

**2015-2016**

## MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et  
l'Environnement

Spécialité

Biologie Intégrative de l'Arbre et des plantes cultivées

Thème : **Nouvelle approche du fonctionnement stomatique chez la vigne**

« **Confidentiel** »

El-hadi **MECELLEM**

MEMOIRE de fin d'étude, soutenu à Nancy le 05/09/2016

Enseignant-référent : Yves **JOLIVET**, Professeur, Université de Lorraine, FST (Nancy)

Tuteur de stage : Florent **PANTIN**, Maître de Conférences, SupAgro, LEPSE (Montpellier)

Co-encadrant : Thierry **SIMONNEAU**, Directeur de recherches, INRA, LEPSE (Montpellier)

Contributeur : Jean-Luc **VERDEIL**, Chercheur, CIRAD, PHIV (Montpellier)



## Remerciements

*Merci !*

Je tiens tout particulièrement à remercier mon maître de stage, Florent PANTIN, et le directeur de recherches au sein de l'équipe ETAP, Thierry SIMONNEAU, de m'avoir permis de faire ce stage très passionnant. Durant lequel j'ai réalisé la place qu'occupe la recherche dans mon projet professionnel. Je les remercie également pour toutes les connaissances qu'ils m'ont permis d'acquérir, leur disponibilité et leur patience lors de mes questions mais surtout leurs promptitude et clairvoyance à évoluer mes rapports.

Je remercie vivement Stéphane BERTHEZENE et Philippe PECHIER pour leur soutien technique, sans oublier Myriam DAUZAT de m'avoir formé à l'utilisation de la caméra thermique ainsi qu'à la régulation des chambres de culture (Phénopsis). Je remercie aussi toute l'équipe du LEPSE pour leur disponibilité et leur accueil chaleureux.

Je tiens à remercier Christophe GOZE-BAC et Maïda CARDOSO de la plateforme BioNanoMRI et Jean-Luc VERDEIL de la plateforme PHIV pour leur contribution à la réalisation de la partie Imagerie à Résonance Magnétique.

Je souhaite également remercier GIS Fruits et le projet APLIM d'avoir financé cette étude.

Un merci va à l'équipe ADAS pour les moments de divertissement que nous avons pu partager ensemble.

Merci aussi à tous les doctorants et à tous les stagiaires passés durant mes 6 mois de stage par la fourmière pour les beaux moments passés ensemble, j'ai déjà la nostalgie des pauses café, de l'humour, mais surtout des discussions scientifiques au cours desquels j'ai beaucoup appris.

Et pour terminer, je remercie ma FAMILLE, mes AMIS et toutes les personnes qui m'ont toujours soutenu de près ou de loin depuis le début jusque-là.

## Résumé

Dans les conditions de stress hydrique, les plantes ont des capacités différentes pour limiter les pertes en eau via les feuilles. Les plantes dites isohydriques maintiennent un potentiel hydrique foliaire élevé en fermant leurs stomates précocement, alors que les plantes anisohydriques permettent une baisse de potentiel hydrique plus conséquente, à la faveur du maintien de l'ouverture stomatique. Les mécanismes physiologiques de ces différences de comportement pourraient dépendre d'une interaction entre les propriétés hydrauliques foliaires et l'hormone acide abscissique (ABA). Nous avons tenté, dans notre étude, de trouver un lien entre le comportement (an)isohydrique et la sensibilité à l'ABA exogène i) de la conductance hydraulique foliaire ( $K_{\text{feuille}}$ ) et ii) de la propagation spatiotemporelle de la fermeture stomatique, chez un génotype de vigne isohydrique (Grenache) et deux anisohydriques (Syrah, Sultanine). Contrastant avec les hypothèses initiales, nos résultats suggèrent que le comportement (an)isohydrique est indépendant de la sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA. En revanche, cette sensibilité semble corrélée avec le profil spatiotemporel de fermeture stomatique en réponse à l'ABA. Les résultats sont discutés sur la base du double effet, local et distant, de l'ABA sur le fonctionnement stomatique.

**Mots clés :** (an)isohydrie,  $K_{\text{feuille}}$ , ABA, propagation spatiotemporelle, stomates, vigne.

## Abstract

Under water stress conditions, plants have different capacities to limit water loss through leaves. The isohydric plants maintain higher leaf water potential by triggering early stomatal closure, while anisohydric plants allow for lower water potential to maintain stomata open. The physiological mechanisms underlying these differences could be based on an interaction between leaf hydraulics and the drought hormone abscisic acid (ABA). In our study, we attempted to establish a link between the (an)isohydric behavior and the sensitivity to exogenous ABA i) of the leaf hydraulic conductance ( $K_{\text{leaf}}$ ) and ii) of the spatiotemporal pattern of stomatal closure in one isohydric (Grenache) and two anisohydric (Syrah, Sultanine) grapevine cultivars. Contrasting with the initial hypotheses, our results suggest that the (an)isohydric behavior is independent of  $K_{\text{leaf}}$  sensitivity to ABA. However, this sensitivity appears correlated with the spatiotemporal pattern of stomatal closure in response to ABA. The results are discussed on the basis of the dual (local and remote) effect of ABA on stomata.

**Key words:** (an)isohydry,  $K_{\text{leaf}}$ , ABA, spatiotemporal pattern, stomata, grapevine.

## Liste de figures :

**Figure 1 :** Modèle du flux d'eau dans la feuille en fonction de l'état hydrique de la plante.

**Figure 2 :** Réponse de la température foliaire à l'ABA chez un cépage isohydrique (Grenache) et anisohydrique (Syrah).

**Figure 3 :** les plantes destinées à l'expérimentation conduite sous serre.

**Figure 4 :** évolution de la température des feuilles de vigne obtenue dans l'automate de PHENOPSIS.

**Figure 5 :** Régulation stable de la température.

**Figure 6 :** dérive légère de la régulation de la température.

**Figure 7 :** Prise d'images et suivi de l'évolution de la température des feuilles des 3 génotypes étudiés en fonction des 2 concentrations d'ABA appliquées.

**Figure 8 :** Vue d'ensemble du dispositif IRM et de la feuille de vigne roulée dans l'antenne avant qu'elle soit soumise à l'imagerie.

**Figure 9 :** test de dessèchement des 3 génotypes et la relation de leurs potentiels hydriques avec les comportements an(isohydrique).

**Figure 10 :** Effet de l'ABA sur la transpiration de feuilles détachées chez Grenache, Syrah et Sultanine.

**Figure 11 :** Effet de l'ABA sur le potentiel hydrique foliaire chez Grenache, Syrah et Sultanine.

**Figure 12 :** Sensibilité de la conductance hydraulique en fonction de la concentration en ABA appliquée chez les 3 génotypes étudiés.

**Figure 13 :** Comparaison de la dynamique de la fermeture stomatique entre les 3 génotypes en fonction du traitement ABA appliqué.

**Figure 14 :** Comparaison de la dynamique de la fermeture stomatique entre traitements chez les 3 génotypes étudiés.

**Figure 15 :** Corrélation entre  $\Delta T$  et  $\Delta E$  par génotype et en fonction de la concentration d'ABA.

**Figure 16 :** Régions d'intérêt pour l'analyse des paramètres IRM sur une feuille de Grenache soumise à la dessiccation.

**Figure 17 :** Analyse quantitative des paramètres M0 et T2 dans les vaisseaux et tissus extravasculaires d'une feuille de Grenache soumise à la dessiccation.

**Figure 18 :** Récapitulatif de la trajectoire de l'eau, de xylème à l'atmosphère.

### **Liste des tableaux :**

**Tableau 1 :** Tableau représentatif des comportements relatifs aux différents géotypes étudiés

**Tableau 2:** Récapitulatif des résultats des propriétés hydrauliques et d'imagerie thermique obtenus.

### **Abréviations :**

ABA : acide abscissique

AQPs : aquaporines

E : transpiration

$K_{\text{feuille}}$  : conductance hydraulique foliaire

$\Psi_{\text{feuille}}$  : potentiel hydrique foliaire

m : masse foliaire

S : surface foliaire

PIPs : les aquaporines de la membrane plasmique (Plasma membrane Intrinsic Proteins)

TIPs : les aquaporines du tonoplaste (Tonoplast Intrinsic Proteins)

## Table des matières :

Remerciements.....	i
Résumé .....	ii
Abstract .....	ii
Liste de figures .....	iii
Listes de tableaux.....	iv
Abréviations.....	iv
<b>I. Introduction :</b> .....	1
<b>II. Présentation de la structure d'accueil :</b> .....	5
1. Historique et localisation géographique de la structure d'accueil :.....	5
2. Organisation et structure de LEPSE :.....	5
A. Equipe 1 : Stress environnementaux et Processus Intégrés du contrôle de la Croissance (SPIC) .....	5
B. Equipe 2 : Modélisation et Analyse de l'interaction Génotype Environnement (MAGE).....	6
C. Equipe 3 : Efficience de la Transpiration et Adaptation des Plantes aux climats secs (ETAP).....	6
<b>III. Matériel et méthodes :</b> .....	7
1. Matériel végétal :.....	7
2. Imagerie thermique : .....	8
3. Détermination de la conductance hydraulique foliaire : .....	10
3.1 Détermination de la transpiration :.....	10
3.2 L'état hydrique de la feuille : .....	10
4. Imagerie à résonance magnétique (IRM) .....	11
<b>IV. Résultats :</b> .....	12
1. Test préliminaire pour la qualification du comportement (an)isohydrique .....	12
2. Effet de la concentration d'acide abscissique sur les propriétés hydrauliques foliaires des trois génotypes étudiés .....	12
3. Caractérisation de la dynamique spatiotemporelle de la fermeture stomatique chez trois génotypes.....	15
4. Suivi de la dynamique de l'eau au niveau des tissus foliaires en réponse à l'acide abscissique par imagerie à résonance magnétique .....	18

<b>V. Discussion :</b> .....	21
<b>VI. Conclusion et perspectives :</b> .....	25
Références bibliographiques	
Annexes	

## I. Introduction :

La vigne (*Vitis vinifera*) est parmi les cultures fruitières les plus importantes du monde avec plus de 7,5 Millions ha, elle est répandue principalement dans 3 continents : l'Europe (54%), l'Asie (24%) et l'Amérique (14%). La production mondiale de raisins en 2014 a atteint les 73,7 Mt (Rossdeutsch, 2015). La France est le 3<sup>ème</sup> exportateur mondial de vin avec une valeur de production viticole représentant 10,63 milliards d'euros, soit 15% de la production agricole totale (Carroué, 2013). La viticulture doit cependant relever de nouveaux défis dans les décennies à venir en raison des changements climatiques (Schultz, 2000).

Un réchauffement climatique est prévu dans le monde en général et en Europe en particulier, où l'on prévoit une augmentation de température entre 2,2 et 5,1°C au cours de 21<sup>ème</sup> siècle. En outre, la moyenne des précipitations annuelles devrait diminuer dans la plupart des pays de l'Europe du sud (4 à 27%) (Malheiro et al., 2010). Cette diminution risque d'entraîner des conditions de sécheresse estivale prononcée, provoquant un stress hydrique important sur les plantes en général et sur la vigne en particulier.

La sécheresse est une contrainte environnementale affectant fortement la productivité des plantes. La perte de rendement induite par le déficit hydrique du sol, ainsi que les températures supra-optimales qui augmentent la sécheresse atmosphérique, dépasse probablement les pertes de toutes les autres causes, notamment quand la gravité et la durée de la contrainte sont critiques. En effet, l'eau est le constituant principal des végétaux, il est impliqué dans le développement et de la physiologie de ces derniers. L'eau intervient notamment dans l'expansion cellulaire, via la turgescence, et les mouvements des cellules tels que l'ouverture stomatique, assurant ainsi la croissance et la photosynthèse (Farooq et al., 2009).

Les stratégies mises en œuvre par les plantes en situation de stress hydrique consistent soit à éviter la contrainte, soit à mettre en œuvre des mécanismes qui leur permettent d'accomplir des fonctions physiologiques pour maintenir la croissance et la production (Tardieu, 2003). Les plantes ont la capacité d'esquiver la sécheresse estivale en raccourcissant leur cycle de développement. Une augmentation de la profondeur et la densité des racines est considéré comme un mécanisme majeur pour l'amélioration de l'absorption d'eau ; l'enroulement des feuilles et la diminution de surface foliaire sont également des processus qui diminuent les pertes en eau (Turner, 1986). Maintenir la turgescence de la plante alors que le potentiel hydrique est très négatif est assuré par des mécanismes de tolérance. L'ajustement osmotique (accumulation d'osmolytes tels que la proline), l'élasticité membranaire, la réduction de la taille des cellules et la résistance protoplasmique (capacité des cellules à résister à un dommage mécanique et à la dénaturation des protéines au niveau membranaire ou cytoplasmique) constituent les processus majeurs (El Jaafari et al., 1993). En outre, la régulation de la conductance stomatique reste le mécanisme majeur intervenant à court terme pour limiter les pertes d'eau : le potentiel hydrique foliaire est maintenu d'autant plus longtemps que la fermeture des stomates est précoce (Maury et al., 2000).

L'ouverture stomatique, permet de classer les variétés de vigne en deux catégories contrastées : isohydrique et anisohydrique. D'une part, les plantes isohydriques sont capables de garder le potentiel hydrique des tissus élevé par la fermeture rapide des stomates ainsi que

par des mécanismes d'économie d'eau alternatifs cités auparavant. Ce comportement qualifié de « pessimiste » assure un contrôle strict des pertes en eau. Les plantes anisohydriques ou « optimistes », d'autre part, maintiennent l'ouverture stomatique et ainsi l'activité photosynthétique. Les pertes en eau sont alors plus importantes, affectant le potentiel hydrique de la plante (Gallé et al., 2013). Lorsque la période d'un déficit hydrique modéré est courte, le comportement anisohydrique pourrait être favorable au maintien de la production, alors que si le stress est sévère et long, le comportement isohydrique pourrait permettre à la plante de parvenir au terme de son cycle de production, ou d'augmenter ses chances de survie dans le cas des pérennes tels que la vigne. En revanche, l'exposition des plantes anisohydriques à une période longue de déficit hydrique sévère, provoque des problèmes physiologiques tels que la cavitation (Prieto et al., 2010). Chez la vigne, les différents cépages se situent dans un continuum entre isohydrie stricte et anisohydrie stricte (Chaves et al., 2010; Coupel-Ledru et al., 2014).

Il a été proposé que la variation entre les comportements isohydrique et anisohydrique résulte principalement de la manière dont les stomates se ferment en réponse au potentiel hydrique foliaire ( $\Psi_{\text{feuille}}$ ) d'une part, et à l'acide abscissique (ABA), une hormone produite par la plante en situation de sécheresse, d'autre part. Tardieu et Davies (1992) ont mis en évidence un mécanisme de fermeture stomatique par lequel  $\Psi_{\text{feuille}}$  augmente la sensibilité des cellules de garde à l'ABA. Ainsi, pour une même concentration d'ABA appliquée sur des épidermes isolés, la fermeture stomatique est plus importante pour une plante stressée ( $\Psi_{\text{feuille}}$  très négatif) que pour une plante non stressée ( $\Psi_{\text{feuille}}$  proche de zéro). Par la suite, Tardieu et Simonneau, (1998) ont montré que ce mécanisme ne s'applique qu'aux plantes isohydriques ; les stomates des plantes anisohydriques seraient quant à eux insensibles à l'interaction entre  $\Psi_{\text{feuille}}$  et l'ABA.

L'origine des différences entre plantes isohydriques et anisohydriques pourrait également provenir de variations dans la production d'ABA. En effet, (Soar et al., 2006) ont montré que le niveau d'ABA dans le xylème ( $[\text{ABA}]_{\text{xyl}}$ ) chez Grenache (cultivar isohydrique) est plus élevé au moment d'un déficit hydrique sévère par rapport à Syrah (cultivar anisohydrique). Ces mêmes auteurs ont observé une corrélation négative entre  $[\text{ABA}]_{\text{xyl}}$  et la conductance stomatique chez les deux variétés. La biosynthèse de l'ABA a lieu notamment dans les racines ; l'hormone va ensuite migrer vers les feuilles par le xylème et fonctionne comme un signal chimique à longue distance pendant le stress hydrique (Wilkinson and Davies, 2010, 2002). Les cellules du parenchyme vasculaire des feuilles sont également capables de synthétiser l'ABA en réponse à la sécheresse (Endo et al., 2008).

Enfin, les comportements isohydriques ou anisohydriques pourraient être déterminés par une interaction entre l'ABA et la capacité d'approvisionnement en eau de la feuille, notamment à travers certaines aquaporines. Les aquaporines sont des canaux protéiques membranaires facilitant le passage de l'eau à travers les membranes cellulaires et elles pourraient être impliquées dans le contrôle de la conductivité hydraulique en situation de contrainte hydrique (Maurel et al., 2008). (Shatil-Cohen et al., 2011) ont montré que l'ABA diminue la conductivité hydraulique de la gaine périvasculaire en réduisant la perméabilité membranaire de protoplastes par l'inhibition de l'activité d'aquaporines de ces cellules de la gaine périvasculaire. Ce blocage du flux d'eau par l'ABA en amont du mésophylle, se traduisant par une baisse de conductance hydraulique foliaire ( $K_{\text{feuille}}$ ), provoque une

diminution du potentiel hydrique se propageant jusqu'aux cellules de garde pour accélérer leur fermeture (Pantin et al., 2013). Ainsi, l'ABA exerce à la fois un effet local et un effet distant sur la fermeture stomatique. Chez la vigne, l'effet négatif de l'ABA sur  $K_{\text{feuille}}$  n'est observé que chez les génotypes isohydriques (Coupel-Ledru et al., soumis).

D'autres travaux suggèrent un lien entre la régulation des aquaporines et le degré d'isohydrie. Dans les racines de vigne, la quantité relative de transcrits du gène *VvPIP1;1* (codant pour une aquaporine) a augmenté lors de l'application d'un déficit hydrique chez le Chardonnay (anisohydrique) mais pas chez le Grenache (isohydrique) où le niveau d'accumulation d'ABA est très élevé (Vandeleur et al., 2009). En outre, La surexpression de l'aquaporine Tom-Tip2;2 chez un mutant de tomate qui a un comportement isohydrique est responsable de la conversion de ce dernier vers le comportement anisohydrique (Sade et al., 2009).

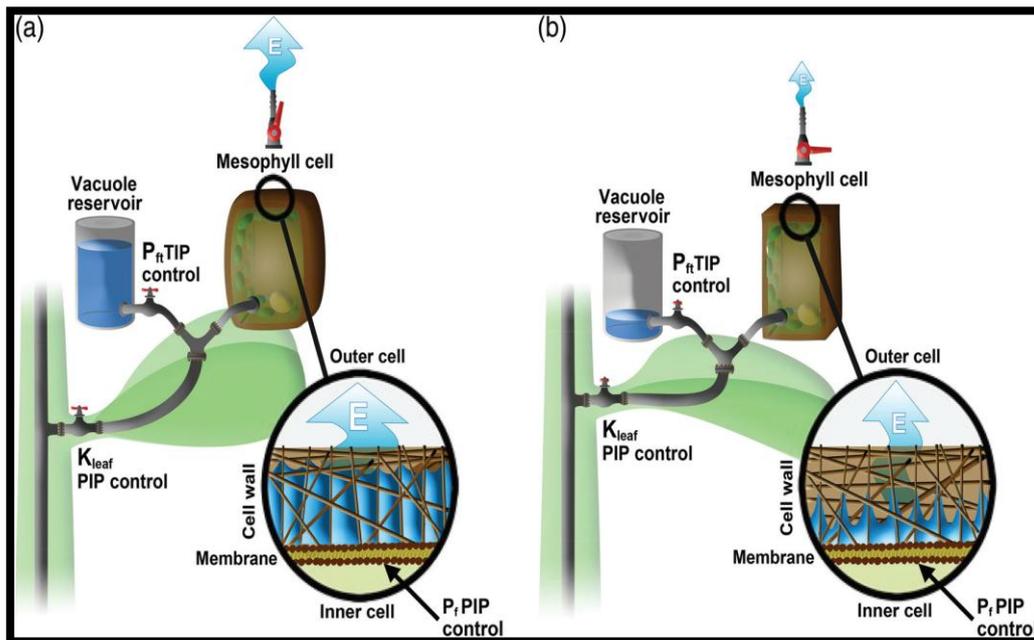


Figure 1 : **Modèle du flux d'eau dans la feuille en fonction de l'état hydrique de la plante.** (A) Feuille à pleine turgescence dans des conditions de forte disponibilité en eau du sol. (B) la même feuille au point de perte de turgescence sous une faible disponibilité en eau du sol : le faible potentiel hydrique est évité par (i) le maintien d'une faible conductivité de la membrane plasmique ( $P_f$ ) qui sépare les deux compartiments (cellules de la gaine et cellules de mésophylle) (ii) Par la réduction de conductivité élevée d'eau de la tonoplaste . En outre,  $K_{\text{feuille}}$  contrôle le mouvement de l'eau dans la feuille et donc le potentiel hydrique des feuilles (Pantin et al., 2013; Shatil-Cohen et al., 2011; Shatil-Cohen and Moshelion, 2012). Il a été proposé que des niveaux élevés de  $P_f$ ,  $P_{ft}$  et  $K_{\text{feuille}}$  en raison de l'activité de TIPs (aquaporines du tonoplaste) et PIPs (aquaporines de la membrane plasmique) pourraient favoriser la transpiration (E) et faire partie du mécanisme moléculaire responsable de la différence entre les plantes anisohydriques et les plantes isohydriques (Sade and Moshelion, 2014).

Le caractère isohydrique d'une plante serait donc déterminé par l'intégration de signaux hydrauliques et hormonaux dans la feuille. A la faveur de cette interprétation, des expériences préliminaires ont été menées au LEPSE sur Syrah et Grenache, visant à caractériser la dynamique spatiotemporelle de fermeture stomatique sur des feuilles détachées et alimentées avec une solution d'ABA. Chez Syrah, la propagation spatiale de la fermeture stomatique se ferait de manière centripète, depuis la périphérie du limbe vers la nervure centrale. A l'inverse

chez Grenache, cette fermeture stomatique se ferait de manière centrifuge, de la veine centrale vers la périphérie (Figure 1).

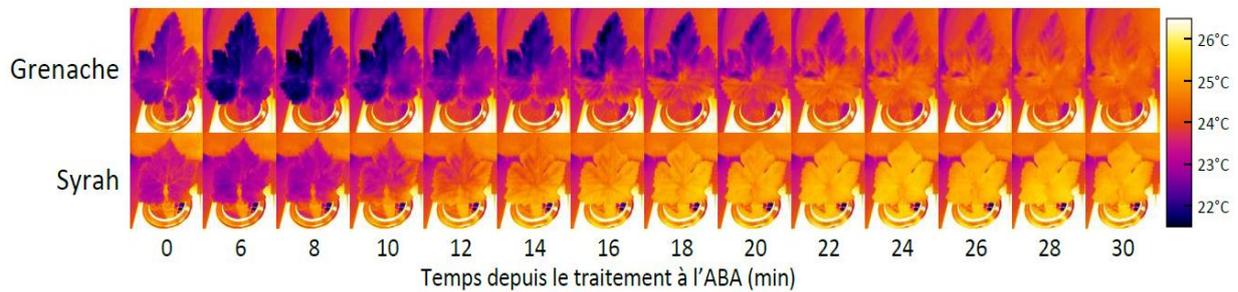


Figure 2 : Réponse de la température foliaire à l'ABA chez un cépage isohydrique (Grenache) et anisohydrique (Syrah). On note la propagation centrifuge chez Grenache et centripète chez Syrah (F. Pantin, données non publiées).

L'objectif de mon travail consistera à :

- 1) Dans un premier temps, à l'aide d'une caméra thermique, valider et caractériser cette dynamique sur ces deux cépages de cuve contrastés (Syrah et Grenache), ainsi qu'un cépage de table Sultanine (anisohydrique). L'analyse de cette signature thermique sera couplée à des mesures des propriétés hydrauliques des feuilles (transpiration par gravimétrie, potentiel hydrique par chambre à pression) dans les différentes conditions expérimentales.
- 2) Dans un second temps, cette signature thermique sera confrontée à des acquisitions en imagerie par résonance magnétique (IRM), qui permettront de suivre la dynamique de l'eau en réponse à l'ABA sur des feuilles placées en conditions contrôlées.

L'enjeu du stage sera d'établir un lien fonctionnel entre la dynamique de fermeture stomatique et la physiologie de l'(an)isohydrie à partir des différences observées entre les cépages.

## **II. Présentation de la structure d'accueil :**

### **1. Historique et localisation géographique de la structure d'accueil :**

Le LEPSE (Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux) a été créé en 1993 pour produire des connaissances et des méthodologies pouvant contribuer à l'amélioration de la productivité des plantes cultivées sous contraintes environnementales. Ce laboratoire est une Unité Mixte de Recherche (INRA-SUPAGRO Montpellier) implantée à Montpellier, sur le campus de Montpellier SupAgro. L'unité dépend du Département Environnement et Agronomie de l'INRA.

L'analyse de la gestion de l'eau par la plante et de ses réactions face au déficit hydrique constitue la thématique fondatrice du LEPSE (1993-1998). Depuis 1998, l'unité a orienté ses recherches sur l'analyse de la variabilité génétique de la réponse des plantes aux contraintes environnementales, en particulier au déficit hydrique (édaphique et atmosphérique). Cette évolution a permis d'explorer les interactions environnement x génétique dans une perspective d'amélioration des plantes.

Aujourd'hui, le LEPSE réunit des écophysiologistes engagés dans une recherche que l'on qualifie de biologie prédictive. Le projet de l'unité porte sur l'analyse et la modélisation des processus impliqués dans le contrôle de la croissance et de la transpiration des plantes soumises à des conditions climatiques fluctuantes et sub-optimales (déficit hydrique, températures élevées) en tenant compte des interactions entre le génotype des plantes et leur environnement. Les objectifs de ces recherches sont l'identification des leviers génétiques et physiologiques utilisés dans la sélection anthropique ou naturelle, la prédiction de la performance d'idéotypes dans des *scenarii* climatiques divers et in fine, des outils d'aide à la création de variétés plus adaptées aux nouveaux contextes agro-climatiques ou à l'optimisation des pratiques culturales.

### **2. Organisation et structure de LEPSE :**

L'unité de recherche LEPSE s'articule autour de 3 équipes de recherches au sein de Laboratoire :

#### **A. Equipe 1 : Stress environnementaux et Processus Intégrés du contrôle de la Croissance (SPIC)**

Les travaux de recherche de SPIC consistent principalement à analyser et modéliser les circuits physiologiques qui lient les différents niveaux d'organisation de la croissance et du développement à l'échelle de la plante en réponse aux contraintes environnementales (phénologie, croissance aérienne et souterraine, développements végétatif et reproducteur, prolifération et extension cellulaire,...). L'activité est principalement conduite chez *Arabidopsis thaliana* et les travaux réalisés permettent de valider l'intérêt de recourir à cette espèce modèle pour conduire des approches à caractère écophysiologique transférables.

## **B. Equipe 2 : Modélisation et Analyse de l'interaction Génotype Environnement (MAGE)**

L'équipe MAGE a été créée en 2005 avec pour mission d'analyser et de modéliser la variabilité génétique de la réponse au déficit hydrique (édaphique et atmosphérique) et à la température chez les céréales. L'espèce de prédilection de l'équipe est le maïs, mais des travaux plus ponctuels et ciblés ont également été conduits sur le sorgho, le blé, le riz et le tournesol dans une approche d'écophysiologie comparée. Cette approche a permis de mettre en évidence des formalismes génériques et d'autres spécifiques de l'espèce étudiée ainsi que de confronter des hypothèses de fonctionnement. Les processus qui ont été étudiés en priorité sont la vitesse d'élongation (essentiellement feuille et soie et, dans une moindre mesure, racine et tige) et l'avortement des grain(e)s. Au cours de la période concernée, l'effet de la température a également été abordé de manière plus systématique, avec des résultats très novateurs.

## **C. Equipe 3 : Efficience de la Transpiration et Adaptation des Plantes aux climats secs (ETAP)**

L'équipe ETAP, au sein de laquelle j'ai effectué mon stage, s'est constituée en 2010. Le projet de recherche d'ETAP porte sur l'étude des processus physiologiques qui déterminent l'efficience de la transpiration pour la photosynthèse comme paramètre d'adaptation des plantes aux climats secs. L'objectif finalisé est la conception de nouveaux systèmes de conduite des cultures et de nouvelles stratégies d'hybridation visant à accroître l'efficience de la transpiration afin d'assurer la durabilité des cultures en condition de raréfaction de l'eau. Le projet est décliné en quatre axes de recherche selon différents niveaux, de la cellule à la plante entière, et s'est progressivement réorganisé, durant la période évaluée, autour de la vigne comme modèle d'étude. L'approche associe l'acquisition de données de physiologie obtenues au champ ou sur plateforme, à la modélisation des relations structure-fonction identifiées.

### **3. La mission qui m'a été confiée au sein de l'équipe :**

La mission qui m'a été confiée au sein de l'équipe au cours de mon stage était de comparer l'effet d'un traitement à l'ABA exogène sur trois variétés de vigne ayant des comportements contrastés sur l'efficience d'utilisation de l'eau et les propriétés hydrauliques en réponse au stress hydrique. L'objectif principal était de montrer comment l'ABA, qui est produit sous l'effet de la sécheresse et qui régule la conductance stomatique, agit sur les trois variétés de vigne, avec une nouvelle approche basée sur l'acquisition d'images infrarouges et IRM, couplée à des mesures de leurs propriétés hydrauliques. L'approche a été développée dans ce rapport.

### III. Matériel et méthodes :

#### 1. Matériel végétal :

Une première série d'expériences a été faite sur des feuilles prélevées sur des plantes en pot conduites en serre. Les plantes destinées à cet effet ont cependant connu un mauvais développement (voir figure 3), sans doute consécutif à une vigueur initiale faible (forte compétition avec des adventives dans le pot lors de la saison précédente) combinée à une phase de pré-culture mal maîtrisée sous des longueurs d'onde de qualité inadéquate (les lampes à mercure provoquant parfois chez la vigne un symptôme dit de « peau de crapaud »).



Figure 3 : les plantes destinées à l'expérimentation conduite sous serre.

Nous avons donc recouru à des plantes plus vigoureuses, cultivées dans une autre serre. Les plantes cette fois-ci étaient indemnes de dysfonctionnements physiologiques, mais pour une raison inconnue ces dernières n'ont par la suite pas répondu au traitement ABA.

Les expériences ont été donc menées durant le printemps 2016, sur des feuilles de vigne prélevées dans le vignoble de SupAgro à Montpellier. Le vignoble a été planté en 2001 sur une parcelle dont le sol artificiel (gravier et sable) a été conçu pour protéger les plantes des maladies liées aux nématodes et pour contrôler le bilan hydrique de la parcelle. La densité de plantation est de 4500 souches /ha, tous les cultivars ont été greffés-soudés sur le porte greffe SO4. La taille des vignes se fait tous les ans au début du mois de Janvier en cordon Royat bilatéral (Syrah et Grenache, cépages de cuve) et en Guyot pour la Sultanine (cépage de table). Les traitements phytosanitaires commencent en Avril avec une fréquence de traitement de 1 traitement / 2 semaines jusqu'à la fin du mois de Juillet. On applique un pesticide systémique principalement contre le Mildiou et l'Oidium. L'irrigation commence au mois de Mai et se prolonge généralement jusqu'au mois de Septembre pour couvrir les besoins d'évapotranspiration. L'eau est apportée en fertirrigation au goutte-à-goutte avec une solution acidifiée (pH compris entre 6.2 à 6.5) FD38 de la société Plantin.

Les feuilles ont été collectées le matin, coupées à la base du pétiole et recoupées rapidement sous l'eau pour éviter la cavitation, et maintenues avec le pétiole dans l'eau jusqu'à utilisation. Le choix des feuilles était très sélectif. Nous recueillons des feuilles planes (pour faciliter la prise d'images) et d'âge comparable (plus jeune feuille ayant totalement terminé sa croissance). Ensuite la surface des feuilles a été nettoyée brièvement à l'aide d'un chiffon humide, et les pétioles laissés dans l'eau pour permettre l'équilibre hydrique au niveau des tissus.

## 2. Imagerie thermique :

Le principe de cette technique consiste en la détection des radiations émises dans la bande infrarouge (IR, 0.7 à 100  $\mu\text{m}$ ) du spectre électromagnétique par la surface de « corps gris » comme les feuilles. L'émission de ce rayonnement est reliée à la température du corps selon la loi de Planck. Au cours de ce stage, nous avons utilisé une caméra ThermoCam B20HS (FLIR Systems) équipée d'un détecteur d'IR dans la bande 7 à 13  $\mu\text{m}$ .

Cette technique est utilisée en physiologie pour tirer parti du fait que le flux de transpiration engendre une diminution de la température de surface de la feuille. Lorsque les stomates se ferment, la diminution de la fraction d'énergie dissipée par évaporation provoque une élévation de cette température. Cette propriété est utilisée depuis longtemps pour estimer le degré relatif d'ouverture des stomates sur les couverts végétaux (Idso et al., 1981). L'imagerie thermique a ouvert de nouvelles perspectives pour la mise au point d'outils permettant d'appréhender l'état hydriques des cultures telles que la pomme de terre (Kotchi and Viau, 2004) et la vigne (Baluja et al., 2012).

Les premiers essais d'imagerie thermique ont été effectués dans l'automate de phénotypage PHENOPSIS qui permet l'analyse de la réponse des plantes au déficit hydrique du sol à haut débit (Granier et al., 2006). Initialement développé pour prendre des photographies dans le visible en vue de l'étude de caractères morphologiques, PHENOPSIS peut également accueillir une caméra thermique. Cependant, l'utilisation de cette caméra dans PHENOPSIS pour acquérir des cinétiques fines de température s'est avérée inappropriée. En effet, la régulation des conditions climatiques, indispensable pour éviter une élévation de la température (liée au système d'éclairage) et donc maintenir des conditions à la fois physiologiques et stables, génère des cycles de température à la fois amples et fréquents (figure 4) malgré tous nos efforts d'optimisation des paramètres de régulation. Or ces cycles n'étaient pas compatibles avec nos besoins d'analyse spatiotemporelle, car l'inertie thermique de la feuille étant différente de celle de l'air (et du capteur de température), il devenait extrêmement difficile de discriminer si une variation de température foliaire était due à des changements de transpiration ou de l'environnement.

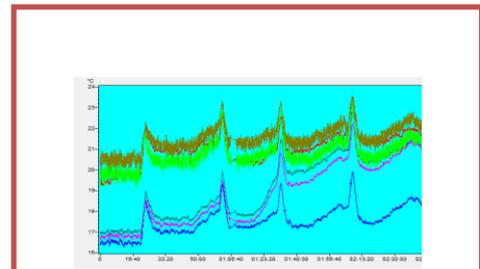


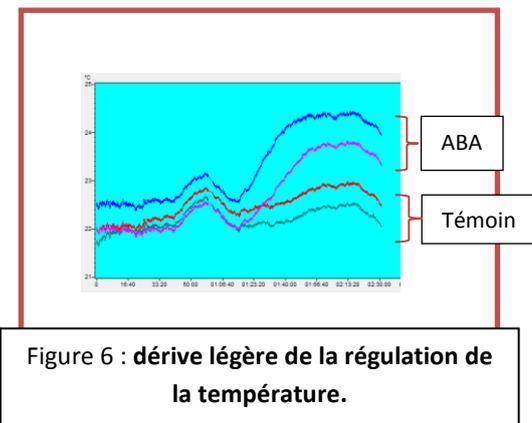
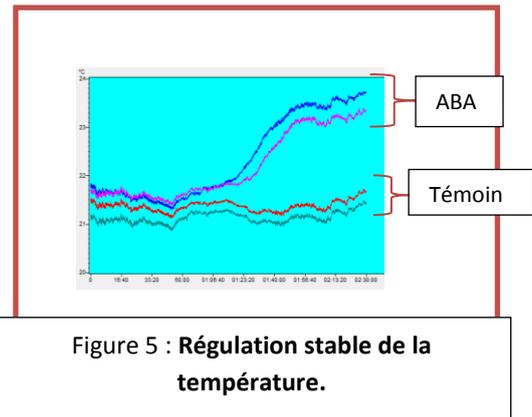
Figure 4 : évolution de la température des feuilles de vigne obtenue dans l'automate de PHENOPSIS.

Nous nous sommes par la suite orientés vers une chambre disposant de caractéristiques plus adaptées à notre protocole en terme de conditions climatiques (mais au détriment de la mobilité de la caméra thermique qui nous aurait permis de phénotyper simultanément un nombre de feuilles plus important). Dans cette chambre de volume important (environ 10  $\text{m}^3$ ), notre stratégie a été d'allumer les lampes sur une zone restreinte de sorte à y obtenir localement une intensité d'environ  $200 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pour éviter les cycles de régulation et obtenir une température acceptable, nous avons fait fonctionner la climatisation et le chauffage de manière simultanée et continue, en impliquant un nombre plus ou moins élevé de résistances en fonction des conditions météorologiques du jour (le flux provenant de l'air extérieur, nous mobilisons plus de résistances pour une journée froide, par exemple). Si ce système ne permettait pas d'atteindre exactement la même valeur de température d'air chaque jour, il présentait l'avantage d'obtenir une température extrêmement stable (Figure 5), ou dérivant légèrement (Figure 6) mais sans jamais causer de cycles. L'humidité relative n'a pas

été régulée car ses variations provoquent également des changements de température foliaire avec un décalage de phase plus ou moins long (notamment à cause de son effet sur la transpiration et la conductance stomatique). Nous avons donc composé avec l'humidité relative ambiante, principalement dépendante des conditions extérieures du jour (aspect le plus critiquable de notre protocole, mais dont la solution nécessiterait des développements techniques). Par ailleurs, le CO<sub>2</sub> n'était pas contrôlé, en l'absence de système de régulation actuellement disponible au LEPSE (ce qui était très peu préjudiciable puisque la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique est extrêmement stable d'une journée à l'autre). Enfin, la ventilation a été réglée au minimum pour éviter les mouvements de feuille liés aux turbulences.

Le champ de la caméra permettant d'observer quatre feuilles simultanément avec une résolution spatiale satisfaisante, et la caméra ne bougeant pas pendant l'expérience, nous avons donc choisi d'observer deux feuilles de deux cépages à chaque expérimentation (par exemple deux feuilles de Syrah et deux feuilles de Grenache, ou deux feuilles de Syrah et deux feuilles de Sultanine). Après avoir disposé quatre feuilles dans la chambre pour une période de stabilisation de 1 h avec le pétiole placé dans un volume d'eau connu au sein d'un tube scellé (pour éviter l'évaporation), on déclenche l'acquisition à la caméra thermique et une image est enregistrée toutes les 30 secondes. On laisse toutes les feuilles dans l'eau pendant 1 h supplémentaire dans ces conditions pour observer un régime stationnaire. Puis, sur la moitié des feuilles, on applique le traitement ABA à distance, sans perturber les conditions thermiques, en ajoutant un volume donné d'une solution-mère de sorte à atteindre la concentration cible (50 ou 400 μM) à l'aide d'une seringue reliée à un tuyau allant dans le tube contenant la feuille (le volume transpiré pendant la phase de stabilisation étant négligeable). On observe alors la cinétique de température des échantillons témoins et traités à l'ABA pendant 1 h 30, après quoi la température a atteint un nouvel équilibre.

La caméra est associée à un logiciel (ThermaCAM Researcher) qui contient deux volets, actualisés en direct (Figure 7) : l'un est fait pour la visualisation de la température foliaire en fausses couleurs ; l'autre est conçu pour le suivi de l'évolution quantitative de la température foliaire moyenne pour les différentes modalités (selon les régions d'intérêt définies par l'utilisateur). A la fin de l'expérience, les valeurs cinétiques de température foliaire sont extraites dans un fichier Excel, et on peut générer un film à l'aide de la succession des images prises lors de l'expérience.



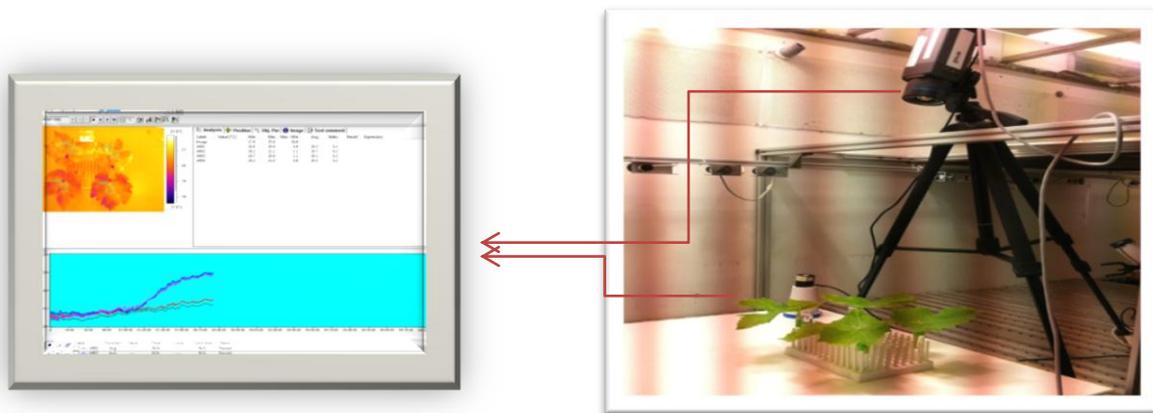


Figure 7 : Prise d'images et suivi de l'évolution de la température des feuilles des 3 génotypes étudiés en fonction des 2 concentrations d'ABA appliquées.

### 3. Détermination de la conductance hydraulique foliaire :

La conductance hydraulique foliaire ( $K_{\text{feuille}}$ ) a été déterminée par la méthode du flux évaporant dite EFM (Sack et al., 2002), qui consiste à placer la feuille coupée à la base de son pétiole dans un environnement favorable à la transpiration, afin de déterminer à la fois son potentiel hydrique foliaire et sa transpiration. Le pétiole a été disposé dans un tube plein d'eau ( $\Psi_{\text{eau}} = 0$ ), la face abaxiale du limbe dirigée vers le bas et maintenue horizontale à l'aide de supports en bois. La mesure de la transpiration ( $E$ ) et du potentiel hydrique foliaire ( $\Psi_{\text{feuille}}$ ) permettent ensuite de calculer  $K_{\text{feuille}}$  suivant la loi d'Ohm appliquée aux flux hydrauliques :

- $K_{\text{feuille}} = E / (\Psi_{\text{eau}} - \Psi_{\text{feuille}}) = - E / \Psi_{\text{feuille}}$

#### 3.1 Détermination de la transpiration :

La transpiration a été mesurée par gravimétrie. Les feuilles contenues dans des tubes ont été pesées à l'aide d'une balance électronique (portée 600 g, précision  $10^{-3}$  g). La balance a un système de couverture anti-vent pour éviter de fausser la pesée par la ventilation de la chambre. Pour chaque feuille, ont été faites 2 pesées ( $m_1$  et  $m_2$ ) avant traitement et 2 autres pesées ( $m_3$  et  $m_4$ ) après traitement à l'acide absicissique. L'intervalle du temps ( $\Delta t$ ) entre les deux pesées est de 15 min. Les valeurs des transpirations finale et initiale ont été obtenues par les équations ci-dessous :

- $E_{\text{initiale}} = (m_1 - m_2) / \Delta t * (1 / S)$
- $E_{\text{finale}} = (m_3 - m_4) / \Delta t * (1 / S)$

Avec  $S$  la surface foliaire déterminée à l'aide du logiciel ImageJ sur l'une des images infrarouges (zénithales) de la séquence.

#### 3.2 L'état hydrique de la feuille :

Le potentiel hydrique foliaire ( $\Psi_{\text{feuille}}$ ) a été mesuré à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA; (Enns et al., 1965). Cette mesure destructive a été

réalisée après la mesure de transpiration finale. Cette méthode consiste à mesurer la tension de l'eau dans les vaisseaux d'une feuille introduite dans une chambre à pression connectée à une bouteille de gaz (azote). Seul le pétiole, coupé à son extrémité, sort de la chambre par un petit orifice prévu à cet effet. La feuille est soumise à une pression gazeuse croissante dans la chambre jusqu'à l'apparition d'une goutte d'eau sur la section du pétiole. La pression minimale pour faire apparaître une goutte d'eau est alors lue sur le manomètre, et correspond à l'opposé de  $\Psi_{\text{feuille}}$ .

#### 4. Imagerie à résonance magnétique (IRM)

L'IRM est une technique très utilisée pour le diagnostic médical, qui fournit des images tridimensionnelles utiles pour générer des coupes anatomiques virtuelles de grande précision. L'IRM est basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN). Il s'agit ici d'observer la RMN des protons de l'eau. L'intensité du signal recueilli pour un élément de volume donné dépend de la concentration de l'eau à l'endroit considéré et on obtient ainsi des images tridimensionnelles de la répartition de l'eau dans le corps vivant (animal ou végétal).

Nous avons réalisé nos essais préliminaires au sein de la plateforme BioNanoMRI, animée par une équipe de médecins spécialistes de l'IRM. Les feuilles de vigne n'avaient jamais été testées sur la plateforme auparavant, aussi avons-nous effectué quelques ajustements techniques. Les feuilles ont été excisées au vignoble et immédiatement laissées le pétiole dans l'eau (comme dans les autres expérimentations), puis transportées jusqu'à la plateforme.

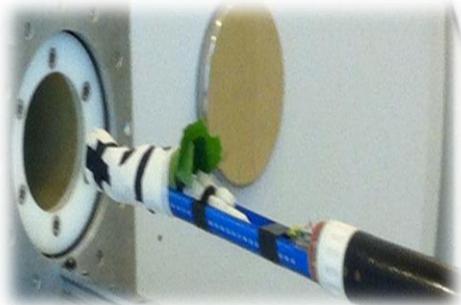


Figure 8 : **Vue d'ensemble du dispositif IRM et de la feuille de vigne roulée dans l'antenne avant qu'elle soit soumise à l'imagerie.**

La feuille a ensuite été roulée afin d'être contenue dans l'antenne. Une référence d'eau a été placée en son centre. Des runs d'acquisition de 13 min ont été effectués dans les conditions définies par l'opératrice de la plateforme (temps de répétition : 4000 ms ; temps d'écho : 8.4 ms ; nombre d'échos : 6 ; champ de vision : 40 mm x 40 mm ; épaisseur : 1 mm ; nombre d'images en épaisseur : 30 ; matrice de données : 192 x 192).

## IV. Résultats :

### 1. Test préliminaire pour la qualification du comportement (an)isohydrique :

Un premier test a été fait sur les 3 génotypes pour tenter de qualifier le comportement (an)isohydrique des trois cépages. Ce test a consisté à mesurer le potentiel hydrique des feuilles bien alimentées en eau, puis à comparer cette valeur avec une mesure effectuée après un dessèchement de 30 minutes sur des feuilles indépendantes. Les résultats montrent que le potentiel hydrique est significativement plus bas après dessèchement chez Syrah et Sultanine comparé à Grenache (Figure 9). Cela tend à confirmer la classification de ces 3 génotypes relevée dans la bibliographie : isohydrie pour Grenache, anisohydrie pour Syrah et Sultanine.

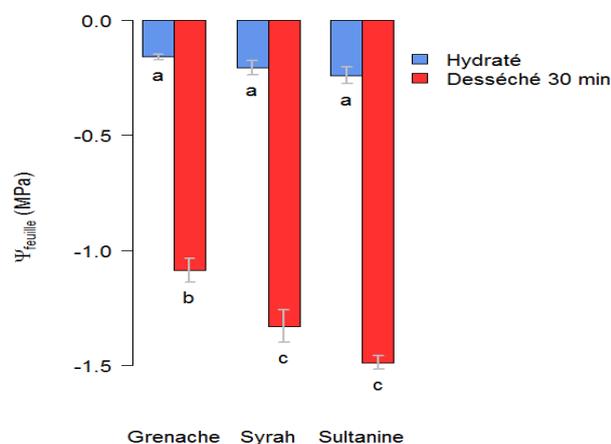


Figure 9 : test de dessèchement des 3 génotypes et la relation de leurs potentiels hydriques avec les comportements an(isohydrique). Barre bleue et barre rouge représentent respectivement le témoin et le traitement. Les lettres indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kruskal-Wallis).

### 2. Effet de la concentration d'acide abscissique sur les propriétés hydrauliques foliaires des trois génotypes étudiés :

Pour évaluer l'effet de l'ABA sur les propriétés hydrauliques foliaires ( $K_{\text{feuille}}$ ,  $\Psi_{\text{feuille}}$ ,  $E$ ) de 3 génotypes de vigne (Syrah, Grenache, Sultanine) à comportements contrastés (an)isohydriques, nous avons appliqué 2 concentrations d'ABA exogène, 50  $\mu\text{M}$  et 400  $\mu\text{M}$  comparées au témoin. Ces 2 concentrations sont très élevées et généralement considérées comme saturantes pour la fermeture stomatique. Après des premiers essais infructueux à 50  $\mu\text{M}$ , nous avons commencé à utiliser une concentration supérieure (400  $\mu\text{M}$ ) pour vérifier si la solution d'ABA devait être remise en cause. Les plantes ne présentant toujours pas une réponse fiable, nous avons conclu que les stomates de nos plantes avaient un niveau de fermeture stomatique déjà trop avancé à l'état initial (pour une raison inconnue), compromettant l'observation de la réponse à l'ABA. Nous avons donc changé de matériel végétal (voir Matériel et Méthodes). Nous avons fait le choix de conserver cette concentration

de 400  $\mu\text{M}$  pour une première série d'expérimentations, comprenant de 7 à 8 répétitions par modalité. Peu avant la fin du stage, nous avons choisi de réitérer l'expérimentation à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , avec laquelle nous avons pu réaliser de 4 à 5 répétitions par modalité.

Afin de mieux caractériser l'effet ABA sur la transpiration, nous avons d'abord estimé la transpiration initiale, en l'absence d'ABA. S'il existe des différences entre cépages, nous avons pu vérifier que les lots traités et non-traités avaient une transpiration égale avant l'application du traitement (Annexe 1). Après avoir appliqué l'ABA à concentration de 50  $\mu\text{M}$ , une diminution de la transpiration a été observée chez les 3 génotypes ; cette diminution de  $E$ , quantifiée par la différence  $\Delta E_{\text{finale-initiale}}$ , était significativement plus importante que la diminution observée chez le témoin, caractérisant la dérive générale du système feuille-climat dans cette expérimentation (Figure 10A). La transpiration a été également mesurée à 400  $\mu\text{M}$  d'ABA ; si l'hormone a également provoqué une baisse de la transpiration à cette concentration, elle n'était pas directement comparable avec celle induite à 50  $\mu\text{M}$  car le témoin dans cette expérience a manifesté une dérive positive (Figure 10B). Nous avons alors effectué une nouvelle analyse statistique sur la différence entre  $\Delta E_{\text{finale-initiale, ABA}}$  et  $\Delta E_{\text{finale-initiale, Témoin}}$ , sur les données appariées par journée de mesure : les conditions micro-météorologiques étant identiques pour l'échantillon témoin et traité, on s'attend à ce que la dérive de transpiration soit identique pour les deux échantillons. Cette analyse a révélé une diminution de la transpiration similaire à 50  $\mu\text{M}$  et à 400  $\mu\text{M}$  chez Syrah et Grenache alors que chez Sultanine, l'inhibition de la transpiration a été significativement plus importante à 400  $\mu\text{M}$  qu'à 50  $\mu\text{M}$  (Figure 10C). Cela suggère que chez Sultanine, le niveau de fermeture stomatique n'était pas saturé à 50  $\mu\text{M}$  d'ABA.

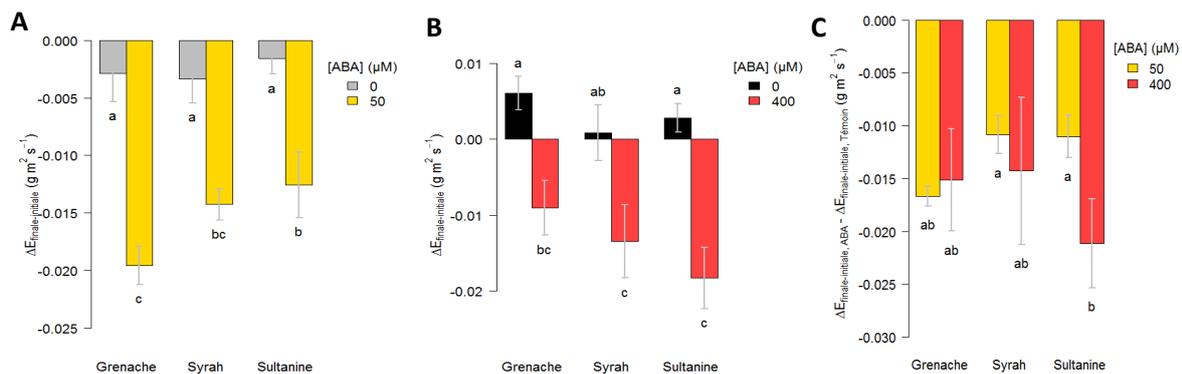


Figure 10 : Effet de l'ABA sur la transpiration de feuilles détachées chez Grenache, Syrah et Sultanine. La transpiration ( $E$ ) initiale et finale a été déterminée sur les échantillons témoins et ceux traités à l'ABA. La différence ( $\Delta E_{\text{finale-initiale}}$ ) est présentée pour l'expérimentation à 50  $\mu\text{M}$  (A) et celle à 400  $\mu\text{M}$  (B). Puis, pour chaque jour de mesure, la différence entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin ( $\Delta E_{\text{finale-initiale, ABA}} - \Delta E_{\text{finale-initiale, Témoin}}$ ),

témoin) a été calculée et soumise à analyse statistique (C). Les lettres indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kruskal-Wallis).

L'état hydrique des feuilles des 3 génotypes a été mesuré sous l'effet des 2 concentrations ABA. Dans l'expérience à 50  $\mu\text{M}$  d'ABA, les potentiels hydriques ( $\Psi_{\text{feuille}}$ ) des 3 génotypes sont identiques et avoisinent -0.2 MPa avant l'ajout de l'hormone. Après l'ajout de l'hormone à 50  $\mu\text{M}$ , les potentiels hydriques ont été augmentés de façon similaire et avoisinent -0.1 MPa. L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les génotypes (Figure 11).

A 400  $\mu\text{M}$  d'ABA, nous avons observé des potentiels hydriques foliaires initiaux similaires chez Grenache et Sultanine (-0.2 MPa), mais pas chez Syrah qui a montré des valeurs beaucoup plus négatives (-0.4 MPa), sans doute liées à des conditions environnementales plus stressantes pour ce cépage anisohydrique sur la période d'expérimentation (Figure 10). Après application de 400  $\mu\text{M}$  d'ABA, les potentiels hydriques ont tous remonté à une valeur bien hydratée de -0.1 MPa, et même encore plus proche de 0 MPa chez Sultanine (Figure 11).

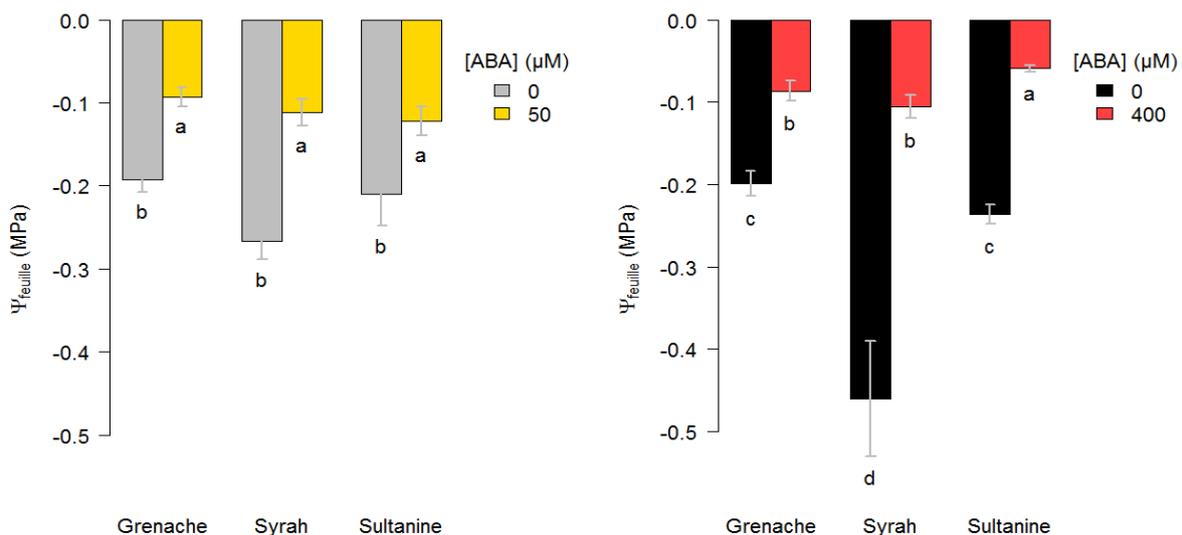


Figure 11 : Effet de l'ABA sur le potentiel hydrique foliaire chez Grenache, Syrah et Sultanine. A gauche de la figure, le potentiel hydrique ( $\Psi_{\text{feuille}}$ ) a été mesuré sur des feuilles traitées à concentration 50  $\mu\text{M}$  ABA (barre jaune) et comparées au témoin (barre grise). A droite de la figure, même analyse sur des feuilles traitées à concentration ABA de 400  $\mu\text{M}$  (barre rouge) et comparées au témoin (barre noire). Les lettres indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kruskal-Wallis).

Ensuite, nous avons pu déterminer la conductance hydraulique foliaire ( $K_{\text{feuille}}$ ). A 50  $\mu\text{M}$ , nous avons observé un même profil de l'effet d'ABA sur  $K_{\text{feuille}}$  chez les 3 génotypes, avec une faible diminution de  $K_{\text{feuille}}$  comparée au témoin (Figure 12). L'analyse statistique n'a pas révélé de différences significatives entre les échantillons témoins et traités. Ceci est sans doute dû à la faible puissance de l'essai ( $n = 4$  à  $5$ ). A 400  $\mu\text{M}$ ,  $K_{\text{feuille}}$  a été affectée significativement ( $n = 7$  à  $8$ ) chez Grenache et Sultanine, mais pas chez Syrah (Figure 12).

Cette analyse à 400  $\mu\text{M}$  confirme donc les résultats obtenus par Coupel-Ledru et al. (soumis) sur Syrah (anisohydrique) et Grenache (isohydrique). En revanche, la sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA chez Sultanine (anisohydrique) n'était pas attendue.

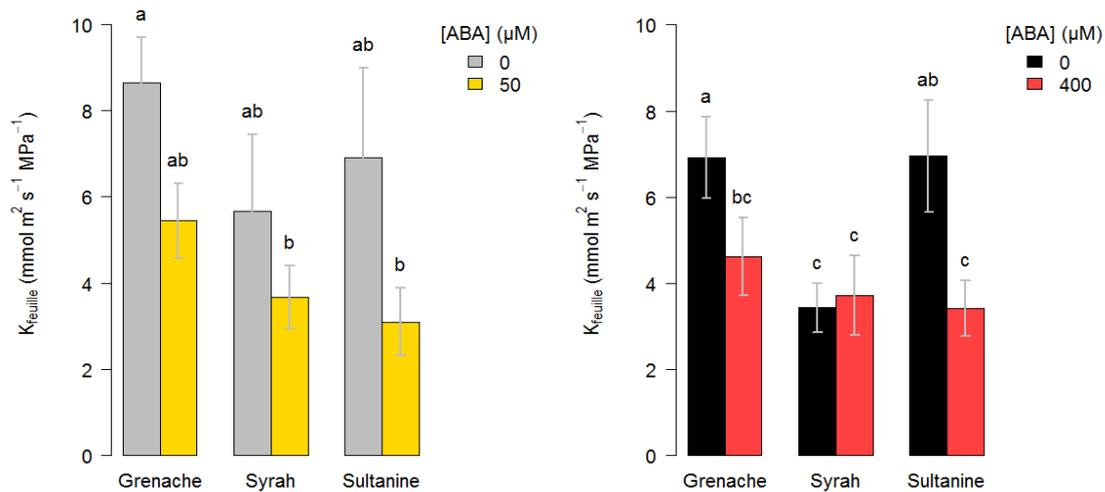


Figure 12 : **Sensibilité de la conductance hydraulique en fonction de la concentration en ABA appliquée chez les 3 génotypes étudiés.** A gauche de la figure, la conductance hydraulique ( $K_{\text{feuille}}$ ) est mesurée à 50  $\mu\text{M}$  ABA (barre jaune) et comparée au témoin (barre grise). A droite de la figure,  $K_{\text{feuille}}$  est mesurée à 400  $\mu\text{M}$  ABA (barre rouge) et comparée au témoin (barre noire). Les lettres indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kruskal-Wallis).

### 3. Caractérisation de la dynamique spatiotemporelle de la fermeture stomatique chez trois génotypes :

Nous voulions étudier la dynamique spatiotemporelle de l'effet de l'acide abscissique sur la fermeture stomatique entre les 3 génotypes et en fonction de la concentration d'ABA. La première étape était de comparer la dynamique de la fermeture des stomates exprimée par l'augmentation de la température foliaire au cours du temps (figure 13). Nous avons montré que cette dynamique est identique chez les 3 génotypes. Après un temps de stabilisation nécessaire pour homogénéiser l'hydraulique et donc la température des feuilles, l'application d'ABA a été effectuée au temps 0 minutes. Pour les trois génotypes, après un temps de latence d'environ 10 minutes, la température commence à augmenter jusqu'à saturation à environ 50 minutes.

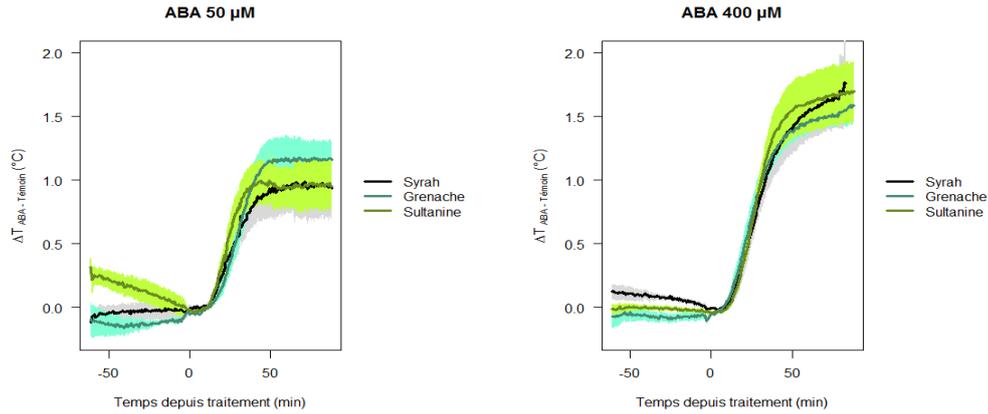


Figure 13 : **Comparaison de la dynamique de la fermeture stomatique entre les 3 génotypes en fonction du traitement ABA appliqué.** A gauche de la figure, la concentration ABA est de 50  $\mu\text{M}$ , à droite, la concentration ABA est de 400  $\mu\text{M}$ , les courbes noires, bleues et vertes correspondent respectivement à Syrah, Grenache et Sultanine.

Si les trois cépages se sont globalement comportés de manière similaire, les deux niveaux de concentration d'ABA ont provoqué des réponses différentes. En effet, la température des feuilles chez les 3 génotypes augmente plus fortement à concentration de 400  $\mu\text{M}$  par rapport à 50  $\mu\text{M}$  d'ABA (Figure 14, mêmes données que la figure 13 mais groupées par génotype). Par ailleurs, la différence de température entre le traitement à 400  $\mu\text{M}$  et le traitement à 50  $\mu\text{M}$  est plus importante chez Syrah et Sultanine (environ 1.75  $^{\circ}\text{C}$ ) que chez Grenache (1  $^{\circ}\text{C}$ ). En outre, l'élévation de la température chez Grenache est significativement plus précoce au traitement 400  $\mu\text{M}$  par rapport à 50  $\mu\text{M}$ , ce qui n'a pas été observé chez les 2 autres génotypes. Les analyses statistiques des paramètres d'un modèle de type exponentiel ajusté à ces courbes (temps de latence, constante de temps et amplitude) confirment les résultats présentés dans la figure 14 (Voir Annexe 2).

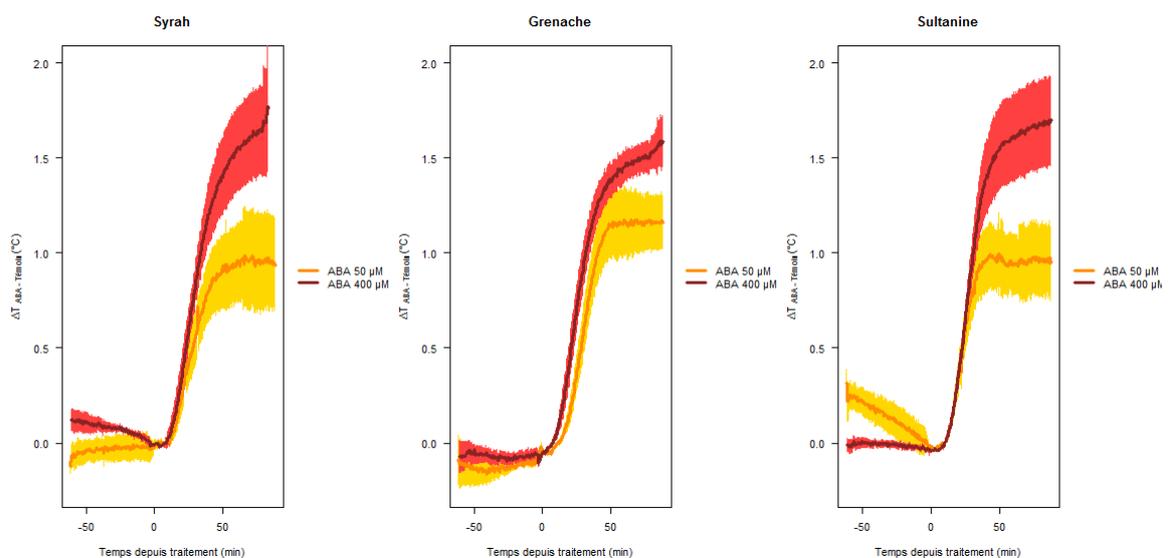


Figure 14 : **Comparaison de la dynamique de la fermeture stomatique entre traitements chez les 3 génotypes étudiés.** Les courbes rouges et orange correspondent respectivement à 400  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  d'ABA pour chacun des génotypes.

Nous avons également examiné la relation qui existe entre la température et la transpiration, chez les génotypes traités à l'ABA avec les 2 concentrations différentes, en les comparant à leurs témoins respectifs. Cette corrélation a été faite entre la différence de la température (finale – initiale) avec la différence de la transpiration (finale – initiale). Cette corrélation est négative (figure 15), à savoir que plus la différence de transpiration diminue, plus la différence de température augmente. Cela est tout à fait cohérent avec le fait que l'acide abscissique en fermant les stomates, inhibe la transpiration et augmente la température des feuilles (figure 15).

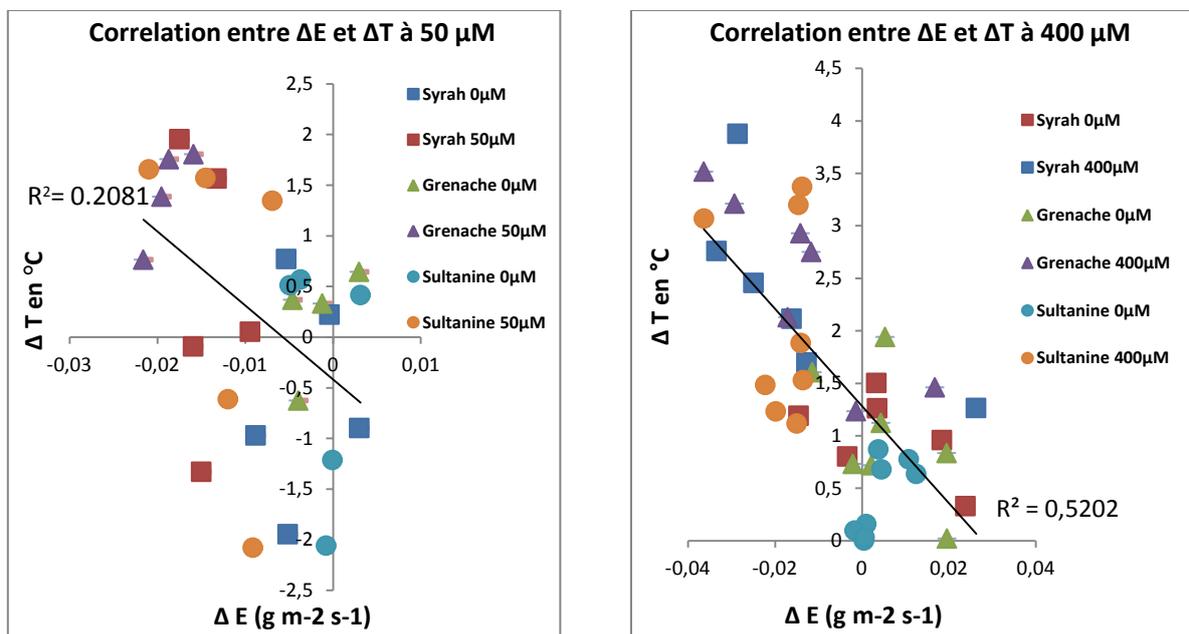


Figure 15 : **Corrélation entre  $\Delta T$  et  $\Delta E$  par génotype et en fonction de la concentration d'ABA.** A gauche Corrélation entre  $\Delta T$  et  $\Delta E$  à 50  $\mu\text{M}$  et à droite Corrélation entre  $\Delta T$  et  $\Delta E$  à 400  $\mu\text{M}$ . les symboles  $\blacksquare$  = Syrah  $\blacktriangle$ =Grenache et  $\bullet$  =Sultanine.

Ensuite, nous avons essayé d'appréhender comment l'acide abscissique agit spatialement au niveau de la feuille chez les 3 variétés. Pour cela nous avons décompté le nombre de films dans lesquels nous pouvons voir des différences de propagation spatiotemporelle de la fermeture stomatique, détectée en imagerie thermique. Ces propagations sont délicates à observer, car la température foliaire présente souvent une certaine variabilité spatiale sur le limbe à l'état initial, qui se combine au bruit biologique associé à la dynamique de la fermeture stomatique. L'objectif principal est de regarder dans quel sens la température au niveau de la feuille se propage au moment de l'ajout de l'ABA : la dynamique spatiale de la fermeture stomatique est-elle centrifuge ou centripète ? Quelle est la dynamique spatiale la plus représentée et par quel génotype ? Les résultats montrent que Grenache et Sultanine manifestent une dynamique majoritairement centrifuge avec respectivement 75% et 62% des répétitions dans lesquelles ce profil a été observé, le reste étant indéterminé (la fermeture

semble homogène sur le limbe, ou sans profil spatial évident). Aucune propagation centripète n'a été identifiée chez ces deux cépages. Syrah, quant à elle, présente une dynamique tantôt centrifuge tantôt centripète avec respectivement 23% et 15% des répétitions, le reste étant indéterminé. Ces comptages sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : **Tableau représentatif des comportements relatifs aux différents géotypes étudiés** (les chiffres sont les nombres de répétitions).

Géotype	Grenache	Syrah	Sultanine
Comportement			
Centrifuge	9	3	8
Centripète	0	2	0
Indéterminé	3	8	5
Total répétition	12	13	13

#### **4. Suivi de la dynamique de l'eau au niveau des tissus foliaires en réponse à l'acide abscissique par imagerie à résonance magnétique :**

Pour aller plus loin dans cette analyse de la propagation spatiotemporelle, nous avons tenté de soumettre nos échantillons à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Pour faire rentrer les organes dans l'appareil, nous les avons roulés et maintenus dans cette position, le pétiole toujours dans l'eau (voir Matériel et Méthodes). La température était maintenue à 20°C, mais les contraintes liées à la géométrie du dispositif nous ont forcés à laisser la feuille à l'obscurité.

Une fois la feuille en place, nous avons commencé par utiliser une procédure pour estimer le T1 caractéristique des feuilles de vigne, que nous avons mesuré à 1200 ms. Ce temps caractéristique, qui reflète les propriétés structurales globales de la feuille, est utile pour optimiser l'acquisition des images et est considéré comme constant entre deux échantillons. Nous avons ensuite procédé à l'acquisition d'images pour estimer deux paramètres variant potentiellement entre deux mesures d'un même échantillon : le M0, qui reflète la teneur en eau, et le T2, qui reflète l'état de liaison de l'eau avec son environnement (comme le potentiel hydrique).

Nous avons acquis une cinétique d'IRM en nous focalisant sur une zone de 4 cm x 4 cm couvrant la jonction entre le pétiole et le limbe. En effet, il n'était pas possible de réaliser l'imagerie sur la feuille entière car la séquence d'acquisition aurait duré trop longtemps (> 1 h) par rapport à la vitesse du phénomène biologique qui nous intéresse (< 15 min). Nous avons également pris soin d'insérer dans cette zone un tube témoin contenant de l'eau pure servant de référence pour le traitement de l'image. Après une heure d'acquisition dans l'eau, l'ABA a été injecté dans le tube à l'aide d'une seringue, et la réponse observée pendant deux heures supplémentaires. Malgré nos efforts, aucune variation significative du signal n'a pu être observée pour les deux paramètres M0 et T2. Ceci est certainement dû au fait que nous partions d'un flux de transpiration très faible dans ces conditions obscures. Nous avons donc

abandonné cet aspect de l'expérimentation, avec des pistes d'améliorations possibles concernant la gestion du microclimat pendant l'expérimentation.

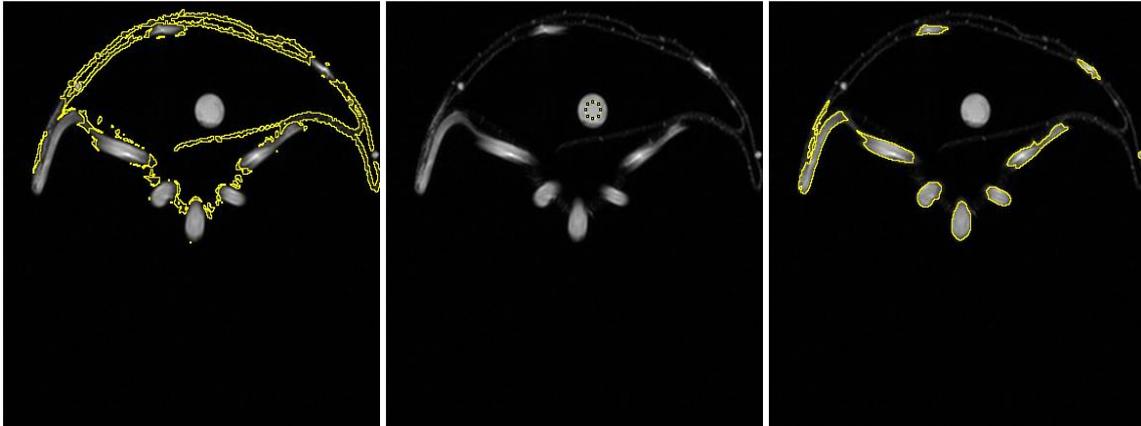


Figure 16 : **Régions d'intérêt pour l'analyse des paramètres IRM sur une feuille de Grenache soumise à la dessiccation.** Les zones en jaune, sélectionnées sous ImageJ, correspondent aux vaisseaux (gauche), aux tissus extravasculaires (milieu), et à la référence en eau (droite) et ont servi à l'analyse quantitative présentée en Figure 16.

Pour essayer toutefois de faire varier le signal par d'autres moyens que l'ABA, nous avons imposé des variations d'état hydrique plus drastiques. Nous en présentons les résultats ici sur Grenache (Figure 16). Après une première image effectuée dans les mêmes conditions que précédemment (pétiole dans l'eau, obscurité, 20°C), nous avons supprimé l'alimentation en eau dans le but de dessécher la feuille. De manière inattendue, aucune variation dans les paramètres M0 ou T2 n'a pu être détectée au bout d'une heure, que ce soit dans les vaisseaux ou les tissus extravasculaires (Figure 17). Ceci est sans doute lié au faible flux transpiratoire dans ces conditions comme mentionné précédemment. La température a alors été élevée jusqu'à 30°C pendant 10 min, puis redescendue à 20°C pour le reste de l'expérience. Nous avons alors observé une diminution immédiate et irréversible des paramètres M0 (vaisseaux et tissus extravasculaires) et T2 (vaisseaux) comparés à la référence. Ceci suggère que l'augmentation du déficit de pression de vapeur causée par l'élévation transitoire de la température a réduit le contenu en eau de la feuille et provoqué un état hydrique plus tendu, notamment dans les vaisseaux ; l'absence d'alimentation en eau ne permettant pas de récupérer l'état hydrique initial lors du retour à 20°C. Cette expérience tend à confirmer les causes de l'échec de l'expérience à l'ABA : des conditions expérimentales non favorables à la transpiration ne permettant pas de capter des variations subtiles du signal.

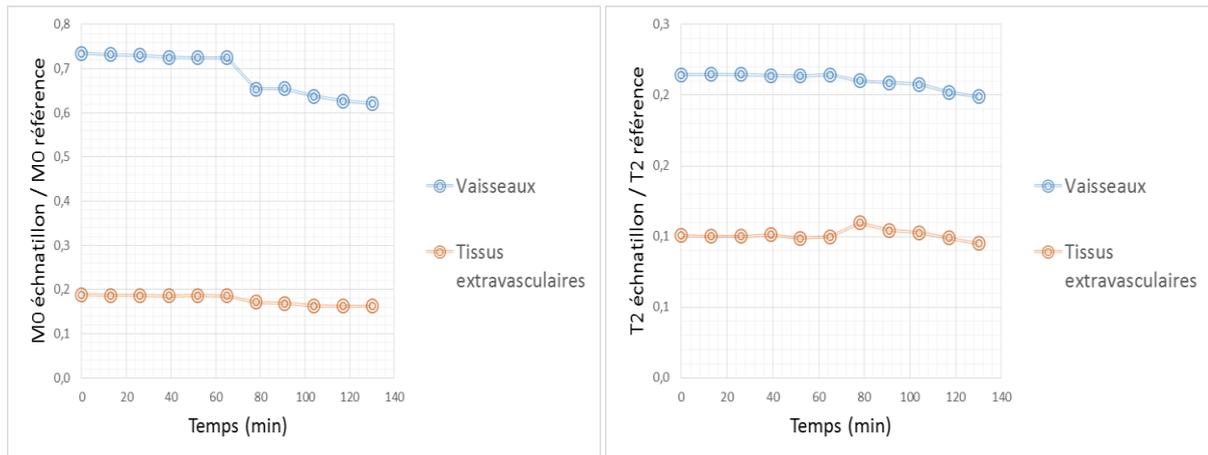


Figure 17 : **Analyse quantitative des paramètres M0 et T2 dans les vaisseaux et tissus extravasculaires d'une feuille de Grenache soumise à la dessiccation.** L'alimentation en eau est supprimée après la première image ( $t = 0$  min). Après 60 min, la température est augmentée à 30°C pendant 10 min puis ramenée à 20°C. La valeur des paramètres M0 (gauche) et T2 (droite) a été ramenée aux valeurs correspondantes de la référence en eau à chaque temps.

## V. Discussion :

Dans cette étude, nous avons caractérisé trois variétés de vigne connues pour leurs stratégies contrastées vis-à-vis de l'utilisation de l'eau (Syrah, Grenache, Sultanine). Notre rapide test de dessèchement a confirmé la classification attendue d'après la bibliographie : tendance isohydrique pour Grenache, tendance anisohydrique pour Syrah et Sultanine (Schultz, 2003 ; Soar et al., 2006 ; Williams, 2012), même si des variations existent en fonction des conditions de culture (Chaves et al., 2010 ; Pou et al., 2012). Notre étude montre que l'ABA a un effet variable sur  $K_{\text{feuille}}$  selon les cépages, notamment à la concentration de 400  $\mu\text{M}$  (où un nombre de répétitions plus important était disponible) : sensibilité chez Grenache et Sultanine, insensibilité chez Syrah. Des études antérieures ont rapporté le rôle négatif de l'ABA sur  $K_{\text{feuille}}$  chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Pantin et al., 2013 ; Shatil-Cohen et al., 2011). Chez la vigne, Coupel-Ledru et al. (soumis) ont montré un effet similaire pour les génotypes isohydriques seulement, tandis que les génotypes anisohydriques restaient insensibles à l'hormone pour  $K_{\text{feuille}}$ . Dans cette étude, Syrah et Grenache ainsi que leurs descendants (Coupel-Ledru et al., 2014) ont été testés, mais pas Sultanine. Notre étude confirme donc les résultats obtenus par Coupel-Ledru et al. (soumis) sur Syrah (anisohydrique, insensible) et Grenache (isohydrique, sensible), mais les résultats sur Sultanine (anisohydrique, sensible) infirment le lien général entre anisohydrie et insensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA (Tableau 2). En revanche, et en dépit d'une variabilité inexplicée, les films obtenus par imagerie thermique tendent à confirmer le lien entre propagation spatiale de la fermeture stomatique et sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA. En effet, Syrah, le seul génotype insensible à l'ABA pour  $K_{\text{feuille}}$ , était également le seul génotype avec une propagation majoritairement indéterminée, et plus rarement centripète. A l'inverse, Grenache et Sultanine, tous deux sensibles à l'ABA pour  $K_{\text{feuille}}$ , ont montré une propagation majoritairement centrifuge et jamais centripète (Tableau 2).

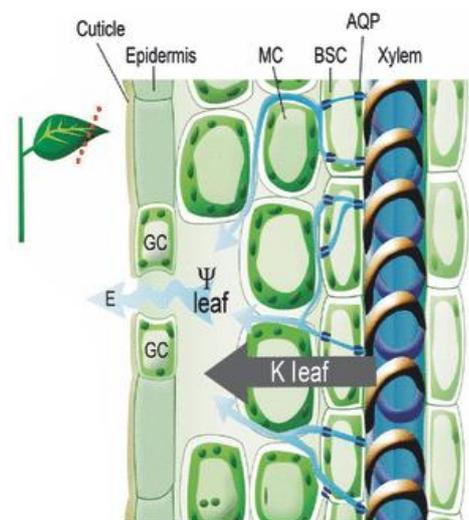
Tableau 2: **Récapitulatif des résultats des propriétés hydrauliques et d'imagerie thermique obtenus.**

Variable Génotype	Comportement	Sensibilité de $K_{\text{feuille}}$ à l'ABA	Propagation spatiale
Grenache	isohydrique	Sensible	Majoritairement centrifuge Absence de centripète
Syrah	anisohydrique	Insensible	Majoritairement indéterminée Présence de centripète
Sultanine	anisohydrique	Sensible	Majoritairement centrifuge Absence de centripète

Les variations de comportement des génotypes vis-à-vis de leur sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA pourraient être à l'origine de différences de sensibilité stomatique à cette même hormone. En effet, Pantin et al. (2013) ont mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* un double effet de l'ABA sur le fonctionnement stomatique, par son effet biochimique direct sur les cellules de garde et son effet indirect sur  $K_{\text{feuille}}$ , affectant la turgescence des cellules de garde. Ceci est cohérent avec les résultats de (Shatil-Cohen et al., 2011), qui montrent que l'ABA transporté par le xylème réduit la perméabilité à l'eau des cellules de la gaine périvasculaire par l'inhibition locale d'aquaporines, réduisant ainsi  $K_{\text{feuille}}$ .

De manière similaire, la sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  chez Grenache et Sultanine à l'ABA pourrait être due à la régulation négative des aquaporines. Il a été suggéré que ces dernières jouent un rôle dans la régulation de  $K_{\text{feuille}}$  en réponse à de nombreux facteurs de l'environnement (Sack and Holbrook, 2006). Par exemple, des études ont montré une corrélation positive entre l'expression d'aquaporines et la dynamique hydraulique des feuilles dans différentes conditions de rayonnement (Cochard et al., 2007), ainsi que le rôle des aquaporines dans la régulation de  $K_{\text{feuille}}$  en réponse à l'ABA, hormone du stress hydrique (Shatil-Cohen et al., 2011). Sade et al., (2014) ont montré que chez des plantes d'*Arabidopsis* dans lesquelles la transcription de *PIPI* était génétiquement réduite, une diminution de conductivité hydraulique protoplasmique (Pf) dans la gaine périvasculaire et dans le mésophylle a été observée et par conséquent, une diminution significative de  $K_{\text{feuille}}$  a été notée. Ce mécanisme pourrait être à l'œuvre chez Grenache et Sultanine, mais pas chez Syrah dont les aquaporines pourraient être insensibles à l'ABA (à cause d'une mutation sur le site protéique sensible à la régulation par l'ABA, par exemple). Ces résultats seraient cohérents avec la théorie de rétroaction hydraulique (la régulation négative des aquaporines réduit  $K_{\text{feuille}}$ , ce qui réduit  $\Psi_{\text{feuille}}$  transitoirement et sert comme un signal de rétrocontrôle positif pour accélérer la fermeture des stomates ; figure 15), qui serait à l'œuvre chez Grenache et Sultanine, mais pas chez Syrah. En revanche, ce mécanisme physiologique n'aurait pas de lien avec le caractère (an)isohydrique du cépage comme postulé initialement par les auteurs de cette théorie, à la lumière de nos résultats obtenus sur la Sultanine.

**Figure 18 : Récapitulatif de la trajectoire de l'eau, de xylème à l'atmosphère.** Le débit d'eau est déterminé par les différences de potentiel hydrique le long de la trajectoire. Le débit est limité par  $K_{\text{feuille}}$ . Les cellules de la gaine (BSC) entourent étroitement le vaisseau vasculaire contenant de l'eau (xylème). Les Canaux d'eau (aquaporines) des cellules de la gaine contrôlent la perméabilité osmotique (Pf) de l'eau de la membrane et déterminent le débit d'eau qui passe à travers la gaine périvasculaire. Ainsi, elle agit comme un centre de contrôle de la régulation de  $K_{\text{feuille}}$  en réponse aux signaux provenant du xylème. Comme la concentration de l'hormone ABA augmente dans le xylème, cela régule négativement l'activité des AQPs des cellules de la gaine (BSC), ce qui réduit le débit d'eau qui passe vers les



cellules de mésophylle et diminue par conséquent transitoirement le  $\Psi_{\text{feuille}}$ , qui induit à son tour une fermeture rapide stomatique et une diminution de E.

Les protéines intrinsèques de la membrane plasmique (PIPs) représentent les aquaporines les plus abondantes de la membrane plasmique de la plante. Des analyses transcriptomiques chez l'arabette et chez le maïs ont indiqué l'expression de 8 et 12 isoformes de PIPs respectivement (Leonhardt et al., 2004; Heinen et al., 2014). Certaines aquaporines de type *PIP1* et *PIP2* sont indispensables aux mouvements hydrauliques au niveau des feuilles. Par exemple, trois PIPs (*PIP1;2*, *PIP2;1*, *PIP2;6*) contribuent individuellement à une augmentation de ~20% de la conductivité hydraulique chez *Arabidopsis thaliana* (Prado et al., 2013). Il semble donc réaliste que l'inactivation d'aquaporines de la membrane plasmique par l'ABA puisse entraîner une limitation de conductivité hydraulique dans les cellules de la gaine périvasculaire, une baisse du potentiel hydrique des feuilles et l'induction de la fermeture des stomates (Shatil-Cohen et al. 2011 ; Sade et al., 2014). A l'inverse, l'ABA semble activer *PIP2;1* dans les cellules de garde, ce qui accélère la fermeture stomatique par une augmentation de la conductivité hydraulique protoplasmique et donc la perte de turgescence de ces cellules (Grondin et al., 2015). Ce mécanisme à l'œuvre dans les cellules de garde aurait donc un effet opposé à celui observé dans les cellules la gaine périvasculaire (Shatil-Cohen et al., 2011). Ces effets apparemment antagonistes contribueraient tous les deux à la fermeture des stomates dans des conditions de stress hydrique, car ils permettraient de coupler la régulation du flux d'eau à l'entrée et à la sortie.

Au niveau moléculaire, les aquaporines sont activées ou désactivées par la phosphorylation ou déphosphorylation de certains peptides qui les composent. Dans les cellules de garde, l'activation de *PIP2;1* par l'ABA est assurée par OST1, une protéine kinase de type SnRK2, connue pour son rôle en aval de la cascade de signalisation de l'hormone, et s'effectue au niveau de l'acide aminé Ser-121 (Grondin et al. 2015). A l'inverse, l'ABA induit la déphosphorylation de *PIP2;1* au niveau de l'acide aminé Ser-280 sur des plantules entières d'*Arabidopsis* (Kline et al., 2010). Cette déphosphorylation correspond probablement à celle observée dans les cellules des gaines périvasculaires (Shatil-Cohen et al., 2011). Ainsi, une seule isoforme PIP peut présenter des réponses au même stimulus qui sont opposées en fonction du type de cellule, par des régulations spécifiques à des sites de phosphorylation distincts. Cela pourrait expliquer la réponse différentielle de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA selon les cépages dans notre étude, aboutissant à des comportements contrastés vis-à-vis de l'utilisation de l'eau.

L'origine des différences observées entre génotypes quant à la propagation spatiotemporelle de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA reste encore hypothétique, mais pourrait être liée à la sensibilité différentielle de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA (Tableau 2). La propagation centrifuge observée chez Grenache et Sultanine apparaît comme la plus intuitive. D'après Pantin et al. (2013), la fermeture stomatique en réponse à l'ABA peut se faire localement (action biochimique) et à distance (action hydraulique) chez les plantes présentant une sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA. Dans notre expérience, le flux d'ABA suit le flux d'eau qui provient du pétiole et se propage dans le limbe via des vaisseaux xylémiques. Ainsi, on s'attend à ce que les stomates les plus proches de la source, au centre du limbe, soient les

premiers exposés à l'hormone et à son action biochimique. Par ailleurs, le passage de l'eau des vaisseaux vers les cellules du mésophylle requiert la traversée de la gaine périvasculaire, qui agit comme un goulot d'étranglement hydraulique (Ache et al., 2010). Si on coupe l'alimentation en eau des feuilles au niveau de la gaine par l'ABA, il est probable que les cellules de garde à proximité étroite de la gaine seront les premières à voir leur turgescence s'affaïsser et ainsi à se fermer. De surcroît, cette diminution du flux d'eau en amont devrait favoriser l'état hydrique en aval et de ce fait retarder la fermeture des stomates les plus éloignés, à la périphérie de la feuille. On assisterait dans ce cas à une propagation centrifuge de la fermeture stomatique.

Pour expliquer la propagation centripète, observée à de rares occasions chez Syrah, il faut faire appel à des hypothèses plus complexes. Par exemple, on peut postuler que les stomates en périphérie de la feuille sont plus rapidement exposés au niveau d'ABA nécessaire au déclenchement de leur fermeture. Pour cela, il faut imaginer que le flux net d'ABA est plus important à la périphérie qu'au centre, parce que le flux d'eau y est plus important (e.g. propriétés anatomiques ou physiologiques augmentant la conductivité hydraulique extravasculaire), que le transport d'ABA s'y effectue plus facilement (e.g. transporteurs plus actifs), que la dégradation ou le piégeage de l'ABA y est moins important (e.g. enzymes de dégradation plus actives, pH apoplastique plus alcalin), ou encore qu'un signal tiers y active la production rapide d'ABA (e.g. vague calcique, signalisation électrique). Par ailleurs, on peut aussi émettre l'hypothèse que la sensibilité à l'ABA des stomates périphériques est plus importante comparée aux stomates du centre, par exemple parce qu'ils seraient pré-exposés à un potentiel hydrique plus négatif (car plus éloignés de la source en eau). On assisterait alors à une propagation centripète de la fermeture stomatique. La combinaison de ces mécanismes avec ceux impliqués dans la propagation centrifuge, en proportions variables dans la population des feuilles étudiées selon l'histoire hydrique à laquelle elles auront été soumises pendant leur développement, donnerait lieu à une propagation apparemment indéterminée.

## VI. Conclusion et perspectives :

La compréhension du fonctionnement stomatique chez les plantes (la vigne en particulier) demande des connaissances très poussées dans plusieurs domaines de recherche, dont l'écophysiologie, l'anatomie et la biologie moléculaire. Dans ce travail nous avons caractérisé les comportements écophysiologiques contrastés de 3 cépages. Nous avons confirmé la sensibilité de la conductance hydraulique foliaire à l'ABA chez Grenache, et l'insensibilité chez Syrah. En revanche, nous avons mis en évidence une sensibilité chez Sultanine, remettant en cause le lien proposé entre cette sensibilité et l'isohydrie. Par ailleurs, notre étude suggère une relation de la sensibilité de  $K_{\text{feuille}}$  à l'ABA et la propagation spatiotemporelle de la fermeture stomatique en réponse à l'hormone. L'activation/inactivation par l'ABA des aquaporines au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde ou de la gaine serait un facteur à l'origine de ces comportements contrastés. Les caractéristiques structurales de la feuille comme la densité, la taille, la géométrie des vaisseaux vasculaires et leur arrangement dans les nervures, qui sont très variables selon les génotypes, pourraient également jouer un rôle majeur dans la distribution et la gestion de l'eau dans la feuille. Une étude plus approfondie, à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique par exemple, pourrait permettre d'apporter de nouveaux éléments pour répondre à cette problématique.

## Références bibliographiques :

- Ache, P., Bauer, H., Kollist, H., Al-Rasheid, K.A.S., Lautner, S., Hartung, W., Hedrich, R., 2010.** Stomatal action directly feeds back on leaf turgor: new insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements. *Plant J.* 62, 1072–1082. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04213.x
- Baluja, J., Diago, M.P., Balda, P., Zorer, R., Meggio, F., Morales, F., Tardaguila, J., 2012.** Assessment of vineyard water status variability by thermal and multispectral imagery using an unmanned aerial vehicle (UAV). *Irrig. Sci.* 30, 511–522. doi:10.1007/s00271-012-0382-9
- Carroué, L., 2013.** La France : les mutations des systèmes productifs. Armand Colin.
- Chaves, M.M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J.M., Santos, T., Regalado, A.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., 2010.** Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Ann. Bot.* 105, 661–676. doi:10.1093/aob/mcq030
- Cochard, H., Venisse, J.-S., Barigah, T.S., Brunel, N., Herbette, S., Guillot, A., Tyree, M.T., Sakr, S., 2007.** Putative Role of Aquaporins in Variable Hydraulic Conductance of Leaves in Response to Light. *Plant Physiol.* 143, 122–133. doi:10.1104/pp.106.090092
- Coupel-Ledru, A., Lebon, É., Christophe, A., Doligez, A., Cabrera-Bosquet, L., Péchier, P., Hamard, P., This, P., Simonneau, T., 2014.** Genetic variation in a grapevine progeny (*Vitis vinifera* L. cvs Grenache×Syrah) reveals inconsistencies between maintenance of daytime leaf water potential and response of transpiration rate under drought. *J. Exp. Bot.* eru228. doi:10.1093/jxb/eru228
- El Jaafari, S., Paul, R., Lepoivre, P., Semal, J., Laitat, É., 1993.** Résistance à la sécheresse et réponses à l'acide abscissique: analyse d'une approche synthétique. *Cah. Agric.* 2, 256–263.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K., Nakazono, M., Kamiya, Y., Koshiba, T., Nambara, E., 2008.** Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. *Plant Physiol.* 147, 1984–1993. doi:10.1104/pp.108.116632
- Enns, T., Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., 1965.** Effect of Hydrostatic Pressure on Gases Dissolved in Water. *J. Phys. Chem.* 69, 389–391. doi:10.1021/j100886a005
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009.** Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management, in: Lichtfouse, E., Navarrete, M.,

Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (Eds.), Sustainable Agriculture. Springer Netherlands, pp. 153–188.

**Gallé, Á., Csiszár, J., Benyó, D., Laskay, G., Leviczky, T., Erdei, L., Tari, I., 2013.** Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: Biosynthesis and function of ABA in stress responses. *J. Plant Physiol.* 170, 1389–1399. doi:10.1016/j.jplph.2013.04.010

**Granier, C., Aguirrezabal, L., Chenu, K., Cookson, S.J., Dauzat, M., Hamard, P., Thioux, J.-J., Rolland, G., Bouchier-Combaud, S., Lebaudy, A., Muller, B., Simonneau, T., Tardieu, F., 2006.** PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol.* 169, 623–635. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01609.x

**Grondin, A., Rodrigues, O., Verdoucq, L., Merlot, S., Leonhardt, N., Maurel, C., 2015.** Aquaporins Contribute to ABA-Triggered Stomatal Closure through OST1-Mediated Phosphorylation. *Plant Cell* 27, 1945–1954. doi:10.1105/tpc.15.00421

**Heinen, R.B., Bienert, G.P., Cohen, D., Chevalier, A.S., Uehlein, N., Hachez, C., Kaldenhoff, R., Thiec, D.L., Chaumont, F., 2014.** Expression and characterization of plasma membrane aquaporins in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.* 86, 335–350. doi:10.1007/s11103-014-0232-7

**Idso, S.B., Reginato, R.J., Jackson, R.D., Jr, P.J.P., 1981.** Measuring yield-reducing plant water potential depressions in wheat by infrared thermometry. *Irrig. Sci.* 2, 205–212. doi:10.1007/BF00258374

**Kline, K.G., Barrett-Wilt, G.A., Sussman, M.R., 2010.** In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15986–15991. doi:10.1073/pnas.1007879107

**Kotchi, S.O., Viau, A.A., 2004.** Détection du stress hydrique par thermographie infrarouge. Application à la culture de la pomme de terre. Université Laval.

**Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., Schroeder, J.I., 2004.** Microarray Expression Analyses of *Arabidopsis* Guard Cells and Isolation of a Recessive Abscisic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant. *Plant Cell* 16, 596–615. doi:10.1105/tpc.019000

**Malheiro, A., Santos, J., Fraga, H., Pinto, J., 2010.** Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Clim. Res.* 43, 163–177. doi:10.3354/cr00918

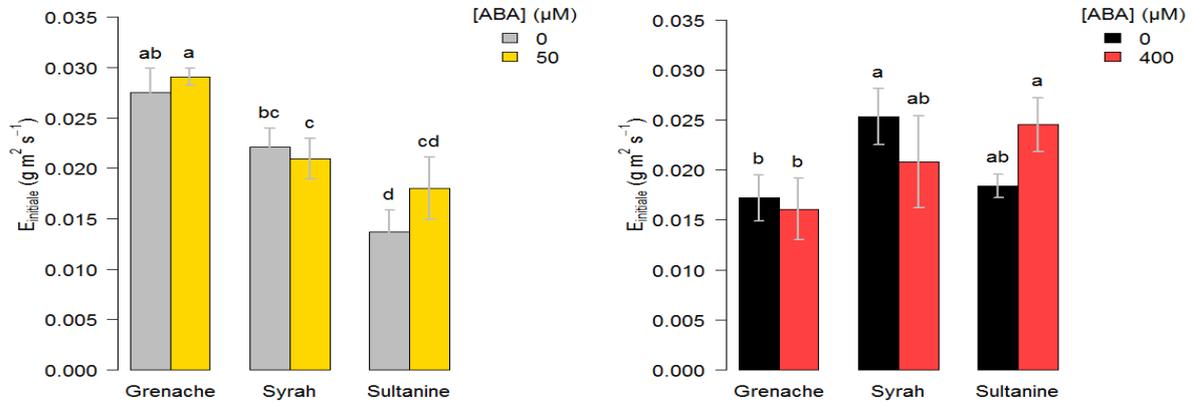
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., Santoni, V., 2008.** Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 595–624. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734
- Maury, P., Berger, M., Mojayad, F., Planchon, C., 2000.** Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant Soil* 223, 155–162. doi:10.1023/A:1004849509673
- Pantin, F., Renaud, J., Barbier, F., Vavasseur, A., Le Thiec, D., Rose, C., Bariac, T., Casson, S., McLachlan, D.H., Hetherington, A.M., Muller, B., Simonneau, T., 2013.** Developmental Priming of Stomatal Sensitivity to Abscisic Acid by Leaf Microclimate. *Curr. Biol.* 23, 1805–1811. doi:10.1016/j.cub.2013.07.050
- Prado, K., Boursiac, Y., Tournaire-Roux, C., Monneuse, J.-M., Postaire, O., Ines, O.D., Schöffner, A.R., Hem, S., Santoni, V., Maurel, C., 2013.** Regulation of Arabidopsis Leaf Hydraulics Involves Light-Dependent Phosphorylation of Aquaporins in Veins. *Plant Cell* 25, 1029–1039. doi:10.1105/tpc.112.108456
- Prieto, J.A., Lebon, É., Ojeda, H., 2010.** Stomatal behavior of different grapevine cultivars in response to soil water status and air water vapor pressure deficit. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 44, 9–20.
- Rosdeusch, L., 2015.** Contribution du métabolisme de l'ABA et de la conductivité hydraulique à la réponse de la transpiration en situation de contrainte hydrique chez la Vigne: Variabilité génétique et effets du greffage. Université de Bordeaux.
- Sack, L., Holbrook, N.M., 2006.** Leaf Hydraulics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 361–381. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144141
- Sack, L., Melcher, P.J., Zwieniecki, M.A., Holbrook, N.M., 2002.** The hydraulic conductance of the angiosperm leaf lamina: a comparison of three measurement methods. *J. Exp. Bot.* 53, 2177–2184. doi:10.1093/jxb/erf069
- Sade, N., Moshelion, M., 2014.** The dynamic isohydric–aniso-hydric behavior of plants upon fruit development: taking a risk for the next generation. *Tree Physiol.* 34, 1199–1202. doi:10.1093/treephys/tpu070
- Sade, N., Shatil-Cohen, A., Attia, Z., Maurel, C., Boursiac, Y., Kelly, G., Granot, D., Yaaran, A., Lerner, S., Moshelion, M., 2014.** The Role of Plasma Membrane Aquaporins in Regulating the Bundle Sheath-Mesophyll Continuum and Leaf Hydraulics. *Plant Physiol.* 166, 1609–1620. doi:10.1104/pp.114.248633

- Sade, N., Vinocur, B.J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., Wallach, R., Karchi, H., Moshelion, M., 2009.** Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytol.* 181, 651–661. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02689.x
- Schultz, H., 2000.** Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 2–12. doi:10.1111/j.1755-0238.2000.tb00156.x
- Shatil-Cohen, A., Attia, Z., Moshelion, M., 2011.** Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylem-borne ABA? *Plant J.* 67, 72–80. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04576.x
- Shatil-Cohen, A., Moshelion, M., 2012.** Smart pipes. *Plant Signal. Behav.* 7, 1088–1091. doi:10.4161/psb.21162
- Soar, C. j., Speirs, J., Maffei, S. m., Penrose, A. b., Mccarthy, M. g., Loveys, B. r., 2006.** Grape vine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 2–12. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00038.x
- Tardieu, F., 2003.** Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends Plant Sci.* 8, 9–14. doi:10.1016/S1360-1385(02)00008-0
- Tardieu, F., Simonneau, T., 1998.** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.* 49, 419–432. doi:10.1093/jxb/49.Special\_Issue.419
- Turner, N., 1986.** Adaptation to Water Deficits: a Changing Perspective. *Funct. Plant Biol.* 13, 175–190.
- Vandeleur, R.K., Mayo, G., Shelden, M.C., Gilliam, M., Kaiser, B.N., Tyerman, S.D., 2009.** The Role of Plasma Membrane Intrinsic Protein Aquaporins in Water Transport through Roots: Diurnal and Drought Stress Responses Reveal Different Strategies between Isohydric and Anisohydric Cultivars of Grapevine. *Plant Physiol.* 149, 445–460. doi:10.1104/pp.108.128645
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2010.** Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ.* 33, 510–525. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x

**Wilkinson, S., Davies, W.J., 2002.** ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 25, 195–210. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00824.x

## Annexes :

**Annexe 1 :** Transpiration initiale : les feuilles témoins et les feuilles soumises au traitement ABA ont une transpiration initiale similaire.



**Annexe 2 :** Paramètres graphiques : ces paramètres expliquent les différences significatives et non significatives observées sur la courbe de la dynamique de fermeture stomatique (Temps de latence, Amplitude et Constante du temps) entre les deux concentrations d'ABA (50  $\mu M$  et 400  $\mu M$ ).

