

## 1. Introduction

À la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, des chercheurs ont tenté de découvrir l'origine de décharges électriques, en disséquant l'organe électrique de *Torpedo* (torpille). Walsh (1773, 1774) parvint à rendre visible la décharge électrique de cet organe, sous la forme d'un « flash » lumineux. Il s'agit de la « naissance » de l'électrophysiologie.

Les signaux électriques ont d'abord été observés et décrits chez les végétaux (Bertholon 1783), puis chez les animaux (Galvani 1791). Chez les végétaux, ils sont devenus une importante ligne d'étude, depuis près de 140 ans, lors d'expériences menées, chez *Dionaea muscipula* (dionée attrape-mouche), par Burdon-Sanderson (1873) et Darwin (1875). Dès lors, cet organisme a été considéré comme une plante modèle.

Selon Davies (2006), chez les végétaux, le potentiel électrique comprend : les potentiels d'action (PA), dont les PA spontanés, aussi appelés « spontaneous action potentials », et les potentiels de variation (PV). À ces signaux, il convient d'ajouter les « system potentials » (SPs) récemment découverts par Zimmermann et al. (2009). Toutes ces réponses bioélectriques sont des variations du potentiel membranaire (PM).

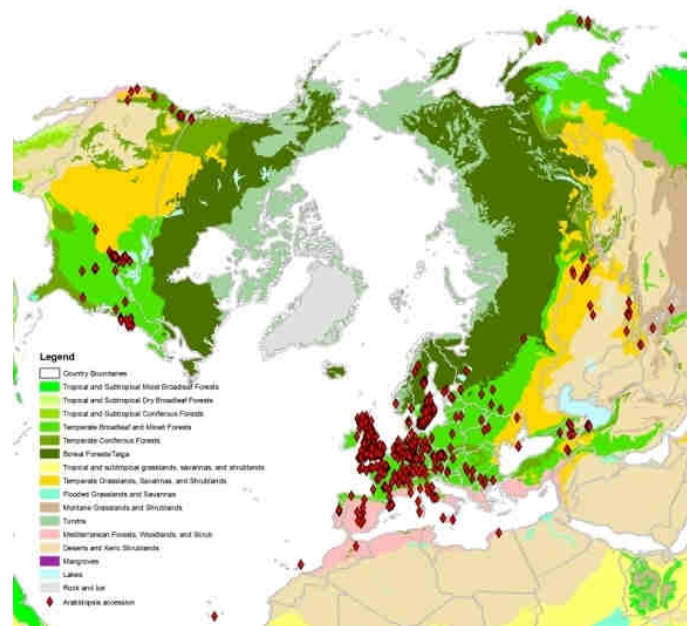
### 1.1. Systématique, historique et généralités d'*Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Columbia (Col), cv. Wassilewskija (Ws), plus communément appelée arabette des dames, arabette de Thalius, *Arabidopsis* de Thalius, arabette rameuse ou encore fausse arabette, est une plante vasculaire de la division des *Magnoliophyta* (angiospermes), de la classe des *Magnoliopsida* (dicotylédones), de l'ordre des *Capparales* et appartenant à la famille des *Brassicaceae* (crucifères).

Selon <http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>, *A. thaliana* a été découverte à la fin du XVI<sup>e</sup> siècle, dans les montagnes du Harz (Nord de l'Allemagne), et décrite par Thal (1588), d'où le nom d'espèce « *thaliana* ». La première étude d'un mutant a été réalisée par Braun (1873). Laibach (1907) a été le premier à publier le nombre correct de 5 chromosomes d'*A. thaliana* et à considérer cette espèce végétale comme un organisme modèle en génétique (Laibach 1943). La première collection de mutants obtenus par

irradiation aux rayons X a été constituée par une étudiante de Laibach, Reinholz (1947). Langridge a joué un rôle important dans l'établissement des propriétés d'*A. thaliana* et de son intérêt lors d'études, en laboratoire, effectuées dans les années 1950 (Langridge 1955a, 1955b, 1957 ; Langridge et Griffing 1959), comme l'a fait Rédei dans les années 1960. Une des contributions importantes de Rédei a été de publier des articles et des ouvrages scientifiques concernant *A. thaliana*, dont l'un particulièrement approfondi (Rédei 1970). Il en a écrit un autre plus facilement consultable (Rédei 1975). Ces études passent en revue certains détails historiques des débuts de l'utilisation, en laboratoire, d'*A. thaliana*. Ce fut le premier génome végétal entièrement séquencé (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Actuellement, *A. thaliana* est un organisme de référence pour la recherche en biologie végétale, comprenant la génétique, l'évolution, la croissance et le développement des plantes à fleurs (Rensink et Buell 2004 ; Coelho et al. 2007 ; Platt et al. 2010).

Selon [http://fr.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis\\_thaliana](http://fr.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana), *A. thaliana* est une plante annuelle originaire d'Europe, d'Asie et du Nord-Ouest de l'Afrique (Blamey et Grey-Wilson 1989 ; Figure 1). D'une taille de 20 à 25 cm de hauteur, ses feuilles vertes sont disposées en rosette à sa base et sont couvertes de petits poils unicellulaires, appelés trichomes. Ses fleurs blanches de 3 mm de diamètre sont disposées en corymbe et formeront des siliques contenant ~50 graines. Son cycle complet de développement est de l'ordre de 6 à 8 semaines. La tige principale, qui produit des fleurs et des siliques, fait son apparition après ~3 semaines.



**Figure 1.** Répartition géographique mondiale des accessions d'*Arabidopsis*. La légende est lisible à la source : <http://borevitzlab.uchicago.edu/Members/gmorris/presentations/arabidopsis-world.jpg/view>

Les raisons du choix d'*A. thaliana* sont nombreuses :

- une petite taille, culture en laboratoire jusqu'à  $\sim 1'000$  plantes·m<sup>-2</sup> ;
- une plante produit  $\sim 40'000$  graines ;
- un cycle de vie (graine → plante → graine) court  $\sim 2$  mois ;
- une capacité à résister et à s'autoféconder ;
- un des plus petits génomes connus chez les angiospermes, la taille du génome a été initialement estimée à  $\sim 125$  Mb (5 chromosomes et 25'498 gènes), mais Bennett et al. (2003) ont estimé qu'elle correspondait à  $\sim 157$  Mb ;
- l'absence d'intérêts économiques facilite l'échange d'informations entre laboratoires.

## **1.2. Potentiels d'action (PA) chez les végétaux**

### **1.2.1. Génération et propagation des PA**

Les PA sont principalement connus dans les tissus excitables d'animaux (nerfs, muscles et épithéliums), mais existent aussi chez les végétaux et les mycètes (Pickard 1973 ; Davies 1987). Le PA est le seul signal à longue distance pouvant être considéré comme un signal électrique « authentique » (Pickard 1973 ; Gradmann et Mummert 1980 ; Simons 1981 ; Ksenzhek et Volkov 1998 ; Davies 2004). Chez les végétaux, il peut être défini comme une dépolarisation transitoire, locale et brève ( $< 40$  s) de la membrane plasmique (MP), obéissant à la loi du « tout ou rien », et s'auto-propageant, sans atténuation d'amplitude et de vitesse, le long de la membrane d'une cellule excitable. Trębacz et al. (2006) précisent qu'un PA peut être généré suite à différents types de stimuli, nuisibles ou non nuisibles au végétal (cf. § 1.2.4.). Dans ce dernier cas, la même zone peut être stimulée de nombreuses fois sans dommages visibles.

Chez les charophytes, la dépolarisation de la MP résulte d'abord de l'influx d'ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol (Hayama et al. 1979), suivi de l'efflux d'ions Cl<sup>-</sup> dans l'apoplaste (Williamson et Ashley 1982 ; Lunevsky et al. 1983). L'amplitude de la dépolarisation dépend de la nature et de l'intensité du stimulus. Lorsqu'elle atteint ou dépasse une valeur minimale, appelée seuil de dépolarisation, elle génère un PA. D'après Davies (2006), l'auto-propagation des PA dépend vraisemblablement de l'ouverture de canaux ioniques, due à des variations du PM. C'est le cas, par exemple, des canaux voltage-dépendants (« voltage-gated ion channels » (VGC) en anglais) qui permettent aux cellules les possédant, la génération et la propagation

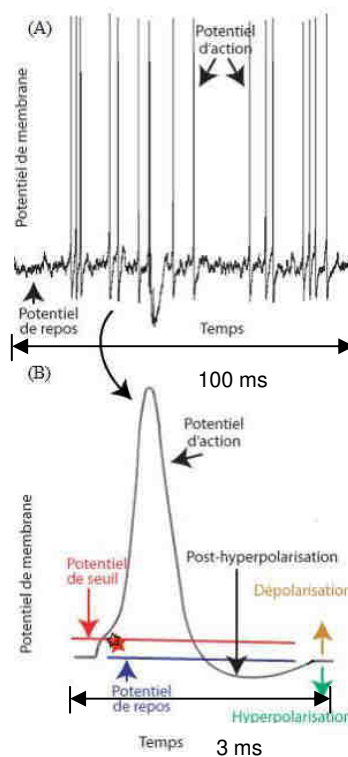
des PA. Des études réalisées chez les charophytes (Wayne 1994) et certains végétaux supérieurs (Tester 1990 ; Fisahn et al. 2004) ont amené à considérer que le VGC initial serait un canal  $\text{Ca}^{2+}$  entraînant, dans le cytosol, une forte augmentation de la concentration cytosolique en ions  $\text{Ca}^{2+}$ , normalement très faible.

Chez les charophytes et les végétaux supérieurs, les PA sont caractérisés par le fait qu'à la différence des PA chez les animaux, la dépolarisation de la MP n'a pas lieu par influx d'ions  $\text{Na}^+$ , mais par efflux d'ions  $\text{Cl}^-$  (Mummert et Gradmann 1991 ; Gradmann 2001 ; Beilby 2007). Chez les végétaux et les animaux, le PM de repos est négatif. La dépolarisation, intervenant lors de l'élicitation d'un PA, représente une diminution de l'amplitude du PM. Le milieu intracellulaire devient moins négatif. En raison de l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  (commun aux PA chez les végétaux et les animaux), pendant la phase de repolarisation, un PA chez les végétaux induit, par conséquent, une perte osmotique de  $\text{KCl}$ , tandis qu'un PA chez les animaux est osmotiquement neutre, lorsque des quantités égales d'influx d'ions  $\text{Na}^+$  et d'efflux d'ions  $\text{K}^+$  s'annulent l'une l'autre.

Les PA sont générés suite à des modifications de la perméabilité des canaux ioniques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) situés dans la MP. Grâce à l'étude des courants ioniques des PA chez les charophytes (Hayama et al. 1979 ; Williamson et Ashley 1982 ; Lunevsky et al. 1983), un mécanisme général a pu être proposé. Chez les végétaux, un PA est divisé en trois phases, basées sur les influx et les efflux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  et  $\text{Cl}^-$  au travers de canaux ioniques spécifiques (dont les VGC) :

- la phase de dépolarisation, correspondant à l'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , entraînant l'influx massif d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol et suivi par l'efflux d'ions  $\text{Cl}^-$  dans l'apoplaste ;
- la phase de repolarisation, relative à l'ouverture des canaux  $\text{K}^+$ , entraînant l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  dans l'apoplaste et suivi par l'influx d'ions  $\text{H}^+$  dans le cytosol ;
- la phase d'hyperpolarisation, répondant à l'efflux d'ions  $\text{K}^+$  en excès et renforçant ainsi la polarité de la MP.

Chez les animaux, la forme générale d'un PA est semblable à celle observée chez les végétaux. Il présente une courbe exponentielle de tension typique, généralement caractérisée par un pic plus ou moins prononcé, suivie d'un retour plus progressif au PM de repos. Pour cette raison, la Figure 2 fait référence à un PA enregistré chez le rat, mais parfaitement applicable à *A. thaliana*. L'allure de l'enregistrement d'un neurone de l'hippocampe de rat, soumis à une stimulation électrique (Figure 2A), est proche de celle d'un enregistrement électrophysiologique extracellulaire chez *A. thaliana*. À la différence de l'échelle de temps du phénomène qui, chez les végétaux, se déroule, par exemple, ~10'000 fois plus lentement chez *A. thaliana*. Les caractéristiques générales des PA (amplitude, durée et vitesse de propagation ; cf. § 2.3.6.), suite à des variations du PM, sont présentées dans la Figure 2B.

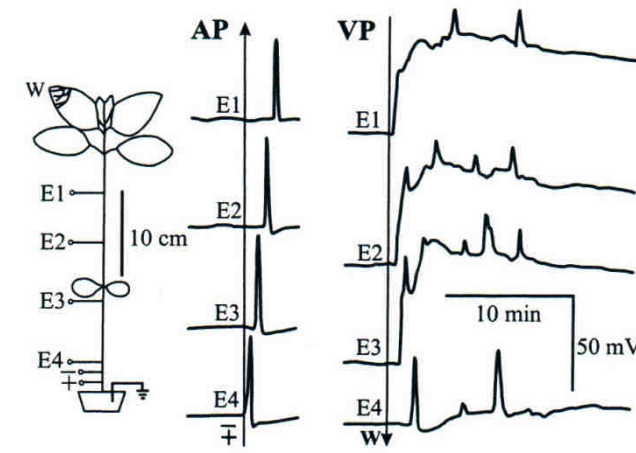


**Figure 2.** (A) Enregistrement, d'une durée de 100 ms, d'un neurone de l'hippocampe de rat soumis à une stimulation électrique. (B) Schéma d'un PA, chez le rat, d'une durée de 3 ms. Figure adaptée à partir de [http://www.apertonote.com/revue/neurone/article\\_80.shtml](http://www.apertonote.com/revue/neurone/article_80.shtml)

Suite à la génération d'un PA, il y a toujours une chute du PM, en dessous du potentiel de repos, appelée hyperpolarisation. Cette période, suivant un PA, est nommée période réfractaire (PR), car il est plus difficile pendant ce temps de stimuler l'organisme, étant donné que son PM est plus éloigné du potentiel seuil et que les gradients de concentration des ions ne sont pas encore rétablis. Deux types de PR peuvent être observés. La PR absolue (PRA) correspond à la période durant laquelle, quelles que soient la nature et l'intensité de la stimulation, il n'y a aucun effet cellulaire. Il n'est donc pas possible d'éliciter un autre PA. La

PR relative (PRR) est la période au cours de laquelle un stimulus, plus puissant que le précédent, peut induire un PA, car le seuil d'excitation est alors très élevé (Paszewski et Zawadzki 1976).

Selon Trębacz et al. (2006), les PA sont caractérisés par un tracé régulier, à l'inverse de celui des PV générés par blessure (Figure 3). La phase de dépolarisation des PA est suivie par des phases plus lentes de repolarisation et d'hyperpolarisation de la MP.



**Figure 3.** Potentiels d'action (AP) et potentiels de variation (VP) enregistrés, dans la tige principale d'*Helianthus annuus* (tournesol), à l'aide d'électrodes extracellulaires, E1-E4. Les PA ont été élicités par stimulation électrique ( $\pm$ ) et les PV ont été induits par blessure (W). Les flèches verticales indiquent le moment où a lieu la stimulation. Les pointes de flèches désignent la direction de propagation de l'onde (d'après Stanković et al. 1998 ; Trębacz et al. 2006).

Eschrich et al. (1988), Fromm et Spanswick (1993), Dziubińska et al. (2001), et Dziubińska (2003) ont indiqué que, chez les végétaux vasculaires, la propagation à longue distance d'un PA a probablement lieu dans les tubes criblés du phloème. De nombreuses analogies structurales ont été observées entre certains tissus d'animaux (axones et épithéliums) et certains tissus de végétaux supérieurs (phloème, tubes criblés et plasmodesmes) comme chez *Aldrovanda*, *Dionaea* et *Conocephalum*, permettant de mieux comprendre le mécanisme de propagation des PA, basé sur la théorie des circuits électriques locaux (Dziubińska 2003).

### 1.2.2. Bref historique des PA

Les premiers PA ont été découverts, chez *D. muscipula*, par Burdon-Sanderson (1873, 1899) qui a mesuré, par stimulation mécanique des poils sensitifs d'une moitié de feuille immobilisée, la différence de tension entre les surfaces adaxiale et abaxiale de l'autre moitié de cette feuille. Darwin (1875, 1896) a, de son côté, constaté une importante analogie entre

l'apparition de PA chez des feuilles de *D. muscipula* stimulées mécaniquement et le mécanisme du réflexe nerveux animal.

Stern (1924), se basant sur le fait que Burdon-Sanderson a empêché les feuilles de *D. muscipula* de se fermer grâce à un harnais, a affirmé l'absence de preuves de connexions directes spécifiques entre le mouvement de fermeture du piège et les PA observés avant et après la fermeture. Hodick et Sievers (1988) ont abouti à des conclusions similaires, à savoir que ce sont toutes les cellules foliaires qui sont impliquées dans le mouvement du piège et qui peuvent générer des PA.

Précédemment, des investigations ont été entreprises chez *Mimosa pudica* (sensitive), nommée ainsi en raison des mouvements d'abaissement de ses feuilles au moindre choc et rendant visible la propagation de l'onde d'excitation. En effet, Kunkel (1878), Haberlandt (1890), Biedermann (1895) et Bose (1906, 1926) ont remarqué qu'après la blessure d'une foliole, des PA apparaissaient parallèlement à ses mouvements.

Brown (1916) a noté que, chez *D. muscipula*, lorsque les stimuli étaient produits une fois toutes les 20 min, 14 stimuli étaient nécessaires avant que le mouvement du piège débute. Di Palma et al. (1961), et Jacobson (1965) ont identifié des fonctions claires comme, par exemple, le mouvement de fermeture du piège serait fonction d'un codage temporel du PA, permettant la capture d'insectes. Sibaoka (1966) a constaté que deux stimuli, séparés de 1 à 25 s l'un de l'autre, étaient requis pour entraîner la fermeture du piège. Simons (1981) a alors émis l'hypothèse que : « les stimuli d'une certaine durée seraient stockés dans une « mémoire » simple, détectant l'accumulation d'une excitation suffisante au niveau du piège, avant de déclencher le mouvement de fermeture. »

Ashida (1935) a détecté, chez *Aldrovanda vesiculosa*, des mouvements similaires de son piège en comparaison à celui de *D. muscipula*, répondant aux mêmes types de stimuli. Lloyd (1942) a supposé que, chez cette dernière espèce, la diminution de la turgescence induite par des PA intervenait lors du mécanisme de fermeture du piège. De plus, Williams (1976) et Sibaoka (1980) ont observé, chez *A. vesiculosa*, des PA générés mécaniquement, précédant une diminution rapide de la turgescence dans l'épiderme interne, permettant à l'épiderme externe de se développer et portant ainsi sur le mouvement des lobes du piège (Ashida 1934).

Sibaoka (1962, 1969, 1991) a indiqué que, chez *M. pudica*, les PA élicités par le toucher se déplacent le long de la feuille et du pétiole dans le pulvinus, où ils peuvent s'arrêter ou être transmis à des organes éloignés, perdant leur turgescence et permettant des mouvements rapides. Fromm et Eschrich (1988) ont démontré que, chez cette espèce, le PA n'était pas seulement impliqué dans le mouvement, mais aussi dans l'exportation des photo-assimilats, présents dans le phloème, des organes sources (feuilles adultes) aux organes puits (graines, racines, tiges, jeunes feuilles, bourgeons, fleurs et fruits).

Benolken et Jacobson (1970) ont remarqué que, chez *D. muscipula*, lorsque la stimulation était suffisante, un PA était induit. Il en est de même chez *Drosera rotundifolia* (drosera à feuilles rondes), où une série de PA a été générée (Williams et Pickard 1972). Dès lors, la fermeture du piège de *D. muscipula* a été considérée comme un modèle, montrant des rôles comparables de PA chez les végétaux et sur des préparations nerf-muscle d'animaux (Simons 1992).

### **1.2.3. Méthodes et techniques électrophysiologiques**

Il existe deux principaux types d'enregistrements électrophysiologiques des cellules végétales : les enregistrements extra- et intracellulaires.

#### *1.2.3.1. Enregistrements extracellulaires*

Les techniques d'enregistrements électrophysiologiques extracellulaires comprennent l'utilisation d'électrodes extracellulaires et la mesure des courants ioniques par microélectrode (MIFE®).

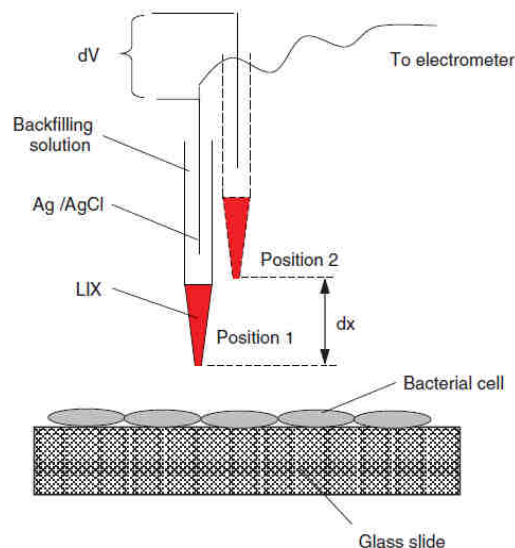
La technique basée sur l'utilisation d'électrodes extracellulaires permet l'étude des signaux électriques dans les tissus de végétaux supérieurs ou dans des cellules géantes d'algues (par exemple : dans les entre-nœuds de charophytes). Zawadzki (1980) a mis une électrode en contact avec le milieu extracellulaire et a ainsi pu enregistrer, chez *Lupinus angustifolius* (lupin bleu), des PA dans de nombreuses petites cellules.

Favre et al. (2001, 2011) ont été les premiers à enregistrer à l'aide d'électrodes extracellulaires des PA, des PA répétitifs et des PV, élicités chez des feuilles adultes d'A.



*thaliana*, suite à un traitement « wound and drop ». Celui-ci consiste à blesser  $\sim 1 \text{ mm}^2$  de la partie distale d'une feuille et à y déposer, après 2 min, 5  $\mu\text{L}$  de KCl 1 M. Préalablement, des mesures extra- et intracellulaires avaient été effectuées chez *Conocephalum conicum* (hépatique à large thalle) et avaient ainsi permis d'induire des PA répétitifs (Zawadzki et Trębacz 1985 ; Favre et al. 1999).

L'autre technique extracellulaire, appelée MIFE<sup>®</sup> (Figure 4) et basée sur l'utilisation d'une microélectrode extracellulaire « vibrant » (se déplaçant d'avant en arrière) pendant une période de quelques secondes près de la surface de la bactérie, du tissu végétal ou du protoplaste, permet l'enregistrement simultané de plusieurs courants ioniques. Depuis 10 ans, cette technique non invasive a permis de réaliser des progrès importants dans la compréhension du fonctionnement des MP végétales (Hush et al. 1992 ; Shabala et al. 1997 ; Shabala 2000 ; Newman 2001 ; Babourina et al. 2002 ; Demidchik et al. 2002, 2003).



**Figure 4.** Schéma de la technique MIFE<sup>®</sup> pratiquée sur des cellules bactériennes. La pointe d'une microélectrode, remplie d'ionophore (LIX), se déplace de façon à former un carré entre deux positions proches d'une monocouche dense de bactéries ou de la surface du biofilm. Un gradient de tension ( $dV$ ) est mesuré par un électromètre entre les deux positions correspondant au déplacement ( $dx$ ). Les flux nets d'ions ( $\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) sont calculés en utilisant les équations de diffusion en géométrie plane (d'après Shabala et al. 2006 ; pour détails cf. Newman 2001).

#### 1.2.3.2. Enregistrements intracellulaires

Les techniques d'enregistrements électrophysiologiques intracellulaires comprennent la mesure du PM en implantant une seule électrode, la technique du « voltage-clamp » à deux électrodes et la technique du « patch-clamp ».

Les observations réalisées par Osterhout (1908), à l'Université d'Harvard, ont permis d'établir la notion de perméabilité sélective de la MP des végétaux. Osterhout et al. (1927) ont effectué par l'implantation d'une microélectrode de verre chez un charophyte, *Valonia macrophysa*, les premières mesures du PM. Dans les années 1930, le PM a été étudié en implantant une électrode dans des cellules géantes de charophytes, par exemple, chez *V. macrophysa*, *Halicystis osterhoutii*, *Nitella flexilis*, *Nitella translucens*, *Chara corallina* et *Nitellopsis obtusa* (passées en revue par Osterhout 1958 ; Hope et Walker 1975).

Plus tard, une meilleure approche de la notion de perméabilité sélective de la MP, dans des processus électrogéniques, a été réalisée. Elle a permis la mise en évidence de canaux ioniques dans les MP végétales. Par exemple, en utilisant cette technique, Ehrhardt et al. (1992) ont découvert que, dans des cellules racinaires de *Medicago sativa* (alfalfa), les facteurs Nod induisaient la dépolarisation de la MP. Kurkdjian et al. (2000), et Ivashikina et al. (2001) ont révélé que cette dépolarisation était la conséquence de l'activation des canaux internes  $K^+$ .

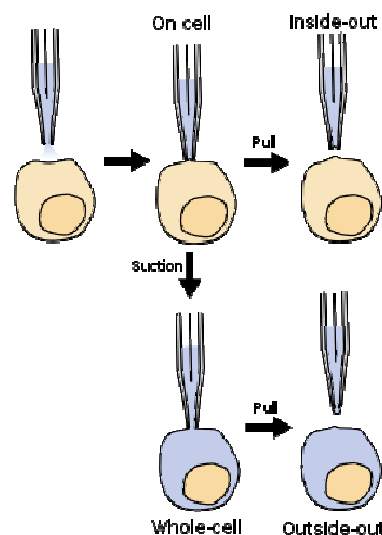
Chez les végétaux, l'origine des courants ioniques est restée incertaine jusqu'aux travaux de Findlay (1961) et Hope (1961) qui utilisèrent la technique du « voltage-clamp » à deux électrodes. Hope a suggéré que, dans les grandes cellules internodales de *Chara australis*, la dépolarisation de la MP, qui a lieu lors de la génération d'un PA, est causée par une augmentation transitoire de la perméabilité de cette membrane aux ions  $Ca^{2+}$ . Cette modification a induit l'influx de ces ions. Cette technique a été précédemment utilisée avec succès en physiologie animale, par Hodgkin et Huxley (1952), pour la création d'un modèle expliquant, dans l'axone géant de calmar, les modes d'élicitation des PA. Elle a l'avantage de maintenir le PM à une valeur fixée par l'expérimentateur. Son intérêt majeur réside dans le fait qu'elle permet de mesurer la quantité de courant ionique à travers la MP, à un moment et à une tension donnés.

La technique du « voltage-clamp » à deux électrodes a permis de caractériser différents types de canaux ioniques :

- des canaux  $Ca^{2+}$  chez *N. flexilis* (Plaks et al. 1979, 1980) et *N. obtusa* (Lunevsky et al. 1983) ;
- des canaux  $Cl^-$  chez *N. flexilis* (Plaks et al. 1979) et *N. obtusa* (Lunevsky et al. 1983) ;

- des canaux  $K^+$  chez *N. flexilis* (Sokolik et Yurin 1981, 1986) ;
- des canaux cationiques non sélectifs chez *N. flexilis* (Yurin et al. 1991).

Selon <http://fr.wikipedia.org/wiki/Patch-clamp>, la technique du « patch-clamp » (Figure 5) a été mise au point par Neher et Sakmann (1976), qui ont reçu pour cela le Prix Nobel de physiologie et médecine en 1991. Cette technique consiste à mettre en continuité électrique une micropipette de verre (~1  $\mu\text{m}$ ), remplie d'une solution ionique qui forme un contact à haute résistance, appelé « gigaohm seal », avec la MP d'une cellule vivante isolée. Elle permet d'étudier les mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques d'une cellule prise individuellement, en permettant le suivi en direct des phénomènes d'ouverture des canaux. Il existe quatre configurations de « patch-clamp » : « cell-attached », « whole-cell », « inside-out » et « outside-out ». Les configurations « whole-cell » et « outside-out » sont les plus fréquemment utilisées pour étudier les courants ioniques chez les végétaux.



**Figure 5.** Schéma présentant les quatre configurations de la technique du patch-clamp pratiquée avec la MP d'une cellule vivante isolée. Source : [http://en.wikipedia.org/wiki/Patch\\_clamp](http://en.wikipedia.org/wiki/Patch_clamp)

La technique du « patch-clamp » a été initialement utilisée dans les cellules végétales. Par exemple, Moran et al. (1984), et Schroeder et al. (1984) ont permis de mettre en évidence deux types de canaux ioniques,  $Ca^{2+}$  et  $K^+$ . Par la suite, l'étude de végétaux supérieurs, avec cette technique, a été réalisée par de nombreux chercheurs (Hedrich et Schroeder 1989 ; Tester 1990 ; Tyerman et Schachtman 1992 ; Barkla et Pantoja 1996 ; Tanner et Caspari 1996 ; White 1998 ; Tyerman et Skerrett 1999 ; Zimmermann et al. 1999 ; Demidchik et al. 2002 ; Véry et Sentenac 2002, 2003 ; White et Broadley 2003 ; Scholz-Starke et al. 2005). La

technique du « patch-clamp » a aussi été combinée à des techniques d'imagerie (Taylor et al. 1997 ; Pei et al. 2000) et à la technique extracellulaire MIFE® (Tyerman et al. 2001).

#### **1.2.4. Génération de PA en fonction de la nature du stimulus**

Chez les végétaux, les PA sont généralement générés suite à différents types de stimuli non nuisibles : électrique, mécanique, transitions lumière/obscurité et obscurité/lumière, bref refroidissement, pollinisation... Dans une moindre mesure, ils peuvent aussi être élicités par des stimuli nuisibles : une blessure seule ou une blessure avec le dépôt de 5 µL de KCl 1 M. Dû au fait que ces deux méthodes de stimulation induisent des PA, mais également des PV, elles ne seront pas traitées ici (cf. § 1.3.).

##### *1.2.4.1. Stimulation électrique*

Auger (1939) a été le premier à générer électriquement des PA chez *N. translucens*. Plus tard, Sibaoka (1969) a élicité des PA, chez *M. pudica*, par stimulation électrique. De la même manière, Paszewski et Zawadzki (1973, 1974, 1976) ont induit, chez des pousses de *L. angustifolius*, des PA présentant des similitudes avec ceux produits dans les nerfs, avec cependant une vitesse de propagation plus lente. Chez cette espèce, les PA sont transmis le long de la tige, mais ne pénètrent pas dans les feuilles et les racines (Zawadzki 1980). Favre et Degli Agosti (2007) ont été les premiers à enregistrer à l'aide d'électrodes extracellulaires des PA, générés chez des feuilles adultes d'*A. thaliana*, suite à une stimulation électrique.

##### *1.2.4.2. Stimulation mécanique*

Kishimoto (1968) a été le premier à générer mécaniquement des PA chez *Chara*. Ce processus a entraîné la formation d'un potentiel récepteur, réplique électrique du stimulus appliqué. Une fois le seuil de dépolarisation atteint, un PA a été observé. Il avait la même forme que les PA élicités électriquement. Kishimoto a aussi remarqué qu'un certain nombre de stimuli, en dessous du seuil, contribuaient à induire des PA. Zimmermann et Beckers (1978) ont constaté qu'une pression croissante ou décroissante génèrerait des PA. Plus tard, Shimmen (1996, 1997a, b, c) a entrepris une étude plus détaillée de la stimulation mécanique chez les charophytes. Dans leur environnement naturel (pluie, courants d'eau, animaux terrestres et aquatiques), un stimulus mécanique est la source d'excitation la plus probable.

Jusqu'à présent, l'étude de PA, chez *A. thaliana*, générés par stimulation mécanique, a fait l'objet d'une seule publication (Favre 2004). Dans cette manipulation, 56 feuilles d'*A. thaliana* (Col) ont été mesurées à l'aide d'électrodes extracellulaires, parmi lesquelles 28 feuilles (50%) n'ont pas élicité de PA, suite à 1 à 3 frottements de pinceau. Dans cette étude, nous démontrons qu'il suffit de toucher délicatement une feuille d'*A. thaliana*, pour qu'elle induise un PA, à la condition qu'elle soit excitable.

#### 1.2.4.3. Transitions lumière/obscurité et obscurité/lumière

D'après Favre (2004), la brusque variation de l'intensité lumineuse, produite par l'extinction (transition lumière/obscurité) et par l'enclenchement (transition obscurité/lumière) des néons équipant la cage de Faraday, a permis de générer des PA chez les feuilles adultes des végétaux supérieurs étudiés (*A. thaliana*, *Spinacia oleracea* (épinard) et *C. conicum*), mais pas chez *Chenopodium rubrum* (chénopode rouge), alors qu'ils pourraient être élicités spontanément (Lehner 2003). Ces observations divergentes pourraient être dues à différentes conditions de mesure, à différents stades végétatifs, et à la présence ou non d'un « stress » biotique ou abiotique. Les résultats de Favre (2004) sont en accord avec les mesures des biopotentiels, chez les végétaux supérieurs, effectuées par Lüttge et Pallaghy (1969). Lorsque les potentiels générateurs induits par la lumière sont suffisamment élevés, ils peuvent entraîner le dépassement du seuil de dépolarisation et la génération de PA (Trębacz et Zawadzki 1985 ; Favre et al. 1999).

#### 1.2.4.4. Bref refroidissement

Pyatygin et al. (1992) ont été les premiers à générer des PA, chez *Cucurbita pepo* (courgette), par une diminution de la température. La nature des modifications, en dessous du seuil de dépolarisation, a été étudiée, dans des cellules souches parenchymateuses de cette espèce, lors de l'élicitation de PA par refroidissement graduel (de 23 à 10°C). Dans les cellules excitables, la dépolarisation de la MP est principalement caractérisée par une diminution de l'activité de la pompe H<sup>+</sup>-ATPase. Cette dernière est dépendante des variations thermiques, agissant sur la structure de la matrice lipidique de la MP. Sur la base des résultats obtenus, une séquence de changements, en dessous du seuil, a été suggérée, dans laquelle des réarrangements structuraux de lipides membranaires induits thermiquement généraient des PA. Król et al. (2003) ont mesuré à l'aide de microélectrodes intracellulaires des PA, chez *C. conicum*,

obéissant à la loi du « tout ou rien », suite à une baisse soudaine de la température. Toutefois, Król et al. (2004) ne sont pas parvenus à éliciter des PA, chez *A. thaliana*, *Helianthus annuus* (tournesol) et *Vicia faba* var. *minor* (féverole), car toutes les cellules du mésophylle examinées étaient inexcitables. Néanmoins, cette baisse de la température a permis d'induire des variations du PM, appelées « cold-induced potential changes ». Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces plantes utiliseraient des flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , provenant de l'apoplaste et de réserves internes, pour entraîner la dépolarisation de la MP induite thermiquement.

#### 1.2.4.5. Pollinisation

Fromm et al. (1995) ont observé, dans le style de fleurs d'*Hibiscus rosa-sinensis* (hibiscus rose de Chine), deux types de variations du PM impliquées dans le processus de pollinisation. Premièrement, le dépôt de pollen sur les lobes stigmatiques, chez *Lilium martagon* (lis martagon) et *Incarvillea grandiflora* (incarvillée à grandes fleurs), a permis à Sinyukhin et Britikov (1967) de mesurer, après quelques minutes, un PA dans le style. De plus, ils ont constaté que l'irritation mécanique d'un lobe stigmatique, chez *I. grandiflora*, entraînait la génération d'un PA non transmis à l'ovaire et la fermeture des lobes. Deuxièmement, la pollinisation, dans le style de fleurs de *Lilium longiflorum* (lis de Pâques), effectuée par Spanjers (1981) lui a permis d'enregistrer, 5 à 6 h plus tard, des variations du PM. Lorsque le pollen déposé avait été préalablement chauffé à 150°C ou qu'il appartenait à d'autres espèces végétales, il n'apparaissait aucun signal électrique.

Fromm et al. (1995) ont étudié les premières réactions du métabolisme ovarien, en mesurant différents métabolites, 10 min après avoir stimulé le stigmate du pollen, par une blessure ou par un choc thermique. L'autopollinisation et la pollinisation croisée ont entraîné une augmentation transitoire du taux de respiration ovarienne, mesurée 3 à 5 min après que le stigmate ait été stimulé.

### 1.3. Autres types de signaux électriques chez les végétaux

Les végétaux présentent d'autres types de signaux électriques que les PA. Parmi ceux-ci, on observe distinctement les PV, aussi appelés « slow wave potentials » (Stahlberg et Cosgrove 1996, 1997), les « voltage transients » (Pickard 1984a, b ; Król et Trębacz 1999), les « rhythmic electrical activities » (Davies 1987, 2004 ; Davies et al. 1991) et, plus récemment, les SPs (Zimmermann et al. 2009).

#### 1.3.1. Potentiels de variation

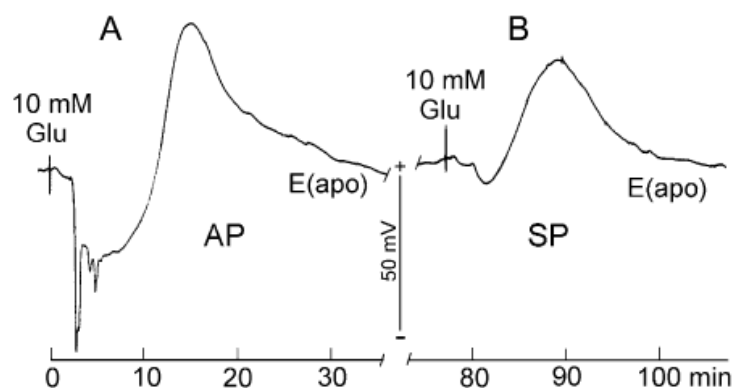
Houwink (1935) a défini, chez *M. pudica*, le PV comme une dépolarisation transitoire, locale et relativement brève (> 1 min) de la MP, le plus souvent induite par un stimulus nuisible à la plante (par exemple : une blessure) et semblant résulter de la libération d'une hormone non identifiée (le facteur de Ricca) dans le flux de transpiration. Contrairement aux PA, les PV sont des signaux électriques propres aux végétaux, non auto-propageables, et ne se conformant pas aux caractéristiques de la loi du « tout ou rien ». La forme de la courbe de tension est extrêmement variable (d'où le nom de « potentiel de variation »), souvent composée de nombreux petits pics superposés sur un potentiel lent hyper- ou dépolarisant. Un PV peut générer un PA, au fur et à mesure de sa propagation, bien que seul le PV soit capable d'être transmis par le pulvinus, régénérant un PA de l'autre côté. De cette manière, un stimulus produit par une blessure peut être transmis dans toute la plante (Houwink 1935 ; Sibaoka 1953). Des PV et des PA, induits par blessure, ont également été détectés chez *Mimosa spegazzinii* (Umrath 1928) et *Mimosa diplotricha* (grande sensitive ; Umrath 1931).

Davies et al. (1991), Malone (1994, 1996) et Mancuso (1999) ont indiqué que, chez les végétaux supérieurs, la propagation d'un PA sur une longue distance se produirait d'abord dans les tubes criblés du phloème, tandis que le PV serait transmis par le xylème. À la différence d'un PA qui est autonome et qui est une variation du PM, un PV est une modification locale du PM résultant de la transmission d'autres signaux et d'une augmentation rapide de la turgescence (Malone 1994, 1996 ; Malone et al. 1994a, b ; Stanković et al. 1998 ; Mancuso 1999). Cependant, le PV doit être dû à des flux d'ions à travers la MP, ne passant pas par des VGC qui génèreraient un PA. Puisque les PV dépendent probablement de canaux ioniques (à l'exception des VGC), la première explication concernant les variations de la pression hydraulique, dans le xylème, doit être fondée sur la

présence de canaux mécanosensitifs, tandis que la deuxième reposant sur la présence de produits chimiques, dans le xylème, doit être basée sur l'existence de canaux activés par un ligand.

### 1.3.2. System potentials (potentiels systèmes)

Les premiers types de signaux électriques à longue distance, observés chez les végétaux, ont été des PA et des PV. Zimmermann et al. (2009) ont mis en évidence un nouveau type de signal électrique, appelé « system potential » (SP). Ce dernier, induit par la dépolarisation de la MP, se propageait systématiquement (par exemple : de feuille à feuille), variant en fonction de la nature et de l'intensité du stimulus initial, à la différence d'un PA (Figure 6). De plus, puisque la direction initiale du signal était une hyperpolarisation (en rapport avec l'intérieur de la cellule), un SP ne pouvait pas non plus être considéré comme un PV (Stahlberg et Cosgrove 1997). Zimmermann et al. (2009) ont prouvé qu'il pouvait être généré et transmis systématiquement par la blessure de feuilles, avec le dépôt de cations inorganiques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) ou de composés organiques (glutamate (Glu)). Des SPs ont été enregistrés chez *Hordeum vulgare* (orge commune), *V. faba* (fève ou féverole), *Nicotiana tabacum* (tabac), *Phaseolus lunatus* (haricot de Lima) et *Zea mays* (maïs).



**Figure 6.** Signaux systémiques apoplastiques typiques (potentiel d'action : AP et « system potential » : SP) enregistrés successivement chez une feuille d'*H. vulgare*. (A) Suite à la blessure d'une feuille, du glutamate (Glu) 10 mM a été déposé. Un PA a été mesuré, chez une feuille distante (distance d'enregistrement de 33 cm), à l'aide d'une microélectrode placée dans la chambre sous-stomatique d'un stomate ouvert. (B) Après que le site de stimulation foliaire ait été rincé avec de l'« artificial apoplastic fluid » (KCl 2 mM et  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM, pH 5), un deuxième dépôt de Glu a été effectué. Il n'a pas généré un PA, mais une hyperpolarisation, un SP. E(apo) : flux apoplastique (d'après Zimmermann et al. 2009).

Le Tableau 1 présente la comparaison des principales caractéristiques observées lors de la génération de PA, PV et SPs. Les PA obéissent à la loi du « tout ou rien » et véhiculent peu d'informations sur la nature et l'intensité du stimulus. À l'inverse, les SPs, par la modulation



de leur amplitude et de leurs courants ioniques, permettent aux végétaux d'obtenir des informations sur la nature et l'intensité de la menace ou de la blessure. D'après Zimmermann et al. (2009), ils représentent un type de signal électrique auto-propageable se produisant régulièrement, lorsque le PM de repos est considérablement déplacé de sa valeur initiale, suite à une blessure avec le dépôt d'un stimulus chimique, entraînant des changements d'activité de la pompe H<sup>+</sup>-ATPase. Les informations transmises concernent une variation de la tension, mais aussi des changements d'activités de canaux ioniques des deux côtés de la MP. Les variations de pH modifient les activités enzymatiques et l'expression génique. Suite à des variations du flux d'ions K<sup>+</sup>, il se produit une sortie d'eau et une modification de la turgescence. Suite à l'influx d'ions Ca<sup>2+</sup>, une augmentation de la concentration cytosolique en ions Ca<sup>2+</sup> libres et une modulation des voies de signalisation ont été observées.

**Tableau 1.** Comparaison des principales caractéristiques observées lors de la génération de PA, PV et SPs (d'après Zimmermann et al. 2009).

Characteristic	APs	VPs	SPs
Induction	Voltage threshold	Rapid turgor increase	Plasma membrane depolarization
Propagation	Self-propagating	Non-self-propagating	Self-propagating
Rate	20–400 cm min <sup>-1</sup>	10 s to several minutes	5–10 cm min <sup>-1</sup>
Mechanism	Activation of ion channels (Ca <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> )	Inactivation of the H <sup>+</sup> pump	Activation of the H <sup>+</sup> pump
Ion movements and ΔV	Ca <sup>2+</sup> triggers Cl <sup>-</sup> efflux and ΔV	Causalities unclear	Ion movements follow voltage
Direction	Depolarization	Depolarization	Hyperpolarization
Duration of initial voltage change	<20 s	10 s to several minutes	8–12 min
Signal	All or none	Graded signals of variable size	Signals depend on stimulus

#### 1.4. Mécanismes de l'accumulation et du transport des ions K<sup>+</sup> chez les végétaux

Dans cette étude, nous nous intéresserons à l'implication éventuelle, dans la génération de PA chez *A. thaliana*, du canal AKT2 appartenant à la famille des canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendants (Kv) de type Shaker. Pour cela, deux mutants AKT2 (fond génétique Ws Montpellier) seront utilisés pour les mesures, l'un inactivant l'expression du gène *AKT2* (AKT2-KO ; cf. § 2.2.1.) et l'autre favorisant l'efflux d'ions K<sup>+</sup> (AKT2-S210N-S329N (AKT2-DM) ; cf. § 2.2.1.). Il nous paraît ici utile de développer quelques aspects de la littérature sur les différentes familles de canaux Kv, et plus particulièrement celle des canaux K<sup>+</sup> de type Shaker.

##### 1.4.1. Caractéristiques générales des transporteurs K<sup>+</sup>

Depuis les travaux menés par Epstein et al. (1963), des progrès importants dans l'analyse du transport des ions K<sup>+</sup> chez les végétaux, tant au niveau moléculaire que physiologique, ont été

réalisés. L'achèvement du séquençage du génome d'*A. thaliana*, accession Col (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000), a permis à Ward (2001) d'établir un inventaire de tous les transporteurs protéiques présents chez cette espèce. Sept principales familles de transporteurs de cations (75 gènes au total), servant de médiateurs de transport des ions  $K^+$  à travers les MP végétales, ont été identifiées par Mäser et al. (2001), Véry et Sentenac (2002, 2003), et Shabala (2003). Il s'agit des : (i) canaux  $K^+$  de type Shaker (9 gènes) ; (ii) canaux  $K^+$  à deux pores (6 gènes) ; (iii) « cyclic nucleotide-gated (CNG) channels » (20 gènes) ; (iv) antiports putatifs  $K^+/H^+$  (6 gènes) ; (v) transporteurs KUP/HAK/KT (13 gènes) ; (vi) transporteur HKT1 (1 gène) ; (vii) récepteurs au glutamate (20 gènes). De plus, Schachtman et al. (1997) ont identifié, dans des feuilles et des racines de *Triticum aestivum* (blé tendre), un transporteur de faible affinité perméable aux ions  $K^+$  (LCT1).

#### **1.4.2. Caractéristiques de base et modes de contrôle des canaux $K^+$ de type Shaker**

Benzer (1971) et son équipe de recherche ont étudié, à l'Institut Technologique de Californie, les rapports entre gènes et comportement chez *Drosophila melanogaster* (mouche du vinaigre). Les drosophiles, présentant une mutation du gène *Shaker*, s'agitaient (« to shake » en anglais) frénétiquement, lors d'une anesthésie à l'éther, ce qui reflétait une perte de leur contrôle moteur et un défaut de certains neurones moteurs, dont la durée du PA était anormalement prolongée. Les canaux  $K^+$  de type Shaker identifiés, chez *A. thaliana*, grâce aux études de Mäser et al. (2001), l'ont aussi été chez d'autres végétaux supérieurs (Véry et Sentenac 2003). Il existe d'importantes similitudes entre ces canaux et les canaux  $K^+$ , présents chez les animaux, identifiés chez *D. melanogaster*. La comparaison des propriétés fonctionnelles de ces canaux suggère, grâce aux travaux de Véry et Sentenac (2002), qu'ils sont actifs sur le PM, à des concentrations en ions  $K^+$  de l'ordre du millimolaire, et qu'ils servent de médiateurs de nombreux courants  $K_v$  sélectifs aux ions  $K^+$ , sous l'influence de la conductance de la MP des ions  $K^+$  ( $g_K$ ), à un PM hyper- ou dépolarisé.

Véry et Sentenac (2003) ont réparti les canaux  $K^+$  de type Shaker, en fonction de leur dépendance à la tension, en trois groupes fonctionnels :

- les canaux à rectification entrante, activés par hyperpolarisation de la MP depuis un seuil plus négatif que le potentiel d'équilibre des ions  $K^+$  ( $E_k^+$ ) et impliqués dans l'influx d'ions  $K^+$  ;
- les canaux à faible rectification entrante, également activés par hyperpolarisation de la MP et impliqués dans l'influx et l'efflux d'ions  $K^+$  ;

- les canaux à rectification sortante, activés à une valeur du PM plus positive que celle d' $E_K^+$  et impliqués dans l'efflux d'ions  $K^+$ .

Chez *A. thaliana*, il existe neuf canaux  $K^+$  de type Shaker, dont les rôles physiologiques et l'expression fonctionnelle sont divers. Les canaux AKT1, SKOR, KAT1 et SPIK ont été les plus étudiés.

Bertl et al. (1994) ont montré que l'activation du canal AKT1 reposait sur une hyperpolarisation de la MP. Son expression se situe au niveau racinaire (Lagarde et al. 1996). Hirsch et al. (1998) ont prouvé son rôle dans l'influx d'ions  $K^+$ , à condition que la concentration externe de ces ions soit dans la gamme du millimolaire et que la valeur du PM soit suffisamment négative.

Gaymard et al. (1998), et Lacombe et al. (2000a) ont étudié, dans le tissu stellaire de la racine, l'expression du canal SKOR et, dans le xylème, le rôle qu'il joue dans l'efflux d'ions  $K^+$ .

Szyroki et al. (2001) ont été les premiers à démontrer, lors de l'ouverture stomatique, la participation du canal KAT1 dans l'influx d'ions  $K^+$ . Toutefois, ce canal n'est pas essentiel. Ceci est probablement dû à la redondance, dans les cellules de garde, des canaux à rectification entrante (Pilot et al. 2001).

Mouline et al. (2002) se sont intéressés, dans le pollen, au rôle du canal SPIK impliqué spécifiquement dans l'influx d'ions  $K^+$  et ont montré sa participation dans le développement optimal du tube pollinique et la capacité concurrentielle du pollen.

Les cinq autres canaux  $K^+$  de type Shaker ont fait l'objet d'études limitées.

Deeken et al. (2000), et Lacombe et al. (2000b) ont émis l'hypothèse que le canal AKT2 serait impliqué dans le transport d'ions  $K^+$  à longue distance via le phloème. Dennison et al. (2001) ont démontré que, dans les cellules du mésophylle, ce canal associé à AKT1 jouait un rôle important dans la perméabilité de la MP aux ions  $K^+$ .

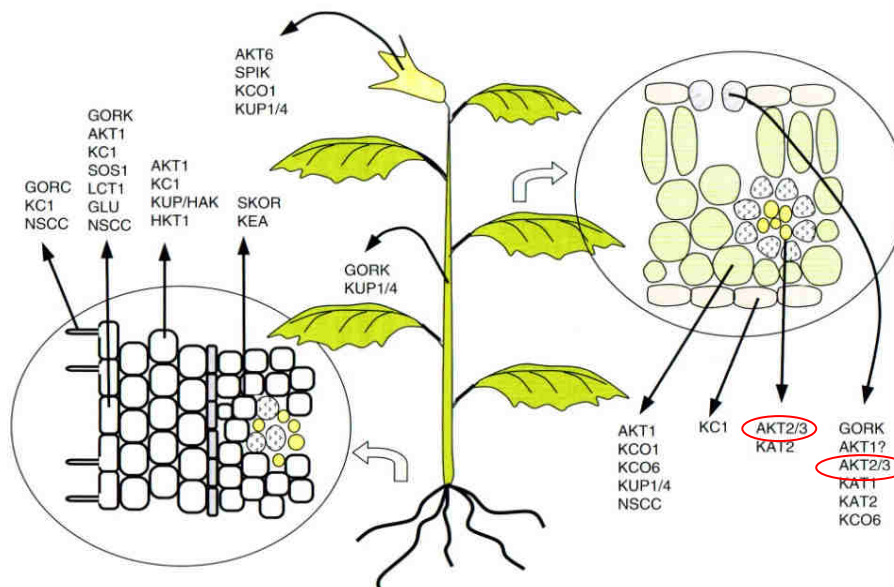
Pilot et al. (2001) ont mis en lumière, lors de l'ouverture stomatique, le rôle du canal KAT2 associé au canal KAT1 dans l'influx d'ions  $K^+$ .

Ache et al. (2001), et Hosal et al. (2003) ont démontré que, lors de la fermeture stomatique, le canal GORK était le médiateur de l'efflux d'ions  $K^+$ . Ivashikina et al. (2001) ont étudié son expression au niveau des poils absorbants et son rôle probable dans l'osmorégulation.

Dans les cellules périphériques de la racine, l'expression du canal AtKC1 a été établie par Ivashikina et al. (2001), et Pilot et al. (2003).

Dans les cellules des fleurs, l'expression du canal AKT6 a été établie grâce aux travaux de Lacombe et al. (2000b).

La Figure 7 présente la localisation de l'expression tissulaire spécifique des transporteurs  $K^+$  chez les végétaux.



**Figure 7.** Localisation de l'expression tissulaire spécifique des transporteurs  $K^+$  chez les végétaux. La plupart des données proviennent d'expériences menées chez *A. thaliana*, bien que les résultats chez d'autres espèces végétales soient également inclus. À l'exception des canaux KCO, tous les autres transporteurs mentionnés sont susceptibles d'être exprimés dans la MP (d'après Cuin et Shabala 2006).

#### 1.4.2.1. Localisation et modes d'ouverture du canal AKT2

De nombreux chercheurs tels que Lacombe et al. (2000b) pensent que le gène *AKT2* serait exprimé dans les cellules de garde et les cellules du mésophylle. Le mésophylle pourrait être le lieu de la transmission des signaux aux feuilles, lors d'une agression mécanique localisée ou par un agent pathogène (Wildon et al. 1992 ; Herde et al. 1996).

D'après les études de Deeken et al. (2000), Lacombe et al. (2000b), et Pilot et al. (2003), le gène *AKT2* s'exprimerait aussi dans le phloème, tissu symplasmique réticulé, assurant la distribution des nutriments dans toute la plante, des organes sources aux organes puits. Le phloème pourrait être le tissu conducteur de la signalisation électrique chez les végétaux (Fromm et Bauer 1994).

Suite aux travaux de Dennison et al. (2001), le canal *AKT2* a été proposé pour assurer le transport des ions  $K^+$  nécessaire à la croissance du mésophylle, ainsi que l'exportation des ions  $K^+$  et photo-assimilats des cellules du mésophylle au phloème (Marten et al. 1999 ; Lacombe et al. 2000b ; Deeken et al. 2002).

Michard et al. (2005) ont démontré que :

*« Les canaux AKT2 pourraient constituer un troisième « pool » silencieux, en plus des « pools » formés par les canaux du 1er mode d'ouverture (NDT : se comportant comme des courants  $K^+$  rectifiants entrants ; Michard et al. 2005) et par ceux du 2ème mode d'ouverture (NDT : responsables des courants de fuite sélectifs aux ions  $K^+$  ; Michard et al. 2005). Des effecteurs spécifiques de l'activité de la protéine kinase A (PKA) modifient la distribution des canaux AKT2 au sein de ces trois « pools », suggérant que les transitions entre ces « pools » dépendent de l'état de phosphorylation des canaux AKT2. De plus, la phosphorylation de l'AKT2 par la PKA est voltage-dépendant. Enfin, deux sites (S210 et S329) de phosphorylation par la PKA ont été identifiés comme étant conservés chez des canaux AKT2 clonés à partir d'autres espèces végétales. Des canaux AKT2, portant des mutations ponctuelles sur ces sites, ont été caractérisés, démontrant que la phosphorylation des deux sites par la PKA est impliquée dans la transition de l'AKT2 d'un mode d'ouverture à l'autre. »*

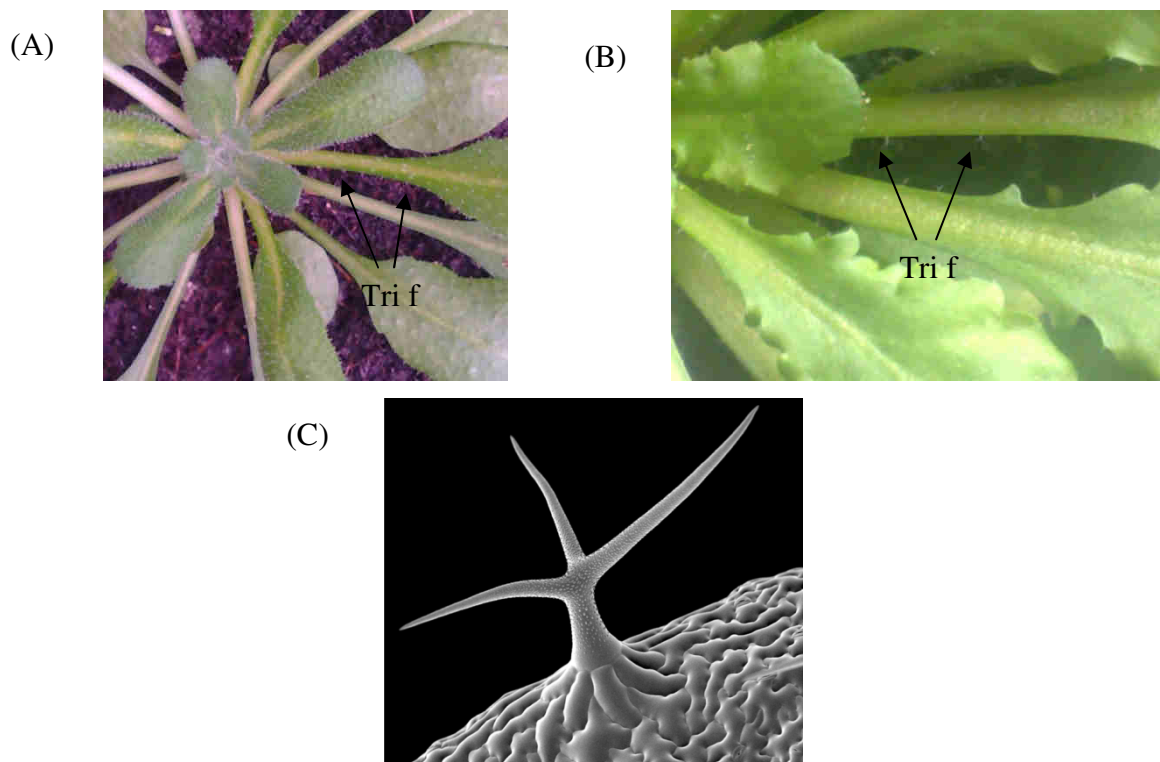
Selon Michard et al. (2005), le canal *AKT2* régulerait l'excitabilité membranaire des cellules végétales. L'état de phosphorylation du canal *AKT2* servirait au transport des ions  $K^+$ , par influx ou par efflux. À l'état phosphorylé, le canal *AKT2* (principalement lié au 2ème mode d'ouverture) se comporterait comme un courant de fuite ou comme les canaux de base, présents dans les cellules animales, censés empêcher les variations du PM (Lesage 2003). À l'état déphosphorylé, le canal *AKT2* (principalement lié au 1er mode d'ouverture, aussi appelé mode silencieux) ne jouerait plus ce rôle. Ainsi, comme les canaux de base décrits dans les cellules animales (Bockenhauer et al. 2001) ou comme un stimulateur cardiaque (Macri et al. 2002 ; Proenza et al. 2002), le gène *AKT2* pourrait être un modulateur de l'excitabilité membranaire des cellules végétales, avec une possibilité de finalisation de cette modulation fine par l'état de phosphorylation du canal.

## 1.5. Trichomes d'*Arabidopsis thaliana*

Comme expliqué précédemment, chez *D. muscipula*, la présence de poils sensitifs serait liée à la génération de PA. Dans cette étude, nous nous intéresserons au rôle éventuel, lors de l'élicitation de PA, des trichomes foliaires d'*A. thaliana*. Pour cela, un double mutant Glabra N2259 (Glabra-DM, fond génétique Col Missouri (MO) ; cf. § 2.2.1.), quasiment dépourvu de trichomes à la surface des feuilles et des tiges, sera utilisé pour les mesures. Il convient ici de décrire brièvement la formation des trichomes et les mutations affectant leur développement. Le germoplasme Glabra N2259 possède respectivement des mutations sur deux gènes, *glabrous1* (*gll*), éliminant la plupart des trichomes foliaires, et *root hair defective2* (*rhd2*), empêchant l'élongation des poils racinaires.

### 1.5.1. Développement et distribution foliaires

Marks (1994) a décrit, chez *A. thaliana*, la formation de poils ou trichomes (Figure 8) à la surface de l'épiderme des organes aériens (tiges et feuilles) et souterrains (racines) comme un exemple de la différenciation de cellules isodiamétriques protodermiques.



**Figure 8.** (A) Trichomes foliaires (Tri f) d'*A. thaliana* accession Col Genève. (B) Trichomes foliaires (Tri f) d'*A. thaliana* Glabra-DM (Col Missouri). (C) Trichome à la surface de l'épiderme foliaire d'*A. thaliana*, observé par microscopie électronique à balayage cryogénisée (cryo-SEM ; échelle non indiquée). Source : [http://www.plantrichome.org/trichomedb/images/Arabidopsis\\_thaliana\\_trichome.png](http://www.plantrichome.org/trichomedb/images/Arabidopsis_thaliana_trichome.png)

Les trichomes d'*A. thaliana* ont été étudiés par Marks (1994). Ce sont des cellules individuelles hautement spécialisées, se développant à l'extérieur de l'épiderme. À la surface de l'épiderme foliaire, les trichomes sont généralement ramifiés en trois ou quatre branches. Ils se forment précocement sur la face adaxiale, lorsque les cellules de l'épiderme (formé par le protoderme) sont en mitose. L'initiation des trichomes s'effectue par l'augmentation de la taille des cellules et des noyaux. Elle est suivie par l'allongement des cellules, perpendiculairement au plan de la feuille, la formation de ramifications et la maturation des parois cellulaires des trichomes. L'initiation des trichomes est basipète. Elle se produit de la partie distale des feuilles en développement à leur base (Hülkamp et al. 1994 ; Marks 1994 ; Larkin et al. 1996).

### **1.5.2. Mutations génétiques**

Chez les végétaux, le développement des trichomes a représenté, pour plusieurs chercheurs (Oppenheimer et al. 1992 ; Hülkamp et al. 1994), un modèle d'étude de la différenciation cellulaire. Certaines mutations génétiques, affectant le développement des trichomes d'*A. thaliana*, ont été isolées (Lee-Chen et Steinitz-Sears 1967 ; Feenstra 1978 ; Koornneef et al. 1982 ; Haughn et Somerville 1988 ; Hülkamp et al. 1994 ; Marks et Esch 1994). Ces analyses génétiques ont identifié cinq gènes impliqués dans les étapes précoces du développement des trichomes. Les mutations d'un des deux gènes, *gll* ou *transparent testa glabra (ttg)*, ont pratiquement éliminé tous les trichomes présents à la surface de l'épiderme de la tige d'*A. thaliana* (Koornneef et al. 1982). Ces deux gènes sont essentiels à l'initiation des trichomes. Des triples mutants « knock-out » (KO) des gènes *gll*, *rhd2* et *ttg* produisent des plantes complètement glabres (Koornneef et al. 1982 ; Schiefelbein et Somerville 1990 ; Oppenheimer et al. 1991), d'où le nom de « mutant Glabra ».

## **1.6. Objectif de l'étude et plan de recherche**

### **1.6.1. Objectif de l'étude**

Cette étude a pour objectif de compléter les observations menées chez *A. thaliana*, concernant sa capacité à générer d'authentiques PA. En effet, des travaux ont déjà montré que des PA sont élicités et transmis par la blessure de feuilles adultes, avec le dépôt de 5 µL de KCl 1 M (Favre et al. 2001, 2011), d'une part et d'autre part, par stimulation électrique (Favre et Degli

Agosti 2007). Dans les deux cas cités, la sensibilité/excitabilité chez l'accession Col Genève était la plus élevée. Nous nous proposons ici d'examiner si un « stress » abiotique, tel qu'une stimulation mécanique (toucher), est aussi un facteur permettant de générer, de façon reproductible, des PA, chez trois accessions (Col Genève, Ws Genève et Ws Montpellier) et trois mutants (Glabra-DM (Col Missouri), AKT2-KO et AKT2-DM (Ws Montpellier)) d'*A. thaliana*, d'une part et d'autre part, d'étudier leurs modes d'élicitation (excitabilité feuille (e1) et transmissibilité pétiole (e2)) et leurs caractéristiques (amplitudes, durées de dépolarisation (e1 et e2), vitesse de propagation d'e1 à e2, répartition horaire diurne et périodes réfractaires absolue et relative). L'excitabilité e1 correspond au nombre de feuilles ayant généré un ou plusieurs PA divisé par le nombre de feuilles mesurées. La transmissibilité e2 fait référence au nombre de feuilles ayant propagé un ou plusieurs PA divisé par le nombre de feuilles excitables. Afin d'expliquer le rôle éventuel, dans la sensibilité, des trichomes d'*A. thaliana*, une analogie sera faite entre l'accession Col Genève et Glabra-DM. Nous comparerons également les accessions Ws (Ws Genève vs. Ws Montpellier) entre elles et l'accession Ws Montpellier avec des mutants du canal AKT2 (AKT2-KO et AKT2-DM), impliqués dans le maintien du PM chez cette espèce. Les canaux AKT2 sont à rectification entrante ou sortante chez le type sauvage (WT), inactifs chez AKT2-KO et à rectification sortante chez AKT2-DM (Dreyer et al. 2001 ; Michard et al. 2005 ; Gajdanowicz et al. 2011). L'étude des PA induits portera aussi sur l'importance de la distance entre la zone de toucher foliaire et le centre de la rosette. La sensibilité de la face abaxiale des feuilles d'*A. thaliana* sera également testée. Grâce à l'étude d'un système intra-plante (différentes feuilles choisies chez une même plante), la possibilité et les modalités d'une propagation interfoliaire (entre les feuilles mesurées) des PA seront étudiées.

### **1.6.2. Plan de recherche**

La première partie de l'étude (cf. § 3.3.) concerne l'étude des PA, chez trois accessions (Col Genève, Ws Genève et Ws Montpellier) et trois mutants (Glabra-DM (Col Missouri), AKT2-KO et AKT2-DM (Ws Montpellier)) d'*A. thaliana*, générés par un toucher, de la face adaxiale, distant de ~38 mm du centre de la rosette. Elle est basée sur quatre thèmes expérimentaux : présence ou quasi-absence de trichomes foliaires (Col Genève vs. Glabra-DM) ; accessions Genève (Col Genève vs. Ws Genève) ; accessions Ws (Ws Genève vs. Ws Montpellier) ; accession Ws Montpellier vs. mutants du canal AKT2 (AKT2-KO et AKT2-DM). Dans cette partie, la répartition horaire diurne est analysée. La deuxième partie (cf. §



3.4.) est relative à la détermination de la période réfractaire des PA élicités, chez l'accension Col Genève, par double stimulation mécanique. La troisième partie (cf. § 3.5.) repose sur l'étude des PA induits par un toucher distant de ~59 mm du centre de la rosette. La quatrième partie (cf. § 3.6.) se base sur l'étude des PA générés par un toucher de la face abaxiale. La dernière partie (cf. § 3.7.) met en exergue la diversité des systèmes inter-plantes et intra-plante, chez *A. thaliana* (Col Genève et Ws Genève), par l'étude des modes d'élicitation des PA et de leurs caractéristiques.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Conditions de culture du matériel végétal

Les graines des accessions et des mutants d'*A. thaliana* ont d'abord été semées dans une barquette de semis, remplie de terreau traité au Trigard<sup>®</sup> et au Previcur<sup>®</sup> N. Elles ont été mises 2 jours en chambre froide (4°C) pour lever la dormance, puis ont été placées 2 semaines en chambre de culture (phytotron de Sciences 3, Université de Genève ; Figure 9) pour la germination et le développement des plantules. Elles ont ensuite été repiquées individuellement dans un pot ( $L \times l \times H = 9 \text{ cm} \times 9 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ ) de terreau et cultivées (arrosage 2 fois·semaine<sup>-1</sup>) pendant 4 à 6 semaines supplémentaires. Les conditions de culture sont les suivantes : photopériode lumière:obscurité (L:D 8:16 h), tubes fluorescents : Osram Lumilux 58 W, PAR :  $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , T :  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  et rH :  $73 \pm 2\%$  (Favre et al. 2011).



**Figure 9.** Chambre de culture thermo- et hygro-régulée du matériel végétal (phytotron).

## 2.2. Matériel végétal

Trois accessions (Col Genève, Ws Genève et Ws Montpellier) et trois mutants (Glabra-DM, AKT2-KO et AKT2-DM) d'*A. thaliana* ont été utilisés pour les mesures.

### 2.2.1. Provenance des graines

Les graines d'*A. thaliana* accession Col Genève (Col-0) ont été initialement obtenues à partir d'un don du Dr Maarten Koornneef (Wageningen Agricultural University, NL) au Dr Philippe Tacchini (Université de Genève), qui les a ensuite mises à disposition du Département de Botanique et Biologie Végétale de l'Université de Genève. Les graines d'*A. thaliana* accession Ws Genève ont été commandées sur le site Web du Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC) : [http://arabidopsis.info/StockInfo?NASC\\_id=915](http://arabidopsis.info/StockInfo?NASC_id=915). Les graines d'*A. thaliana* Glabra-DM (Col Missouri (MO)), fournies par le Dr John W. Schiefelbein (University of Michigan, USA ; Schiefelbein et Somerville 1990), ont été commandées sur le site Web du NASC : [http://arabidopsis.info/StockInfo?NASC\\_id=2259](http://arabidopsis.info/StockInfo?NASC_id=2259) (Figure 10) et ont été initialement obtenues par le Dr George P. Rédei (Université du Missouri-Columbia, MO, USA).



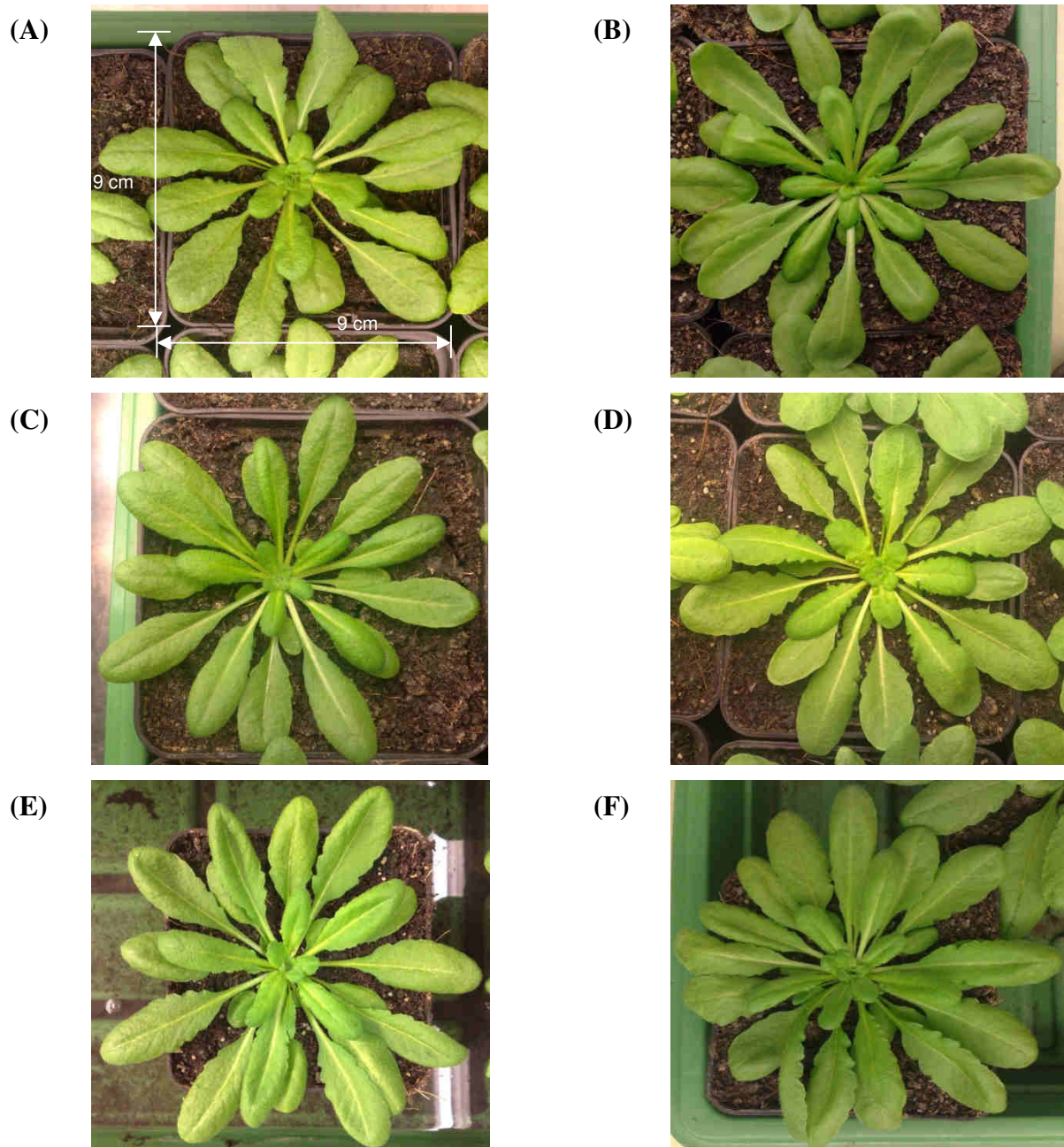
**Figure 10.** Racine d'*A. thaliana*, sans poils absorbants, correspondant au germoplasme Glabra N2259 (échelle non indiquée). Source : [http://arabidopsis.info/ImageInfo?NASC\\_id=N2259&photo\\_no=1](http://arabidopsis.info/ImageInfo?NASC_id=N2259&photo_no=1)

Les graines d'*A. thaliana* accession Ws Montpellier, ainsi que celles des mutants AKT2-KO et AKT2-DM (Ws Montpellier) ont été fournies gracieusement par le Dr Jean-Baptiste Thibaud (CNRS/INRA, Montpellier, France). AKT2-KO désigne un mutant « knock-out » (allèle *akt2-1* inactif) résultant de l'insertion d'un ADN de transfert, dans le 3ème exon du gène *AKT2* (Dennison et al. 2001 ; Gajdanowicz et al. 2011), et n'exprimant pas la protéine AKT2. AKT2-DM (AKT2-S210N-S329N), favorisant l'efflux d'ions  $K^+$ , correspond à AKT2-KO complété avec un gène recombinant actif mutagénisé sur les deux sites (S210 et S329) de phosphorylation par la PKA (Michard et al. 2005 ; Gajdanowicz et al. 2011). Les

graines d'*A. thaliana* AKT2-DM (Ws Montpellier) testées étaient un mélange de graines issues d'une même plante. Les graines des accessions et des mutants d'*A. thaliana* ont été amplifiées (produites en plus grand nombre) et cultivées à Sciences 3, Université de Genève.

### 2.2.2. Accessions et mutants

La Figure 11 présente les différentes accessions et mutants d'*A. thaliana*, âgés de  $\sim 51 \pm 2$  j.



**Figure 11.** Différentes accessions et mutants d'*A. thaliana*, âgés de  $\sim 51 \pm 2$  j et cultivés en chambre de culture (phytotron) en photopériode L:D (8:16 h). (A) Col Genève. (B) Glabra-DM (Col Missouri). (C) Ws Genève. (D) Ws Montpellier. (E) AKT2-KO (Ws Montpellier). (F) AKT2-DM (Ws Montpellier).

## 2.3. Méthodes et acquisition de données

### 2.3.1. Appareils de mesure

#### 2.3.1.1. Chambre de mesure

Les plantes adultes des accessions et des mutants d'*A. thaliana*, mesurées à un stade végétatif (âgées de  $\sim 45 \pm 2$  j à  $\sim 53 \pm 3$  j), ont d'abord été transférées du phytotron à la chambre de mesure thermo- et hygro-régulée, située au Laboratoire de Physiologie Végétale. Elles ont ensuite été installées dans une cage de Faraday (Figure 12), se trouvant dans la chambre de mesure, pour être expérimentées après 15 à 96 h d'acclimatation (Favre et Degli Agosti 2007).



**Figure 12.** Cage de Faraday comprenant une enceinte à 7 tubes fluorescents (Sylvania Luxline Plus 18 W, non visible sur la photographie) et une enceinte de mesure, où sont installées les plantes mesurées. Ces deux enceintes sont isolées par une plaque de Plexiglas™.

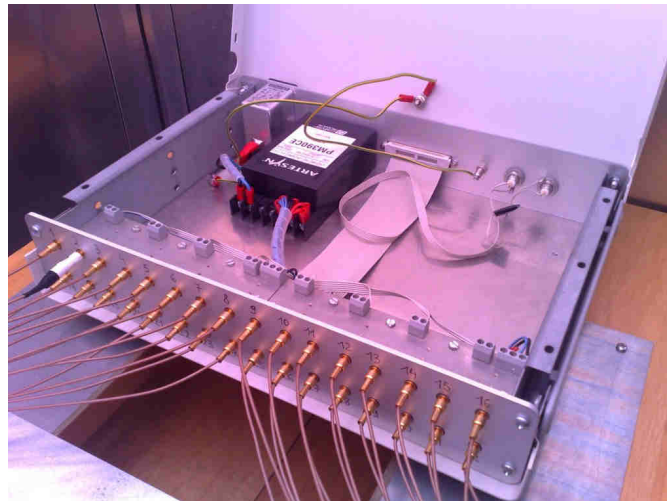
#### 2.3.1.2. Cage de Faraday

Les plantes ont été mesurées dans les conditions suivantes : photopériode L:D (8:20 h), tubes fluorescents : Sylvania Luxline Plus 18 W, PAR :  $115 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , T :  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  et rH :  $57 \pm 5\%$  (Favre et al. 2011). La cage de Faraday est reliée à la masse électrique, différente du réseau électrique standard (50 Hz ; Favre 2004), et isole des champs électromagnétiques.

#### 2.3.1.3. Électromètre INA116U différentiel à haute impédance

L'électromètre (Figure 13) possède une impédance de  $10^{15} \Omega$ , délivrée grâce aux 16 puces électroniques INA116U (Burr-Brown Corporation, Tucson, AZ, USA) fixées à un circuit imprimé (pour détails cf. fiche technique sur le site Web :

<http://focus.ti.com/lit/ds/sbos034/sbos034.pdf>), assurant la connexion aux 32 entrées SMB (16 entrées +/-) et à la broche de sortie reliée à l'ordinateur. Chaque puce a pour fonction de mesurer un très faible courant (haute impédance) par le calcul électronique de la différence de potentiel électrique entre l'entrée + et la masse, en contact avec la plante (par exemple : dans le terreau du pot ; max. 1 V), soustraite à la valeur du potentiel électrique entre l'entrée - et la masse. L'électromètre INA116U a été mis au point en collaboration avec Olivier Guinnard (GAP-Optique, Université de Genève ; Favre 2004).



**Figure 13.** Électromètre INA116U différentiel à haute impédance (boîtier ouvert).

#### *2.3.1.4. Électrodes de mesure et de référence*

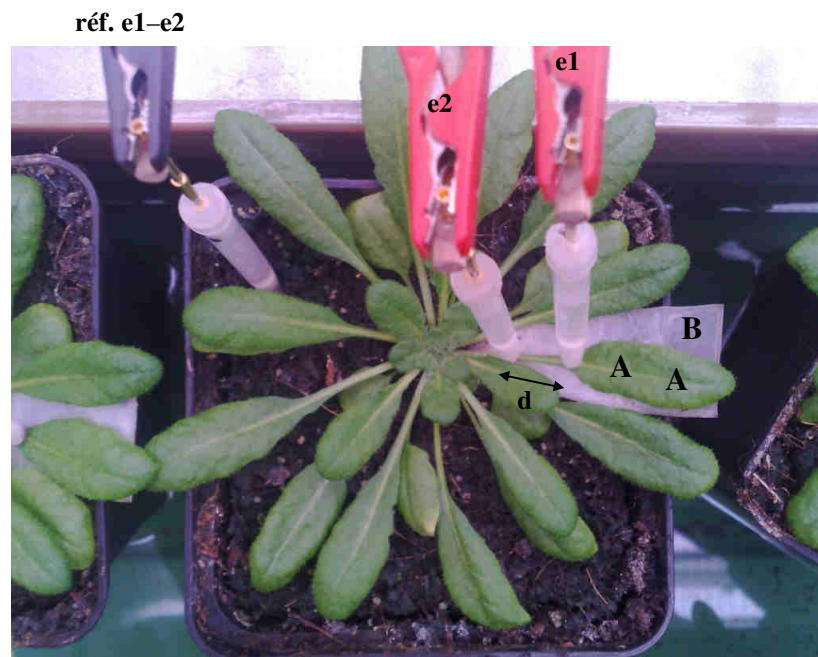
Les électrodes de mesure (e1-e8) et de référence (réf.) sont des senseurs, non invasifs, permettant la mesure extracellulaire du potentiel de surface d'un ensemble de cellules (Figures 14-18). Le contact (interface) est établi avec un morceau de coton ( $\varnothing$  2 mm). Ce dernier est imbibé d'une solution électrophysiologique (KCl 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, sorbitol 50 mM et MES/Tris 2mM, pH 6.8) contenue dans un microtube Eppendorf, dans lequel un fil en argent chloruré Ag/AgCl ( $\varnothing$  0.125 mm) est immergé. L'électrode de référence est plantée dans le terreau du pot et représente la terre électrique (Favre et al. 2001, 2011).



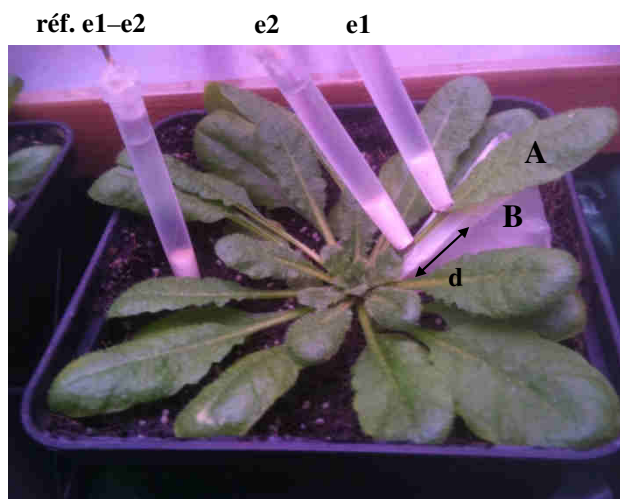
### 2.3.2. Positionnement des électrodes

Une fois les électrodes de mesure et de référence placées, les plantes adultes ont été libérées de toute contrainte physique, pendant au moins 15 h, et installées pour être mesurées durant au maximum 4 jours consécutifs. Les plantes sélectionnées possédaient  $\sim 13 \pm 1$  feuilles adultes ( $L \geq 40-72$  mm, pétiole inclus ;  $l = 15-20$  mm). Les expériences ont été réalisées chez un maximum de 8 feuilles adultes par plante.

Dans un système inter-plantes (feuilles choisies chez différentes plantes), 8 plantes maximum peuvent être mesurées successivement, à raison d'une feuille par plante. Deux électrodes de mesure sont disposées sur la nervure centrale d'une feuille, isolée du terreau par un support en plastique dur recouvert de Parafilm<sup>®</sup> « M » (American National Can<sup>™</sup>, Greenwich, CT, USA ; Figures 14-15). La première électrode (feuille : e1) a été placée entre l'extrémité du pétiole et le début de la feuille, et la deuxième (pétiole : e2) a été positionnée sur le pétiole, à proximité du centre de la rosette.

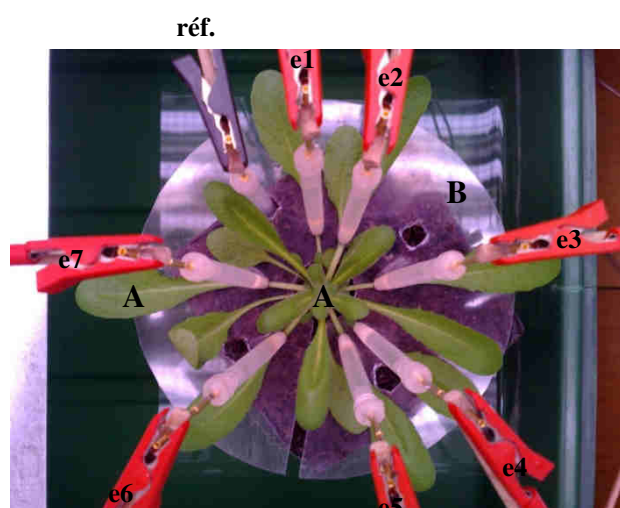


**Figure 14.** Installation sur une plante adulte d'*A. thaliana* (Col Genève), âgée de  $\sim 51 \pm 2$  j, des électrodes de référence (réf. e1-e2) et de mesure (e1 et e2), placées le long du pétiole d'une feuille adulte ( $L \geq 40-72$  mm, pétiole inclus ;  $l = 15-20$  mm) non blessée. (A) Zone où a lieu la stimulation mécanique par un toucher, de la face adaxiale, distant de  $\sim 38$  mm (114 feuilles) ou distant de  $\sim 59$  mm (30 feuilles) du centre de la rosette. La distance moyenne (d) sur 114 feuilles qui sépare les électrodes est de  $\sim 14 \pm 2$  mm. (B) Support en plastique dur recouvert de Parafilm<sup>®</sup> « M ». Il est utilisé pour assurer la rigidité et la stabilité des électrodes lors de la mesure, mais aussi pour isoler la feuille du terreau du pot. La longueur totale moyenne des 114 feuilles adultes mesurées est de  $\sim 68 \pm 3$  mm. Chaque plante possède  $\sim 13 \pm 1$  feuilles adultes. Ce système est abrégé sous les noms « inter » et « distant », car le toucher est réalisé sur des feuilles choisies chez différentes plantes ou de façon plus distante ( $\sim 59$  mm du centre de la rosette) par rapport au témoin ( $\sim 38$  mm ; cf. Figures 31 et 47).

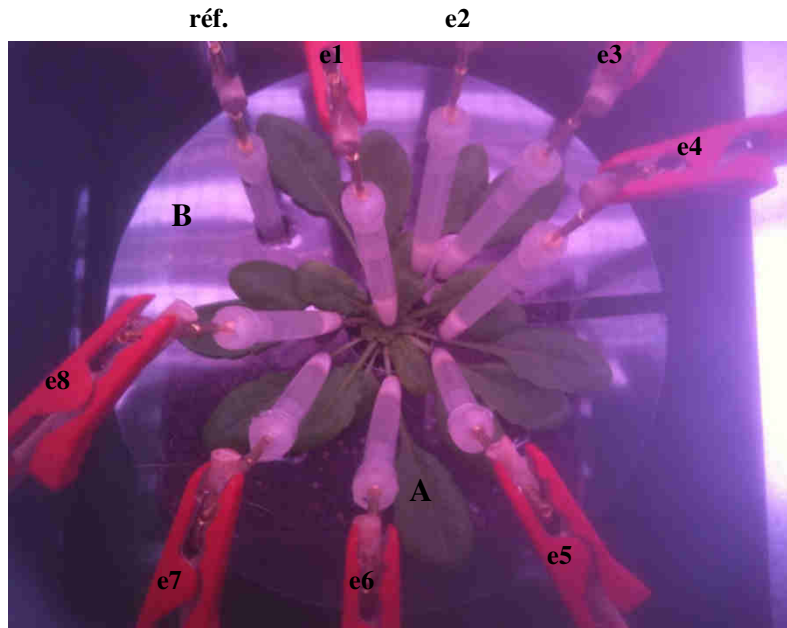


**Figure 15.** Installation sur une plante adulte d'*A. thaliana* (Col Genève), âgée de  $\sim 53 \pm 3$  j, des électrodes de référence (réf. e1-e2) et de mesure (e1 et e2), placées le long du pétiole d'une feuille adulte ( $L \geq 40-72$  mm, pétiole inclus ;  $l = 15-20$  mm) non blessée. (A) Zone où a lieu la stimulation mécanique par un toucher de la face abaxiale. La distance moyenne (d) sur 20 feuilles qui sépare les électrodes est de  $\sim 11 \pm 2$  mm. (B) Support en plastique dur recouvert de Parafilm® « M ». La longueur totale moyenne des 20 feuilles adultes mesurées est de  $\sim 69 \pm 3$  mm. Chaque plante possède  $\sim 13 \pm 1$  feuilles adultes. Ce système est abrégé sous le nom « ab », car le toucher est réalisé sur la face abaxiale des feuilles choisies chez différentes plantes (cf. Figure 48).

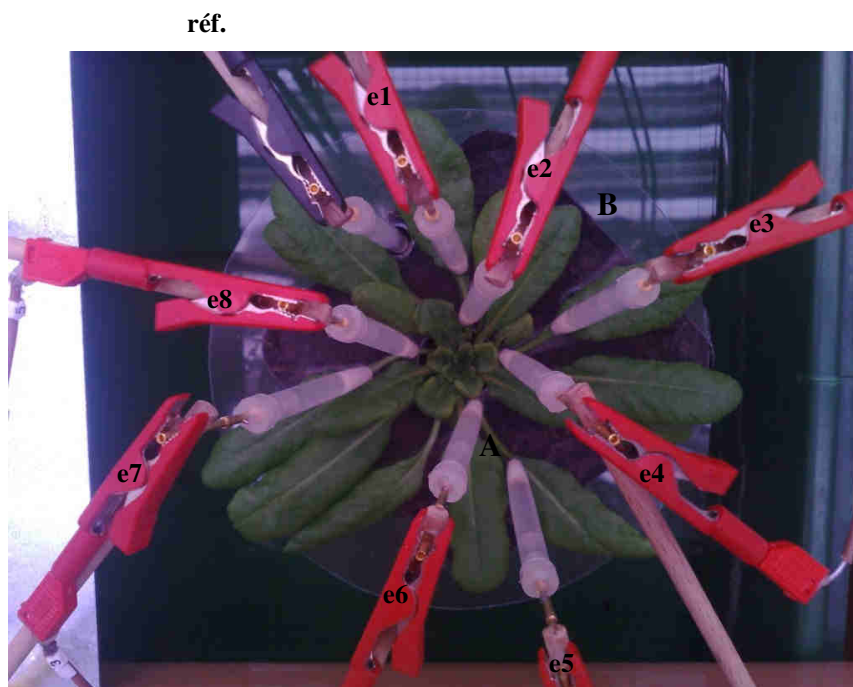
Dans un système intra-plante (différentes feuilles choisies chez une même plante, afin d'observer une éventuelle propagation interfoliaire des PA), 1-2 plantes peuvent être mesurées successivement, avec un maximum de 8 feuilles par plante. Les 8 électrodes de mesure (e1-e8), reliées aux canaux 1-8, sont placées sur les pétioles, à proximité du centre de la rosette, de feuilles adultes (cf. différentes expériences présentées dans les Figures 16-18).



**Figure 16.** Installation sur une plante adulte d'*A. thaliana* (Ws Genève), âgée de  $\sim 46 \pm 3$  j, des électrodes de référence (réf.) et de mesure (e1-e7), placées sur les pétioles, à proximité du centre de la rosette, de feuilles adultes ( $L \geq 40-72$  mm, pétiole inclus ;  $l = 15-20$  mm) non blessées. (A) Zones où ont lieu la stimulation mécanique par un toucher distant de  $\sim 38$  mm du centre de la rosette, d'une part et d'autre part, au centre de la rosette. (B) Support en plastique dur. La longueur totale moyenne des 70 feuilles adultes mesurées est de  $\sim 62 \pm 7$  mm. Chaque plante possède  $\sim 12 \pm 1$  feuilles adultes (dont 57% ont pu être étudiées). Ce système est abrégé sous les noms « intra » et « centre », car le toucher est réalisé sur des feuilles choisies ou au centre de la rosette chez une même plante (cf. Figures 49 et 54).



**Figure 17.** Installation sur une plante adulte d'*A. thaliana* (Col Genève), âgée de  $\sim 45 \pm 2$  j, des électrodes de référence (réf.) et de mesure (e1-e8), placées au centre de la rosette et sur les pétioles, à proximité du centre de la rosette, de feuilles adultes ( $L \geq 40-72$  mm, pétiole inclus ;  $l = 15-20$  mm) non blessées. (A) Zone où a lieu la stimulation mécanique par un toucher distant de  $\sim 38$  mm du centre de la rosette. (B) Support en plastique dur. La longueur totale moyenne des 83 feuilles adultes mesurées est de  $\sim 48 \pm 5$  mm. Chaque plante possède  $\sim 10 \pm 1$  feuilles adultes (dont 75% ont pu être étudiées). Ce système est abrégé sous le nom « rosette », car une électrode est disposée au centre de la rosette. Le toucher est réalisé sur différentes feuilles choisies chez une même plante (cf. Figure 59).



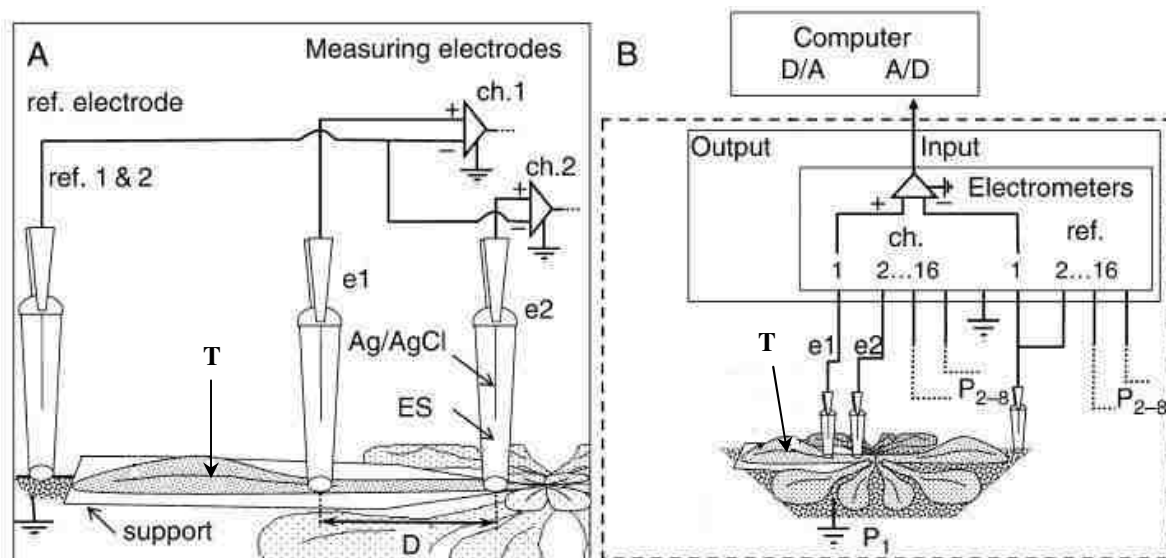
**Figure 18.** Installation sur une plante adulte d'*A. thaliana* (Col Genève), âgée de  $\sim 51 \pm 1$  j, des électrodes de référence (réf.) et de mesure (e1-e8), placées le long des pétioles de 3-4 feuilles adultes ( $L \geq 40-72$  mm, pétiole inclus ;  $l = 15-20$  mm) choisies au hasard et non blessées. (A) Zone où a lieu la stimulation mécanique par un toucher au centre du pétiole. (B) Support en plastique dur. La longueur totale moyenne des 35 feuilles adultes mesurées est de  $\sim 68 \pm 3$  mm. Chaque plante possède  $\sim 13 \pm 1$  feuilles adultes. Ce système est abrégé sous le nom « pétiole », car le toucher est réalisé au centre du pétiole des différentes feuilles choisies chez une même plante (cf. Figure 63).



### 2.3.3. Stimulation mécanique

Pour se décharger de l'électricité statique du corps, un bracelet électrostatique a été porté au poignet de l'expérimentateur et a été relié à la masse électrique. Cela a permis de limiter l'enregistrement du bruit de fond, dû à l'utilisation de l'électromètre INA116U et aux perturbations du réseau électrique.

La méthode de stimulation mécanique (Figure 19) consiste à réaliser délicatement, avec un pinceau, un toucher (T), de la face adaxiale d'*A. thaliana*, distant de ~38 mm du centre de la rosette.



**Figure 19.** Schéma de l'installation du système de stimulation mécanique (toucher) et de mesure chez *A. thaliana*. (A) La feuille examinée est déposée sur un support en plastique dur recouvert de Parafilm® « M ». La première électrode (feuille : e1) a été placée entre l'extrémité du pétiole et le début de la feuille (canal 1 : ch. 1). La deuxième électrode (pétiole : e2) a été positionnée sur le pétiole, à proximité du centre de la rosette (canal 2 : ch. 2). Elles sont disposées symétriquement par rapport à l'électrode de référence (ref. 1 & 2), plantée dans le terreau du pot. La distance (D) entre e1 et e2 est mesurée pour chaque feuille étudiée comme indiqué. Les électrodes extracellulaires sont réalisées avec un morceau de coton (Ø 2 mm), tassé à l'extrémité d'un microtube Eppendorf sectionné. La surface de contact (interface) avec la plante est ~7 mm<sup>2</sup>. Le microtube est rempli avec une solution électrophysiologique (ES ; KCl 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, sorbitol 50 mM et MES/Tris 2mM, pH 6.8), dans lequel un fil en argent chloruré Ag/AgCl (Ø 0.125 mm) est immergé. Ici et généralement, un toucher (T), de la face adaxiale d'*A. thaliana*, distant de ~38 mm du centre de la rosette, est réalisé. (B) Schéma de l'installation générale du système. Le système de stimulation mécanique et de mesure prend place dans une cage de Faraday (carré en pointillés), sauf pour la carte d'acquisition AD/DA reliée à l'ordinateur. 16 circuits intégrés amplificateurs permettent de mesurer le potentiel électrique, entre les électrodes de mesure et l'électrode de référence, par rapport à la masse électrique (symbole terre). Chaque électrode de mesure et son électrode de référence (ch. 1-16 et ref. 1-16), à partir de 1 à 8 plantes (P<sub>1-8</sub>), sont reliées à l'électromètre INA116U (par exemple : ch. 1 et ref. 1), envoyant le signal sur le canal approprié de la carte A/D (entrée). Deux sorties de la carte D/A fournissent des tensions analogiques à partir de données numériques programmées dans l'interface utilisateur. Le toucher (T) a été effectué successivement sur des feuilles choisies chez un maximum de 8 plantes [pointillés : connexion avec les autres plantes (P<sub>2-8</sub>) par rapport à la plante modèle (P<sub>1</sub>)]. Figure adaptée à partir de Favre et Degli Agosti (2007).

La Figure 20 présente le type de pinceau utilisé dans la plupart des expériences.



**Figure 20.** Pinceau plat (largeur 9 mm) à poils durs.

Pour des raisons pratiques, le même type pinceau a aussi été adapté en fonction des expériences réalisées (par exemple : un toucher de la face abaxiale (Figure 21) ; un toucher au centre de la rosette (Figure 22)).



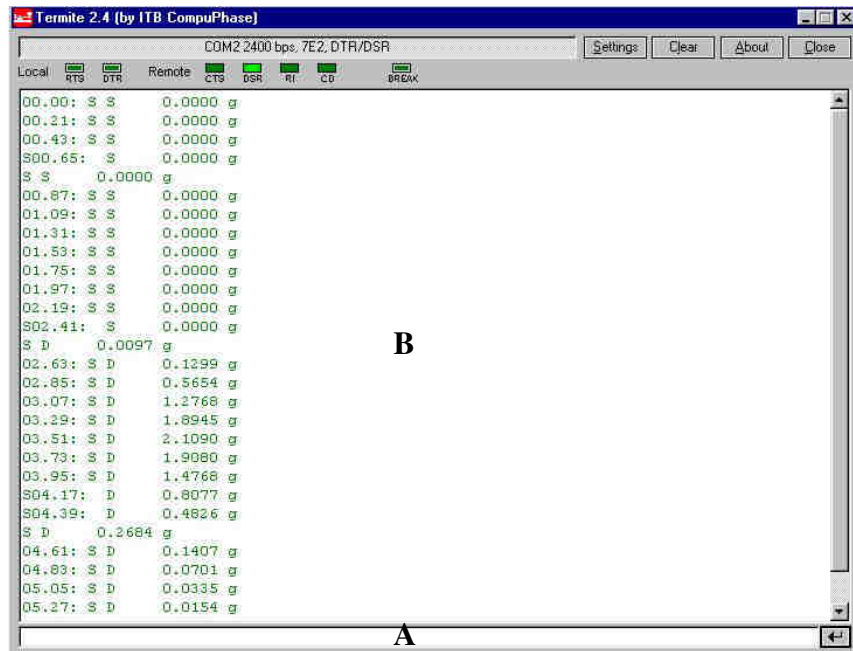
**Figure 21.** Pinceau plat (largeur 9 mm) à poils durs.



**Figure 22.** Pinceau plat (largeur 4 mm) à poils durs.

### *2.3.3.1. Quantification du toucher*

L'intensité du toucher a été évaluée grâce à l'utilisation de l'application Termite 2.4 (ITB CompuPhase, NL, © 2006-2010), reliée à une balance analytique Mettler-Toledo AG204 DeltaRange<sup>®</sup> (Greifensee, CH). Ce programme libre d'accès permet d'utiliser et de configurer facilement la connexion série RS232. Il emploie une interface semblable à celle des programmes de messagerie, une ligne d'édition pour dactylographier les instructions à transmettre et une grande fenêtre qui contient toutes les données reçues (Figure 23). Cet utilitaire est facile d'installation (éventuellement avec des paramètres préconfigurés) en utilisant une recherche heuristique pour le port COM approprié. Les données ont été copiées-collées dans un éditeur de texte (bloc-notes) et enregistrées au format .txt. La masse maximale de chacun des 100 touchers réalisés a été importée dans le tableur Microsoft<sup>®</sup> Excel 97.



**Figure 23.** Interface configurée de l'application Termite 2.4. (A) Ligne d'édition pour dactylographier les instructions à transmettre. (B) Grande fenêtre contenant toutes les données reçues.

### 2.3.4. Ordinateur dédié et carte d'acquisition AD/DA

L'ordinateur Hewlett-Packard (Figure 24), dédié aux enregistrements électrophysiologiques extracellulaires, possède les spécifications techniques suivantes : microprocesseur Intel<sup>®</sup> Pentium<sup>®</sup> cadencé à 120 MHz, 64 MB RAM. Le système d'exploitation est Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup> 95 (32 bits).



**Figure 24.** Ordinateur dédié à l'acquisition de données. (A) Unité centrale contenant la carte d'acquisition AD/DA. (B) Écran. (C) Clavier. (D) Souris.

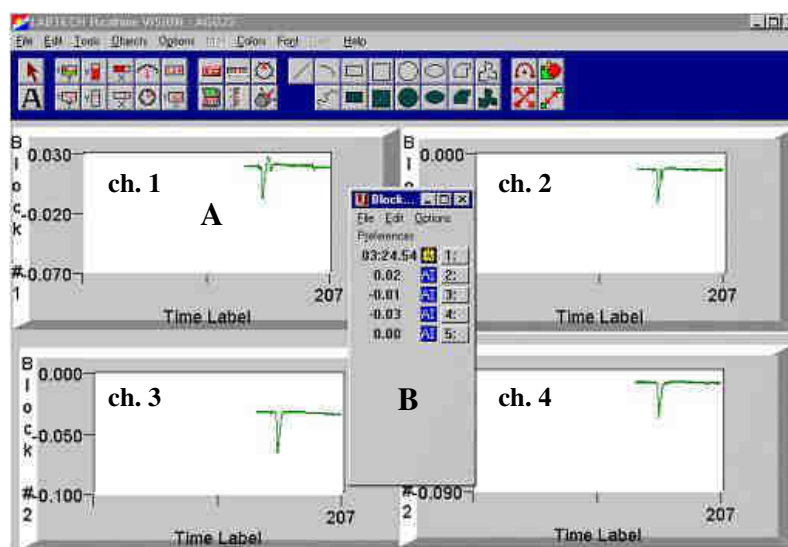
La carte d'acquisition AD/DA (ACL-812PG, ADClone Inc., Schait, CH ; Figure 25) a permis d'échantillonner et de numériser la tension analogique (AD) provenant des 16 canaux de l'électromètre INA116U. Deux sorties de la carte fournissent des tensions analogiques à partir de données numériques (DA) programmées dans l'interface utilisateur (Favre 2004). La carte est située dans l'unité centrale (Figure 24A) et est branchée sur un port bus ISA de l'ordinateur. Le taux d'échantillonnage est fixé à une fréquence de 10 Hz.



**Figure 25.** Carte d'acquisition AD/DA (ACL-812PG, ADClone Inc., Schait, CH) comprenant 16 entrées analogiques bipolaires 12-bit, un convertisseur A/D 12-bit, 2 sorties analogiques unipolaires 12-bit, un signal entrée/sortie, 16 entrées digitales et 16 sorties digitales, 3 compteurs programmables et un convertisseur de tension continue DC/DC 5 V.

### 2.3.5. Logiciel d'acquisition de données et de contrôle des processus

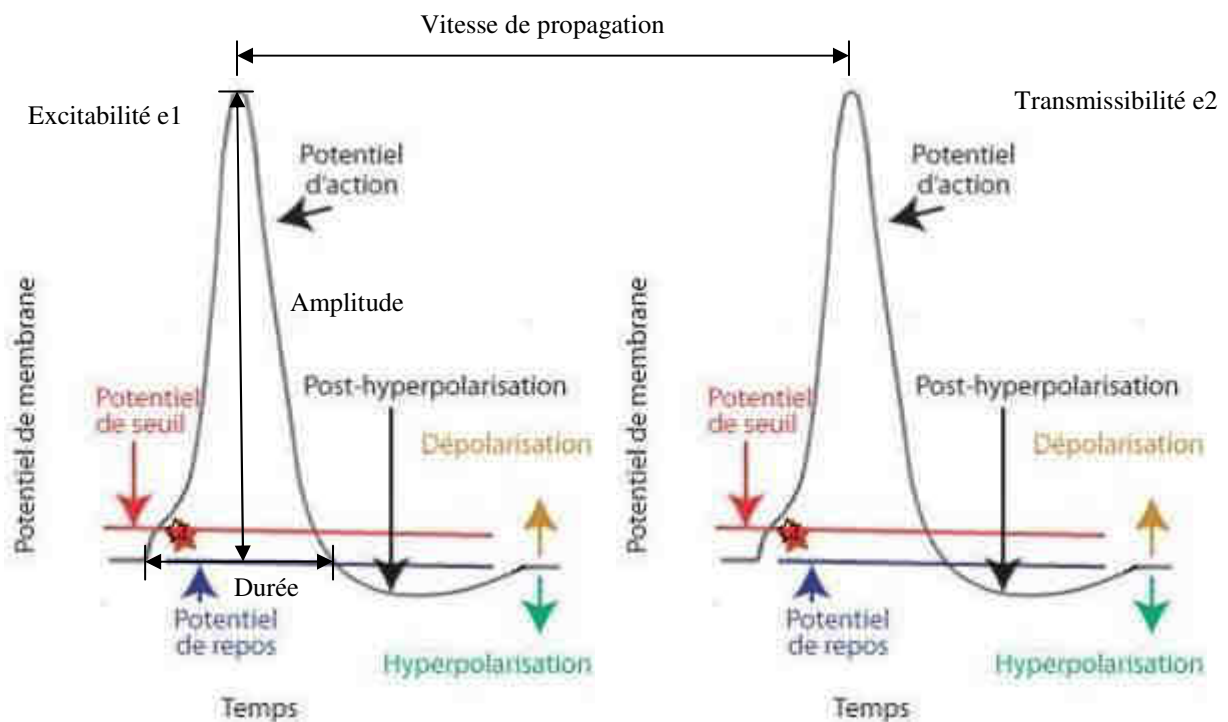
Le logiciel d'acquisition de données en temps réel et de contrôle des processus Labtech® Notebook™ (version 8.02 pour Microsoft® Windows®, Laboratory Technologies Corp., Wilmington, MA, USA ; Figure 26) permet de gérer les canaux d'entrée et de sortie de la carte AD/DA (Favre 2004).



**Figure 26.** Représentation graphique en temps réel de l'interface Realtime Vision, 3 min 24 s après le début d'une expérience. 2 PA ont été générés et transmis : canal (ch.) 1 → ch. 2 et ch. 3 → ch. 4. (A) Graphique en temps réel du canal 1. (B) Tensions en volts mesurées en temps réel sur l'ensemble des canaux (1-4).

### 2.3.6. Caractéristiques des PA

Les PA peuvent être caractérisés par leurs modes d'éllicitation (excitabilité e1 et transmissibilité e2) et leurs caractéristiques : l'amplitude (la dépolarisation négative maximum à partir du PM de repos) en mV ; la durée (le moment depuis le début de la dépolarisation jusqu'à un retour au PM de repos) en s ; la vitesse de propagation (se définissant, au sein de la plante, par la transmissibilité d'e1 à e2) en  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figure 27 ; Favre et al. 2011).



**Figure 27.** Schéma de l'étude des modes d'éllicitation (excitabilité e1 et transmissibilité e2) des PA et de leurs caractéristiques (amplitudes, durées de dépolarisation (e1 et e2) et vitesse de propagation d'e1 à e2). Figure adaptée à partir de [http://www.apteronote.com/revue/neurone/article\\_80.shtml](http://www.apteronote.com/revue/neurone/article_80.shtml)

## 2.4. Traitement des données et analyses statistiques

### 2.4.1. Compression et transfert de données

Les données brutes enregistrées au format .prn (format texte ASCII), utilisé par le logiciel Labtech® Notebook™, ont été compressées à l'aide du logiciel PKZIP® (version 2.01 pour Microsoft® Windows®, PKWARE®, © 1989-1996 PKWARE, Inc., WI, USA), afin de pouvoir être transférées par disquette 3.5" 1.44 MB.

### 2.4.2. Microsoft® Excel 97

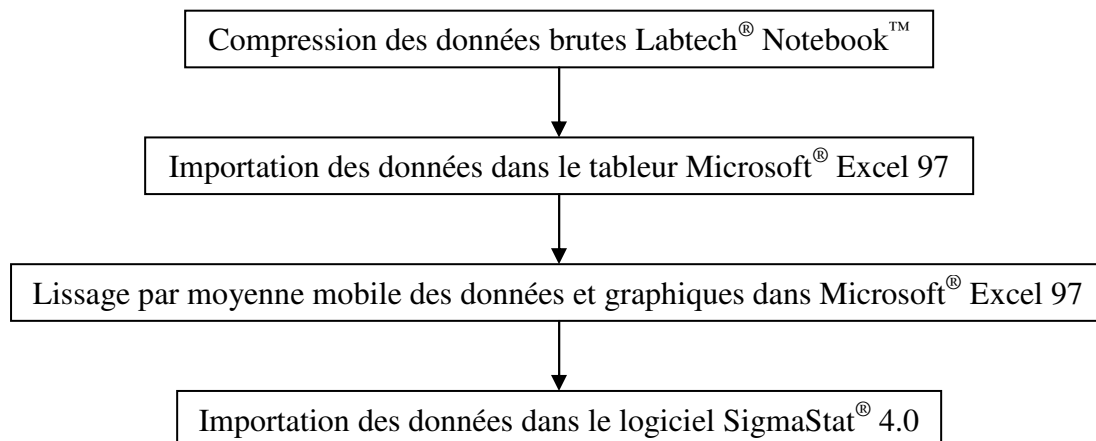
Les fichiers .prn ont été importés dans le tableur Microsoft® Excel 97. Les données ont été filtrées (lissage par moyenne mobile sur 11 points), présentées sous forme de tableaux, de graphiques (selon le sous-type de graphique « nuages de points reliés par une courbe sans marquage de données », histogramme, histogramme de classe) et enregistrées au format .xls.

### 2.4.3. SigmaStat® 4.0

Les données ont été importées dans le logiciel SigmaStat® version 4.0 (SPSS Inc., Ashburn, VA, USA) pour y être analysées et soumises à certaines analyses statistiques : test de normalité (Shapiro-Wilk), test  $z$  de proportion, test  $t$  de Student ou test  $U$  de Mann-Whitney, one-way ANOVA ou test de Kruskal-Wallis. L'intervalle de confiance de la valeur estimée a été fixé à 95% (seuil de risque  $\alpha = 5\%$ ). Les différences significatives des moyennes ont été évaluées à  $P \leq 0.050$ .

### 2.4.4. Organigramme

L'organigramme (Figure 28) représente schématiquement les différentes étapes du traitement des données et analyses statistiques.



**Figure 28.** Organigramme du traitement des données et analyses statistiques.