

## Remerciements

Tout d'abord, je remercie très sincèrement le Docteur Robert Degli Agosti, directeur et responsable de mon étude, de m'avoir permis d'effectuer, dans les meilleures conditions, un travail de Master aussi intéressant au sein du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Genève. Mes nombreuses conversations avec lui ont été pour moi très enrichissantes, autant afin d'évoluer indépendamment dans les expériences menées, que sur un plan plus personnel. Il a toujours pris le temps de superviser mon travail et de répondre à mes questions concernant l'appareillage du laboratoire ou l'utilisation de programmes tels que Microsoft® Excel 97 et SigmaStat® 4.0. J'ai ressenti, dans ses encouragements et la motivation apportée au cours de cette étude, la passion qu'il avait à partager ses connaissances. Je le remercie de m'avoir aidé à affiner mes résultats et pour la correction de ce mémoire.

Mes remerciements vont également aux Docteurs Michèle Crèvecoeur et Patrice Simon pour la correction de ce travail.

Je remercie aussi Madame Maryline Freyre et Monsieur Victor Fell pour leur aide précieuse, lors de la culture des plantes nécessaires au bon déroulement des expériences réalisées.

Mes remerciements vont également au Docteur Jean-Baptiste Thibaud, responsable de l'équipe « Signalisation électrique et calcique » au sein du Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (UMR 5004 CNRS/UMR 0386 INRA/Montpellier SupAgro/Université Montpellier 2 (France)), pour nous avoir fourni le matériel végétal (graines) relatif à l'étude du canal AKT2 chez *Arabidopsis thaliana*.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leur soutien.

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>V</b>
<b>Abstract</b>	<b>VI</b>
<b>Abréviations et symboles</b>	<b>VII</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
1.1. Systématique, historique et généralités d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	
1.2. Potentiels d'action (PA) chez les végétaux	3
1.2.1. Génération et propagation des PA	
1.2.2. Bref historique des PA	6
1.2.3. Méthodes et techniques électrophysiologiques	8
1.2.3.1. <i>Enregistrements extracellulaires</i>	
1.2.3.2. <i>Enregistrements intracellulaires</i>	9
1.2.4. Génération de PA en fonction de la nature du stimulus	12
1.2.4.1. <i>Stimulation électrique</i>	
1.2.4.2. <i>Stimulation mécanique</i>	
1.2.4.3. <i>Transitions lumière/obscurité et obscurité/lumière</i>	13
1.2.4.4. <i>Bref refroidissement</i>	
1.2.4.5. <i>Pollinisation</i>	14
1.3. Autres types de signaux électriques chez les végétaux	15
1.3.1. Potentiels de variation	
1.3.2. System potentials (potentiels systèmes)	16
1.4. Mécanismes de l'accumulation et du transport des ions K <sup>+</sup> chez les végétaux	17
1.4.1. Caractéristiques générales des transporteurs K <sup>+</sup>	
1.4.2. Caractéristiques de base et modes de contrôle des canaux K <sup>+</sup> de type Shaker	18
1.4.2.1. <i>Localisation et modes d'ouverture du canal AKT2</i>	20
1.5. Trichomes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
1.5.1. Développement et distribution foliaires	
1.5.2. Mutations génétiques	23
1.6. Objectif de l'étude et plan de recherche	
1.6.1. Objectif de l'étude	
1.6.2. Plan de recherche	24
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>25</b>
2.1. Conditions de culture du matériel végétal	
2.2. Matériel végétal	26
2.2.1. Provenance des graines	
2.2.2. Accessions et mutants	27
2.3. Méthodes et acquisition de données	28
2.3.1. Appareils de mesure	
2.3.1.1. <i>Chambre de mesure</i>	
2.3.1.2. <i>Cage de Faraday</i>	
2.3.1.3. <i>Électromètre INA116U différentiel à haute impédance</i>	
2.3.1.4. <i>Électrodes de mesure et de référence</i>	29
2.3.2. Positionnement des électrodes	30

2.3.3. Stimulation mécanique	33
2.3.3.1. <i>Quantification du toucher</i>	34
2.3.4. Ordinateur dédié et carte d'acquisition AD/DA	35
2.3.5. Logiciel d'acquisition de données et de contrôle des processus	36
2.3.6. Caractéristiques des PA	37
2.4. Traitement des données et analyses statistiques	
2.4.1. Compression et transfert de données	
2.4.2. Microsoft <sup>®</sup> Excel 97	38
2.4.3. SigmaStat <sup>®</sup> 4.0	
2.4.4. Organigramme	
<b>3. Résultats</b>	<b>39</b>
3.1. Courbes d'enregistrement témoin et contrôles	
3.2. Quantification du toucher	40
3.3. Potentiels d'action générés par un toucher de la face adaxiale (inter)	41
3.3.1. Schéma du montage expérimental	
3.3.2. Représentation graphique des types de PA	42
3.3.2.1. <i>PA simples non transmis</i>	
3.3.2.2. <i>PA simples transmis</i>	
3.3.2.3. <i>PA simples transmis avec hyperpolarisation</i>	43
3.3.2.4. <i>PA doubles</i>	
3.3.3. Caractéristiques des modes d'élicitation et phénomènes des PA	44
3.3.4. Distribution des caractéristiques des PA	46
3.3.4.1. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (feuille)</i>	48
3.3.4.2. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (pétiole)</i>	49
3.3.4.3. <i>Histogrammes des distributions de la durée (feuille)</i>	50
3.3.4.4. <i>Histogrammes des distributions de la durée (pétiole)</i>	51
3.3.4.5. <i>Histogrammes des distributions de la vitesse de propagation</i>	52
3.3.5. Répartition horaire diurne (en trois intervalles de temps) des modes d'élicitation et caractéristiques des PA	53
3.3.5.1. <i>Histogrammes de l'excitabilité et de la transmissibilité foliaires</i>	57
3.3.5.2. <i>Histogrammes des amplitudes (feuille et pétiole)</i>	58
3.3.5.3. <i>Histogrammes des durées (feuille et pétiole)</i>	59
3.3.5.4. <i>Histogrammes de la vitesse de propagation</i>	60
3.4. Période réfractaire (PR) des potentiels d'action générés par double stimulation mécanique	62
3.4.1. Schéma de deux expériences de PR	
3.4.2. Évolution des modes d'élicitation et caractéristiques des PA en fonction de la PR	63
3.5. Potentiels d'action générés par un toucher distant du centre de la rosette (distant)	66
3.5.1. Schéma du montage expérimental	
3.5.2. Excitabilité et transmissibilité foliaires des PA	
3.5.3. Distribution des caractéristiques des PA	67
3.6. Potentiels d'action générés par un toucher de la face abaxiale (ab)	68
3.6.1. Schéma du montage expérimental	
3.6.2. Distribution des caractéristiques des PA	
3.7. Diversité des systèmes intra-plante et inter-plantes	69
3.7.1. Potentiels d'action générés par un toucher foliaire (intra)	70
3.7.1.1. <i>Schéma du montage expérimental</i>	
3.7.1.2. <i>Représentation graphique des types de PA</i>	

3.7.1.3. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (feuille)</i>	71
3.7.1.4. <i>Histogrammes des distributions de la durée (feuille)</i>	72
3.7.2. Potentiels d'action générés par un toucher au centre de la rosette (centre)	
3.7.2.1. <i>Schéma du montage expérimental</i>	
3.7.2.2. <i>Représentation graphique des types de PA</i>	73
3.7.2.3. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (feuille)</i>	74
3.7.2.4. <i>Histogrammes des distributions de la durée (feuille)</i>	
3.7.3. Potentiels d'action générés par un toucher foliaire avec électrode placée au centre de la rosette (rosette)	75
3.7.3.1. <i>Schéma du montage expérimental</i>	
3.7.3.2. <i>Représentation graphique des types de PA</i>	
3.7.3.3. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (feuille)</i>	76
3.7.3.4. <i>Histogrammes des distributions de la durée (feuille)</i>	
3.7.4. Potentiels d'action générés par un toucher au centre du pétiole (pétiole)	77
3.7.4.1. <i>Schéma du montage expérimental</i>	
3.7.4.2. <i>Représentation graphique des types de PA</i>	
3.7.4.3. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (feuille)</i>	78
3.7.4.4. <i>Histogrammes des distributions de l'amplitude (pétiole)</i>	
3.7.4.5. <i>Histogrammes des distributions de la durée (feuille)</i>	79
3.7.4.6. <i>Histogrammes des distributions de la durée (pétiole)</i>	
3.7.5. Distribution des caractéristiques des PA	80
<b>4. Discussion</b>	<b>81</b>
4.1. Potentiels d'action générés par un toucher de la face adaxiale	
4.2. Période réfractaire des potentiels d'action générés par double stimulation mécanique	86
4.3. Potentiels d'action générés en fonction de la zone de toucher foliaire	
4.4. Diversité des systèmes inter-plantes et intra-plante	87
<b>5. Perspectives</b>	<b>88</b>
<b>6. Références bibliographiques</b>	<b>89</b>
<b>7. Annexes</b>	<b>103</b>
7.1. Potentiels d'action générés par un toucher de la face adaxiale (inter)	
7.1.1. Caractéristiques des modes d'élicitation et phénomènes des PA	
7.1.2. Distribution des caractéristiques des PA	
7.2. Répartition horaire diurne (en trois intervalles de temps) des caractéristiques des PA	105
7.3. Potentiels d'action générés par un toucher distant du centre de la rosette (distant)	109
7.3.1. Excitabilité et transmissibilité foliaires des PA	
7.3.2. Distribution des caractéristiques des PA	
7.4. Potentiels d'action générés par un toucher de la face abaxiale (ab)	110
7.5. Diversité des systèmes intra-plante et inter-plantes	111
7.6. Résumé d'un poster	112

## Résumé

Lors d'études précédentes, des potentiels d'action (PA) ont été générés par la blessure de feuilles adultes d'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., avec le dépôt de 5  $\mu$ L de KCl 1 M, d'une part et d'autre part, par stimulation électrique. Nous nous proposons ici d'éliciter mécaniquement (toucher foliaire : masse  $\sim 1.6 \pm 0.7$  g, surface  $\sim 30$  mm<sup>2</sup> et durée  $\sim 1$  s) des PA chez cette plante modèle. Cette méthode a induit d'authentiques PA, dépolarisations transitoires, locales et brèves (< 40 s) de la membrane plasmique (MP), enregistrés à l'aide de deux électrodes extracellulaires éloignées du site de stimulation foliaire (distant de  $\sim 38$  mm du centre de la rosette). La première électrode de mesure a été placée entre l'extrémité du pétiole et le début de la feuille, et la deuxième a été positionnée sur le pétiole, à proximité du centre de la rosette. Des PA ont été observés chez trois accessions (Columbia Genève (Col GE), Wassilewskija Genève (Ws GE) et Ws Montpellier (Ws MPL)). La sensibilité/excitabilité d'*A. thaliana* (le nombre de feuilles ayant généré un ou plusieurs PA divisé par le nombre de feuilles mesurées) était Col GE (86%) > Ws MPL (63%) > Ws GE (35%). Des PA ont été transmis, de la zone de toucher foliaire à la base du pétiole, à des vitesses de propagation de  $0.95 \pm 0.26$  (Ws MPL),  $1.25 \pm 0.32$  (Ws GE) et  $1.48 \pm 0.61$  mm·s<sup>-1</sup> (Col GE). Chez Col GE, une période réfractaire relative des PA  $\sim 110$  min a été déterminée entre deux touchers, représentant un rétablissement à 80% de la sensibilité d'*A. thaliana* et de ses caractéristiques (amplitude, durée et vitesse de propagation). Le rôle éventuel, dans l'excitabilité, des trichomes foliaires d'*A. thaliana* a été examiné en utilisant un double mutant (DM) qui en est quasiment dépourvu, Glabra N2259 (Col Missouri). Cependant, la sensibilité de ce DM (90%) et la vitesse de propagation des PA ( $1.50 \pm 0.58$  mm·s<sup>-1</sup>) restaient élevées, proches de celles mesurées chez Col GE. Les PA sont élicites suite à des modifications de la perméabilité des canaux ioniques (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>) situés dans la MP. Deux mutants d'*A. thaliana* (Ws MPL) ont été étudiés, comprenant un canal K<sup>+</sup>, AKT2, modifié. Le premier mutant, AKT2-KO (allèle *akt2-1* inactif) n'exprimait pas la protéine AKT2, et le deuxième, AKT2-S210N-S329N (AKT2-DM) favorisait l'efflux d'ions K<sup>+</sup>. Chez Ws MPL, AKT2-KO et AKT2-DM, l'excitabilité d'*A. thaliana* était de 63, 59 et 78%, avec des vitesses de propagation ( $0.95 \pm 0.26$ ,  $1.00 \pm 0.19$  et  $1.06 \pm 0.33$  mm·s<sup>-1</sup>) proches. Cette étude montre clairement qu'*A. thaliana* peut générer, de façon reproductible, des PA en réponse à un stress abiotique (toucher). Dans ce cas, les récepteurs primaires ne sont vraisemblablement pas les trichomes foliaires. Nous confirmons, avec cette nouvelle méthode de stimulation, l'existence d'une variabilité génétique parmi les accessions et mutants Col et Ws.

## Abstract

In previous studies, action potentials (APs) were generated by wounding with the deposition of 5  $\mu\text{L}$  of 1 M KCl onto *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. adult leaves, on one hand and on the other hand, by electrical stimulation. Here, we propose to elicit mechanical (leaf touch: mass  $\sim 1.6 \pm 0.7$  g, area  $\sim 30$   $\text{mm}^2$  and duration  $\sim 1$  s) APs in this model plant. This method induced genuine APs, short ( $< 40$  s) and transient local depolarizations of the plasma membrane (PM), recorded by two extracellular electrodes away from the leaf stimulation site (distant of  $\sim 38$  mm from the center of the rosette). The first measuring electrode was placed between the end of the petiole and the beginning of the limb, and the second one was positioned on the petiole, near the center of the rosette. APs were observed in three accessions (Columbia Geneva (Col GE), Wassilewskija Geneva (Ws GE) and Ws Montpellier (Ws MPL)). *A. thaliana* sensitivity/excitability (the number of leaves that generated one or several APs divided by the number of leaves measured) was Col GE (86%)  $>$  Ws MPL (63%)  $>$  Ws GE (35%). Some APs were transmitted, from the leaf touch area to the petiole base, at conduction velocities of  $0.95 \pm 0.26$  (Ws MPL),  $1.25 \pm 0.32$  (Ws GE) and  $1.48 \pm 0.61$   $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  (Col GE). In Col GE, a relative refractory period of APs  $\sim 110$  min was determined between two touches, representing an 80% recovery of *A. thaliana* sensitivity and their characteristics (amplitude, duration and conduction velocity). The possible role, in excitability, of *A. thaliana* leaf trichomes was examined using a double mutant (DM) virtually devoid of them, *Glabra* N2259 (Col Missouri). However, the sensitivity of this DM (90%) and the conduction velocity of APs ( $1.50 \pm 0.58$   $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) remained high, close to those measured in Col GE. APs are elicited in response to changes in the permeability of ion channels ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) located in the PM. Two *A. thaliana* mutants (Ws MPL) were studied, including a modified  $\text{K}^+$  channel, AKT2. The first mutant, AKT2-KO (*akt2-1* inactive allele) did not express the AKT2 protein, and the second one, AKT2-S210N-S329N (AKT2-DM) induced  $\text{K}^+$  efflux. In Ws MPL, AKT2-KO and AKT2-DM, *A. thaliana* excitability was 63, 59 and 78%, with close conduction velocities ( $0.95 \pm 0.26$ ,  $1.00 \pm 0.19$  and  $1.06 \pm 0.33$   $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ). This study clearly shows that *A. thaliana* can reproducibly generate APs in response to an abiotic stress (touch). In this case, the primary receptors are unlikely to be the leaf trichomes. We confirm, with this new stimulation method, that a genetic variability exists among Col and Ws accessions and mutants.

## Abréviations et symboles

ABA : acide abscissique  
AD : analogique-digital  
Ag : argent  
AgCl : chlorure d'argent  
ATPase : adénosine triphosphatase  
Ca<sup>2+</sup> : ion calcium  
CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium  
Cl<sup>-</sup> : ion chlorure  
Col : Columbia  
cv. : cultivar  
d : distance  
DA : digital-analogique  
DC : courant continu  
DM : double mutant  
e1 : électrode feuille  
e2 : électrode pétiole  
E<sub>k</sub><sup>+</sup> : potentiel d'équilibre des ions K<sup>+</sup>  
GE : Genève  
H : hauteur  
H<sup>+</sup> : ion hydrogène ou proton  
K<sup>+</sup> : ion potassium  
KCl : chlorure de potassium  
KO : knock-out  
Kv : canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendants  
l : largeur  
L : longueur  
L. : Linné  
L:D : lumière:obscurité  
MIFE<sup>®</sup> : technique de mesure des courants ioniques par microélectrode extracellulaire  
MO : Missouri  
MP : membrane plasmique  
MPL : Montpellier  
N : asparagine  
Na<sup>+</sup> : ion sodium  
NASC : Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre  
p : proportion(s)  
P : probabilité  
PA : potentiel(s) d'action  
PAR : rayonnement photosynthétiquement actif  
pH : potentiel hydrogène  
PKA : protéine kinase A  
PM : potentiel membranaire  
PR : période réfractaire  
PRA : période réfractaire absolue

PRR : période réfractaire relative  
PV : potentiel(s) de variation  
réf. : référence  
rH : humidité relative  
S : sérine  
SPs : potentiels systèmes  
T : température  
VGC : canaux voltage-dépendants  
Ws : Wassilewskija  
WT : type sauvage

## Unités et symboles

% : pourcent	min : minute
°C : degré Celsius	mm : millimètre
cm : centimètre	ms : milliseconde
g : gramme	mV : millivolt
h : heure	nmol : nanomole
Hz : hertz	Ω : ohm
j : jour	s : seconde
m : mètre	μmol : micromole
Mb : mégabase	V : volt
MB : mégabyte	W : watt
MHz : mégahertz	