suppositions ne tiennent pas compte du comportement différent de la racine principale et des racines latérales. De plus, il est possible que l'âge, le stade de développement et les capacités photosynthétiques des plants interagissent avec les deux stress. Les prévisions sont donc difficiles et il sera très intéressant de mener ces études.

Les résultats développés dans cette thèse demandent à être prolongés par des études complémentaires. En particulier, avant même d'étudier l'interaction entre stress hydrique et carence en potassium, il serait bon de définir l'importance de l'âge et du stade de développement sur la réponse de la croissance racinaire de plantules soumises à l'une ou l'autre des contraintes. En particulier, il sera intéressant de déterminer comment les capacités à osmoréguler évoluent avec l'âge de la plante et les conséquences éventuelles sur la régulation de la croissance racinaire. De même, une étude sur des plants plus âgés, dans des conditions de transpiration

normales, pourra apporter des informations quant au rôle de la conductance hydraulique dans la régulation du grandissement cellulaire. Il sera également intéressant de vérifier que les paramètres biomécaniques de la croissance racinaire de plantules cultivées dans un sol ne sont pas différents de ceux de plantules cultivées en hydroponie.

D'autre part, l'hétérogénéité mise en évidence entre types de racines (pression de turgescence et réaction de la croissance en réponse à la carence en potassium) montrent que ce type d'étude biomécanique pourrait être utile pour *expliquer des variations dans l'architecture des systèmes racinaires*. Dans ce cadre, il serait très intéressant, pour compléter ce travail sur le pin maritime, de comparer les effets du déficit hydrique sur les deux types de racines, principale et latérales.

Parmi toutes ces perspectives, il est déjà prévu de mettre en oeuvre ces microtechniques afin d'expliquer les différences entre quelques familles de pin maritime présentant des potentialités de croissance très différentes face au déficit hydrique. La différence génétique entre ces familles s'exprime-t-elle au niveau de l'extensibilité des parois des tissus en croissance ou au niveau des capacités à osmoréguler et donc à maintenir la pression de turgescence?

Enfin, l'utilisation des microtechnologies mises en place à l'INRA de Nancy pourra être étendue à l'étude des effets d'autres contraintes sur la croissance racinaire et les relations hydriques cellulaires (autres déficits minéraux, phénomènes de toxicité, etc.). Par ailleurs, le micromanomètre intracellulaire et le picolitre osmomètre sont des outils qui offrent de multiples possibilités. Les mesures de pression de turgescence et de pression osmotique à l'échelle cellulaire sont tout à fait réalisables sur des organes aériens (feuille, tige non lignifiée) et sont envisageables sur de nombreuses essences forestières.

Références bibliographiques

Alt D, Rau JN, Wirth R. 1993. Potassium deficiency causes injuries to *Picea pungens glauca* in nurseries. *Plant and Soil* 155/156: 427-429.

Atzmon N, Salomon E, Reuveni O, Riov J. 1994. Lateral root formation in pine seedlings. I. Sources of stimulating and inhibitory substances. *Trees* 8, 268-272.

Barracclough PB, Leigh R. 1993. Critical plant K concentrations for growth and problems in the diagnosis of nutrient deficiencies by plant analysis. *Plant and Soil* 155/156: 219-222.

Besford RT. 1975. Effect of potassium nutrition on leaf protein concentrations and growth of young tomato plants. *Plant and Soil* 42: 441-451.

Bonneau M. 1992. Need of K fertilizers in tropical and temperate forests. In : *Potassium in Ecosystems*. Proceeding of the 23rd colloquium of the International Potash Institute. Prague. Basel, Switzerland: 309-324.

Bonneau M. 1995. *Fertilisation des forêts dans les pays tempérés*. ENGREF eds. 367p.

Boyer JS. 1987. Hydraulics, wall extensibility and wall proteins. In: Cosgrove DJ, Knievel J, eds. *Physiology of cell expansion during plant growth*. The American Society of Plant Physiologists, 109-120.

Boyer JS. 1993. Temperature and growth-induced water potential. *Plant, Cell and Environment* 16: 1099-1106.

Boyer JS, Cavalieri AJ, Schulze ED. 1985. Control of the rate of cell enlargement: excision, wall relaxation, and growth-induced water potentials. *Planta* 163: 527-543.

Bunce JA. 1977. Leaf elongation in relation to leaf water potential in soybean. *Journal of Experimental Botany* 28: 156-161.

Chazen O, Neumann M. 1994. Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to Polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiology* 104: 1385-1392.

Cleland RE. 1976. The control of cell enlargement. *Symposium of the Society for Experimental Biology* 31: 101-115.

Cleland RE. 1986. The role of hormones in wall loosening and plant growth. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 93-103.

Cleland RE. 1987. The mechanism of wall loosening and wall extension. In: Cosgrove DJ, Knievel J, eds. *Physiology of cell expansion during plant growth*. The American Society of Plant Physiologists, 18-27.

Cosgrove DJ. 1985. Cell wall yield properties of growing tissue. Evaluation by in vivo stress relaxation. *Plant physiology* 78, 347-356.

Cosgrove DJ. 1986. Biophysical of plant cell growth. *Annual review of Plant physiology* 37: 377-405.

Cosgrove DJ. 1987a. Wall relaxation and the driving forces for cell expansive growth. *Plant physiology* 84, 561-564.

Cosgrove DJ. 1987b. Linkage of wall extension with water and solutes uptake. In: Cosgrove DJ, Kniewel J, eds. *Physiology of cell expansion during plant growth*. The American Society of Plant Physiologists, 88-100.

Cosgrove DJ. 1993a. Wall extensibility : its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *The New Phytologist* **127**: 1-23.

Cosgrove DJ. 1993b. Water uptake by growing cells : an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *International Journal of Plant Sciences* **154**(1): 10-21.

Cosgrove DJ, Cleland RE. 1983. Solutes in the free space of growing stem tissues. *Plant Physiology* **72**: 326-331.

Cosgrove DJ, Li ZC. 1993. Role of expansin in cell enlargement of oats coleoptiles. Analysis of developmental gradients and photocontrol. *Plant physiology* **103**, 1321-1328.

Creelman RA, Mason HS, Bensen RJ, Boyer JS, Mullet JE. 1990. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiology* **92**: 205-214.

Deleens E, Marcotte L, Schwebel-Dugue N, Vartanian N. 1989. Stable isotope carbon study: long term partitioning during progressive drought stress in *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant, Cell and Environment* **12**: 615-620.

Dunisch O, Bauch J. 1994. Influence of soil substrate and drought on wood formation of spruce (*Picea abies* L. Karst.) under controlled conditions. *Holzforschung* **48**: 447-457.

Ericsson T. 1995. Growth and shoot:root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil* **168/169**: 205-214.

Ericsson T, Kähr M. 1993. Growth and nutrition of birch seedlings in relation to potassium supply rate. *Trees*. **7**: 78-85.

Ferris R, Taylor G. 1994. Increased root growth in elevated CO₂: a biophysical analysis of root cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1603-1612.

Frensch J, Hsiao TC. 1994. Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Plant Physiology* **104**: 247-254.

Fricke W, Leigh R, tomos AD. 1994. Epidermal solute concentrations and osmolality in barley leaves studied at the single cell level. *Planta* **192**: 317-323.

Gardner WR, Nieman RH. 1964. *Science* **143**: 1460-1462.

Gammon NJr, Blue WG. 1952. Potassium requirements for pastures. *Proceedings of the Soil Science Society of Florida* **12**: 154-156.

Gonzalez-Bernaldez F, Lopez-Saez JF, Garcia-Ferrero G. 1968. *Protoplasma* **65**: 255-262.

Green JF, Muir FM. 1979. Analysis of the role of the potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion. *Physiologia Plantarum* **46**: 19-24.

Green PB. 1976. Growth and cell pattern formation on an axis : critique of concept, terminology and mode of study. *Botanical Gazette* **137**: 187-202.

Green PB, Erickson RO & Buggy J. 1971. Metabolic and physical control of cell expansion rate. In vivo studies in *Nitella*. *Plant Physiology* **47**: 423-430.

Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P. 1994. Interactive effects of elevated CO₂ and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two european forest tree species. *Tree physiology* **14**: 707-724.

Hsiao TC. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* **24**: 519-570.

Hsiao JC, Acevedo E, Fereres E, Henderson DW. 1976. Water stress, growth and osmotic adjustment. *Phil Trans R Soc London Ser B* **273**: 479-500.

Hsiao TC, Jing J. 1987. Leaf and root expansive growth in response to water deficits. In: Cosgrove DJ, Kniewel J, eds. *Physiology of cell expansion during plant growth*. The American Society of Plant Physiologists, 180-192.

- Hüsken D, Zimmermann U, Steudle E. 1978. Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. *Plant Physiology* 61: 158-163.
- Hylton LO, Ulrich A, Cornelius DR. 1967. Potassium and sodium interrelations in growth and mineral content of Italian regrass. *Agronomy Journal* 59: 311-314.
- Ingestad T, Lund AB. 1986. Theory and techniques for steady mineral nutrition and growth of plants. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 1: 439-453.
- Itoh K, Nakamura Y, Kawata H, Yamada T, Ohta E, Sakata M. 1987. Effect of osmotic stress on turgor pressure in mung bean root cells. *Plant and Cell Physiology* 28: 987-994.
- Jones HG. 1992. *Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology*. Second edition. Cambridge University Press. 428 p.
- Kaufmann MR, Eckard AN. 1971. Evaluation of water stress control with polyethylene glycols by analysis of guttation. *Plant Physiology* 47: 453-456.
- Kutcher U, Schopfer P. 1985. Evidence against the acid-growth theory of auxin action. *Planta* 163: 483-493.
- Kutcher U, Schopfer P. 1986. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptyles. *Planta* 167: 527-535.
- Lagerwerff JV, Ogata G, Eagle HE. 1961. Control of osmotic pressure of culture solutions with Polyethylene Glycol. *Science* 133: 1486-1487.
- Lawlor DW. 1970. Absorption of Polyethylene Glycols by plants and their effects on plants growth. *The New Phytologist* 69: 501-513.
- Lecoeur J, Wery J, Turc O, Tardieu F. 1995. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* 46: 1093-1101.
- Leigh RA, Wyn Jones RG. 1984. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *The New Phytologist* 97: 1-13.
- Lockhart JA. 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8: 264-275.
- Malone M, Leigh RA, Tomos AD. 1989. Extraction and analysis of sap from individual wheat leaf cells: the effect of sampling speed on the osmotic pressure of extracted sap. *Plant, Cell and Environment* 12: 919-926.
- Malone M, Tomos AD. 1992. Measurements of gradients of water potential in elongating stem by pressure probe and picotite osmometry. *Journal of Experimental Botany* 43: 1325-1331.
- Marschner H. 1993. *Mineral nutrition of Higher plants*. Academic press. 889p.
- Matyssek R, Maruyama S, Boyer JS. 1991. Growth-induced water potentials may mobilize internal water for growth. *Plant, Cell and Environment* 14:917-923.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell* 4: 1425-1433.
- Meier CE, Newton RJ, Puryear JD, Sen S. 1992. Physiological response of Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedlings to drought stress: osmotic adjustment and tissue elasticity. *Journal of Plant Physiology* 140: 754-760.
- Meinzer FC, Moore PH. 1987. Apoplastic solutes and lowered water potential in elongating sugarcane leaves. In: Cosgrove DJ, Knievel J, eds. *Physiology of cell expansion during plant growth*. The American Society of Plant Physiologists, 239-240.
- Mengel K, Arneke WW. 1982. Effect of potassium on the water potential, the pressure potential, the osmotic potential and cell elongation in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 54: 402-408.
- Meyer RF, Boyer JS. 1972. Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* 108: 77-87.

Meyer RF, Boyer JS. 1981. Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials. *Planta* 151: 482-489.

Michel BE, Kaufmann MR. 1973. The osmotic potential of the polyethylene glycol 6000. *Plant physiology* 51: 914-916.

Molz FM, Boyer JS. 1978. Growth-induced water potentials in plant cells and tissues. *Plant Physiology* 62: 423-429.

Money NP. 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. *Plant Physiology* 91: 766-769.

Morgan JM. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of Plant physiology* 35: 299-319.

Newmann PM. 1993. Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant, Cell and Environment* 16: 1107-1114.

Newmann PM, Azaizeh H, Leon D. 1994. Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. *Plant, Cell and Environment* 17: 303-309.

Newmann PM, Van Volkenburg E, Cleland RE. 1988. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology* 88: 233-237.

N'Guyen A. 1986. *Effets d'une contrainte hydrique racinaire sur de jeunes plants de pin maritime (Pinus pinaster Ait.)*. Thèse de l'Université de Bordeaux 1. 149p.

N'Guyen A, Lamant A. 1988. Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stress seedlings of maritime pine. *Phytochemistry* 27: 3423-3427.

N'Guyen A, Lamant A. 1989a. Effect of water stress on potassium distribution in young seedlings of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Annales des Sciences Forestières* 46suppl., 379s-383s. (Forest Tree Physiology, E. Dreyer et al., eds).

N'Guyen A, Lamant A. 1989b. Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree Physiology* 5: 123-133.

Nonami H, Boyer JS. 1987. Origin of growth-induced water potential. Solute concentration is low in apoplast of enlarging tissues. *Plant Physiology* 83: 593-601.

Osonubi O, Davies WJ. 1978. Solute accumulation in leaves and roots of woody plants subjected to water stress. *Oecologia* 32: 323-332.

Passioura JB. 1994. The physical chemistry of the primary cell wall: implication for the control of expansion rate. *Journal of Experimental Botany* 45: 415-422.

Passioura JB, Fry SC. 1992. Turgor and cell expansion : beyond the Lockhart equation. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 565-576.

Pardossi A, Pritchard J, Tomos AD. 1994. Leaf illumination and root cooling inhibit bean leaf expansion by decreasing turgor pressure. *Journal of Experimental Botany* 45: 415-422.

Pritchard J. 1994. The control of cell expansion in roots. *The New Phytologist* 127: 3-26.

Pritchard J, Barlow PW, Adam JS, Tomos AD. 1990a. Biophysics of the inhibition of the growth of maize roots by lowered temperature. *Plant Physiology* 93: 222-230.

Pritchard J, Hetherington PR, Fry SC, Tomos AD. 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *Journal of Experimental Botany* 44: 1281-1289.

Pritchard J, Tomos AD. 1993. Correlating biophysical and biochemical control of root cell expansion. In Smith JAC, Griffiths H, eds. *Water deficits, plant responses from cell to community*. Oxford, UK: Bios Scientific publishers, 53-72.

Pritchard J, Tomos AD, Wyn Jones RG. 1987. Control of wheat root elongation rate. I. Effects of ions on growth rate, wall rheology and cell water relations. *Journal of Experimental Botany* 38: 948-959.

Pritchard J, Williams G, Wyn Jones RG, Tomos AD. 1989. Radial turgor pressure profiles in growing and mature zones of wheat roots-A modification of the pressure probe. *Journal of Experimental Botany* 40: 567-571.

Pritchard J, Wyn Jones RG, Tomos AD. 1988. Control of wheat root growth. The effects of excision on growth, wall rheology and root anatomy. *Planta* 176: 399-405.

Pritchard J, Wyn Jones RG, Tomos AD. 1990b. Measurement of yield threshold and cell wall extensibility of intact wheat roots under different ionic, osmotic and temperature treatments. *Journal of Experimental Botany* 41: 669-675.

Pritchard J, Wyn Jones RG, Tomos AD. 1991. Turgor, growth and rheological gradients of wheat roots following osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* 42: 1043-1049.

Qi L, Fritz E, Tianqing L, Hüttermann A. 1991. X-ray microanalysis of ions contents in roots of *Populus maximowiczii* grown under potassium and phosphorus deficiency. *Journal of Plant Physiology* 138: 180-185.

Ranney TG, Bassuk NL, Whitlow TH. 1991. Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 684-688.

Ray PM. 1987. Principles of plant cell expansion. In: Cosgrove DJ, Knievel J, eds. *Physiology of cell expansion during plant growth*. The American Society of Plant Physiologists, 1-17.

Reader RJ, Jalili A, Grime JP, Spencer RE, Matthews N. 1993. A comparative study of plasticity in seedling rooting depth in drying soil. *Journal of Ecology* 81: 543-550.

Roden J, Van Volkenburgh E, Hinckley TM. 1990. Cellular basis for limitation of poplar leaf growth by water deficit. *Tree Physiology* 6: 211-219.

Rygel J, Zimmermann U. 1990. Radial and axial turgor pressure measurements in individual root cells of *Mesembryanthemum crystallinum* grown under various saline conditions. *Plant Cell and Environment* 13: 15-26.

Saab IN, Sharp RE, Pritchard J, Voetberg GS. 1990. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology* 93: 1329-1336.

Sabatier G, Vartanian N. 1983. Cinétique de la rhizogenèse adaptative à la sécheresse. Relation avec l'évolution des paramètres hydriques et morphologiques chez le *Sinapis alba*, à deux niveaux d'énergie lumineuse. *Physiologia Plantarum* 59: 501-507.

Sarjala T, Kaunisto S. 1993. Needle polyamine concentrations and potassium nutrition in Scots pine. *Tree physiology* 13: 87-96.

Schmalstig JG, Cosgrove DJ. 1990. Coupling of solute transport and cell expansion in pea stems. *Plant Physiology* 94: 1625-1633.

Seillac P. 1960. Contribution à l'étude de la nutrition du Pin maritime : variations saisonnières de la teneur des pseudophylles en azote, potassium et acide phosphorique. Ph. D. Thesis, Université de Bordeaux I, France.

Seillac P. 1967. Recherches des besoins en azote et en potassium des jeunes Pins maritimes cultivés sur milieu liquide. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série D*, 264: 1047-1050.

Serpe MD, Matthews MA. 1992. Rapid changes in cell wall yielding of *Begonia argenteo-guttata* L. leaves in response to changes in response to changes in plant water status. *Plant Physiology* 100: 1825-1857.

Sharp RE, Davies WJ. 1979. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* 174: 43-49.

Sharp RE, Hsiao TC, Silk WK. 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 93: 1337-1346.

Sharp RE, Silk WK, Hsiao TC. 1988. Growth of the primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* 87: 50-57.

- Sharp RE, Spollen WG, LeNoble ME, Feng X. 1995. Hormone action in the maintenance of root elongation at low water potentials. In: *Plant roots-From cell to systems*. Programme Abstracts from the 14th Long Ashton International Symposium.31.
- Sharp RE, Wu Y, Voetberg GS, Saab IN, LeNoble ME. 1994. Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany* 45: 1743-1751.
- Silk WK, Lord EM, Eckard KJ. 1989. Growth patterns inferred from anatomical records. *Plant Physiology* 90: 708-713.
- Spollen WG, Sharp RE. 1991. Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. *Plant Physiology* 96: 438-443.
- Steudle E. 1992. The biophysics of plant water: compartmentation, coupling with metabolic processes and flow of water in plants roots. In Somero GN, Osmond CB, Bolis CL, eds. *Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 173-204.
- Steudle E. 1993. Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell tissue and organ level. In Smith JAC, Griffiths H, eds. *Water deficits, plant responses from cell to community*. Oxford, UK: Bios Scientific publishers, 5-31.
- Steudle E. 1994. Water transport across roots. *Plant and Soil* 167: 79-90.
- Steudle E, Oren R, Schultze ED. 1987. Water transport in maize roots. Measurement of hydraulic conductivity, solute permeability, and of reflexion coefficients of excised roots using the root pressure probe. *Plant Physiology* 84: 1220-1232.
- Stevenson TT, Cleland RE. 1982. Osmoregulation in the *Avena* coleoptile: control of solute uptake in peeled sections. *Plant Physiology* 69: 292-295.
- Stone JA, Taylor HM. 1983. Temperature and the development of the taproot and lateral roots of four indeterminate soybean cultivars. *Agronomy Journal* 75: 613-618.
- Tan V, Blake J, Boyle TJB. 1992. Drought tolerance in faster- and slower-growing blake spruce (*Picea mariana*) progenies: II osmotic adjustment and changes of soluble carbohydrates and amino acids under osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 85: 645-651.
- Taylor G, Ranasinghe S, Bosac C, Gardner SDL, Ferris R. 1994. Elevated CO₂ and plant growth: cellular mechanisms and responses of whole plants. *Journal of Experimental Botany* 45: 1761-1774.
- Thornley JHM. 1972. A balanced quantitative model for root:shoot ratios in vegetative plants. *Annals of Botany* 36, 431-441.
- Tomos AD, Pritchard J. 1994. Biophysical and biochemical control of cell expansion in root and leaves. *Journal of Experimental Botany* 45: 1721-1731.
- Thomas A, Tomos AD, Stoddart JL, Thomas H, et Pollock CJ. 1989. Cell expansion rate, temperature and turgor pressure in growing leaves of *Lolium temulentum* L. *The New Phytologist* 112: 1-5.
- Tyner EH. 1946. The relation of corn yields to leaf nitrogen, phosphorus and potassium content. *Soil Science Society of America, Proceedings* 11: 317-323.
- Van Volkenburg E, Hunt S, Davies WJ. 1983. A simple instrument for measuring cell-wall extensibility. *Annals of Botany* 51: 669-672.
- Vivin P. 1995. Effets de l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ et de contraintes hydriques sur l'allocation de carbone et d'azote et sur l'ajustement osmotique chez *Quercus Robur* L. Thèse de l'Université Henri Poincaré de Nancy I. 136p.
- Vivin P, Guehl JM, Clément A, Aussenac G. 1995. The effects of elevated CO₂ and water stress on whole plant CO₂ exchange, carbon allocation and osmoregulation in oak seedlings. *Annales des Sciences Forestières*, sous presse.
- Voetberg GS, Sharp RE. 1991. Growth of the maize primary root at low water potentials. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 96: 1125-1130.

Waisel Y, Eshel A. 1991. Multiform behavior of various constituents of one root system. In: Waisel Y, Eshel A and Kafkafi U eds. *Plant roots: the hidden half*.

Wesgate ME, Boyer JS. 1984. Transpiration and growth-induced water potential in maize. *Plant Physiology* 74: 882-889.

Wesgate ME, Boyer JS. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164: 540-549.

Wood IM, Dart IK, So HB. 1993. Measurement of the total water potential of aqueous solutions polyethylene glycol: a comparison between osmometer, thermocouple psychrometer and equilibrated soil cores. *Australian Journal of Soil Research* 31:1-11.

Wu Y, Spollen WG, Sharp RE, Hetherington PR, Fry SC. 1994. Root growth maintenance at low water potentials. *Plant Physiology* 106: 607-615.

Wyn Jones RG, Brady CJ, Speirs J. 1979. Ionic and osmotic relations in plant cells. In: Laidman DL, Wyn Jones RG, eds. *Recent advances in the biochemistry of cereals*. Academic Press, London. 63-103.

Zhang J, Davies WJ. 1990. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant, Cell and Environment* 13: 277-285.

Zhu GL, Boyer JS. 1992. Enlargement in Chara studies with a turgor clamp. Growth rate is not determined by turgor. *Plant Physiology* 100: 2071-2080.

Zimmermann U, Rygol J, Balling A, Klöck G, Metzler A, Haase A. 1992. Radial turgor and osmotic pressure profiles in intact and excised of *Aster tripolium*. *Plant Physiology* 99: 186-196.

Résumé: Ce travail a permis d'améliorer les connaissances *du contrôle de la croissance racinaire* chez le pin maritime. Cette étude, dont la base est une *analyse biophysique du grandissement cellulaire*, a fait appel à deux nouvelles microtechnologies: le micromanomètre intracellulaire et le picolitre osmomètre.

En conditions optimales, la *pression de turgescence cellulaire* est uniforme dans toute la zone d'élongation. Par contre, les propriétés rhéologiques des parois varient au cours de la maturation cellulaire et contrôlent le grandissement cellulaire.

Trois intensités de stress osmotique ont affecté la croissance racinaire différemment. Un *déficit hydrique modéré* l'a stimulée en induisant une augmentation de l'extensibilité pariétale, en dépit d'une légère baisse de la pression de turgescence. Lors du *déficit hydrique moyen*, une réduction de la pression de turgescence a été compensée par une augmentation de l'extensibilité pariétale et la vitesse de croissance racinaire n'a pas été affectée. Lors du *déficit hydrique intense*, la croissance a été inhibée par une forte réduction de la pression de turgescence.

Le système racinaire a répondu de façon hétérogène à l'application d'une *carence en potassium*. La croissance de la *racine principale* n'a pas été modifiée par cette contrainte: ni la pression de turgescence, ni les propriétés rhéologiques n'ont été affectées. Par contre, la croissance des *racines latérales* a été fortement inhibée par une réduction de l'extensibilité pariétale. Par ailleurs, dans l'apex de la racine principale, la relativement faible réduction de la concentration en potassium (divisée par 2), et des autres ions inorganiques, a été totalement compensée par une augmentation des teneurs en sucres solubles et en glutamine. Dans l'apex des racines latérales, la forte réduction de la concentration en potassium (divisée par 8), et des autres ions inorganiques, n'a quasiment pas été compensée, induisant une réduction de pression osmotique dans les tissus matures.

Abstract: This work allowed us to improve our knowledge about the control of root growth of maritime pine. This study, which is based on a biophysical analysis of cell expansion, utilised two new micro-technologies: the cell pressure probe and the picolitre osmometer.

In unstressed plants, cell turgor pressure was uniform over the entire elongation zone. On the other hand, cell wall rheological properties changed during cell maturation and controlled cell expansion.

Three levels of osmotic stress affected root growth differently. A moderate water deficit stimulated root growth by increasing cell wall extensibility, in spite of a small decrease of cell turgor pressure. During the medium water deficit, a reduction of cell turgor pressure was compensated by an increase of cell wall extensibility, root growth rate was not affected. During the highest water deficit, root growth was inhibited by a strong reduction of turgor pressure.

The root system responded heterogeneously to a potassium shortage. Tap root growth was not modified by this constraint: neither turgor pressure nor rheological properties were affected. On the other hand, lateral roots growth was strongly inhibited by a reduction of cell wall extensibility. Moreover, in the apex of the tap root, a small reduction in potassium concentration (divided by 2), and also of other inorganic ions, was completely compensated by an increase of soluble sugars and glutamine concentrations. In the apex of lateral roots, a large reduction in potassium concentration (divided by 8), and of other inorganic ions, was practically not compensated, inducing a reduction of the osmotic pressure in mature tissues.

Nom : TRIBOULOT

Prénom : Marie-Béatrice

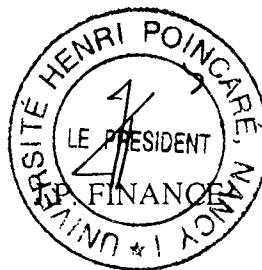
DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I

en BIOLOGIE FORESTIÈRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 31 JAN. 1996 UHP 2

Le Président de l'Université



Résumé: Ce travail a permis d'améliorer les connaissances du contrôle de la croissance racinaire chez le pin maritime. Cette étude, dont la base est une analyse biophysique du grandissement cellulaire, a fait appel à deux nouvelles microtechnologies: le micromanomètre intracellulaire et le picolitre osmomètre.

En conditions optimales, la pression de turgescence cellulaire est uniforme dans toute la zone d'élongation. Par contre, les propriétés rhéologiques des parois varient au cours de la maturation cellulaire et contrôlent le grandissement cellulaire.

Trois intensités de stress osmotique ont affecté la croissance racinaire différemment. Un déficit hydrique modéré l'a stimulée en induisant une augmentation de l'extensibilité pariétale, en dépit d'une légère baisse de la pression de turgescence. Lors du déficit hydrique moyen, une réduction de la pression de turgescence a été compensée par une augmentation de l'extensibilité pariétale et la vitesse de croissance racinaire n'a pas été affectée. Lors du déficit hydrique intense, la croissance a été inhibée par une forte réduction de la pression de turgescence.

Le système racinaire a répondu de façon hétérogène à l'application d'une carence en potassium. La croissance de la racine principale n'a pas été modifiée par cette contrainte: ni la pression de turgescence, ni les propriétés rhéologiques n'ont été affectées. Par contre, la croissance des racines latérales a été fortement inhibée par une réduction de l'extensibilité pariétale. Par ailleurs, dans l'apex de la racine principale, la relativement faible réduction de la concentration en potassium (divisée par 2), et des autres ions inorganiques, a été totalement compensée par une augmentation des teneurs en sucres solubles et en glutamine. Dans l'apex des racines latérales, la forte réduction de la concentration en potassium (divisée par 8), et des autres ions inorganiques, n'a quasiment pas été compensée, induisant une réduction de pression osmotique dans les tissus matures.

Abstract: This work allowed us to improve our knowledge about the control of root growth of maritime pine. This study, which is based on a biophysical analysis of cell expansion, utilised two new microtechnologies: the cell pressure probe and the picolitre osmometer.

In unstressed plants, cell turgor pressure was uniform over the entire elongation zone. On the other hand, cell wall rheological properties changed during cell maturation and controlled cell expansion.

Three levels of osmotic stress affected root growth differently. A moderate water deficit stimulated root growth by increasing cell wall extensibility, in spite of a small decrease of cell turgor pressure. During the medium water deficit, a reduction of cell turgor pressure was compensated by an increase of cell wall extensibility, root growth rate was not affected. During the highest water deficit, root growth was inhibited by a strong reduction of turgor pressure.

The root system responded heterogeneously to a potassium shortage. Tap root growth was not modified by this constraint: neither turgor pressure nor rheological properties were affected. On the other hand, lateral roots growth was strongly inhibited by a reduction of cell wall extensibility. Moreover, in the apex of the tap root, a small reduction in potassium concentration (divided by 2), and also of other inorganic ions, was completely compensated by an increase of soluble sugars and glutamine concentrations. In the apex of lateral roots, a large reduction in potassium concentration (divided by 8), and of other inorganic ions, was practically not compensated, inducing a reduction of the osmotic pressure in mature tissues.