

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann

Institut National de la Recherche Agronomique

THÈSE

présentée par :

Thomas DURAND

soutenue le 17 décembre 2009

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Physiologie végétale

Approche protéomique des stress abiotiques chez *Populus tremula* x *P. alba*

THÈSE dirigée par :

M. Philippe LABEL

Directeur de Recherche, INRA Orléans

RAPPORTEURS :

Mme Milvia-Luisa RACCHI

M. Yves JOLIVET

Professeur, Université de Florence (Italie)

Maître de conférences, HDR, Université de Nancy

JURY :

M. Alain LEGRAND

M. Franck BRIGNOLAS

M. Jean-François HAUSMAN

M. Yves JOLIVET

M. Philippe LABEL

M. Domenico MORABITO

Mme Milvia-Luisa RACCHI

Mme Jenny RENAUT

Professeur, Université Orléans, Président du jury

Professeur, Université d'Orléans

Professeur Associé, Université de Luxembourg,
CRP-Gabriel Lippmann

Maître de conférences, Université de Nancy

Directeur de Recherche, INRA Orléans

Maître de conférences, Université d'Orléans

Professeur, Université de Florence (Italie)

Responsable de la Plateforme Protéomique, CRP
- Gabriel Lippmann



Populus tremula x *P. alba*
Génotype 717-1B4

Cette thèse est dédiée à la mémoire de Joël Durand
mon père

« La science est un jeu dont la règle du jeu consiste à trouver quelle est la règle du jeu. »

François Cavanna

« Ce que la vie et la société exigent de chacun de nous, c'est une attention constamment en éveil, qui discerne les contours de la situation présente, c'est aussi une certaine élasticité du corps et de l'esprit, qui nous mette à même de nous y adapter. ***Tension et élasticité, voilà deux forces complémentaires l'une de l'autre que la vie met en jeu.*** »

Henri Bergson, Le rire. Essai sur la signification du comique (1900)

« Je ne suis pas loin d'imaginer Thomas Durand comme Merlin l'Enchanteur, avec un long bonnet pointu, entouré de créatures dans son laboratoire. »

Marie Darrieussecq (2008)

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien du Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Grand Duché du Luxembourg (bourse AFR 05/094).

Je suis reconnaissant envers les responsables des équipes de recherche qui m'ont accueilli durant ces années dans leurs laboratoires, le professeur **Francis Delmotte** ainsi que le professeur **Franck Brignolas** du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures ainsi que le professeur **Lucien Hoffmann** du département EVA du Centre de Recherche Public -Gabriel Lippmann.

Je remercie le professeur **Milvia-Luisa Racchi** et le docteur **Yves Jolivet** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail. Je remercie également les membres du jury de thèse, notamment le professeur **Alain Legrand**.

J'ai eu la chance d'être encadré par un certain nombre de scientifiques sur plusieurs sites et dans plusieurs instituts, une chance dont s'ensuit maintenant d'inévitables remerciements qui risqueraient de se répéter et de paraître interminables si je disais tout ce que j'ai à dire. Je serai donc bref.

En premier lieu, je tiens à remercier **Domenico Morabito**, tout simplement parce qu'il est celui qui a fait germer l'idée saugrenue que je pourrais éventuellement faire une thèse, celui qui est directement responsable de m'y avoir fait croire. Sans sa patience, ses encouragements et son aide constante, je n'aurais pas osé tenter ce challenge, je n'en serais pas là et vous ne seriez pas en train de lire ces lignes. Si j'osais je dirais que cette thèse est un peu la sienne.

Philippe Label a accepté de diriger ma thèse et je l'en remercie. Je le remercie aussi pour le recul qu'il a su prendre, son œil impitoyable sur chaque faiblesse, et les impulsions qu'il a su me donner aux moments critiques. Je n'ai pas oublié ses conseils sur l'amour qu'il me faudrait nourrir pour les statistiques et le langage informatique... Je pense qu'il sait bien que les conseils les meilleurs sont souvent ceux que l'on ne suit pas suffisamment.

De l'autre côté de la frontière, **Jean-François Hausman** a un jour répondu à un email envoyé de France par un étudiant en quête d'un accueil et d'un financement pour une thèse. La réponse qui tenait en deux lignes disait, en substance : pourquoi pas ? Je suis très reconnaissant à Jean-François d'avoir rendu possible ces quatre années de labeur. Il m'a accueilli, chaleureusement, dans une équipe internationale où j'ai pu faire progresser mon anglais et ma maîtrise du canoë entre autres compétences, même si, indéniablement, il me reste des progrès à faire.

Trois encadrants n'étant pas suffisant, j'ai pu travailler avec **Jenny Renaut** qui m'a très vite fait me sentir un membre à part entière de la *Plateforme Protéo*. Grâce à elle, j'ai pu me familiariser avec cet environnement technologique intimidant. Merci beaucoup, Jenny.

Kjell Sergeant est le Spectro-Maître du CRP. Non content d'être scandaleusement compétent en ce domaine, il a aussi fait preuve de la qualité de sa plume dans l'aide qu'il m'a apportée pour la rédaction des articles. Je le remercie pour son soutien précieux.

Sabine Carpin, sans façon, m'a accueilli dans son bureau quand il faisait froid, a mis les mains dans le terreau et l'azote liquide pour m'aider lors des prélèvements quand mes quatre mains (entendez par là que Domenico était présent) risquaient de ne pas suffire. Je lui suis reconnaissant d'avoir été, mine de rien, une personne importante dans mon parcours.

Sur deux sites, à 500 km d'intervalle, durant ces années, j'ai pu travailler et apprendre dans une ambiance dont je serai bientôt nostalgique auprès de gens que je n'oublierai pas de sitôt, **Agnès, Coralie, Fotini, Sophie, Bruno, Ludovic, Régis** et **Sylvain** de la fratrie des doctorants ; **Laurent, Didier** et **Isabelle**, compagnons des réunions Biofar, mais aussi **Christiane, Françoise, Géraldine, Stéphanie, Alain, Aurélien, François**, et puis **Gilles** dont la gentillesse nous manquera beaucoup. Je n'oublierai pas que j'ai, un temps, partagé mon bureau avec **Maria-Hélène, Carole, Christelle, Cosette, Bram, Florent** et tout un tas de stagiaires généralement très sympa... mais dont les noms m'échappent.

Ce travail n'aurait peut-être pas été supportable sans la folie ambiante alimentée par un ingénieur technicien mais néanmoins ami, **Sébastien**, dont le bon goût littéraire me fera oublier son peu d'oreille musicale et son étrange amour pour les arts martiaux teutons...

Pol, tu es parti trop tôt vers les sphères de l'enseignement ! Il a fallu faire cette dernière année sans toi. C'est scandaleux.

Je n'oublie pas **Sacha**, notre brillant Dungeon Master qui *ira loin*, et dont j'attends beaucoup dans l'avenir afin de pouvoir dire : *moi je connais un prix Nobel*. Merci d'avoir toujours été là pour donner un avis, un conseil ou un coup de main.

Un merci également aux personnels administratifs, qui savent parfois nous simplifier l'existence au milieu des impératifs officiels. Un merci particulier à **Vanessa** pour son aide anglophonique sur la rédaction des articles.

Hors du laboratoire, la vie continue parfois, ce que je dois à ma famille et à mes amis qui m'ont aidé à faire aboutir des projets moins scientifiques. S'ils ne savent pas que je leur en suis reconnaissant c'est embêtant, car peu d'entre eux viendront lire cette page.

Enfin, il est des soutiens plus intimes et quotidiens qui n'attendent pas d'être mentionnés dans ces lignes, qui n'en ont pas besoin, mais auxquels on pense quand même, bien sûr, parce qu'on n'y peut rien.

Table des matières

Abréviations	9
Introduction générale.....	11
1.1. Contexte	13
1.2. Le peuplier	15
1.3. Le stress : concept et définitions.....	16
1.3.1. Concept.....	16
1.3.2. Définitions	22
1.4. Problématique et objectifs	24
Le stress métallique	27
2.2. Le zinc	32
2.2.1. Introduction.....	32
2.2.2. Importance biologique	32
2.2.3. Homéostasie du zinc.....	33
2.3. Le cadmium	35
2.3.1. Introduction.....	35
2.3.2. Toxicité	36
2.4. Phytotoxicité des métaux.....	38
2.5. Tolérance aux métaux lourds	41
2.6. Accumulation et compartimentation des métaux lourds	45
2.7. Questions et stratégie	49
2.8. Zinc and cadmium effect on growth and ion distribution in <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i> ..	50
2.9. Acute metal stress in <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by Cd ²⁺ . <i>Proteomics, in press.</i>	55
2.10. Cd and Zn are differentially distributed in <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> exposed to metal excess. Submitted to <i>Plant Biosystems</i>	76
2.11 Discussion synthétique.....	91
2.11.1. Gestion du zinc par la plante.....	91
2.11.2. L'effet-dose du cadmium.....	95
Le stress thermique.....	98
3.1. Introduction.....	100
3.2. Définir le stress thermique	104
3.3. Réponse végétale aux fortes températures	106

3.4. Réponses moléculaires.....	110
3.5. Questions et stratégie	112
3.6. Screening of changes in leaf and cambial proteome of <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> genotype 717-1B4 under heat stress.....	113
Le stress hydrique.....	145
4.1 Introduction.....	147
4.2 Effets physiologiques de la sécheresse	149
4.3 Mécanismes de défense.....	151
4.4 Réponses physiologiques à la sécheresse	153
4.5 Questions et stratégie	155
4.6 Poplar under drought: comparison of leaf and cambial proteomic responses.	156
4.7 Discussion et perspectives	178
Discussion générale.....	181
5.1 État de stress en relation avec les contraintes.....	183
5.2 Réponses foliaires de stress chez le peuplier.....	187
5.3 Réponses cambiales de stress chez le peuplier.....	189
5.4 Perspectives.....	195
Références.....	197

Abréviations

• Ψ	Potentiel hydrique
• 2-D DIGE	Électrophorèse bidimensionnelle différentielle
• APX	Ascorbate Peroxydase
• CAT	Catalase
• ADN	Acide désoxyribonucléique
• ARN	Acide ribonucléique
• DTT	1,4-Dithiothreitol
• GAS	Syndrome Général d'Adaptation (General Adaptation Syndrome, Selye 1951)
• GPX	Glutathion Peroxydase
• GR	Glutathion Réductase
• g_s	Conductance stomatique
• GSH	Glutathion sous forme réduite
• GSSG	Glutathion sous forme oxydée
• GST	Glutathion-s-transférase
• HSF	Heat Shock Factor
• HSP	Heat Shock Protein
• kDa	kilo Dalton
• LEA	Late Embryogenesis Abundant
• Lhc	Antenne collectrice de lumière (<i>Light harvesting complex</i>)
• MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
• MT	Metallothionéine
• OEC	Complexe producteur d'oxygène (<i>Oxygen Evolving Complex</i>)
• PC	Phytochélatine
• pH	Potentiel hydrogen
• P_N	Assimilation nette du CO ₂
• ppm	Parties par millions.
• PR protein	Protéine de réponse aux pathogènes (Pathogenesis Related protein)
• PSI et PSII	Photosystèmes 1 et 2
• ROS	Espèces activées de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
• RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
• RWC	Contenu relatif en eau (Relative Water Content)
• SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
• SLA	Specific Leaf Area
• SOD	Superoxyde Dismutase

Chapitre 1

Introduction générale

- 1.1 Contexte
- 1.2 Le peuplier
- 1.3 Le stress, concept et définitions
- 1.4 Problématique et objectifs

1.1. Contexte

Les questions environnementales s'imposent de manière récurrente sur la scène publique, occasionnant inquiétude, débats et recherches, notamment sur les thématiques des pluies acides (Krug et Frink 1983), de la couche d'ozone (Smith *et al.* 1992), et, plus récemment, depuis la prise de conscience des dangers que représente le changement climatique. L'élévation de la température moyenne de la Terre, telle que prédite par les experts, s'accompagnerait d'évènements extrêmes (canicules, inondations, ouragans, etc.) plus fréquents et plus intenses (Easterling *et al.* 2000). Ces évènements font peser sur les écosystèmes déjà fragilisés par les activités humaines la menace d'importantes extinctions d'espèces. La déforestation qui entraîne le lessivage des sols, la désertification et l'accumulation de sels dus aux mauvaises pratiques d'irrigation, les pollutions de l'eau, de l'air et des sols par les rejets industriels, agricoles et domestiques continuent de dégrader l'environnement et de rendre les équilibres écologiques de plus en plus précaires. Faut-il en conclure que des écosystèmes sont appelés à disparaître ?

De fait, les plantes ont toujours été soumises aux aléas environnementaux. Au fil de l'évolution, elles ont développé des capacités d'adaptation et d'acclimatation importantes (Schlichting 1986). Les arbres colonisent des milieux extrêmement variés grâce à une grande plasticité phénotypique (Dickinson *et al.* 1991). Les contraintes abiotiques demeurent toutefois des facteurs déterminants de la répartition des espèces sur Terre. La disponibilité en eau est le principal critère pour l'installation et la survie des plantes, notamment dans les écosystèmes forestiers (Loustau *et al.* 2005). La sécheresse est la première cause de perte de production végétale des plantes de grande culture ; la recherche de cultivars résistant à la sécheresse serait une alternative à une irrigation qui s'avère économiquement et écologiquement problématique (McTernan et Mize 1992; Siebe et Cifuentes 1995). Les fortes températures estivales des régions tempérées constituent des évènements extrêmes, significativement au-delà des températures optimales pour la physiologie des plantes (Mahan *et al.* 1995). Ces températures sont appelées à se produire de plus en plus fréquemment, en corrélation avec des changements atmosphériques qui modifieront très probablement les communautés végétales avec des effets imprévisibles sur les cycles de l'eau et du carbone.

A ces perturbations hydriques et thermiques s'ajoute le problème de la pollution causée par des composés organiques ou métalliques à proximité des sites industriels et agricoles (Nriagu 1990). Cette pollution se retrouve disséminée sur de grandes distances *via* un transport sous forme d'aérosol, ou véhiculée par l'eau. Cette contamination à longue distance est également une contamination à long terme, puisque la persistance des éléments traces et de certains composés organiques entraîne leur accumulation. Les écosystèmes forestiers ne sont donc pas épargnés par ce problème, spécialement dans les régions fortement anthropisées.

Les connaissances actuelles sur la mortalité des essences ligneuses face aux agressions de leur environnement demeurent vagues ; il est encore malaisé de prévoir à partir de quel niveau de stress un arbre dépérit, ou de savoir quels sont les arbres d'une population donnée qui disparaîtront les premiers (McDowell *et al.* 2008). La recherche sur les mécanismes de la tolérance des plantes aux contraintes environnementales, qui n'a débuté que dans les années 1980 (Vincent et Zivy 2007), a mis en évidence, dans la plante qui subit un stress, l'activation de voies de signalisation, l'expression de nombreux gènes, et des changements dans l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans divers métabolismes. Un quart des protéines végétales n'ont pas de fonctions actuellement connues (*proteins with obscure feature*), elles ne possèdent pas de domaine ou de motif défini, et un travail de transcriptomique et de protéomique est nécessaire pour établir leur rôle éventuel dans les réponses de végétaux soumis à des contraintes environnementales (Luhua *et al.* 2008).

~~L'analyse des réponses des tissus foliaire et cambial du peuplier sous diverses contraintes permettra d'appréhender la comparaison de ces tissus sous différents angles afin de visualiser en plusieurs dimension les aspects communs et singulier de leur réponse de stress.~~

1.2. Le peuplier

Le peuplier appartient à la famille des Salicacées qui est constituée de quelques trois cents espèces ligneuses pionnières, capables de s'installer sur des milieux très perturbés (Karrenberg *et al.* 2002). Cette capacité est assurée par une importante production de graines et une forte reproduction asexuée par multiplication végétative (Francis *et al.* 2005). Les espèces du genre *Populus* apparaissent à la fin de l'Eocène (-34 MA), leur aire de répartition phytogéographique s'étend sur l'ensemble de l'hémisphère nord, sur plus de 80 millions d'hectares (FAO 2008). L'aire de répartition du peuplier semble conditionnée par la durée du jour, la température et par la disponibilité en eau du sol (Tschaplinski *et al.* 1998).

L'intérêt scientifique pour les peupliers a plusieurs causes. Ils présentent une grande variabilité d'écotypes et d'hybrides entre espèces sympatriques. Leur génome, de petite taille, est désormais séquencé (Tuskan *et al.* 2006). Le peuplier est devenu l'espèce modèle de la biologie moléculaire en foresterie (Taylor 2002; Plomion *et al.* 2006; Bogeat-Triboulot *et al.* 2007), notamment pour l'étude des stress (Street *et al.* 2006; Caruso *et al.* 2008; Renaut *et al.* 2008a; Kieffer *et al.* 2009b; Escalante-Perez *et al.* 2009), et plusieurs lignées transgéniques ont été produites (Lapierre *et al.* 1999). Il est par ailleurs sur la liste des espèces potentiellement utilisables pour la phytoremédiation des sols et des eaux (Robinson *et al.* 2000; Peuke et Rennenberg 2005).

L'intérêt scientifique et économique du peuplier réside également dans sa nature d'essence ligneuse. Il est propice aux études portant sur la formation du bois et sur le fonctionnement du cambium (Pilate *et al.* 2004; Morabito *et al.* 2006). L'activité cambiale est directement responsable de la production de la majeure partie de la biomasse continentale (Brunner *et al.* 2004). Le cambium est un tissu méristématique constitué d'une assise cellulaire qui entoure le tronc de l'arbre. La division puis la différenciation de ces cellules produit, vers l'intérieur de la tige des cellules de xylème (futur bois), et vers l'extérieur des cellules de phloème chargées de la circulation de la sève élaborée. Il s'agit d'un tissu dynamique où les cellules sont en perpétuelle spécialisation ; il est donc difficile de délimiter clairement le cambium et les tissus environnants. C'est pourquoi on parle généralement de zone cambiale. Jusqu'à présent, la réponse de ce tissu aux contraintes environnementales est peu étudiée

1.3. Le stress : concept et définitions

1.3.1. Concept

Dans un environnement variable où les stimuli et les agressions imprévisibles sont des risques constants, le bon fonctionnement des organismes repose sur leur capacité à s'adapter rapidement et efficacement afin de gérer une situation de **stress**. Dans un premier temps, il nous faut préciser le sens dans lequel le mot *stress* sera entendu dans ce manuscrit. Il s'agit d'un terme employé dans de si nombreux contextes qu'aucune définition précise et consensuelle n'est disponible, et qu'il est aujourd'hui encore un concept élastique (Viner 1999; Moberg 2000; Bijlsma et Loeschke 2005; Qureshi *et al.* 2007). Des années 1970 à la fin des années 80, on a débattu sur l'existence du stress végétal et son importance sur la structure des végétations (Grime 1989; Grime 2001; Pierce *et al.* 2005). En 2000 Mathé insistait sur la nécessité d'une définition physiologique et pathologique du stress, et en 2003 Körner jugeait inadéquat son usage dans la littérature. En raison, notamment, des multiples disciplines (physiologie, écologie, biologie évolutive, éthologie, médecine, etc.) et des différentes échelles biologiques (population, organisme, cellule, molécule...) les *stress* rencontrés dans la littérature scientifique correspondent à des réalités différentes.

Le mot se rencontre au début du XX^{ème} siècle dans le domaine de la psychologie et de la physiologie, mais la première définition du concept à l'origine de l'acception courante est donnée par Hans Selye (1936), pour qui le stress est « l'ensemble des réactions de l'organisme (positives ou négatives) à une demande d'adaptation ». A cette définition de stress, Selye associe le *syndrome général d'adaptation* et ses quatre phases (cf. encadré page 14).

Malgré cette définition qui fait toujours référence, on rencontre dans la littérature des acceptions imprécises de *stress* qui désigne selon les cas l'agent stressant, la réponse du système biologique, ou l'état dudit système. On préférera ici circonscrire le stress aux réactions physiologiques de l'organisme (Gaspar *et al.* 2002; Larcher 2003). Ce point de vue présente l'avantage de tenir compte du fait que deux individus en présence d'un même agent stressant peuvent produire des réactions différentes et donc endurer des niveaux de stress différents. Cependant, par commodité de langage, on parlera parfois de *réponse de*

stress pour insister sur le processus physiologique, et d'*intensité de stress* pour qualifier l'état de la plante soumise à un certain degré de contrainte.

A la définition doit s'ajouter le facteur de l'**imprédictibilité** de l'évènement (Buchanan 2000). Les espèces sont par exemple adaptées aux changements saisonniers ou nycthéméraux qui ne constituent donc pas des agents stressants, même si ces changements peuvent s'accompagner de conditions défavorables, et accroître la sensibilité des organismes à des agents stressants.

En 1932, Walter Bradford Cannon propose le terme **homéostasie** pour désigner la capacité d'un organisme à maintenir un état de stabilité relative entre les composants de son milieu interne. Depuis Hippocrate (V-IV^e siècle avant JC) les perturbations des équilibres internes étaient considérées comme probables sources des maladies. Après Cannon, l'homéostasie et ses équilibres dynamiques deviennent une notion cruciale en physiologie. Les mécanismes de maintien de cette homéostasie sont précisément ceux qui répondent aux conditions stressantes. Gaspar *et al.* (2002) considèrent le stress comme "une condition physiologique modifiée par un facteur ayant tendance à altérer un équilibre".

Le stress, en tant que réponse, consiste en une flexibilité phénotypique qui tend à rétablir l'état et le fonctionnement optimal du système biologique dans les conditions données : une meilleure *fitness* (Lichtenthaler 1996). On considère généralement que la réponse possède deux modalités que sont l'évitement et la tolérance. La **tolérance** consiste en une coexistence avec l'agent stressant ; le système biologique maintient son fonctionnement malgré la contrainte. L'**évitement** consiste à se soustraire à la contrainte ; le système biologique isole son métabolisme de l'agent stressant, en luttant par exemple contre les pertes d'eau, ou en diminuant son activité photosynthétique pour limiter le stress photooxydant. La troisième possibilité de réponse est la **mort** de l'organisme, qui intervient lorsque l'intensité du stress dépasse ses capacités de réaction, quand le stress s'étend sur une trop longue durée, ou quand les capacités de défense sont affaiblies et mettent l'individu à la merci de pathogènes opportunistes. Toutefois, même si la mort met en jeu des phénomènes complexes et régulés, il ne s'agit pas d'une réponse adaptée, mais d'un échec des mécanismes de défense à l'échelle de l'individu.

Grime (2001) définit le *stress* (mais en parlant de l'agent stressant) comme étant une « contrainte extérieure qui limite la production de matière sèche de tout ou partie du

végétal ». Pour autant, il arrive qu'une condition environnementale altère le métabolisme, et provoque des nécroses partielles sans affecter significativement la biomasse. D'autre part, la diminution d'activité métabolique n'est pas obligatoirement le résultat d'une ressource limitée, mais peut constituer une réponse adaptée (une plasticité) de l'organisme qui va limiter les risques de dommage. Cela montre la limite d'une définition souvent admise qui réduit le stress à une valeur non optimale de la *fitness* de l'organisme (Bijlsma et Loeschcke 2005).

Les végétaux sont des organismes sessiles ; les plantes ne prennent pas la fuite en cas de danger, ne migrent pas, et les générations, elles-mêmes, se succèdent le plus souvent au même endroit. Les plantes sont donc entièrement soumises aux variations de leur environnement, un environnement en perpétuel changement, résultat de variables interdépendantes liées à des caractéristiques édaphiques, hydrographiques, astronomiques, climatiques, etc. Dans les faits, les individus comme les populations sont rarement dans des conditions optimales, et on pourrait vouloir en conclure qu'ils sont presque constamment en situation de stress. Dans cette acception, le stress est un évènement normal, quasi quotidien dans la vie des plantes ; il ne constitue pas nécessairement un obstacle au fonctionnement de l'organisme (Kozlowski 2002). A cela, Körner (2003) répond qu'un environnement 'stressant' n'existe que pour les espèces qui n'y sont pas adaptées. D'une certaine manière, cela n'existe donc pas dans les conditions naturelles. Il montre qu'un environnement que l'on considère comme 'limitant', les forêts tempérées alpines, sont en fait un milieu comparable aux forêts tropicales humides pour peu que la comparaison se base sur la biomasse produite par jour au cours de la saison de végétation. Körner remet en cause le lien souvent établi entre **conditions suboptimales** et stress (Larcher 2003; Pierce *et al.* 2005). Il suggère que le caractère suboptimal des paramètres de l'environnement n'est pas suffisant pour utiliser le mot *stress* qu'il faudrait réserver à des cas de 'limitation' extrême.

Hans Selye, après avoir donné la première définition du stress, a aussi formulé le **Syndrome Général d'Adaptation** (*General Adaptation Syndrome - GAS*) qui décrit les phases de la réponse du système biologique face à une menace (Selye 1951, Figure 1.2). La première caractéristique du GAS est qu'il est **non spécifique** ; c'est une réponse stéréotypée propre à

chaque système biologique, et que celui-ci manifesterait à chaque agression : la signature de l'état de stress.

Initialement élaboré sur le modèle mammifère, le GAS s'avère concorder avec les observations du monde végétal (Leshem *et al.* 1998a). L'ensemble du règne végétal manifeste en effet la même gamme de réponses à virtuellement toutes les situations de forte demande environnementale (froid, chaleur, sécheresse, anoxie, salinité, pollution métallique, pathogènes...). De fait, les stress englobent les mêmes réponses dans tout le vivant : 1) évitement de la limitation du métabolisme ; 2) protection du métabolisme primaire contre des perturbations fonctionnelles et structurales ; et 3) réparation ou élimination des molécules endommagées (Pierce *et al.* 2005). Les nombreuses similarités des réponses de la plante malgré la diversité des effets des multiples stress posent la question des modes de perception et de signalisation.

Un stress résulte toujours de la combinaison de plusieurs contraintes environnementales ; il s'agit d'un signal multifactoriel que le système biologique doit intégrer. Cette intégration est responsable d'une grande diversité dans la réponse. On peut citer le cas de l'accumulation de proline chez la plante *Silene vulgaris* soumise à un excès de Cd^{2+} qui ne répond pas de manière directe au stress métallique, mais à la perturbation des relations hydriques induites par le Cd^{2+} ; en condition de forte humidité, une concentration toxique de Cd^{2+} ne provoque pas d'accumulation de proline (Schat *et al.* 1997). On a également montré que la réponse du peuplier à la sécheresse au niveau transcriptomique était dépendante du moment de la journée où les prélèvements sont réalisés (Wilkins *et al.* 2009, *in press*).

Cette combinaison de facteurs à l'origine des stress conduit à des schémas de réponse qu'il est encore difficile de résoudre. Par exemple, les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) font partie des molécules impliquées dans toutes les réponses de stress connues. Pour autant, les gènes impliqués dans la réponse aux ROS sont stimulés différemment selon le stress appliqué, en fonction de l'endroit où les ROS sont produites et stockées, mais aussi sans doute en relation avec les médiateurs de croissance végétaux (Apel *et Hirt* 2004; Mittler *et al.* 2004). Les ROS sont au cœur de la question des liens entre les différentes réponses. Il a été montré que le peroxyde d'hydrogène confère une tolérance croisée envers plusieurs stress abiotiques chez le maïs (Gong *et al.* 2001). La façon dont les

signaux se conjuguent dans la cellule est encore assez mal appréhendée. Cela nécessite de ne plus seulement isoler les réponses, mais aussi de placer le système biologique dans des conditions réalistes. Une plante n'aura pas la même réponse face à une contrainte thermique seule, ou bien accompagnée, ou précédée, d'un stress hydrique (Griffin *et al.* 2004). C'est pourquoi la combinaison des stress est désormais un angle nécessaire pour faire émerger des réponses qui auront un vrai sens biologique (Mittler 2006b).

Malgré l'universalité d'un certain nombre de réactions, qui constituent le GAS et sont au cœur de la réponse non-spécifique de stress, les systèmes vivants ont aussi développé de très nombreux mécanismes de défense spécifiques pour répondre à des situations précises. Au-delà du concept générique de stress, on est amené à s'intéresser à des contextes réalistes et on parlera ainsi de stress thermique, de stress hydrique, *etc.* Pour comprendre l'ajustement de la plante dans son milieu il devient important de distinguer dans sa réponse de tolérance ce qui relève du stress générique et ce qui correspond à un axe de réponse plus spécifique (Figure 1.1.). Les limites du GAS chez les végétaux, et la manière dont les réponses génériques participent à la mise en place des réponses spécifiques ne sont pas encore bien établies. Le travail de cette thèse participera à l'éclaircissement de ces notions.

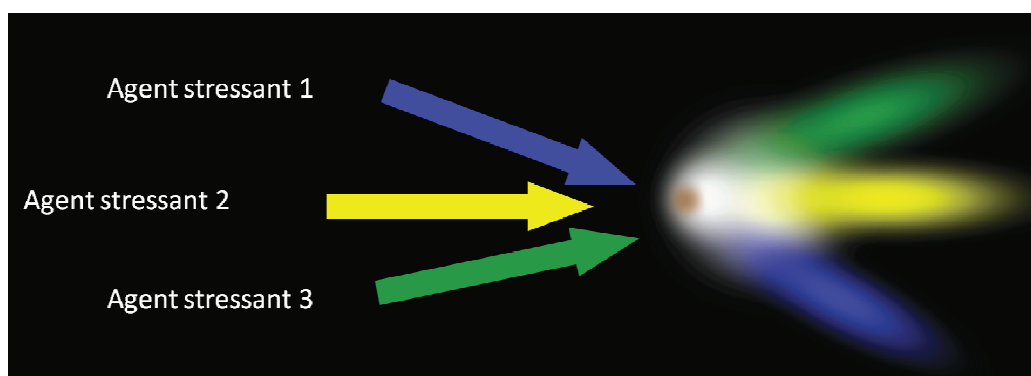


Figure 1.1 Stress générique ou particulier. À partir de l'état d'équilibre initial, une série de réactions biologiques interviennent dans tous les stress (zone blanche), mais il existe des processus qui se produisent de façon spécifique (et colorée) en réponse à une contrainte donnée.

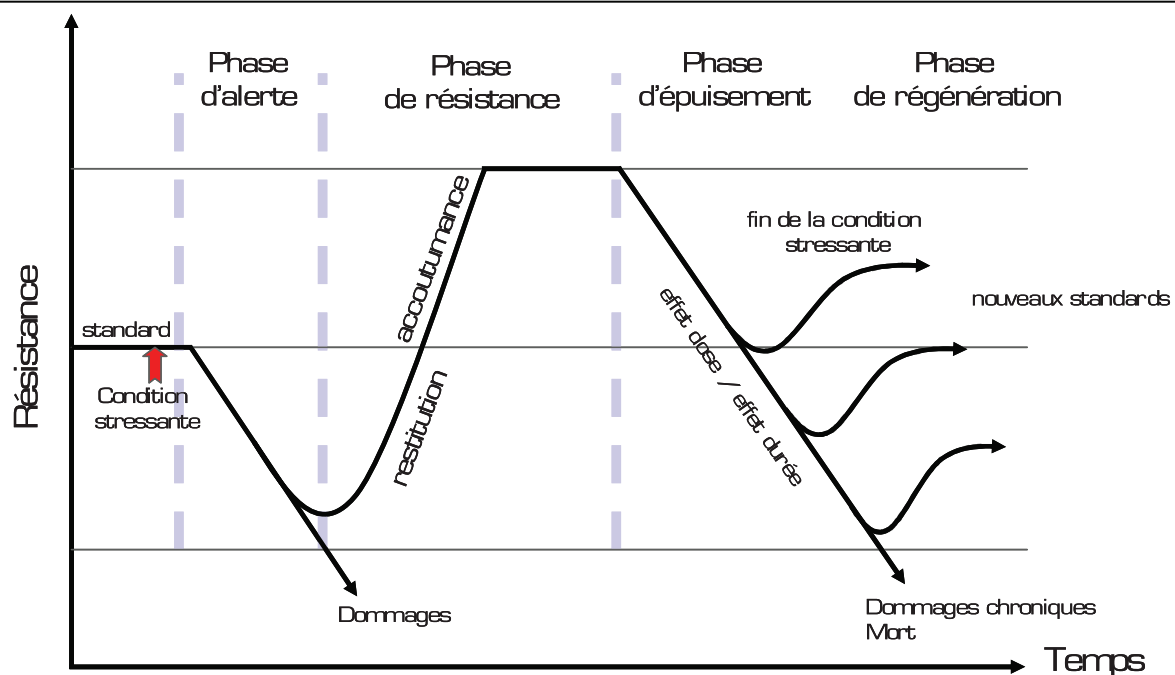


Figure 1.2. Syndrome Général d'Adaptation d'un système biologique en situation de stress (d'après Selye 1951 et Lichtenthaler 1998).

La phase d'alerte correspond à la première exposition aux conditions stressantes. Des perturbations structurales et fonctionnelles se produisent, qui vont amoindrir les performances du système biologique, y compris sa résistance. Si le stress n'est pas assez intense pour provoquer des dommages irréversibles, la réponse métabolique débouche sur la deuxième phase.

La phase de résistance commence avec l'activation des processus de réparation et de protection qui mettent en jeu, notamment, la réorganisation des membranes, l'ajustement des taux métaboliques et le protéome de stress. Le niveau de résistance atteint un maximum ; le système biologique est accoutumé.

La phase d'épuisement intervient si le stress se prolonge ou atteint une intensité qui dépasse les capacités des défenses mises en place. La résistance de la plante baisse, sa sensibilité aux attaques augmente, les dommages vont se multiplier.

La phase de régénération a lieu si les conditions stressantes prennent fin avant le déclenchement de la sénescence de l'organisme. Soustrait à la pression de l'agent stressant, le système biologique établit un nouvel état d'équilibre de ses composants entre eux et avec l'environnement. Cet état pourra être similaire à l'état initial ou non. Comme on l'a vu, il est possible qu'il soit maintenant amorcé.

1.3.2. Définitions

Le rôle du stress est de rétablir un niveau de performance optimal du métabolisme ; l'organisme développe une **accoutumance** aux conditions environnementales défavorables (Shulaev et Oliver 2006). Le stress implique l'activation de processus inductibles, dont beaucoup sont rencontrés chez tous les organismes. Le coût métabolique des défenses constitutives, qui pèse sur la compétitivité de l'organisme, explique le succès évolutif des réponses inductibles (Heil et Baldwin 2002; Cipollini *et al.* 2003). Toutefois la perception de la demande environnementale, la signalisation cellulaire, les cascades d'activations qui s'ensuivent et qui aboutiront à une réponse régulée de l'organisme prennent du temps ; la réponse ne peut pas être immédiate. L'organisme est donc momentanément vulnérable.

Quand la demande environnementale cesse (disparition de l'agent stressant), l'organisme revient à l'état qui était le sien avant le stress, à ses équilibres et performances "normales". Cependant un épisode de stress peut laisser des traces dans l'organisme et entraîner un **amorçage**¹ des défenses qui aboutit à une meilleure réactivité de la plante et lui confère une **tolérance acquise**. Évolutivement, ce mécanisme constitue probablement une compensation au délai d'activation des défenses inductibles.

Les mécanismes de l'amorçage ne sont pas encore bien expliqués. On a suggéré la production ou la modification post-traductionnelle de protéines qui demeurent inactives jusqu'à un prochain épisode stressant. Une autre hypothèse propose l'accumulation de facteurs de transcription prêts à cibler massivement les gènes de réponse dès la perception du prochain stress (Conrath *et al.* 2006). Cette "mise en mémoire" du stress peut être d'ordre épigénétique et se transmettre aux générations ultérieures (Madlung et Comai 2004; Molinier *et al.* 2006; Bruce *et al.* 2007). L'amorçage peut également être initié par les composés organiques volatils et ainsi résulter d'une communication entre plantes (Baldwin *et al.* 2006; Beckers et Conrath 2007). L'amorçage renforce les avantages que présentent les défenses inductibles en terme de coût métabolique et de fitness (van Hulten *et al.* 2006).

Les réponses aux différents agents stressants mettent en jeu des fonctions communes assurées par des molécules qui peuvent être différentes mais appartiennent aux mêmes familles, comme les molécules chaperones (Wang *et al.* 2004a) ou les composés

¹ "Priming". Le mot est davantage utilisé dans le cadre des stress biotiques, mais s'applique aussi aux contraintes abiotiques (Conrath *et al.* 2006; Goellner et Conrath 2008).

antioxydants (Mittler 2002). On a par exemple mis en évidence des protéines impliquées dans un stress dû à une élévation de la température ou à une diminution de température, ou bien encore aux deux conditions (Sung *et al.* 2003). Le phénomène de **tolérance croisée** provient de gènes assurant une fonction de défense envers plusieurs types de contraintes (Neumann *et al.* 1994; Arora *et al.* 1998; Knight et Knight 2001; Wang *et al.* 2003; Bhargava *et al.* 2005; Uenishi *et al.* 2006; Fujita *et al.* 2006). Il semble exister une protection croisée entre la plupart des stress abiotiques (Rhodes et Nadolska-Orczyk 2001). En vertu de la base commune des réponses de stress, la tolérance acquise peut également être une tolérance croisée. Par exemple un stress thermique induit par quelques heures à 42°C améliore la résistance du maïs envers le froid, la sécheresse et la salinité (Gong *et al.* 2001), tout comme l'exposition à un déficit hydrique renforce la thermostabilité du photosystème II de l'orge (Oukarroum *et al.* 2009).

Comme de nombreux concepts le stress pose le problème d'une définition qui varie considérablement en fonction de la manière dont on l'approche. Il n'existe pas encore de définition ultime et satisfaisante, et il convient donc de délimiter le sens à lui donner avant de l'employer. Tout au long de ce manuscrit, et compte tenu de la réflexion ci-avant, nous considérerons la définition suivante :

Le stress est l'état physiologique modifié ou le changement d'état physiologique d'un système biologique en réponse à une demande environnementale.

1.4. Problématique et objectifs

Dans un contexte où semble s'annoncer une crise environnementale, il est important de mieux comprendre les procédés par lesquels les organismes s'ajustent à un milieu en changement. Les plantes, premiers éléments des chaînes trophiques sont en première ligne sur ce questionnement. Le stress végétal, résultat des contraintes de l'environnement, possède des aspects génériques et d'autres spécifiques qu'il faut délimiter et caractériser afin de comprendre les raisons de l'échec ou du succès des plantes dans leur réponse aux demandes environnementales. Il est nécessaire d'identifier les molécules qui permettent une réponse régulée et efficace chez les espèces herbacées, les plus étudiées, mais aussi chez les espèces ligneuses qui ont un intérêt écologique et économique considérable.

La longévité des arbres implique que, immobilisés sur leur substrat, ils soient capables de supporter une large gamme de conditions défavorables, comme l'accumulation de polluants dans l'air, l'eau et le sol, les épisodes caniculaires, l'augmentation de la température globale de 1,4 à 5,8 °C prévue dans les cinquante prochaines années, ou l'augmentation de la teneur atmosphérique en CO₂ (Houghton *et al.* 2001). En Europe, les changements de température et de niveau de CO₂, en favorisant les réactions métaboliques, provoquent un allongement de 10 à 15 jours de la saison de végétation chez les arbres. La surproduction de biomasse qui en résulte s'accompagne d'une demande accrue en eau et nutriments. A long terme, les réserves d'eau et la composition minérale du sol en seront modifiées. Dans l'avenir, les carences en eau estivales auxquelles sont soumises les plantes risque de s'aggraver ; elles devront résister à la combinaison de ces conditions nouvelles.

Jusqu'à présent les études du stress végétal chez l'arbre se sont essentiellement focalisées sur les tissus foliaires et racinaires, l'un étant responsable de la photosynthèse qui nourrit l'organisme, l'autre de son approvisionnement. La réponse du cambium lors de contraintes environnementales, en revanche, reste mal connue et, en regard de son importance, notamment sur la fixation du carbone dans le bois, réclame une attention particulière.

Dans la nature, une contrainte abiotique se présente rarement de manière isolée ; elles sont le plus souvent combinées (Griffin *et al.* 2004), une forte chaleur avec une carence en eau et un excès de radiations (UV en particulier) par exemple, ou bien une acidification du

sol causée par une sécheresse qui rend disponibles les métaux lourds du sol (Adkinson *et al.* 2008).

L'étude de la réponse de l'arbre à des contraintes combinées présente donc un réel intérêt. Les stress hydriques, thermiques, métalliques, salins sont souvent interconnectés et produisent des dommages cellulaires comparables. Ils sont systématiquement accompagnés d'un stress oxydant (Borsani *et al.* 2001; Larkindale et Knight 2002a; Sharma et Dubey 2005; Singh *et al.* 2006) qui provoque des dénaturations protéiques (Smirnoff 1998). Ainsi, ces différents stress activent des voies de signalisation et des réponses cellulaires similaires et parfois communes (Wang *et al.* 2003). Nous chercherons à déterminer quels sont les acteurs de la tolérance ou de la sensibilité de la plante vis-à-vis de différentes contraintes afin de dégager les points communs et les spécificités de chaque stress.

L'objectif de ce travail est de dresser une carte des changements protéomiques dans la feuille et dans la zone cambiale en réponse à des contraintes environnementales de natures variées : un excès de métaux lourds, une température élevée, un arrêt d'arrosage. La réponse physiologique de la plante sera analysée de manière à caractériser, et, dans une certaine mesure, de quantifier un état de stress réversible dans lequel les changements observés pourront être associés à une tolérance de la plante. Il sera alors possible de comparer la réponse protéomique des deux tissus considérés sous chaque contrainte et d'établir quelle part de cette réponse appartient au registre général du stress de chacun de ses tissus ou au contraire n'intervient qu'en réponse à une contrainte spécifique.

Chapitre 2

Le stress métallique

2.1	<i>Introduction</i>
2.2	<i>Le zinc</i>
2.3	<i>Le cadmium</i>
2.4	<i>Phytotoxicité des métaux lourds</i>
2.5	<i>Tolérance aux métaux lourds</i>
2.6	<i>Accumulation et compartimentation des métaux lourds</i>
2.7	<i>Questions et stratégie</i>
2.8	<i>Article : Zinc and cadmium effect on Populus tremula × Populus alba genotype 717-1B4: growth and ion distribution. Submitted to Biologia Plantarum.</i>
2.9	<i>Article : Acute metal stress in Populus tremula x P. alba (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by Cd²⁺. Proteomics, in press.</i>
2.10	<i>Article : Cd and Zn are differentially distributed in Populus tremula x P. alba exposed to metal excess. Submitted to Plant biosystems</i>
2.11	<i>Discussion synthétique</i>

2.1. Introduction

*« Rien n'est poison. Tout est poison. C'est la dose qui fait le poison. »
Paracelse*

Le mot '*pollution*' est parfois mal employé. Quand le futur président américain Ronald Reagan déclare en 1981 « Les arbres causent davantage de pollution que les automobiles¹. » il commet au moins une erreur. En effet le terme *pollution* implique toujours une cause humaine à différentier d'une possible altération de la qualité de l'environnement due à des facteurs naturels (volcanisme, climat, érosion...). La distinction est surtout pertinente lorsque ces deux origines peuvent aboutir au même résultat, comme c'est le cas pour les concentrations élevées en métaux lourds dans le sol. La définition de [Holdgate \(1979\)](#) réserve l'utilisation du terme pollution à tout effet de l'homme sur l'environnement conduisant à un phénomène de *toxicité* ou de perturbation pour l'écosystème. Le rapport N°42 de l'Académie des Sciences confirme cet usage ([Bourrelier et Berthelin 1998](#)). En l'absence de toxicité, on utilisera le terme plus général de '*contamination*'.

Les activités humaines produisent de nombreux polluants, organiques ou minéraux, souvent libérés dans le sol, l'atmosphère ou les cours d'eau. Les métaux lourds représentent une part considérable de cette pollution, et ils sont relativement mobiles dans le sol ([Pichtel et al. 1997](#)), ainsi le littoral reçoit environ 20 % de la pollution toxique industrielle ([source IFREMER 2005](#)). Le Rhône, par exemple, déverse dans la mer 4 à 6 t/an de mercure et de cadmium ([source IFREMER 2005](#)).

Il est utile de distinguer au départ la notion de *toxicité* de celle de *métaux lourds*, puisque certains d'entre eux sont des oligo-éléments indispensables à la vie (cf. Principe de Paracelse). Les métaux lourds sont généralement définis comme des éléments aux qualités métalliques (malléabilité, possibilité d'alliage) dont la densité est supérieure à 5 g.cm⁻³ ([Jarup 2003](#)).

Les premières traces de contaminations métalliques remontent à la domestication du feu ([Nriagu 1996](#)), mais les révolutions industrielles, dans diverses régions du monde, ainsi que les activités militaires, ont récemment accru de manière drastique cette pollution. Les principales sources sont liées aux combustions industrielles et domestiques, et à certaines pratiques culturelles (épandage de boues, pesticides, engrais...) ([Garbisu et Alkorta 2003](#); [Halim et al. 2003](#)). On estime, par exemple, que 16% du territoire de l'Union Européenne, soit 52 millions d'hectares, est touché par une dégradation plus ou moins conséquente du sol causée par les métaux lourds ([Peuke et Rennenberg 2005](#)).

¹ "Trees cause more pollution than automobiles do."

Les métaux lourds sont dispersés dans la biosphère principalement sous forme de particules *via* l'atmosphère (Komarnicki 2005). Lessivés par les pluies, on retrouve ces polluants dans les sols et les cours d'eau. La pollution par le cadmium, en particulier, a une origine atmosphérique pour 33 à 72% (Yaaqub *et al.* 1991), provenant de combustions domestiques ou industrielles. Son transport se fait à grande échelle. L'émission atmosphérique de cadmium en France est de 15 tonnes par an, celle du zinc dépasse 1500 tonnes (Source CITEPA - traitement OPECST). En Europe, entre l'an 1800 et l'an 2000 les teneurs atmosphériques en Zn et Cd ont été multipliées respectivement par 30 et 15, même si un déclin s'est amorcé après les années 1970 (Van de Velde *et al.* 2000). Au niveau foliaire, les plantes sont capables d'incorporer le cadmium aérosol sous forme de particules (Harrison et Chirgawi 1989).

En 1988 on estimait que la toxicité des rejets métalliques dépassait celle de tous les rejets organiques et radioactifs additionnés (Nriagu et Pacyna 1988). Depuis, la prise de conscience de ce problème a conduit à un effort de recyclage, qui permet de limiter les rejets. La contamination est toutefois d'ores et déjà planétaire, puisque des traces de métaux (Cd en particulier) se retrouvent dans les organes de mammifères de l'Arctique canadien (Gamberg *et al.* 2005). De plus, les métaux ne sont pas dégradables comme le sont certains polluants organiques, et de ce fait persistent indéfiniment dans l'environnement (Alloway et Jackson 1991).

Certains métaux lourds (le mercure et le cadmium par exemple) s'accumulent le long des chaînes alimentaires quand d'autres (comme le plomb), en se localisant dans le squelette, échappent en partie à cette accumulation (Andrews *et al.* 1989). Ils sont souvent plus toxiques pour les animaux qu'ils ne le sont pour les plantes. Comme premier maillon de la chaîne alimentaire, les plantes sont la voie d'entrée de la majeure partie des métaux lourds dans les organismes (Satarug *et al.* 2003). Certaines plantes ont même acquis la capacité d'accumuler ces métaux démontrés toxiques pour les autres espèces dans des proportions telles que l'on parle d'espèces hyperaccumulatrices. En 1865, *Thlaspi caerulescens* est la première espèce hyperaccumulatrice étudiée (Sachs 1865) bien que le mot *hyperaccumulation* soit défini seulement en 1976 par Jaffré *et al.* Il est intéressant de noter que, le plus souvent, cette hyperaccumulation est spécifique à un métal.

Dans l'organisme animal, les métaux lourds sont responsables de neurotoxicité, d'hépatotoxicité et de néphrotoxicité (Stohs et Bagchi 1995; Pinot *et al.* 2000; Cui *et al.* 2005). On a estimé que 7% de la population mondiale souffre de dysfonctionnements rénaux dus à une exposition au cadmium (Jarup *et al.* 1998). La catastrophe de la baie de Minamata, qui a commencé en 1932 au Japon, illustre les dangers d'une intoxication massive par le mercure. Les conséquences ne furent pour la plupart visibles qu'une vingtaine d'années après le début de l'exposition, avec l'apparition de maladies

dégénératives (Parkinson, Alzheimer) et la naissance d'enfants lourdement handicapés. Cette contamination par le mercure a causé directement ou indirectement la mort de plus de mille personnes ([Harada 1995](#)).

La question des effets biologiques des métaux lourds sur les organismes revêt donc une importance considérable.

L'étude des effets des métaux sur les végétaux doit tenir compte de nombreux paramètres, édaphiques (pH, humidité, salinité, diversité microbiologique) qui vont altérer la mobilité et la biodisponibilité des métaux, ou environnementaux (lumière, eau en particulier) qui peuvent influencer sur le métabolisme de la plante et altérer ou masquer la réponse. Le transfert des métaux depuis les racines vers les parties aériennes est différent selon les espèces, ce qui aura un effet sur le niveau de phytotoxicité. Les études en plein champ ou utilisant un sol prélevé en zone polluée nécessitent du temps et des moyens importants, ce qui explique que de nombreuses études se font en conditions hydroponiques, de façon à simplifier le modèle. Le risque est alors que la réponse enregistrée soit très différente de ce qu'elle est en conditions réelles ([Ross S. 1994](#); [Dos Santos Utmazian et Wenzel 2007](#)). Il devient en particulier impossible de mesurer l'éventuelle modification des exsudats racinaires et leur effet sur la solubilisation ou la complexation des ions métalliques dans le sol. Il est probable que le milieu hydroponique modifie la translocation des minéraux vers les parties aériennes. De plus, dans la mesure où les résultats en termes de tolérance et d'accumulation peuvent être spécifiques au sol, il devient difficile de les comparer. Les limites intrinsèques des modèles expérimentaux possibles imposent la prudence dans les conclusions que l'on peut tirer des résultats obtenus. Enfin la réponse du végétal s'inscrit dans une cinétique complexe qu'il est difficile d'élucider, la plupart des études ne s'étalant tout au plus que sur une quinzaine de jours ([Sanita di Toppi et Gabbrielli 1999](#)).

L'étude de l'accumulation des métaux par les plantes ouvre la voie à des applications biotechnologiques. La phytoremédiation, par exemple, permet d'envisager des méthodes de décontamination des sols, de l'eau, et même de l'air. La connaissance des mécanismes de tolérance et de translocation devrait également permettre d'améliorer certaines espèces agricoles destinées à la consommation humaine, de sorte qu'elles limitent l'entrée des métaux potentiellement toxiques dans la chaîne alimentaire, ou qu'elles permettent au contraire d'éviter des carences, comme celle du zinc ([Cakmak 2008](#)).

Dans cette optique l'étude de la réponse des arbres à une contrainte métallique vise notamment à produire un 'phytoremédiateur' avec une forte production de biomasse dans laquelle une grande quantité de métaux pourraient être stockés ([Dhillon et al. 2009](#)).

2.2. Le zinc

2.2.1. Introduction

Le zinc fut tout d'abord exploité sous la forme de son minéral carbonaté, la calamine, dont le nom latin est *cadmia*. La découverte de l'élément zinc est généralement attribuée au suisse Paracelse en 1516 qui lui donne son nom, tandis que l'obtention du métal pur revient à l'allemand Andreas Marggraf en 1746. Le nom provient de l'allemand *zinke*, il signifie « pointe acérée » ou « dent », en raison des dendrites formées par le refroidissement du métal dans un récipient de coulée.



Le Zn, de masse atomique 65,38 u, est un métal de transition. Contrairement à la plupart des 37 autres métaux de transition, il ne possède qu'un état d'oxydation : Zn^{2+} . Le zinc est le 23^{ème} élément le plus abondant sur Terre. La teneur en Zn du sol est généralement comprise entre 17 et 125 mg.kg^{-1} (Peer *et al.* 2005), avec une teneur moyenne de 64 mg.kg^{-1} (Emsley 2003). Il est le deuxième métal lourd le plus présent dans les organismes après le fer, et le seul qui interagisse avec les 6 classes d'enzymes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lysases, isomérases, ligases) (Broadley *et al.* 2007). La teneur en Zinc du corps humain est de 33 mg.kg^{-1} . Dans les plantes, cette teneur varie selon les espèces et les tissus ; la plus forte teneur se rencontre dans les fleurs (Krämer et Clemens 2006). La limite basse est autour de 15-20 mg.kg^{-1} (Marschner 1995). La concentration en zinc dans les cellules est globalement de 0,1 – 0,5 mM (Eide 2006).

2.2.2. Importance biologique

Le zinc est un élément essentiel pour les plantes (Sommer et Lipman 1926) comme pour les animaux, dont l'homme (Jeejeebhoy 2007). Environ 10% des protéines humaines sont potentiellement capables de lier le Zn^{2+} (Andreini *et al.* 2006), il est le cofacteur le plus fréquemment rencontré dans les métalloprotéines (Hänsch et Mendel 2009). Chez *Arabidopsis*, ce sont plus de 2300 protéines qui sont considérées comme étant reliées au Zn^{2+} (Broadley *et al.* 2007) et 4% des protéines prédites contiennent un motif de liaison au zinc, le *zinc zipper* (Kawagashira *et al.* 2001). On estime que 12 à 50% du Zn^{2+} cellulaire est impliqué dans les mécanismes de transcription et de traduction (Finney et O'Halloran 2003). Le "succès" du Zn^{2+} dans ses relations avec les biomolécules résulte de ses propriétés chimiques particulières. D'abord, le Zn est un acide de Lewis fort, il a donc de fortes affinités pour les bases faibles (*e.g.* ligands sulphides), comme pour les bases fortes (ligands

¹ <http://www.lennotech.com/Periodic-chart-elements/Zn-en.htm>

amino, carboxylate, hydroxyl, etc). Ensuite le zinc intervient dans les systèmes biologiques sous une unique forme d'oxydation : Zn^{2+} , ce qui écarte tout risque de générer des radicaux libres. La géométrie induite par l'ion Zn^{2+} est plus souple que pour la plupart des autres métaux de transition ; il est le seul à permettre une structure tétraédrique (par exemple dans les "doigts à zinc"). Enfin l'échange de ligand du Zn^{2+} est plus rapide que celle des autres métaux présentant des propriétés proches (Ni, Cu, Co), même si elle reste très inférieure à celle du Ca^{2+} qui est l'ion de signalisation par excellence (Frausto da Silva et Williams 2001). Considérant ses liens privilégiés avec l'ADN, certains auteurs considèrent que le Zn peut jouer le rôle de *signal lent* ou d'hormone (Frausto da Silva et Williams 2001). Toutefois les motifs de liaison à l'ADN à *doigt à zinc* ne se rencontrent guère en dehors des eukaryotes (Clarke et Berg 1998).

La carence humaine en Zn est très répandue ; 20% des enfants des zones rurales chinoises y seraient sujets (Ma et al. 2007). Dans le monde, on estime qu'un tiers de la population est soumis à cette carence (Lazzerini 2007; Stein et al. 2007). Elle causerait la mort de 800 000 enfants chaque année (Hambidge et Krebs 2007). Au niveau agronomique, la déficience en zinc touche la moitié des cultures mondiales, avec un effet significatif sur la production (Hotz et Brown 2004; Broadley et al. 2007). Ainsi, dans les années 1990, la supplémentation en Zn de cultures en Australie, Inde et Turquie a permis une augmentation des récoltes de 600% (Cakmak 2004). Bien que le manque de zinc constitue un problème majeur de santé humaine, spécialement dans les pays en développement (Cakmak 2008), dans le même temps les rejets anthropiques liés aux activités industrielles, sidérurgiques et minières, aux transports et aux pratiques culturelles conduisent à de nombreuses pollutions des sols, des eaux et de l'air par le zinc, avec des conséquences à grande échelle, en particulier dans le cas de la pollution atmosphérique (Altaf 2007).

2.2.3. Homéostasie du zinc

En tant qu'élément indispensable au fonctionnement de nombreuses protéines, le Zn^{2+} doit être présent partout dans la plante. Il doit donc être transporté depuis le sol jusqu'aux cellules qui en ont besoin. Il existe donc de nombreux transporteurs cellulaires du zinc qui participent à la tolérance et à son accumulation (van der Zaal et al. 1999), dans différentes familles : notamment les ABC transporteurs, ZIP, NRAMP, YSL, CDF et $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPase (Colangelo et Gueriot 2006).

En cas d'excès, le zinc, comme les autres ions métalliques, induit un stress de type oxydant (Chaoui et al. 1997) et donc l'activation des enzymes du cycle Halliwell-Asada liées notamment à l'ascorbate et au glutathion et qui régulent le statut redox de la cellule (Foyer et Noctor 2005; Halliwell 2006). Une forte teneur de Zn dans le sol s'accompagne parfois d'une accumulation de cet ion dans la plante (Deng et al. 2006), mais ce n'est pas toujours le cas (Wang et al. 2007). L'excès de Zn dans le sol

conduit à une réduction de la synthèse de chlorophylle et une dégradation des chloroplastes, et à des interférences qui limitent l'absorption d'éléments tels que P, Mg et Mn (Broadley *et al.* 2007). La toxicité du Zn est très liée au pH du sol (Chaney 1993). L'activation de phytochélatines accroît la tolérance et l'accumulation du Zn chez *A. thaliana* (Tennstedt *et al.* 2009). Parmi les multiples pistes de recherche pour expliquer la tolérance et l'accumulation du Zn, on peut citer les nicotinamine synthases, fortement exprimées chez l'hyperaccumulateur *A. halleri* (Weber *et al.* 2004).

2.3. Le cadmium

2.3.1. Introduction

Kadmeia (Cadmée en français) est le nom de la citadelle de Thèbes (Grèce), fondée par le roi légendaire Cadmos. Près de la ville était exploité un minerai de carbonate de zinc, autrefois appelé *calamine*. En 1817 Friedrich Stromeyer isole ce qui était considéré comme une impureté du zinc, et lui donne le nom de cadmium.



Le cadmium n'existe pas à l'état natif, et son principal minerai, CdS, reste rare et inexploité ; sa production dépend de celle du zinc. La teneur en cadmium des minerais de zinc varie de 0,1 à 5% (Adriano 1986). Le cadmium est relativement rare, classé 67^{ème} dans l'ordre d'abondance des éléments. Sa teneur dans le sol est généralement comprise entre 0,06 et 1,1 mg.kg⁻¹ (Peer et al. 2005) même si certaines roches montrent des teneurs dépassant 15 mg.kg⁻¹. Dans les cas extrêmes, on rencontre des teneurs allant jusqu'à 160 mg.kg⁻¹ (IPCS 1992). A l'état naturel, la teneur en Cd de l'eau de mer ne dépasse pas 0,1 µg.L⁻¹, celle des rivières oscille entre 1 et 13,5 ng.L⁻¹. Dans les régions exemptes d'activité humaine, l'air contient moins de 1 ng.m⁻³ de Cd (IPCS 1992). En France, la valeur limite de référence dans le sol est 2 mg.kg⁻¹ (Baize 1997). Dans la solution du sol, le seuil de pollution est estimé à 0,32 µM (Wagner 1993).

Certains sels de cadmium sont facilement solubles dans l'eau, ce qui est une des raisons de sa toxicité (Pinto et al. 2004) et de sa dispersion dans l'environnement.

L'utilisation industrielle du cadmium commence à la fin du 19^{ème} siècle. Dès 1850 le cadmium sert à la confection de pigments de couleur jaune à écarlate, utilisés notamment par Van Gogh. La première batterie nickel-cadmium est développée au début du 20^{ème} siècle. Aujourd'hui cette industrie consomme annuellement plus de 9000 tonnes de Cd dans le monde occidental, et continue de se développer. En 1998 la concentration de Cd dans le sol augmentait encore de 0,2% par an (Jarup et al. 1998). A l'échelle mondiale, les émissions anthropogéniques de cadmium dans l'environnement atteignaient 29 000 tonnes en 1997 (Sanita di Toppi et Gabbrielli 1999). En l'an 2000, 19 700 tonnes de cadmium étaient extraites du sol (COWI 2003). Son utilisation était essentiellement dévolue à la production de batteries (75%), et de pigments (12%). La même année, les déchets contenant du cadmium représentaient 2522 tonnes dans l'Union Européenne (Scoullas et al. 2001).

Le cadmium a des particularités chimiques proches du zinc ; comme lui, c'est un métal de transition qui ne possède qu'un seul état d'oxydation. Mais en raison de sa relative rareté dans

l'environnement, les organismes ne l'ont pas retenu pour assurer des fonctions biologiques, s'associant préférentiellement, et parfois spécifiquement avec le zinc. Lane et Morel (2000) ont mis en évidence l'existence chez une espèce de diatomée (*Thalassiosira weissflogii*) d'une isoforme d'anhydrase carbonique (AC) qui, en cas de carence de Zn^{2+} , compense l'absence d'activité des isoformes de AC spécifiques au Zn^{2+} en utilisant spécifiquement Cd^{2+} comme co-facteur. Cet exemple demeure à ce jour l'unique exception à la règle qui fait du cadmium un métal sans rôle biologique. Dans tous les autres cas, le Cd est *a priori* un métal toxique non essentiel.

2.3.2. Toxicité

Le cadmium est considéré comme un modèle pour les métaux toxiques, il est celui qui provoque le plus de dommages à la croissance des plantes et à la santé humaine (Dong *et al.* 2006). On a reporté un cas d'intoxication mortelle par ingestion volontaire de 5g d'iodure de cadmium (Wisniewski-Knypl *et al.* 1971) bien que les cas d'intoxications aiguës soient le plus souvent dus à l'inhalation de fumée, avec 15-20% de mortalité sous 3 jours des personnes développant une pneumonie chimique (Lauwerys *et al.* 2007). Dans le cas d'ingestion de nourriture contaminée, on peut assister à une interférence avec le métabolisme du calcium provoquant de l'ostéomalacie et de l'ostéoporose, comme ce fut le cas pour la maladie de "Itai-Itai"¹ au Japon dans les années 1950 (Kasuya 2000; Inaba *et al.* 2005). De nombreux articles de revue ont traité de la toxicité du cadmium chez les végétaux (Das *et al.* 1997; Benavides *et al.* 2005), les animaux (Burukoglu et Baycu 2008) ou l'homme (Jarup *et al.* 1998; Cui *et al.* 2005). Il est considéré comme l'un des métaux les plus toxiques pour les plantes vasculaires (Jones *et al.* 1993) sa toxicité étant de 2 à 20 fois supérieure à celle des autres métaux lourds (Vassilev *et al.* 1998). Il est également classé 7^{ème} au classement des 20 toxines les plus dangereuses par Yang *et al.* (2004). L'implication du cadmium dans le développement de cancers a été démontrée et l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer l'a classé parmi les substances cancérigènes (Waalkes 2000; Schwartz et Reis 2000; Waisberg *et al.* 2003). Le cadmium et ses dérivés sont considérés par la communauté européenne comme des substances cancérigènes et génotoxiques (JOCE 2004).

¹ <http://www.accessscience.com/studycenter.aspx?main=9&questionID=4978>

La toxicité du cadmium chez l'homme a pour cause essentielle la prise alimentaire de tissus végétaux ayant accumulé le métal. L'intoxication via les nourritures carnées, l'eau ou l'air ne contribue que minoritairement à l'accumulation de Cd dans les populations humaines (Koren'kov *et al.* 2007). De ce point de vue, la mobilisation du Cd^{2+} depuis les racines vers les parties aériennes (généralement celles que l'homme va consommer quand il s'agit d'espèces agricoles) est un phénomène qui mérite une attention particulière.

2.4. Phytotoxicité des métaux

La composition minérale du sol est l'un des paramètres environnementaux envers lesquels les plantes sont capables d'ajustement. Cette composition minérale est sujette à des modifications rapides, notamment dans les régions à forte activité humaine. La toxicité des métaux lourds, même essentiels, lorsqu'ils sont présents en excès, a été clairement démontrée.

Chronologiquement, le premier effet sur les plantes d'une contamination du sol par des métaux lourds est indirect ; elle cause une réduction de la population microbienne du sol, ce qui a un impact sur la biodisponibilité des minéraux pour les plantes (McGrath *et al.* 1995; Moreno *et al.* 1999).

Au cours de l'évolution, les organismes ont développé des fonctions biochimiques en exploitant les propriétés d'éléments présents dans leur environnement. Le premier critère, celui de la réactivité chimique des éléments, s'est nécessairement conjugué à celui de l'abondance relative et de la disponibilité de ces éléments (Frausto da Silva et Williams 2001). Cela a pour conséquence l'actuelle spécificité entre certaines biomolécules et des éléments dits '*essentiels*'. En corollaire, des éléments présentant des caractéristiques proches des éléments essentiels mais plus rares dans l'environnement sont susceptibles de réagir avec les biomolécules et d'altérer leur fonctionnement. D'où la toxicité d'éléments comme l'arsenic qui appartient au même groupe que le phosphore, le sélénium qui appartient au groupe du soufre, ou le cadmium qui présente des similitudes avec le zinc (Clemens 2006).

Le Cd^{2+} se déplace dans les cellules en utilisant les transporteurs dédiés au Zn^{2+} (Fujishiro *et al.* 2009). Cd^{2+} et Zn^{2+} sont connus pour être compétiteurs : Zn^{2+} limite l'entrée et la translocation du Cd^{2+} dans la plante (Hawf et Schmid 1967; Green *et al.* 2003), Cd^{2+} peut prendre la place de Zn^{2+} dans certains sites actifs, comme ceux de DNA-binding proteins (Vallee et Auld 1990). Le cadmium peut aussi emprunter la voie du fer (Besson-Bard *et al.* 2009), du magnésium (Dalton *et al.* 2005), ou du calcium (Clemens *et al.* 1998; Misra *et al.* 2002), un comportement "d'autostoppeurs opportunistes".

Les métaux essentiels peuvent eux aussi représenter un danger lorsqu'ils sont présents en excès (en concentration supra-optimale) du fait même de leur réactivité, car en participant à

la réaction de Fenton, la plupart d'entre eux sont à l'origine de radicaux hydroxyles toxiques pour la cellule.

Les symptômes les plus récurrents de la toxicité des métaux lourds chez le peuplier sont une diminution de croissance des racines et de la tige, et des chloroses et/ou nécroses des feuilles (Castiglione *et al.* 2007). On note une inhibition de la photosynthèse et de la transpiration (Sandalio *et al.* 2001; Heckathorn *et al.* 2004), une perturbation des relations eau-plante (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002; Vitoria *et al.* 2003) et l'activation de mécanismes de sénescence (Skorzynska-Polit et Baszyski 1997). En augmentant la perméabilité cellulaire des racines, les métaux interfèrent avec l'absorption d'éléments majeurs. Ainsi le Cd interfère avec l'absorption et le transport de plusieurs minéraux (Ca, Mg, K, P) ainsi que de l'eau (Das *et al.* 1997). Il inhibe la Fe(III) réductase des racines, ce qui peut provoquer une carence en fer, et donc une chlorose (Haghiri 1974) avec pour conséquence une inhibition significative de la photosynthèse (Alcantara *et al.* 1994). L'absorption et le transport des nitrates sont également affectés, *via* la sensibilité au Cd de l'activité de nitrate réductases (Hernandez *et al.* 1996). Au niveau anatomique, le Cd provoque par exemple une modification de la structure du mésophylle et du chloroplaste chez le pois (Sandalio *et al.* 2001).

La première cible du Cd est la membrane plasmique (Hall 2002), chez laquelle il induit une modification de la composition en lipides (Meharg 1993; Hernandez et Cooke 1997) et une peroxydation de ces lipides (Gallego *et al.* 1996). Chez *A. thaliana*, la tolérance au Cd a pu être améliorée en limitant les teneurs en peroxyde d'hydrogène (Cho et Seo 2005), ce qui confirme l'importance des systèmes antioxydant dans la tolérance (Collin *et al.* 2008; Dinakar *et al.* 2008). En se liant aux groupes disulfides, les métaux lourds conduisent à la dénaturation de protéines (Patra *et al.* 2004), et peuvent prendre la place de métaux essentiels dans les domaines catalytiques des enzymes, inhibant leur activité et provoquant des symptômes de carence (Van Assche et Clijsters 1990). En s'accumulant dans les tissus tout au long de la vie de l'organisme, les métaux lourds ont un effet cumulatif ; ils affectent plus particulièrement les caractères tardifs, comme la reproduction (Macnair 2007). Tous les métaux toxiques induisent un stress oxydant dans la plante (Ercal *et al.* 2001), voir figure 2.1.

Cadmium & stress oxydant

Garnier *et al.* (2006) ont mis en évidence un mécanisme de toxicité par 3 vagues successives de ROS (Reactive Oxygen Species) qui provoquent la mort de cultures cellulaires de tabac (figure 2.1). C'est d'abord l'activation par Cd^{2+} d'une NADPH oxydase membranaire qui produit une forte concentration de H_2O_2 à l'extérieur de la cellule : première poussée oxydante que l'on soupçonne de faciliter l'entrée du métal dans la cellule. Dans ces travaux, la deuxième cible est la mitochondrie, qui est en elle-même une importante source de ROS. Le cadmium est suspecté de s'y lier au cytochrome b, perturbant son fonctionnement et provoquant la production de radicaux superoxyde : deuxième vague. La troisième vague, provoquant la mort cellulaire, est une peroxydation des membranes initiée par les radicaux, et éventuellement via une réaction de Fenton induite par des ions Fe^{2+} sur lesquels l'action du cadmium n'est pas encore connue.

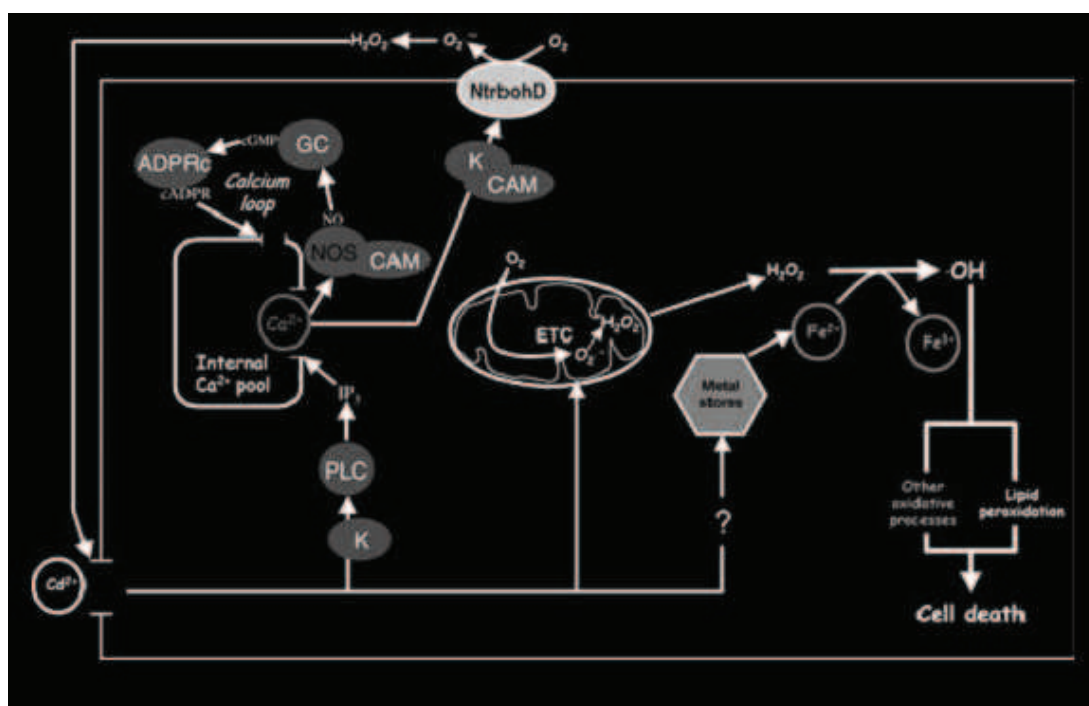


Figure 2.1 : La phytotoxicité de Cd^{2+} expliquée par 3 poussées oxydantes (oxidative burst) aboutissant à la mort cellulaire chez le tabac (Garnier *et al.* 2006).

2.5. Tolérance aux métaux lourds

La tolérance aux métaux lourds est un "phénomène dans lequel la plante interagit avec la concentration externe en métaux tout en régulant la concentration interne" (Macnair 2007). Les divers mécanismes de contrôle sont 1) l'exsudation d'agents complexant dans le sol, 2) la liaison des métaux aux parois cellulaires, 3) l'efflux actif des métaux depuis le symplasme, 4) la limitation du transport des métaux dans les parties aériennes (translocation), 5) la complexation à divers ligands dans le symplasme (phytochélatines, acides organiques, acides aminés, ferritine, métallothionéines), puis le transport de ces complexes dans la vacuole, 6) l'induction d'antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques, 7) la formation d'enzymes résistantes aux métaux qui limitent les dommages (Hall 2002; McGrath et Zhao 2003; Benavides *et al.* 2005). Ces mécanismes de tolérance aux métaux, dépendants de l'expression de gènes de réponse au stress, peuvent s'activer séparément ou concomitamment, *via* notamment la production d'acides aminés spécifiques dans les racines et exsudats racinaires qui jouent potentiellement le rôle de signal de stress (Costa *et al.* 1997).

Le stress métallique implique une large gamme de réponses que l'on rencontre également lors d'autres types de stress. On a rapporté l'induction par les métaux lourds de Pathogenesis Related Proteins (PR proteins) (Didierjean *et al.* 1996; Kieffer *et al.* 2009b), généralement associées aux stress biotiques ou à la réponse aux basses températures (Moffatt *et al.* 2006; Renaut *et al.* 2008b). Les métallothionéines (MT) font également partie de la gamme de réponse au stress métallique. Les MT sont fortement induites par des teneurs toxiques en métaux lourds (Hassinen *et al.* 2009). Cependant les MT sont aussi observées en réponse à des contraintes lumineuses, au froid, à la sécheresse, à une infection virale ou lors de la sénescence (Kohler *et al.* 2004; Wisniewski *et al.* 2008; Berta *et al.* 2009). Chez les mammifères on a aussi mis en évidence leur rôle neuroprotecteur dans les maladies dégénératives du cerveau (Penkowa 2006). Les MT d'*Arabidopsis* appartiennent à diverses familles de gènes, ce qui rend délicat l'interprétation de leur fonction exacte dans la résistance (Zhou et Goldsbrough 1995; Kohler *et al.* 2004). D'une manière identique, le stress métallique affecte l'expression et l'activité d'enzymes de détoxification impliquées dans la

majorité des stress étudiés. On notera toutefois que le caractère stimulant ou inhibant du stress sur ces enzymes est loin d'être consensuel dans la littérature (Tableau 2.1).

Les phytochélatines (PC) sont des polypeptides qui possèdent une structure assez proche des MT qui leur permet de se lier à plusieurs ions métalliques. Toutefois, si les MT sont génétiquement encodées, les PC sont le résultat d'une polymérisation de glutathion réalisée par une PC synthase (Cobbett et Goldsbrough 2002). Les PC présentent une forte spécificité envers le stress métallique (Grill *et al.* 1985; Clemens 2006) même si une étude tend à montrer leur implication dans le stress initié par une exposition aux UV (Bhargava *et al.* 2005). On retrouve les PC dans toutes les espèces végétales étudiées depuis les végétaux supérieurs jusqu'aux algues (Callahan *et al.* 2006), à l'exception notable du saule *Salix viminalis* (Landberg et Greger 2004) qui est pourtant capable d'accumuler dans ses feuilles jusqu'à 500 mg.Cd kg⁻¹ (Cosio *et al.* 2006). Les phytochélatines jouent sans doute un rôle transitoire dans la détoxification, puisque les complexes PC-métal disparaissent des tissus racinaires quelques jours après l'exposition au métal, sans pour autant que les ions métalliques soient libérés dans les tissus (Leopold *et al.* 1999). Dans le cas du cadmium, on a montré que le complexe PC-métal migre vers la vacuole (Hu *et al.* 2001) dans laquelle il se dissocie, le Cd²⁺ libre pouvant alors se lier aux acides organiques vacuolaires (Memon *et al.* 2001). La tolérance aux métaux est corrélée aux capacités d'exclusion et de compartimentation de la plante (Hall 2002).

Tableau 2.1. Multiplicité des effet du stress Cd sur les enzymes du cycle Ascorbate-Glutathion.

Enzyme	Reference	Metal treatment	Response	Species
Glutathione Reductase (GR)				
	(Pereira <i>et al.</i> 2002)	2mM Cd	Increased activity	<i>Crotalaria juncea</i>
	(Yannarelli <i>et al.</i> 2007)	100 μ M Cd	Increased activity in roots, not in leaves	<i>Triticum aestivum</i>
	(Hsu et Kao 2007)	5mM CdCl ₂	Increased activity	<i>Oryza sativa</i>
	(Mishra <i>et al.</i> 2006)	5 to 100 μ M	Increased activity (but decreased after 2 days)	<i>Bacopa monnieri</i>
	(Israr <i>et al.</i> 2005)	0-250 μ M Cd	Increased activity for 0-50 μ M Cd, then decreased	<i>Sesbania drummondii</i>
	(Chaoui <i>et al.</i> 1997)	5 μ M Cd or 20 μ M Zn	Increased activity (leaves)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Morgan
	(Iannelli <i>et al.</i> 2002)	50 μ M CdSO ₄	Increased activity	<i>Phragmites australis</i>
	(Vitoria <i>et al.</i> 2001)	0.25 - 1mM Cd	Increased activity	<i>Raphanus sativus</i>
	(Smeets <i>et al.</i> 2008)	1-10 μ M Cd	Increased expression and activity in leaves and roots	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	(Sarvajeet <i>et al.</i> 2008)	100 mg Cd kg ⁻¹ soil	Increased activity in roots, but decreased in leaf	<i>Vigna mungo</i> L. Hepper cv.
	(Kieffer <i>et al.</i> 2009b)	20 μ M Cd, up to 56 days	Unchanged activity in leaves and roots	<i>Populus tremula</i>
	(Gallego <i>et al.</i> 1996)	0.5 mM Cd	Decreased activity	<i>Helianthus annuus</i>
	(Aravind et Prasad 2005a)	10 μ M Cd	Decreased activity	<i>Ceratophyllum demersum</i>
	(Schützendübel et Polle 2002)	5 and 50 μ M Cd	Decreased activity (roots)	<i>Populus canescens</i>
	(Stobrawa et Lorenc-Plucinska 2007)	0.4 mg Cd.kg ⁻¹ / 266 mg Pb.kg ⁻¹ / 884 mg Cu.kg ⁻¹	Decreased activity in spring, increased in autumn	<i>Populus nigra</i> / <i>Populus deltoides</i>
	Schützendübel <i>et al.</i> , 2001)	50 μ M Cd	Decreased activity	<i>Pinus sylvestris</i>
Glutathione Peroxidase (GPX)				
	(Smeets <i>et al.</i> 2008)	1-10 μ M Cd	Increased expression and activity in leaves	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	(Dixit <i>et al.</i> 2001)	4 μ M et 40 μ M Cd	Decreased activity	<i>Pisum sativum</i>
	(Stobrawa et Lorenc-Plucinska 2007)	0.4 mg Cd.kg ⁻¹ / 266 mg Pb.kg ⁻¹ / 884 mg Cu.kg ⁻¹	Decreased activity	<i>Populus nigra</i> / <i>Populus deltoides</i>
	(Aravind et Prasad 2005a)	10 μ M Cd	Decreased activity (40%)	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.
	(Markovska <i>et al.</i> 2009)	10, 30, 50 and 100 μ M of Cd for 5 d	Decreased activity	<i>Brassica juncea</i> L. cv. Vitasso
Glutathione-S-Transferase (GST)				
	(Dixit <i>et al.</i> , 2001)	40 μ M Cd	Increased activity	<i>Pisum sativum</i>
	(Kieffer <i>et al.</i> , 2009)	20 μ M Cd, up to 56 days	Increased abundance & activity in roots. No change in leaves	<i>Populus tremula</i>
	(Aravind et Prasad 2005a)	10 μ M Cd	Increased activity (14%)	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.
	(Iannelli <i>et al.</i> 2002)	50 μ M CdSO ₄	Increased activity	<i>Phragmites australis</i>
Superoxide Dismutase (SOD)				
	(Dixit <i>et al.</i> , 2001)	40 μ M Cd	Increased activity	<i>Pisum sativum</i>
	(Iannelli <i>et al.</i> 2002)	50 μ M CdSO ₄	Increased activity	<i>Phragmites australis</i>
	(Vitoria <i>et al.</i> 2001)	0.25 - 1mM Cd	Increased activity (for 2 predominant isoenzymes)	<i>Raphanus sativus</i>
	(Smeets <i>et al.</i> 2008)	1-10 μ M Cd	Increased expression and activity in roots. No change in leaves. (Mn and Fe SOD)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	(Hsu et Kao 2007)	100 mg Cd kg ⁻¹ soil	Increased activity in leaf, but decreased in roots	<i>Vigna mungo</i> L. Hepper cv.
	Mishra <i>et al.</i> , 2006)	5mM CdCl ₂	Increased activity	<i>Oryza sativa</i>
	(Schützendübel <i>et al.</i> 2001)	10 μ M & 25 μ M	Increased activity (but decreased after 7 days)	<i>Bacopa monnieri</i>
	(Sarvajeet <i>et al.</i> 2008)	50 μ M Cd	Increased activity (0-12h, then returned to control value)	<i>Pinus sylvestris</i>
	(Stobrawa et Lorenc-Plucinska 2007)	100 mg Cd kg ⁻¹ soil	Increased activity in leaf, decreased in roots	<i>Vigna mungo</i> L. Hepper cv.
	(Sobkowiak et Deckert 2006)	0.4 mg Cd.kg ⁻¹ / 266	Ambiguous results	<i>Populus nigra</i> / <i>Populus</i>

	mg Pb.kg ⁻¹ / 884 mg Cu.kg ⁻¹		<i>deltoides</i>
(Pereira <i>et al.</i> 2002)	1-10 µM	Globally unchanged. with isoenzymes differences	<i>Glycine max</i> (cell suspension)
(Milone <i>et al.</i> 2003)	2mM CdCl ₂	No change (leaves and roots)	<i>Crotalaria juncea</i>
(Iannelli <i>et al.</i> 2002)	0.25 to 4.4 µM	Decreased activity (leaves and roots)	<i>Triticum aestivum</i> L.
(Sandalio <i>et al.</i> 2001)	50 µM CdCl ₂	Decreased activity. Sensitivity to Cd : Cu,Zn-SOD > Fe-SOD > Mn-SOD	<i>Pisum sativum</i> L.
Cu/Zn SOD			
(Kieffer <i>et al.</i> 2009)	20µM Cd, up to 56 days	Decreased abundance in leaves	<i>Populus tremula</i>
(Romero-Puertas <i>et al.</i> 2007)	50µM Cd	Decreased abundance	<i>Pisum sativum</i>
(Schützendübel <i>et al.</i> 2002)	50µM Cd	Decreased activity (roots)	<i>Populus canescens</i>
(Smeets <i>et al.</i> 2008)	1-10 µM Cd	Decreased expression and activity in leaves and roots	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Ascorbate Peroxidase (APX)			
(Dixit <i>et al.</i> 2001)	40µM Cd	Increased activity	<i>Pisum sativum</i>
(Hsu <i>et al.</i> 2007)	5mM CdCl ₂	Increased activity	<i>Oryza sativa</i>
(Mishra <i>et al.</i> 2006)	5 to 100 µM	Increased activity (5-25µM) decreased for 100µM	<i>Bacopa monnieri</i>
(Israr <i>et al.</i> 2005)	0-250µM Cd	Increased activity for 0-50µM Cd, then decreased	<i>Sesbania drummondii</i>
(Chaoui <i>et al.</i> 1997)	5µM Cd or 20 µM Zn	Increased activity (leaves)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Morgan
(Markovska <i>et al.</i> 2009)	10, 30, 50 and 100 µM of Cd for 5 d	Increased activity	<i>Brassica juncea</i> L. cv. Vitasso
(Sobkowiak <i>et al.</i> 2006)	1-10 µM	Unchanged	<i>Glycine max</i> (cell suspension)
(Iannelli <i>et al.</i> 2002)	50µM CdSO ₄	Increased activity	<i>Phragmites australis</i>
(Smeets <i>et al.</i> 2008)	1-10 µM Cd	Increased expression and activity in leaves	<i>Arabidopsis thaliana</i>
(Sarvajeet <i>et al.</i> 2008)	100 mg Cd kg ⁻¹ soil	Increased activity in both leaf and roots	<i>Vigna mungo</i> L. Hepper cv.
(Kieffer <i>et al.</i> 2009)	20µM Cd, up to 56 days	Decreased activity at day 56 in leaves. No change in roots	<i>Populus tremula</i>
(Schützendübel <i>et al.</i> 2001)	50 µM Cd	Decreased activity (24h), then increased, then back to control	<i>Pinus sylvestris</i>
(Schützendübel <i>et al.</i> 2002)	5 and 50µM Cd	Decreased activity (roots)	<i>Populus canescens</i>
Catalase (CAT)			
(Dixit <i>et al.</i> 2001)	4µM et 40 µM Cd	Increased activity	<i>Pisum sativum</i>
(Milone <i>et al.</i> 2003)	0.25 to 4.4 µM	Increased activity (leaves and roots)	<i>Triticum aestivum</i> L.
(Pereira <i>et al.</i> 2002)	2mM CdCl ₂	Increased activity in leaves (x6)	<i>Crotalaria juncea</i>
(Hsu <i>et al.</i> 2007)	5mM CdCl ₂	Increased activity	<i>Oryza sativa</i>
(Iannelli <i>et al.</i> 2002)	50µM CdSO ₄	Increased activity	<i>Phragmites australis</i>
(Vitoria <i>et al.</i> 2001)	0.25 - 1mM Cd	Increased activity	<i>Raphanus sativus</i>
(Smeets <i>et al.</i> 2008)	1-10 µM Cd	Increased expression and activity in leaves and roots	<i>Arabidopsis thaliana</i>
(Schützendübel <i>et al.</i> 2002)	5 and 50µM Cd	Decreased activity (roots)	<i>Populus canescens</i>
(Stobrawa <i>et al.</i> 2007)	0.4 mg Cd.kg ⁻¹ / 266 mg Pb.kg ⁻¹ / 884 mg Cu.kg ⁻¹	Decreased activity (except <i>P. deltoides</i> : increased in spring)	<i>Populus nigra</i> / <i>Populus deltoides</i>
(Mishra <i>et al.</i> 2006)	5 to 100 µM	Decreased activity	<i>Bacopa monnieri</i>
(Schützendübel <i>et al.</i> 2001)	50 µM Cd	Decreased activity (24h), then increased, then back to control	<i>Pinus sylvestris</i>
(Chaoui <i>et al.</i> 1997)	5µM Cd or 20 µM Zn	Decreased activity (roots and leaves - not in stem)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Morgan
(Sandalio <i>et al.</i> 2001)	50 µM CdCl ₂	Decreased activity	<i>Pisum sativum</i> L.
(Sobkowiak <i>et al.</i> 2006)	>6µM	Decreased activity	<i>Glycine max</i> (cell suspension)
(Sarvajeet <i>et al.</i> 2008)	100 mg Cd kg ⁻¹ soil	Decreased activity in both leaf and roots	<i>Vigna mungo</i> L. Hepper cv.
(Markovska <i>et al.</i> 2009)	10, 30, 50 and 100 µM of Cd for 5 d	Decreased activity	<i>Brassica juncea</i> L. cv. Vitasso
Thioredoxin peroxidase			
(Kieffer <i>et al.</i> 2008)	20 µM Cd	Decreased abundance	<i>Populus tremula</i>

2.6. Accumulation et compartimentation des métaux lourds

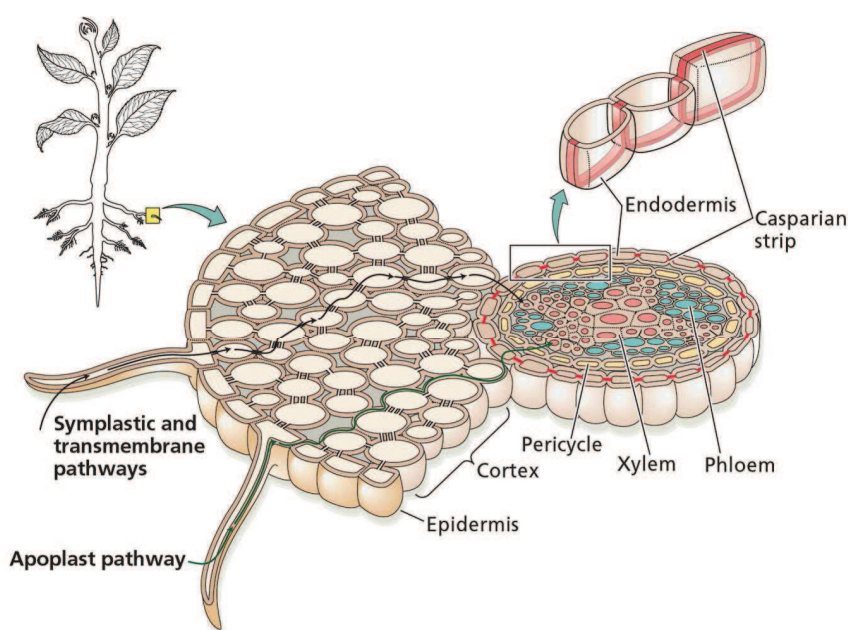
L'accumulation des métaux dans la plante est l'aboutissement d'un processus complexe qui commence avant l'absorption racinaire, par la solubilisation du métal dans le sol. En effet de nombreux métaux biologiquement indispensables sont présents dans le sol sous une forme insoluble, et les plantes doivent sécréter des acides organiques et des ligands afin de les rendre biodisponibles (Cieslinski *et al.* 1998; Peer *et al.* 2005). La détermination de la part de métal biodisponible est en soi problématique. Si des extractions en séquences permettent de connaître l'état d'association entre le métal et le sol, elles sont en revanche insuffisantes pour conclure en terme de biodisponibilité (Degryse *et al.* 2004).

On peut considérer 5 fractions du sol auxquels les métaux sont susceptibles d'être liés : 1) dans la solution du sol sous forme libre ou de complexe soluble, 2) adsorbés sur les constituants inorganiques du sol, 3) liés à la matière organique, 4) sous forme de précipités (oxydes, hydroxydes et carbonates) et 5) ancrés dans les structures des minéraux silicatés (Lasat 2000). Seules les fractions 1 et 2 sont directement biodisponibles pour la plante. La biodisponibilité des métaux peut varier, notamment, en fonction de la teneur en matière organique et du pH (Sarkar et Wynjones 1982). En lien avec le pH et l'activité microbologique, les acides humiques peuvent augmenter l'absorption de métaux lourds par la plante et améliorer leur translocation dans les parties aériennes (Halim *et al.* 2003; Evangelou *et al.* 2004; Sterckeman *et al.* 2005). La mycorrhizosphère peut jouer un rôle de première importance pour faciliter (Citterio *et al.* 2005) ou au contraire réduire (Huang et Xu 2008) la biodisponibilité des métaux. La plante, elle-même, en sécrétant des chélateurs dans ses exsudats racinaires peut limiter la mobilité et la disponibilité des métaux toxiques (Patra *et al.* 2004). On a par exemple montré une corrélation entre la présence de malate dans les exsudats d'apex racinaires et la tolérance à l'aluminium chez le blé (Delhaize et Ryan 1995).

La translocation du métal dans la plante est le passage depuis la racine vers les parties aériennes. Elle implique que l'ion métallique a atteint les tissus conducteurs de la racine (figure 2.2). La distribution des métaux dans les organes de la plante est très variable d'une espèce à une autre. La vacuolarisation des métaux dans la racine est l'un des premiers facteurs qui réduisent la translocation (Xing *et al.* 2008). On a reporté une subérisation plus

importante des racines chez plusieurs espèces dont le maïs en présence de métaux lourds (Schreiber *et al.* 1999). Cette subérisation limite les flux d'eau et l'absorption de nutriments – et de métal (Cosio 2006).

La distribution du métal dans les parties de la plante varie entre les espèces. Chez certaines plantes, l'allocation foliaire du Cd^{2+} dépend de l'âge de la feuille. Ainsi le Cd^{2+} est plus accumulé dans les feuilles âgées de *Salix viminalis* (Cosio *et al.* 2006), et *Silene vulgaris* (Chardonens *et al.* 1998) ou *Spinacia oleracea* (Fagioni et Zolla 2009), mais davantage dans les feuilles jeunes de *Thlaspi caerulescens* et *Brassicae juncea* (Salt *et al.* 1995). A l'intérieur des feuilles, la localisation des métaux est là encore variable selon les espèces. Le Cd^{2+} se concentre en périphérie des feuilles, dans la membrane et l'apoplasme, de *T. caerulescens* (Cosio *et al.* 2005). Chez *B. juncea*, le Cd^{2+} est stocké dans les trichomes (Salt *et al.* 1995). Ce n'est pas le cas chez *S. viminalis* (Cosio *et al.* 2006).



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 4.3 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Figure 2.2. Voies de passage des racines de l'eau et des minéraux depuis le sol vers le système vasculaire : symplasma et apoplasme.

En règle générale, lors d'un stress abiotique, le maintien de la croissance est associé à deux modalités : la *tolérance* et l'*évitement*. Dans le cas du stress métallique, ces modalités

peuvent être mises en relation avec trois grandes stratégies que sont l'exclusion, l'absorption non régulée des métaux (réponse type 'indicateur'), et l'**hyperaccumulation** (Figure 2.3). Ces trois stratégies sont le reflet de mécanismes moléculaires contrastés. Les plantes qui ne régulent pas l'entrée des métaux lourds présentent une sensibilité plus importante que celles des deux autres catégories (Callahan *et al.* 2006).

Toutes les plantes peuvent extraire les métaux du sol de manière régulée afin de combler leurs besoins métaboliques. Certaines, toutefois, les accumulent bien au delà de ces besoins. L'exemple le plus marquant est l'hyperaccumulateur appelé "Sève bleue" (*Sebertia acuminata*). Le latex de cet arbre endémique de Nouvelle Calédonie peut contenir jusqu'à 25 % de nickel (Jaffré *et al.* 1976). Le phénomène est rare ; seule 0,2 % des angiospermes sont considérées comme hyperaccumulatrices (Baker *et al.* 2000), elles sont en revanche très dispersées d'un point de vue taxonomique.

La raison de l'évolution vers l'hyperaccumulation fait encore débat. On a évoqué pour expliquer son apparition : 1) la tolérance envers les métaux, 2) une absorption 'accidentelle', 3) l'allélopathie, 4) la résistance à la sécheresse et 5) la protection contre les phytophages (Sagner *et al.* 1997) et les phytopathogènes (Boyd et Martens 1992). Whiting *et al.* (2003) ont toutefois montré que l'accumulation de Ni ou de Zn était sans effet sur la résistance à la sécheresse de *Alyssum murale* et de *Thlaspi caerulescens*. Par ailleurs, l'entrée des métaux lourds dans les tissus végétaux est souvent "accidentelle", relevant d'un manque de sélectivité des transporteurs et des pores membranaires. On note à cet égard qu'une forte concentration en cations divalents, comme Zn^{2+} par exemple, réduit l'entrée de Cd^{2+} chez de nombreuses espèces (Lombi *et al.* 2002). Il apparaît que le coût métabolique d'un mécanisme plus sélectif dépasserait celui de posséder un système d'efflux inductible (Silver 1996). L'hypothèse liée à la défense contre les herbivores et pathogènes semble à l'heure actuelle relativement bien étayée (Jiang *et al.* 2005) dans la mesure où tolérance métallique et accumulation sont deux caractères qui ségrégent généralement de façon indépendante (Macnair *et al.* 1999; Zha *et al.* 2004; Macnair 2007). Cette hypothèse est confortée par le fait que les hyperaccumulateurs ont des concentrations de métal plus élevées dans les feuilles, les organes les plus sensibles aux pathogènes et herbivores. Par exemple *Arabidopsis halleri* accumule le Zn à la base de ses trichomes (Zhao *et al.* 2000) et accumule le Cd au même endroit (Küpper *et al.* 2000). Chez *T. caerulescens* le zinc est localisé dans les

vacuoles de l'épiderme (Küpper *et al.* 1999). Les exemples de ce type sont nombreux (Küpper *et al.* 2001; Robinson *et al.* 2006). On peut toutefois rappeler, comme le font Noret *et al.* (2007), que les sites métallifères sont caractérisés par une faible pression des herbivores qui a conduit au fil de l'évolution les plantes à limiter leurs défenses organiques constitutives (comme les glucosinates), ce qui ne cadre pas avec l'hypothèse de la défense contre les herbivores et pathogènes. Les résultats de Noret *et al.* montrent une absence de protection des fortes concentrations en Zn contre les herbivores pour les écotypes métallicoles de *T. caerulescens*.

Les populations métallicoles de *T. caerulescens* développent une tolérance acquise envers les métaux, comparées aux populations non métallicoles (Assunção *et al.* 2003). Cela implique l'existence d'un "coût de tolérance" qui justifie que cette tolérance serait un désavantage dans un environnement non contaminé. L'origine de ce coût n'est toutefois pas encore élucidée (Macnair 2007).

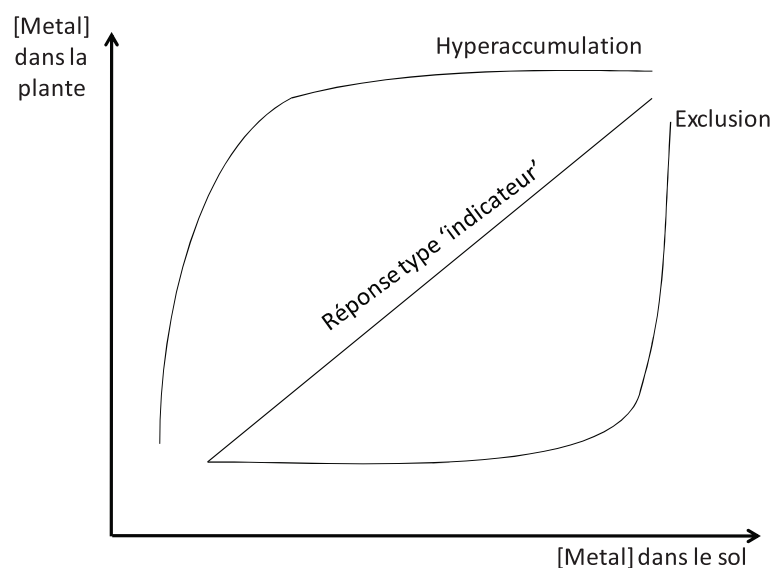


Figure 2.3. Trois stratégies de réponse à la présence de métaux lourds dans l'environnement (d'après Callahan 2006).

2.7. Questions et stratégie

Le cadmium étant dépourvu d'activité biologique, sa gestion par la plante est certainement très différente de celle d'un métal essentiel comme le zinc. En effet la plante possède un système homéostatique et de nombreux transporteurs spécifiques pour le zinc alors que le Cd ne stimule a priori que des systèmes de détoxification. Le travail effectué a pour but de déterminer les similitudes et dissemblances des contraintes constituées par un excès de ces métaux. Nous cherchons notamment à éclaircir les points suivants :

1 — Quel sont les effets physiologiques d'un excès de zinc ou de cadmium dans le sol ? Dans quelle mesure ces ions métalliques sont-ils en compétition dans le sol et dans la plante ? Affectent-ils l'homéostasie d'autres cations essentiels comme K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{2+} ?

Durand T.C., Hausman J.-F., Carpin S., Albéric P., Baillif P., Label P., & Morabito D. Zinc and cadmium effect on *Populus tremula* × *Populus alba* genotype 717-1B4: growth and ion distribution. *Biologia Plantarum* 54, 191-194.

2 — Quels sont les changements protéomiques induits par une contrainte cadmique ? Quels sont les aspects de la réponse partagés par deux tissus aussi différents que la feuille et la zone cambiale ?

Durand T.C., Sergeant K., Planchon S., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J.-F., Renault J. Acute metal stress in *Populus tremula* × *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by Cd^{2+} . *Proteomics* 10, 349-368.

3 — Existe-t-il une différence dans les niveaux d'absorption, de translocation et de distribution de Zn^{2+} et Cd^{2+} ?

Durand T.C., Baillif P., Albéric P., Carpin S., Label P., Hausman J.-F., Baillif P., Label P., & Morabito D. Cd and Zn are differentially distributed in *Populus tremula* × *P. alba* exposed to metal excess. Submitted for publication to *Plant Biosystems*.

2.8. Zinc and cadmium effect on growth and ion distribution in *Populus tremula* × *Populus alba*

T.C. DURAND^{1,2,3,4}, J.F. HAUSMAN³, S. CARPIN^{1,2}, P. ALBERIC⁵, P. BAILLIF⁵, P. LABEL^{4¶} and D. MORABITO, ^{1,2¶*}

Adresses

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Faculté des Sciences, Université d'Orléans, F-45067 Orléans Cedex 2, France¹

INRA USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE) F-45067 Orléans Cedex 2, France²

CRP-Gabriel Lippmann, Department Environment and Agrobiotechnologies, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, GD Luxembourg³

Institut National de la Recherche Agronomique, 2163 avenue de la Pomme de Pin, B.P. 20619 Ardon, F-45166 Olivet cedex, France⁴

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, UMR 6113 - CNRS/Université d'Orléans. 1A, rue de la Férollerie F-45071 Orléans Cedex 2, France⁵

¶ These authors contributed equally as senior author.

BRIEF COMMUNICATION

Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus tremula* × *Populus alba*

T.C. DURAND^{1,2,3,4}, J.F. HAUSMAN³, S. CARPIN^{1,2}, P. ALBERIC⁵, P. BAILLIF⁵, P. LABEL⁴ and D. MORABITO^{1,2*}

Faculté des Sciences, Université d'Orléans, LBLGC, F-45067 Orléans Cedex 2, France¹

INRA, USC2030 ARCHE, F-45067 Orléans Cedex 2, France²

CRP-Gabriel Lippmann, Department Environment and Agrobiotechnologies, L-4422 Belvaux, Luxembourg³

INRA, UAGPF, F-45166 Olivet Cedex, France⁴

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, CNRS/Université d'Orléans, F-45071 Orléans Cedex 2, France⁵

Abstract

The effects of cadmium and zinc on growth and mineral distribution in *Populus tremula* × *P. alba* genotype 717-1B4 were investigated. Exposure to 360 mg(Cd) kg⁻¹(soil) resulted in accumulation of Cd in all organs and inhibition of primary and secondary growth as well as of the net photosynthetic rate. No growth inhibition occurred under zinc exposure. Cd was mainly stored in the woody parts of stem, whereas zinc was preferentially localized in the leaves. Cd treatment also altered distribution of Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, and Fe²⁺ in different organs.

Additional key words: poplar, mineral distribution, net photosynthetic rate, stomatal conductance.

Plants responses to heavy metals are drawing growing attention, as metal pollution is still increasing worldwide and threatens the stability of our ecosystems (Menon *et al.* 2007). Metals exist naturally in the environment and take part in the normal metabolism of plants. Yet beyond a certain threshold, that is variable according to the metals and plant species, phytotoxicity can occur (Shamsi *et al.* 2008, Markovska *et al.* 2009). Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal albeit plants often easily absorb it. This bioavailability is most likely due to its similarities with zinc (Zn), an essential element for life. Though essential for plant metabolism, zinc can also be present at an excessive level in the environment, adversely affecting ecosystems. Besides, a contamination of the environment by cadmium often occurs as a result of zinc pollution, since Cd is a by-product of the Zn industry.

The first strategy for a plant to resist to a high amount of toxic metal ions in its environment is to hamper their entrance, or to develop active effluxes from roots. However airborne particles deposition on leaves accounts

for a substantial contribution to metal pollution of plants that cannot be prevented by root efflux (Yaaqub *et al.* 1991). Plants unable to impede entry of toxic ions must then possess inner mechanisms of detoxification and mostly compartmentalisation. This is sometimes insufficient, at least partly due to lack of specificity of ions transporters. Essential ions are conveyed *in planta* by specific and multiple transporters, *e.g.* P-type ATPases, cation diffusion facilitator, ZIP, *etc.* (Colangelo and Guerinot 2006). Meanwhile the translocation of toxic elements like cadmium is not fully explained yet.

Metals are reported to be unevenly distributed among species and among plant organs and tissues. The roots are most often directly in contact with the pollutants, especially in the case of edaphic pollutions. This is why roots usually exhibit the greatest metal content in the plant (*e.g.* Wojcik and Tukiendorf 2005, Deram *et al.* 2006, Unterbrunner *et al.* 2007). Yet, metal ions can also concentrate in aboveground organs, especially in hyperaccumulator plants like *Thlaspi caerulescens*

Received 7 May 2009, accepted 17 November 2009.

Abbreviations: g_s - stomatal conductance; P_N - net photosynthetic rate.

Acknowledgments: Thomas Durand was supported by a PhD fellowship of the Luxembourg Ministry of Culture, Higher Education and Research (BFR 05/094). The authors are grateful to Alain Guichard, Gilles Moreau and Julie Jumeau (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures) for their excellent technical assistance. P.L. and D.M. contributed equally as senior author.

* Corresponding author; fax: (+33) 2 38 49 40 89, e-mail: domenico.morabito@univ-orleans.fr

(Roosens *et al.* 2003). The metal distribution inside the plant represents *per se* an indicator of the tolerance and/or accumulation mechanisms. Besides supplying an important biomass, tree species would provide a practical material: the wood, from which little dispersal is likely to occur. So, the storage of heavy metals in woody parts appears to be prominent for the validation of a proper woody phytoremediator.

This study describes primary and secondary growth and gas exchange of young pot-grown poplars submitted to Cd or Zn, and the consecutive stress they endured. The paper provides the profiles of the content of major elements, namely Ca, Mg, K and Fe, as for the two heavy metals Cd and Zn, in the poplar organs, including different tissues of the cutting.

Woody stem cuttings obtained from 1-year-old cut-back stems of *Populus tremula* L. $\times$ *P. alba* L. [*Populus* $\times$ *canescens* (Aiton) Smith] genotype INRA 717-1B4 were planted into sand. After rooting (1 month), plants were placed during 6 weeks in 1 dm³ pots composed of sand and peat moss (25:75, v/v, pH 6.9) to allow stem and leaf growth. Then the plants were transferred into 10 dm³ pots containing uncontaminated or contaminated soil. Concomitantly plants were pruned in order to make sure that the new leafy stems were entirely formed while plants were exposed to metal. The heavy metal constraints consisted in the addition of 1 mmol of Cd or Zn at the beginning of the treatment (day 0). The actual concentration of metal in soils and in soil solutions was measured (Table 1). The temperature was 21 ± 2 °C, relative humidity 70 ± 5 % and an irradiance $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided during 16-h photoperiod. At the end of the treatment (day 61), plants were divided into roots, cutting (initial stem utilized to root the plant), stem (newly formed stem during the treatment) and leaves. The cuttings were lyophilised and separated into 3 parts: xylem, cambial zone and bark.

During the treatment, the total leaf area and the diameter of the cuttings (radial growth) were measured as described by Morabito *et al.* (2006). The net photosynthetic rate (P_N) and the leaf stomatal conductance to water vapour (g_s) were measured on the last fully expanded leaf. Measurements were conducted with a portable photosynthetic system (*Ciras-2*, *PP Systems*, Hitchin, Herts, UK). Zn, Cd, K, Ca, Mg and Fe were quantified as described by Marchand *et al.* (2006). Dry samples (100 mg) were grinded into a fine powder and resuspended in 10 cm³ of an acid mixture containing HClO₄ (60 %) + HNO₃ (85 %) + H₂O (1:1:1, v/v). Subsequently 1 cm³ H₂O₂ (30 %) was added in each sample. Digestion was completed in a *MDS 2000* (*CEM Corp.*®, Mathews, NC, USA) microwave, 15 min at 190°C and 1.3 MPa. The final volume was brought to 100 cm³ with double distilled water. Heavy metals and ions contents were determined on a *Jobin-Yvon*® *HR-ICP-AES* (Edison, NJ, USA) from three individual plants per treatment. The heavy metal content in soil as well as the concentration in the soil solution were also measured.

Measurements were carried out on 3 to 5 biological replicates. A Student's *t*-test was performed to determine significance of differences.

Normal Cd soil content is about 1 mg kg⁻¹ (Peer *et al.* 2005) but less than 2 % of this metal is usually in bioavailable form (Ma and Rao 1997). The Cd treatment applied in the present study, 360 mg(Cd) kg⁻¹(soil DM), with a soil solution close to 20 μM Cd, represented a severe pollution. The resulting soil zinc content, 265 mg(Zn)kg⁻¹(soil DM) or 140 μM Zn in soil solution was at least 2-fold higher than in nature. However, this concentration was lower than the phytotoxicity thresholds (*e.g.* Paschke *et al.* 2006). *In vitro*-cultured *Populus alba* showed toxicity when exposed to 0.5 to 3 mM Zn (Castiglione *et al.* 2007).

Under Zinc treatment, Zn content in the soil was approximately 9-fold higher than in control pots and corresponded to 265 mg kg⁻¹(DM). Under cadmium treatment the zinc content did not significantly differ from control soil and corresponded to 37.1 mg kg⁻¹(DM), whereas Cd content in the soil was 360 mg kg⁻¹(DM). Cd was detected neither in control nor in Zn-treated soils. Under control conditions, soil solution contained 8.3 μM Zn²⁺. When Zn treatment was applied, this concentration reached 140.4 μM Zn²⁺. The Cd treatment resulted in a soil solution containing 20.8 μM Cd²⁺ and 7.3 μM Zn²⁺.

Table 1. Soil constraint characterization and physiological parameters of *Populus tremula* $\times$ *P. alba* genotype 717-1B4 exposed 61 d to 360 mg(Cd) kg⁻¹(soil), to 265(Zn) mg kg⁻¹(soil) or to control condition. Means $\pm$ SE ($n = 3$ to 5; significant differences in comparison with control at * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$; *** - $P < 0.001$ according to Student *t*-test; nd - not detectable).

Parameter	Control	Zinc	Cadmium
Zn in soil [mg kg ⁻¹]	29.7 $\pm$ 0.5	265.0 $\pm$ 17.3***	37.1 $\pm$ 7.7
Zn ²⁺ in solution [μM]	8.3 $\pm$ 2.3	140.4 $\pm$ 10.6***	7.3 $\pm$ 1.1
Cd in soil [mg kg ⁻¹]	nd	nd	360.0 $\pm$ 15***
Cd ²⁺ in solution [μM]	nd	nd	20.8 $\pm$ 0.5***
K in soil [g kg ⁻¹]	3.1 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.1
Mg in soil [g kg ⁻¹]	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1
Ca in soil [g kg ⁻¹]	2.9 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.7
Total leaf area [dm ²]	21.8 $\pm$ 3.1	25.0 $\pm$ 3.6	7.8 $\pm$ 1.3**
Diameter increase [mm]	2.7 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2
Root dry mass [g]	3.8 $\pm$ 1.8	5.7 $\pm$ 2.0	0.5 $\pm$ 0.1*
Cutting dry mass [g]	12.6 $\pm$ 0.4	13.1 $\pm$ 2.1	7.8 $\pm$ 0.3***
Stem dry mass [g]	7.9 $\pm$ 2.9	9.1 $\pm$ 1.8	1.3 $\pm$ 0.1*
Leaves dry mass [g]	19.0 $\pm$ 6.4	22.3 $\pm$ 4.3	2.8 $\pm$ 0.2*
g_s [mmol(H ₂ O) m ⁻² s ⁻¹]	156.0 $\pm$ 20	141.0 $\pm$ 16	68.0 $\pm$ 20*
P_N [$\mu\text{mol}(\text{CO}_2)$ m ⁻² s ⁻¹]	22.7 $\pm$ 0.9	19.8 $\pm$ 2.0	1.7 $\pm$ 0.2***

After stem pruning on day 0, which corresponds to the beginning of the metal treatments, bud break occurred on day 21. The primary growth, estimated by the total leaf area, was not altered under Zn treatment whereas a 64 % decrease occurred in Cd-treated plants on day 61

(Table 1). Zn treatment had no effect on the dry mass of the different plant organs, however, DM of all organs exhibited a significant reduction caused by Cd exposure (Table 1).

Zn treatment had no significant effect on P_N and g_s . Cd treatment caused an important inhibition of P_N and g_s (93 and 56 %, respectively; Table 1).

Under control conditions, the stem presented the highest zinc content (Table 2). After Zn exposure, all organs presented a significant increase in Zn content. When exploring the different tissues of the cuttings, Zn treatment did not change Zn content in xylem nor in the cambial zone, while the Zn content was almost doubled in bark compared to control plants. Under Cd exposure, Zn content in leaves was 2.3 fold higher than in control (Table 3).

Table 2. Contents of Cd, Zn, Fe [mg kg^{-1}], Ca, Mg and K [g kg^{-1}] in dry mass of poplar 717-1B4 exposed to 360 mg(Cd) kg^{-1} (soil), to 265(Zn) mg kg^{-1} (soil) or to control condition (C) for 61 d. Means $\pm$ SE ($n = 3$; significant differences in comparison with control at ** - $P < 0.01$, *** - $P < 0.001$ according to Student *t*-test; nd - not detectable).

Ions	Roots	Cutting	Stem	Leaves
Cd	C nd	nd	nd	nd
	Zn nd	nd	nd	nd
	Cd 255.1 $\pm$ 68***	85.6 $\pm$ 18***	92.7 $\pm$ 4***	84.0 $\pm$ 7.5***
Zn	C 46.6 $\pm$ 7.5	33.3 $\pm$ 5.8	60.1 $\pm$ 7.3	35.3 $\pm$ 5.4
	Zn 194.4 $\pm$ 36**	83.8 $\pm$ 8.7**	157.3 $\pm$ 25**	325.6 $\pm$ 16***
	Cd 40.1 $\pm$ 3.5	36.3 $\pm$ 7.8	46.1 $\pm$ 4.5	79.6 $\pm$ 3.6**
Fe	C 478.0 $\pm$ 156	103.0 $\pm$ 7.0	49.0 $\pm$ 7.0	102.0 $\pm$ 14
	Zn 352.0 $\pm$ 34	109.0 $\pm$ 9.0	42.0 $\pm$ 11	111.0 $\pm$ 4.0
	Cd 608.0 $\pm$ 100	114.0 $\pm$ 9.0	49.0 $\pm$ 13	110.0 $\pm$ 31
Ca	C 8.3 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 0.4	8.0 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.6
	Zn 8.8 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.3
	Cd 9.9 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 1.5	12.0 $\pm$ 0.1**	11.2 $\pm$ 0.7**
Mg	C 1.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.01	2.1 $\pm$ 0.1
	Zn 1.5 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1
	Cd 1.2 $\pm$ 0.0**	0.5 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2***
K	C 23.1 $\pm$ 2.6	6.5 $\pm$ 1.1	21.6 $\pm$ 0.7	18.6 $\pm$ 1.5
	Zn 19.7 $\pm$ 2.2	7.2 $\pm$ 0.1	21.3 $\pm$ 0.2	18.4 $\pm$ 0.6
	Cd 10.5 $\pm$ 0.7**	3.3 $\pm$ 0.12*	20.4 $\pm$ 1.2	43.2 $\pm$ 5.2**

Under control and Zn constraints, no Cd was detected in plants (Table 2). Under Cd treatment, the highest Cd content occurred in the roots. In the cutting, Cd accumulated more in the bark and in the cambial zone than in the xylem (Table 3).

Iron content remained unchanged under both

treatments (Table 2). Under Zn exposure, no change occurred in potassium, calcium or magnesium content. Under Cd exposure, roots exhibited a reduction in K^+ and Mg^{2+} content. K^+ content also decreased in the cuttings whereas it increased in leaves. Calcium content increased in the stem and leaves. A modified status of metal homeostasis in response to Cd was reported in hyperaccumulator species (Küpper *et al.* 2001) and a Cd-induced increase of K^+ content in leaves was observed in also soybean (Drazic *et al.* 2004). These changes may aim to alleviate Cd toxicity. Indeed, Zn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} were reported to reduce Cd phytotoxicity by partly impeding Cd uptake from soil (Zoghalmi *et al.* 2006) and protective effect against Cd toxicity *in planta* have been ascribed to Zn^{2+} (Aravind and Prasad 2005).

Table 3. Zinc and cadmium content [mg kg^{-1}] in the xylem, cambial zone and bark of poplar 717-1B4 stems exposed 61 d to 360 mg(Cd) kg^{-1} (soil), to 265(Zn) mg kg^{-1} (soil) or to control conditions. Means $\pm$ SE ($n = 3$; significant differences in comparison with control at ** - $P < 0.01$, *** - $P < 0.001$ according to Student *t*-test; nd - not detectable).

Metal	Treatment	Xylem	Cambial zone	Bark
Zn	control	32.8 $\pm$ 7.1	169.7 $\pm$ 28.6	104.9 $\pm$ 7.90
	Zn	28.7 $\pm$ 1.8	184.9 $\pm$ 32.5	199.6 $\pm$ 18.4**
	Cd	27.2 $\pm$ 4.1	168.4 $\pm$ 16.7	89.3 $\pm$ 1.90
Cd	control	nd	nd	nd
	Zn	nd	nd	nd
	Cd	16.5 $\pm$ 6.2***	122.9 $\pm$ 28.8***	158.1 $\pm$ 40.9***

Although cadmium is absorbed near to hyper-accumulation level, its handling by the plant is problematical. Indeed, an unefficient Cd compartmentalisation can lead to impaired functioning of meristems, necrotic spots on leaves, and reduced growth under severe Cd exposure. In roots, Cd toxicity can induce cytoskeleton perturbation (Xu *et al.* 2009). Survival of 717-1B4 poplar genotype under such drastic condition is not granted. On the other hand, the results confirm the ability of this poplar genotype to pursue growth and development in Zn-polluted soils. The plant appeared to be able to uptake and to compartmentalise efficiently Zn in its leaves and bark under a moderate Zn contamination. Poplar biomass production and metal bioaccumulation factors in tissues plead for its use in Zn phytoextraction.

Beyond this study, it would be worth exploring the physiological response of such trees at the tissue level where specific protein profiles could be associated to ion transport and storage.

References

- Aravind, P., Prasad, M.N.V.: Cadmium-induced toxicity reversal by zinc in *Ceratophyllum demersum* L. (a free floating aquatic macrophyte) together with exogenous supplements of amino- and organic acids. - *Chemosphere* **61**: 1720-1733, 2005.
- Castiglione, S., Franchin, C., Fossati, T., Lingua, G., Torrigiani,

- P., Biondi, S.: High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* L. cv. Villafranca). - *Chemosphere* **67**: 1117-1126, 2007.
- Colangelo, E.P., Guerinot, M.L.: Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. - *Curr Opin. Plant Biol.* **9**: 322-330, 2006.
- Deram, A., Denayer, F.-O., Petit, D., Van Haluwyn, C.: Seasonal variations of cadmium and zinc in *Arrhenatherum elatius*, a perennial grass species from highly contaminated soils. - *Environ. Pollut.* **140**: 62-70, 2006.
- Dražić, G., Mihailović, N., Stojanović, Z.: Cadmium toxicity: the effect on macro- and micro-nutrient contents in soybean seedlings. - *Biol Plant* **48**: 605-607, 2004.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., Wieshammer, G., McGrath, S.P.: Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. - *J. exp. Bot.* **52**: 2291-2300, 2001.
- Ma, L.Q., Rao, G.N.: Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. - *J. environ. Qual.* **26**: 259-264, 1997.
- Marchand, C., Lallier-Vergès, E., Baltzer, F., Albéric, P., Cossa, D., Baillif, P.: Heavy metals distribution in mangrove sediments along the mobile coastline of French Guiana. - *Marine Chem.* **98**: 1-17, 2006.
- Markovska, Y., Gorinova, N., Nedkovska, M., Miteva, K.: Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. - *Biol. Plant.* **53**: 151-154, 2009.
- Menon, M., Hermle, S., Günthardt-Goerg, M., Schulin, R.: Effects of heavy metal soil pollution and acid rain on growth and water use efficiency of a young model forest ecosystem. - *Plant Soil* **297**: 171-183, 2007.
- Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Carli, C., Laurans, F., Depierreux, C., Kahlem, G., Label, P.: Cambial activity of *Populus tremula* × *Populus alba* clone 717-1B4 in hydroponic culture. - *Can. J. Forest Res.* **36**: 719-724, 2006.
- Paschke, M., Perry, L., Redente, E.: Zinc toxicity thresholds for reclamation forb species. - *Water Air Soil Pollut.* **170**: 317-330, 2006.
- Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., Murphy, A.S.: Phytoremediation and hyperaccumulator plants. - In: Tamas, M.J., Martinoia, E. (ed.): *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Pp. 299-340. Springer, Berlin - Heidelberg 2005.
- Roosens, N.H., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximenez-Embun, P., Smith, J.A.C.: Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. - *Plant Cell Environ.* **26**: 1657-1672, 2003.
- Shamsi, I., Wei, K., Zhang, G., Jilani, G., Hassan, M.: Interactive effects of cadmium and aluminum on growth and antioxidative enzymes in soybean. - *Biol. Plant.* **52**: 165-169, 2008.
- Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustos, P., Zupan, M., Wenzel, W.W.: Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. - *Environ. Pollut.* **148**: 107-114, 2007.
- Wojcik, M., Tukiendorf, A.: Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. - *Biol. Plant.* **49**: 237-245, 2005.
- Xu, P., Liu, D., Jiang, W.: Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. - *Biol. Plant.* **53**: 387-390, 2009.
- Yaaqub, R.R., Davies, T.D., Jickells, T.D., Miller, J.M.: Trace elements in daily collected aerosols at a site in south-eastern England. - *Atmos. Environ.* **25**: 985-996, 1991.
- Zoghalmi, L.B., Djebali, W., Chaibi, W., Ghorbel, M.H.: Physiological and structural modifications induced by cadmium-calcium interaction in tomato (*Lycopersicon esculentum*). - *Comp. rend. Biol.* **329**: 702-711, 2006.

2.9. Acute metal stress in *Populus tremula* x *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by Cd²⁺. *Proteomics, in press.*

Durand, Thomas C₂^{abcd}; Sergeant, Kjell^a; Planchon, Sébastien^a; Carpin, Sabine^{bc}; Label, Philippe^d; Morabito, Domenico^{bc}; Hausman, Jean-François^a; Renaut, Jenny^{a*}

^a CRP-Gabriel Lippmann, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, GD, Luxembourg. Department Environment and Agro-biotechnologies.

^b Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France.

^c INRA, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), 45067 Orléans, France.

^d Institut National de la Recherche Agronomique, CS40001 Ardon, 2163 Avenue de la pomme de pin, 45075 Orléans CEDEX 2, France.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: renaut@lippmann.lu

Acknowledgment :

The authors are grateful to Thomas Udelhoven for his helpful expertise in statistics and to Vanessa Caruso for English correction.

Thomas Durand was supported by a PhD fellowship of the Luxembourg Ministry of Culture, Higher Education and Research (BFR 05/094) and a National funds for Research grant (AFR)

Keywords : Cadmium, Cambium, Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis, Mass spectrometry, Metal stress, Phytoremediation.

Abbreviations: DAP: DNA-binding Aspartyl Protease / PRP: proline-rich protein / PSII : Photosystem 2.

RESEARCH ARTICLE

Acute metal stress in *Populus tremula* × *P. alba* (717-1B4 genotype): Leaf and cambial proteome changes induced by cadmium²⁺

Thomas C. Durand^{1,2,3,4}, Kjell Sergeant¹, Sébastien Planchon¹, Sabine Carpin^{2,3}, Philippe Label⁴, Domenico Morabito^{2,3}, Jean-François Hausman¹ and Jenny Renault¹

¹CRP-Gabriel Lippmann, Department Environment and Agro-biotechnologies, Belvaux, GD, Luxembourg

²UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Orléans, France

³INRA, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), Orléans, France

⁴Institut National de la Recherche Agronomique, Ardon, Orléans, France

The comprehension of metal homeostasis in plants requires the identification of molecular markers linked to stress tolerance. Proteomic changes in leaves and cambial zone of *Populus tremula* × *P. alba* (717-1B4 genotype) were analyzed after 61 days of exposure to cadmium (Cd) 360 mg/kg soil dry weight in pot-soil cultures. The treatment led to an acute Cd stress with a reduction of growth and photosynthesis. Cd stress induced changes in the display of 120 spots for leaf tissue and 153 spots for the cambial zone. It involved a reduced photosynthesis, resulting in a profound reorganisation of carbon and carbohydrate metabolisms in both tissues. Cambial cells underwent stress from the Cd actually present inside the tissue but also a deprivation of photosynthates caused by leaf stress. An important tissue specificity of the response was observed, according to the differences in cell structures and functions.

Received: July 7, 2009
Revised: October 20, 2009
Accepted: October 22, 2009

**Keywords:**

Cadmium / Cambium / Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis / Metal stress / Plant proteomics / Phytoremediation

1 Introduction

Cadmium (Cd) is regarded as one of the most toxic heavy metals responsible for human and plant diseases [1, 2]. When plant physiology is affected by Cd stress, symptoms are generally chlorosis, necrosis, leaf rolling or drying and growth inhibition [3]. Cd toxicity arises notably from competition with Zn for binding sites in biomolecules, e.g. enzymes or carriers [4, 5].

Correspondence: Dr. Jenny Renault, CRP-Gabriel Lippmann, Department Environment and Agro-biotechnologies, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, GD, Luxembourg
E-mail: renaud@lippmann.lu
Fax: +352-470264

Abbreviations: Cd, cadmium; DAP, DNA-binding aspartyl protease; IF, impact factor; OEE, oxygen evolving enhancer; PRP, proline-rich protein; RuBisCo, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; SDW, soil dry weight; TCA, trichloroacetic acid; UDP, uridine diphosphate

Since a few years *Salicaceae* (e.g. willows and poplars) have emerged as promising candidates in the search for convenient species to achieve phytoremediation of polluted sites [6]. Indeed, poplar, whose small genome is now completely sequenced, is a suitable model plant to support molecular studies on stress responses [7, 8]. Poplar is reported to be able to thrive despite metal contamination, and to accumulate metals, especially Cd [9]. Being a perennial species poplar furthermore allows the opportunity to shape an ideal phytoremediator. Year after year accumulation of metals in harvestable woody tissues provides a convenient means of soil clean up combined with the potential of energy production. As a model-tree species poplar can also be used to study the metabolic mechanisms of metal uptake and tolerance in woody species.

The plant responses to metal stress are mediated through modifications in gene expression and protein levels. Proteins that participate in metal tolerance response are

reported to be involved in the induction of transcription factors, in the protection or restoration of macromolecules and in detoxification activities [10].

Metal homeostasis and detoxification are known to be partly constitutive [2], but inducible parts of these processes can be explored by a proteomic approach. Although proteomic research has been conducted on the effects of metals on plants, *e.g.* on the response to Cd in roots of *Oryza sativa* [11], in cell cultures of *Arabidopsis thaliana* [12], in leaves of *Spinacia oleracea* [13] or in roots and shoots of *Thlaspi caerulescens* [14], a recent review by Ahsan *et al.* [15] deplored the limited proteomic investigations on this topic, especially for long-term exposition. Kieffer *et al.* [16, 17] recently reported proteome changes in leaves of poplar exposed to Cd up to 56 days under hydroponic conditions.

The comprehension of the tolerance of plants to environmental constraints requires a profound description of the acting molecules during the response. Typically, a constraint will evoke a stress perception and a stress signalization leading to damage avoidance and repair. For each step of the plant response, some of the involved molecules belong to a generic pattern of response to all biotic/abiotic stresses, while others can be related to one specific stressor. Current research mainly deals with molecules involved in the response to a range of diverse constraining conditions, *e.g.* chaperones, antioxidants, proline, plant growth regulators, *etc.* [18–21]. These molecules are responsible for the General Adaptation Syndrome, initially formulated by Selye in 1951 [22, 23]. However, one type of stress will not equally affect the dissimilar tissues within an individual. Published proteomic studies of plant stress most often concern leaf or root tissues. This is graspable considering that the photosynthetic apparatus is often affected by heavy metal toxicity [24], while roots are directly exposed to the contaminated environment. Yet, other tissues can be considered to complement the analysis. In woody species the cambium activity determines the secondary growth that represents a physical support for the extended primary growth of the tree. It also shapes the structure of conductor tissues – number and size of wood vessels and fibers, cellular composition of phloem. Cambium activity eventually influences the production of biomass wherein heavy metals can be accumulated. Despite its importance, the cambium response remains scarcely questioned. Available studies on the cambial tissue generally focus on developmental questions (*e.g.* [25, 26]) and few deal with biotic [27] or abiotic stress [28].

A proteomics approach on the responses of plants during exposure to pollutants, *in casu* Cd, will point out the molecular actors supporting metal intake and also give information about stress-related responses in different tissues. This knowledge will allow the selection or the design of plants that prevent deleterious metal accumulation along the food chain (like Cd), or, on the contrary, crops that could solve problems of human essential metal deficiencies.

In this study, young poplar plants were exposed to a soil contaminated by the addition of 360 mg Cd/kg soil dry weight (SDW), corresponding to a total amount of 1 mmol of metal *per* liter of soil. Ecophysiological parameters were monitored all along the 61 days of exposure to characterize the physiological state of the plant. Metal distribution in the tree was also determined. A subsequent proteome analysis on leaf and cambial tissues illustrated the acute stress endured by Cd and its strong effect on photosynthesis and carbon metabolism.

2 Materials and methods

2.1 Plant material and metal constraints

Pot-grown *Populus tremula* L. × *P. alba* L. (*Populus* × *canescens* (Aiton) Smith) genotype INRA 717-1B4 were obtained as previously described in Durand *et al.* [29]. Once rooted and 3 months old, poplar plants were pruned and transplanted from 0.3 L pots to 10 L pots filled with a sand – peat moss soil mixture (25:75 v/v, pH 6.9). Cd was incorporated in the 10 L soils by uniformly hand mixing.

Control soil contained no detectable Cd. Cd contaminated soil contained 360 mg Cd/kg SDW. Soil solution concentrations were determined from 100 g of fresh soil after 20 min of centrifugation at 10 000 × *g*. The supernatant was collected for quantification using a Jobin-Yvon® HR-ICP-AES, as described in [29]. Soil solution of metal-exposed plants contained 20.8 μM Cd²⁺.

Plants were grown in culture chamber at 21 °C, 70% of relative humidity, and with an irradiance of 1000 μmol m^{−2} s^{−1} provided for 16 h *per* day. After 61 days of metal exposure, leaf and woody tissues were collected and frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until protein extraction.

2.2 Protein extraction and sample preparation

Four biological replicates corresponding to each individual plant were used. Leaf proteins were extracted starting from 500 mg of fresh weight collected from the three last fully expanded leaves of one plant. After lyophilization of the cutting, the bark was excised. The cambial zone was then collected by softly scratching the inner face of the bark with a scalpel. Proteins from the cambial zone were extracted from approximately 60 mg of dry tissue of each replicate. Tissues were ground in liquid nitrogen. Proteins were extracted using the trichloroacetic acid (TCA)-acetone precipitation method described by Damerval *et al.* [30]. Resolubilization of the precipitated proteins was carried out in a lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5). The protein extracts were quantified using a quantification kit (2D-Quant Kit, GE healthcare, Little Chalfont, UK) with BSA as standard.

After quantification, proteins were labeled by mixing 240 pmol of fluorochromes (CyDyesTM, GE Healthcare) with 30 µg proteins. For each gel, Cy3 and Cy5 were used for control or treated samples; Cy2 was used for the internal standard consisting of a mix of equal amounts of each sample. A dye swap was used between Cy3 and Cy5 to avoid problems associated with preferential labeling.

2.3 Protein separation and relative quantification (2-D DIGE)

Bidimensional electrophoresis was carried out as described in Bohler *et al.* [31], with slight modifications. Isoelectric focusing was carried out on pH 3–10 IPG-strips (24 cm, non-linear gradient; GE Healthcare) using the IPGphor system from GE Healthcare. Protein samples were cup loaded. The migration was performed at 20°C (≤ 50 µA, 60 V for 2 h; gradient from 60 to 1000 V for 3 h; hold 1000 for 1 h, gradient from 1000 to 8000 for 3 h; hold 8000 V until 85 000 Vh). Strips were then stored at –20°C.

Prior to second dimension migration, the strips were equilibrated. During equilibration, proteins were reduced by 1% DTT for 15 min and then alkylated by 2.5% w/v iodoacetamide for 15 min. The SDS-PAGE was carried out on 12.5% w/v of acrylamide-bisacrylamide (37.5/1) gels. Proteins were separated by applying 1.5 W *per gel* for 20 min, and then 2 W *per gel* until the migration front reached the end of the gel. After migration and fixing of proteins in the gel, images were captured using a Typhoon Variable Mode Imager 9400 (GE Healthcare).

DeCyder v.6.05.11 software (GE Healthcare) was used to determine differentially expressed proteins with a variation factor of at least 1.3 in abundance (up and down) and a significant Student's *t*-test score ($p < 0.05$). The automated matching was manually confirmed for all the spots that were selected for identification, and that are further discussed. Spots were picked from the gel and digested by trypsin for 6 h at 37°C using an Ettan Dalt Spot Handling Workstation (GE Healthcare) before acquisition of peptide mass spectra with a MALDI-TOF-TOF analyser (4800 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.4 Protein identification

As the poplar genome is not yet completely annotated and many sequences were only available as ESTs, protein identification was mainly done using the EST database on an in-house MASCOT platform. The NCBI poplar EST database used in this study contains 419 944 poplar sequences and was downloaded from the NCBI database on 06/11/2009. MS and MS/MS data were also submitted for analysis with a viridiplantae protein database downloaded on 02/17/2009 and containing 1 214 000 sequences. All searches were carried out using a mass window of 100 ppm for the

precursor and 0.5 Da for the MS/MS fragments. Up to two trypsin miscleavages were accepted. The search parameters allowed for carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine as well as oxidation of tryptophan to kynurenine and double oxidation of tryptophan to *N*-formylkynurenine. During automatic interrogation of databases, the MASCOT score cut-off was 77 for NCBI and 65 for EST interrogations. Because all spectra and identifications were manually verified, peptide scores were considered even below the cut-off values for peptide scores. Identifications were validated manually with at least two identified peptides at disparate sites within a protein with a score above homology.

Percentage of sequence coverage is given in Tables 1 and 2. Since ESTs generally do not represent an entire protein sequence, the authors would like to remark that this value has little significance when identifications were done on EST sequences. Grouping of proteins in biological processes was done according to KEGG and Uniprot databases (<http://www.genome.jp/kegg>; <http://www.uniprot.org/>). The functions of some proteins were enlightened by the use of InterPro [32] (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), which consists in blasting the amino sequences to the integrated resources of several databases like PANTHER, PROSITE and Gene3D.

In leaf and cambial proteomes, respectively, in two and seven spots, more than one protein was identified; since this prevents any interpretation about the actual abundance of change in them, biological discussion was not done on these proteins. They are nonetheless presented at the end of Tables 1 and 2.

2.5 Statistics

Statistical analysis was carried out with four biological replicates. The variable used for comparison was the log₁₀ of standardized volume of protein spots in the gels. A Student's *t*-test analysis was carried out in the DeCyder software. The results based on the log₁₀ of standardized volume of protein spots in the gels were provided by the DeCyder software by Student's *t*-test analysis. A false discovery rate correction was applied in the software.

3 Results

3.1 Leaf proteome profiles

The 2-D electrophoretic leaf pattern presented 1023 spots (Fig 1). Among them, 120 spots exhibited a significant absolute variation greater than 1.3-fold between control and treated conditions ($p < 0.05$). The Cd treatment resulted in an increased abundance for 40 protein spots, and a decreased abundance for 80 protein spots. The MS analysis of these spots resulted in the confident identification of 103 proteins, of which two were a mix of at least two proteins (Table 1 and Supporting Information Table 1).

Table 1. Differentially expressed proteins in the leaf proteome of *P. tremula* × *P. alba* genotype 717-1B4 submitted during 61 days on a soil containing 360 mg Cd/kg DW ($n = 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Spot number ^{a)}	Leaf protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
Photosynthesis								
1464	RuBisCO large subunit [<i>Populus tomentosa</i>]	283		gil22001406	8	41	−4.3***	0.000013
1681	RuBisCO large subunit	250		gil52001641	4	29	−4.09*	0.039
677	RuBisCO large subunit	260		gil1223722	4	57	−3.99***	0.00083
1742	RuBisCO large subunit	283		gil9623109	4	32	−1.65*	0.039
1673	RuBisCO large subunit	291		gil30143303	6	29	−3.11**	0.003
1748	RuBisCO large subunit	305		gil60101630	5	25	−2.99**	0.0098
1750	RuBisCO large subunit	113		gil60101630	2	30	−6.02**	0.0025
1778	RuBisCO large subunit [<i>Malusherbia linearifolia</i>]	123		gil1771273	3	30	−2.91**	0.0032
1718	RuBisCO large subunit	207		gil1346967	3	36	−2.77*	0.019
1195	RuBisCO large subunit	313		gil57338574	6	40	−2.59*	0.014
1238	RuBisCO large subunit	466		gil60101630	7	36	−2.39*	0.022
694	RuBisCO large subunit	138		gil2149483	3	39	−2.36*	0.029
1686	RuBisCO large subunit	114		gil52001641	2	33	−2.12*	0.011
1737	riBulose 1,5-bisphosphate carboxylase	279		gil32442736	4	31	−3.41*	0.016
683	RuBisCO large subunit [<i>P. alba</i>]	172		gil110227087	4	50	−1.58*	0.042
593	RuBisCO large subunit [<i>P. alba</i>]	129		gil110227087	3	53	1.72***	0.00032
503	RuBisCO	147		gil47680208	3	32	4.02*	0.046
648	RuBisCO large subunit	300		gil30143315	7	42	2.03*	0.012
853	RuBisco activase precursor	137		gil3687676	2	40	−2.22**	0.01
1043	RuBisco activase B	447		gil7960277	6	39	−1.63*	0.025
939	RuBisco activase B	168		gil7960277	2	33	−2.2*	0.029
969	RuBisco activase, chloroplast precursor	202		gil10720249	2	39	−1.62*	0.022
1048	RuBisco activase 1	382 (+32)		gil12620881	6	36	−1.83**	0.0092
912	RuBisCO activase	459	gil52397711	gil94549022	6		−2.02*	0.037
1578	Chlorophyll a/b binding protein(Lhcb2) [<i>Cicer arietinum</i>]	219 (+70)		gil3928140	6	69	−10.26*	0.026
1602	Chlorophyll a/b binding protein(Lhcb2) [<i>C. arietinum</i>]	196 (+87)		gil3928140	7	71	−7.67***	0.00093
1609	Chlorophyll a/b binding protein (Lhcb2)	163		gil398599	4	18	−2.6**	0.0025
1584	Chlorophyll a/b binding protein (Lhcb2)	134 (+74)		gil398599	5	26	−2.08*	0.029
1608	LHCII type II chlorophyll a/b-binding protein [<i>V. radiata</i>]	160 (+16)		gil9587203	6	28	−4.09***	0.00083
1517	Light-harvesting complex II protein Lhcb1 [<i>Populus trichocarpa</i>]	229	gil52533657	gil224083006	5	65	−11.02**	0.0035
1663	Chlorophyll a/b-binding protein type III (Lhca3)	133 (+117)		gil7271947	3	26	−4.53**	0.00236
1658	Chlorophyll a/b-binding protein type III (Lhca3)	370	gil56824867	gil116519121	6	63	−6.11***	0.0000043

Table 1. Continued

Spot number ^{a)}	Leaf protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
1680	Chlorophyll-a/b binding protein Lhcb3	163	gil50059931	gil169124051	3	70	−3.77**	0.0017
1629	LHCB5 – chlorophyll binding	301		gil15235029	3	46	−2.69***	0.00067
1441	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor	392	gil38580986	gil30013657	6	51	−7.03***	0.00028
1439	Oxygen-evolving complex protein 1	250 (+60)		gil739292	3	53	−4.42**	0.0039
1471	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor	198		gil12644171	2	32	−4.81**	0.0012
1480	Oxygen-evolving enhancer protein 1	83 (+62)	gil27410837	gil223538464	4	54	−3.65***	0.0005
1456	OEE protein 1 precursor	203	gil57892741	gil119952178	4	59	−2.75**	0.0028
1692	OEE protein 2, chloroplast precursor	169		gil131390	3	30	−5.51***	0.00019
1653	PSBP-1 (OEE protein 2); calcium ion binding	280	gil55735291	gil223539254	6	49	−5.38***	0.000015
1672	OEE protein 2, chloroplast precursor	261	gil55734950	gil223539254	6	52	−4.15***	0.00067
1661	OEE protein 2, chloroplast precursor	215	gil55735137	gil131390	5	30	−3.73**	0.0025
1699	OEE protein 2, chloroplast precursor	227	gil24099140	gil223539254	5	62	−5.88***	0.00038
Carbon and carbohydrate metabolism								
1571	Triosephosphate isomerase, cytosolic	304	gil24060530	Gi: 136057	6	76	1.99**	0.0026
1566	Triosephosphate isomerase, cytosolic	180		gil136057	5	40	2.19**	0.0039
1120	Sedoheptulose biphosphatase	253	gil52530247	gil223530064	6	53	−2.48***	0.00015
1116	Sedoheptulose biphosphatase	292	gil52530247	gil118175929	6	59	−1.53*	0.03
284	Transketolase 1	256 (+68)		gil3559814	5	20	−1.61*	0.015
1127	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	185 (+157)		gil120671	7	32	1.91***	0.00027
1124	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	122	gil57892956	gil51703306	5	81	2.07***	0.000093
1051	3-Phosphoglycerate kinase [Populus tremuloides]	135		gil29124969	3	46	2.45*	0.023
1275	Phosphoglycerate kinase	112 (+16)		gil2499497	5	30	−1.75*	0.015
501	Glucose-6-phosphate isomerase [Solanum tuberosum]	80	gil52620161	gil167909863	4	60	2.22***	0.0059
597	UDP-glucose pyrophosphorylase [P. tremula × P. tremuloides]	226		gil32527831	4	37	1.49**	0.0015
553	Glycosyl hydrolase family 38 protein	106	gil56833433	gil186510450	3	34	1.92**	0.0099
1340	Ferredoxin-NADP oxidoreductase	314		gil170111	6	28	−1.81*	0.014
1059	Ferredoxin-NADP oxidoreductase	314 (+83)		gil170111	8	28	−1.67*	0.017
1365	Ferredoxin-NADP oxidoreductase	190		gil170111	3	30	−1.55*	0.04
1342	Ferredoxin-NADP oxidoreductase	257	gil52536292	gil4930123	6	58	−1.38*	0.015
1359	Putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	96	gil27415025	gil224102711	4	62	−1.5*	0.031
1332	Ferredoxin-NADP oxidoreductase	141		gil170111	6	28	2.01**	0.003
1338	Ferredoxin-NADP oxidoreductase	156 (+83)		gil119905	6	49	2.84***	0.00083

Table 1. Continued

Spot number ^{a)}	Leaf protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
884	AXS2 (UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose synthase 2)	182	gil27422474	gil13390863	4	54	2.38*	0.027
1551	Acid phosphatase [<i>Glycine max</i>]	90	gil55734561	gil3341443	3	54	1.78*	0.014
Energy metabolism								
1598	Carbonic anhydrase	318		gil1354515	6	63	–1.85*	0.014
1616	Carbonic anhydrase	570		gil1354517	6	53	–1.43*	0.035
1592	Carbonic anhydrase	249		gil1354515	4	40	–1.31*	0.049
1660	Carbonic anhydrase	118		gil1354515	2	47	2.21**	0.018
620	ATPase β subunit [<i>P. tomentosa</i>] – chloroplast	354		gil22094585	6	75	–4.19***	0.00085
632	ATPase β subunit [<i>P. tomentosa</i>] – chloroplast	295		gil22094585	5	75	–3.91***	0.000019
633	ATPase β subunit [<i>P. tomentosa</i>] – chloroplast	401 (+237)		gil22094585	7	80	–2.02**	0.0044
594	ATPase α subunit [<i>Didyma perrieri</i>] – mitochondrion	240		gil6561625	6	38	1.83*	0.015
599	ATPase α subunit [<i>D. perrieri</i>] – mitochondrion	137 (+71)		gil6561625	4	33	2.51*	0.011
Protein metabolism and catabolism								
1290	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor	162		gil3334196	2	36	–1.7*	0.028
548	d-3-Phosphoglycerate dehydrogenase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	72 (+22)	gil23995055	gil223542068	3	29	36.78*	0.025
435	FtsH protease 8 / ATPase/Zn dependant metalloproteinase	98		gil42561751	4	30	–1.51*	0.014
1678	PBD1 (PROTEASOME SUBUNIT PRGB); peptidase	146		gil15228805	2	20	–1.49*	0.028
Protein folding								
1518	Nascent polypeptide associated complex α chain [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	199	gil52502629	gil124484511	2	60	–3.72**	0.0081
1752	Nascent polypeptide associated complex α chain (<i>O. sativa</i>)	183		gil46575976	2	50	–5.45**	0.0024
1011	Heat shock protein 70	214		gil48716124	3	41	–1.59**	0.0064
357	Heat shock protein 70	535 (+81)		gil6911551	8	38	1.6*	0.014
1635	Chloroplast chaperonin 21 [<i>Vitis vinifera</i>]	188	gil52519679	gil50660327	5	37	–2.23*	0.016
427	Chaperonin, putative	81		gil15232923	3	37	2.44	0.027
Citrate Cycle								
1200	NAD-dependent malate dehydrogenase	87 (+57)		gil15982948	2	37	–1.84***	0.00037
1316	Malate dehydrogenase, putative [<i>R. communis</i>]	79	gil52536153	gil223538636	3	35	–1.75**	0.0038

Table 1. Continued

Spot number ^{a)}	Leaf protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
902	Citrate (si)-synthase [<i>P. trichocarpa</i>]	177	gil53783182	gil1648926	6	33	2.11**	0.0034
903	Citrate (si)-synthase [<i>P. trichocarpa</i>]	119		gil1648926	2	37	1.99**	0.0091
418	Succinate dehydrogenase	168		gil115470493	4	25	1.45*	0.046
Oxidoreductase								
936	GDP-mannose 3,5-epimerase/NAD binding	294		gil15241945	4	45	1.85**	0.0086
1202	Aldo/keto reductase family-like protein	121	gil60216418	gil23495741	5	63	–2.62**	0.0037
1061	Formate dehydrogenase	166 (+13)	gil38593943	gil224129102	5	51	2.08**	0.0043
1821	Peroxioredoxin type 2, putative	187	gil52505836	gil15231718	2	57	–2.09*	0.025
1637	1-cys peroxiredoxin [<i>Xerophyta viscosa</i>]	151		gil19423862	2	10	16.7***	0.000013
Glutathione metabolism								
1659	Glutathione S-transferase	417	gil55734403	gil161347485	7	48	2.11**	0.0071
1667	Glutathione S-transferase	196	gil24102869	gil161347485	4	55	2.12*	0.018
Miscellaneous								
1552	Class IV chitinase [<i>Galega orientalis</i>]	285	gil57894645	gil33414046	3	63	1.99*	
572	Inositol-3-phosphate synthase (Myo-inositol-1-phosphate synthase)	391		gil14548095	6	21	–1.99**	0.0082
1192	α -Tubulin [<i>Nicotiana tabacum</i>]	224 (+74)		gil11967906	6	38	–2.94*	0.04
1300	Potassium channel β subunit	143 (+27)		gil3402279	3	9	1.6**	0.0079
1756	Auxin-binding protein ABP19a precursor, putative [<i>R. communis</i>]	142	gil52530576	gil223539406	5	14	–2.56*	0.037
225	Translation elongation factor EF-G [G. max]	354 (+47)		gil402753	5	37	–1.64***	0.00046
Spots presenting more than one protein identification								
1736	Glutathione S-transferase + Germin-like	84		gil51556908		29	–3.41*	0.074
1801	Plastoquinol-plastocyanin reductase	71		gil4586598		25	–4.93**	0.0036

a) Spot number on the master gel.

b) Protein obtained by blasting the EST against the NCBI database.

c) MASCOT score (protein score as given by the GPS software (Applied Biosystems)).

d) Accession number of the EST sequence in the NCBI database.

e) Accession number of the corresponding protein in the NCBI database.

f) Average ratio of the protein abundance (Cadmium/Control). Positive values of ratio are given as such, negative values are given according to the following formula: given value =

–1/average ratio. The average ratio of the protein abundance was calculated between treated and control plants.

g) p-Value of Student's t test.

Table 2. Differentially expressed proteins in the cambial zone proteome of *P. tremula* × *P. alba* 717-1B4 genotype after 61 days on a soil containing 360 mg Cd/kg DW (*n* = 4)

Spot number ^{a)}	Cambial protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
Carbon and carbohydrate metabolism								
784	Enolase1 [<i>Zea mays</i>]	395	gil24075693	gil162458207	6	81	−1.39**	0.0013
798	Enolase1 [<i>Z. mays</i>]	249	gil24102975	gil162458207	4	61	−1.38**	0.0015
816	Enolase [<i>Brassica napus</i>]	142	gil24020181	gil34597332	4		−1.73***	0.00048
802	Enolase1 [<i>Z. mays</i>]	358		gil162458207	4	42	−1.74***	0.00022
800	Os06g0136600 [<i>O. sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)]	130		gil115466256	4	36	−2.1***	0.00035
759	Triosephosphate isomerase-like protein [<i>S. tuberosum</i>].	96	gil52505071	gil76573375	3	33	−1.59*	0.01
752	UDP-glucose pyrophosphorylase [<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>]	239		gil32527831	3	19	−1.52*	0.028
744	UDP-glucose dehydrogenase [<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>]	313		gil6164591	6	66	−1.58**	0.0015
809	UDP-glucose dehydrogenase [<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>]	132 (+61)	gil57892820		4	55	−1.43**	0.0011
792	UDP-glucose dehydrogenase	151 (+59)	gil27415980	gil6164591	4	82	−3.47**	0.0012
851	Phosphofructokinase family protein [<i>A. thaliana</i>]	82 (+37)	gil27411363	gil15238818	5	44	−2.04***	0.0002
526	2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	110	gil52493827	gil223540739	2	59	−1.82***	0.00036
288	α-d-xylosidase [<i>Tropaeolum majus</i>]	123	gil73928193	gil5725356	2	23	1.53*	0.012
1892	α-d-xylosidase precursor [<i>A. thaliana</i>]	111	gil28606907	gil4163997	3		1.51*	0.01
390	α-Mannosidase [<i>A. thaliana</i>]	113		gil10177664	3	10	1.77**	0.0015
433	α-Mannosidase [<i>A. thaliana</i>]	79		gil10177664	2	12	1.44**	0.0085
480	RHM1/ROL1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS1); UDP-glucose 4,6-dehydratase/catalytic [<i>A. thaliana</i>]	123		gil15218420	3	17	−1.4**	0.0029
481	RHM1/ROL1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS1); UDP-glucose 4,6-dehydratase/catalytic	106		gil15218420	3	19	1.64**	0.001
487	RHM1/ROL1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS1); UDP-glucose 4,6-dehydratase/catalytic	130		gil15218420	4	19	−1.8***	0.00013
1202	Fructokinase, putative [<i>R. communis</i>]	170	gil60697528	gil223526803	5	62	−1.9***	
1069	Alcohol dehydrogenase [<i>P. tremula</i>]	130		gil52851038	2	29	2.13***	0.00052
1070	Alcohol dehydrogenase [<i>P. tremula</i>]	220		gil52851054	5	74	1.62***	0.00071
Protein metabolism								
381	Methionine synthase [<i>S. tuberosum</i>]	146 (+96)		gil8439545	5	30	−2.58***	0.0009
385	Vitamin-b12 independent methionine synthase, [<i>P. trichocarpa</i>]	328	gil27414927	gil224104961	6	67	−1.98**	0.0011
383	Methionine synthase [<i>Z. mays</i>]	170		gil17017263	5	33	−1.99**	0.0022
391	Methionine synthase [<i>Carica papaya</i>]	138	gil24107875	gil151347486	3	66	−1.58**	0.0045
885	S-adenosylmethionine synthetase	98		gil15450421	4	24	−2.02***	0.0003
891		170	gil24065013	gil1346524	2	60	−1.83*	0.018

Table 2. Continued

Spot number ^{a)}	Cambial protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
	S-adenosylmethionine synthetase [<i>Phaseolus lunatus</i>]	100		gil30683070	3	34	−1.88***	0.000026
881	S-adenosylmethionine synthetase 1 [<i>A. thaliana</i>]	121		gil34099833	3	34	−1.38***	0.00075
11240	O-acetylserine (thiol) lyase [<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>]	167		gil162460698	3	32	−1.63*	0.039
1302	60S acidic ribosomal protein P0 [<i>Z. mays</i>]							
Protein catabolism								
896	26S proteasome ATPase subunit [<i>Pisum sativum</i>]	243		gil49175787	5	82	−1.82***	0.00016
1555	Proteasome subunit α type, putative [<i>R. communis</i>]	154	gil24076896	gil223529618	3	76	−1.49*	0.034
796	Leucine aminopeptidase, putative [<i>R. communis</i>]	140	gil73877305	gil223531128	2	62	−1.47**	0.0037
Protein folding								
537	Protein disulfide-isomerase precursor	387	gil24065613	gil111133775	5	63	−1.69*	0.012
541	Protein disulfide-isomerase precursor (PDI)	433	gil24065613	gil11133775	5	63	−1.99***	0.00056
1161	Protein disulfide isomerase, putative [<i>R. communis</i>]	101 (+18)	gil23994033	gil223545789	3	65	−1.71***	0.0015
715	Calreticulin-1 [<i>G. max</i>]	156	gil60214695	gil117165712	5	47	−1.88**	0.0045
Transcription and translation factors								
892	Elongation factor 1-γ [<i>G. max</i>]	116	gil24069167	gil18958499	2	20	−1.83***	0.00015
911	Elongation factor 1-γ [<i>G. max</i>]	103		gil18958499	2	20	−1.55*	0.012
332	Elongation factor 1-γ [<i>O. sativa</i> Japonica Group]	114	gil24103246	gil169244489	3	60	1.65	0.073
877	DEAD box RNA helicase [<i>P. sativum</i>]	105		gil25809054	3	33	1.45**	0.0023
920	Eukaryotic initiation factor 4A [<i>O. sativa</i> (j. cultivar-group)]	156 (+51)		gil303844	3	53	−1.85*	0.01
1830	RNA-binding glycine-rich protein-1a [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	118	gil52512794	gil469070	2	52	−1.62*	0.037
1836	Glycine-rich RNA-binding protein [<i>Euphorbia esula</i>]	126 (+26)	gil56819713	gil2674201	2	48	6.41**	0.0021
1838	Glycine-rich RNA-binding protein [<i>E. esula</i>]	137	gil24008735	gil2674201	4	50	−1.89**	0.0095
Cytoskeleton and cell wall								
772	α-Tubulin 1 [<i>Pseudotsuga menziesii</i> var. <i>menziesii</i>]	341		gil56481443	6	71	−1.49**	0.0045
773	α-Tubulin [<i>Trifolium repens</i>]	366		gil37789885	6	71	−1.53**	0.0042

Table 2. Continued

Spot number ^{a)}	Cambial protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
782	α -Tubulin 1 [<i>P. tremuloides</i>]	342		gil29124983	5	52	–1.71***	0.0009
708	β -6 tubulin [<i>Z. mays</i>]	451		gil162459800	8	67	–1.77***	0.00051
695	β -6 tubulin [<i>Z. mays</i>]	370		gil162462765	7	59	–1.68***	0.0017
702	Tubulin β -5 chain (β -5-tubulin)	456		gil8928427	7	58	–1.5***	0.0026
710	Tubulin β -5 chain (β -5-tubulin)	383		gil8928427	7	59	–1.62***	0.0036
1319	Phenylcoumaran benzylic ether reductase [<i>P. trichocarpa</i>]	603	gil33453463	gil3114901	7	84	–1.57***	0.0046
1323	Phenylcoumaran benzylic ether reductase [<i>P. trichocarpa</i>]	122	gil33453463	gil224066197	5	65	–1.62*	0.03
1340	Phenylcoumaran benzylic ether reductase [<i>P. trichocarpa</i>]	415	gil33453463	gil224066197	5	56	–1.67*	0.012
1168	Reversibly glycosylated polypeptide	112 (+38)	gil23978092	gil2317729	2	11	–2.72***	0.00046
1187	Reversibly glycosylated polypeptide-1	170	gil57894464	gil2317729	2	76	–3.93***	0.00017
1317	Leucine rich repeat protein [<i>P. tremula</i>]	134 (+26)	gil33451847	gil190897438	4	52	–1.6***	0.00065
977	Actin [<i>Stevia rebaudiana</i>]	133		gil23955912	3	58	2.15***	0.00048
990	Actin [<i>Gossypium hirsutum</i>]	650		gil32186906	8	77	–1.54**	0.0024
1057	Putative PRP [<i>O. sativa</i> Japonica Group]	193	gil38594177	gil14209541	2	16	–2.13*	0.027
926	Putative PRP [<i>O. sativa</i> Japonica Group]	83 (+46)	gil38594177	gil14209541	3	22	2.08***	0.0094
1324	Cinnamoyl-CoA reductase [<i>Jatropha curcas</i>]	247	gil73869335	gil239909311	5	27	–1.46*	0.02
Stress response - defense								
1179	Cupin family protein	140	gil24106291	gil15226926	6	30	–1.54***	0.00016
Citrate cycle								
1268	NAD-dependent malate dehydrogenase [<i>Prunus persica</i>]	157	gil52521122	gil15982948	4	33	–1.41**	0.0037
1290	Malate dehydrogenase precursor [<i>Medicago sativa</i>]	132	gil24062191	gil2827080	3	54	–1.58*	0.036
1336	Malate dehydrogenase [<i>G. max</i>]	133	gil73871484	gil5929964	5	47	–1.61**	0.0062
Oxidoreductase								
1137	Peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	147	gil57894628	gil14031049	4	42	2.93*	0.015
Glutathione metabolism								
1657	Glutathione-S-transferase θ , gst, putative [<i>R. communis</i>]	120	gil24100781	gil223551315	3	57	1.66*	0.027
908	6-Phosphogluconate dehydrogenase, putative [<i>R. communis</i>]	146 (+32)	gil50069101	gil223529624	4	70	–1.54***	0.00033
909	6-Phosphogluconate dehydrogenase family protein	149 (+39)	gil50069101	gil223529624	3	70	–1.51**	0.0012
Lipid metabolism								
1059	Acetylcholinesterase [<i>Macroptilium atropurpureum</i>]	128	gil24064109	gil168274274	6	38	1.46***	0.0029
1064	Acetylcholinesterase [<i>Macroptilium atropurpureum</i>]	212	gil24064109	gil168274274	5	38	1.59***	0.00077

Table 2. Continued

Spot number ^{a)}	Cambial protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
1066	Acetylcholinesterase [<i>M. atropurpureum</i>]	323	gil24064109	gil188274274	5	39	1.89***	0.00019
572	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein [<i>A. thaliana</i>]	227	gil38594604	gil15242458	2	33	–1.73*	0.023
576	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein [<i>A. thaliana</i>]	218	gil23976058	gil21553940	3	42	–1.63***	0.0042
DAP								
1140	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	92	gil38572690	gil18412482	2	17	–1.66***	0.00027
913	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	228	gil33184151	gil15232503	5	30	–1.46**	0.0037
996	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	191	gil33450735	gil15232503	5	48	–1.64*	0.01
1157	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	93	gil38572403	gil15238250	2	25	–1.34*	0.016
1146	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	201	gil23994041	gil15238250	3	44	2.15***	0.00015
398	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	148	gil33453642	gil15232503	5	52	5.05*	0.041
1488	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	78 (+19)	gil52514491	gil15232503	4	27	2.59*	0.026
1495	Aspartyl protease family protein [<i>A. thaliana</i>]	120	gil27421141	gil15232503	4	24	2.94***	0.00063
1106	41 kD chloroplast nucleoid DNA binding protein (CND41)	133	gil23994041	gil24430421	3	31	1.58***	0.00021
1115	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	153	gil38572403	gil110740049	2	30	1.78***	0.00033
1206	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein [<i>A. thaliana</i>]	171	gil38572403	gil110740049	3	26	1.67*	0.012
1142	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	226	gil23989413	gil8979711	2	75	2.13***	0.00029
1148	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	113 (+71)	gil38572403	gil110740049	4	30	1.85***	0.0076
1149	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	170	gil38572403	gil110740049	2	30	2.09***	0.0048
1169	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	202	gil23989413	gil8979711	2	59	2.01**	0.0058
1177	Nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	163	gil38572403	gil110740049	3	26	1.7*	0.04
Nucleotides metabolism								
1129	Putative adenosine kinase [<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>]	66 (+54)		gil41350585	3	55	–1.34**	0.0071

Table 2. Continued

Spot number ^{a)}	Cambial protein identifications ^{b)}	Protein score ^{c)}	Accession number		No. of peptides	Sequence coverage (%)	Cd/Ctr	
			EST ^{d)}	NCBI ^{e)}			Ratio ^{f)}	p Value ^{g)}
1135	Putative adenosine kinase [<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>]	129		gil41350585	3	56	−1.41**	0.0023
Miscellaneous								
1375	Putative β-subunit of K ⁺ channels [<i>S. tuberosum</i>]	180 (+32)	gil57892112	gil223542738	4	51	−1.69**	0.0014
1376	Potassium channel β, putative [<i>R. communis</i>].	118 (+14)	gil57892112	gil223542738	3	51	−1.78**	0.0012
1492	Phi-1 [N. tabacum]	120 (+36)	gil18014334	gil3759184	3	59	1.99*	0.035
491	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (V-ATPase subunit A)	306		gil137460	6	55	−1.8***	0.00022
519	Vacuolar proton pump subunit α	220	gil56834889	gil137460	6	61	−1.48**	0.0028
1411	Predicted protein [<i>P. trichocarpa</i>]	150	gil90190382	gil224144967	3	43	−1.64*	0.012
Spots presenting more than one protein identification								
880	Eukaryotic initiation factor 4A ⁺ predicted protein	115		gil303844			2.69***	0.00077
1112	Aspartyl protease family protein + acid α galactosidase 1	116	gil23989413	gil8979711			2.58***	0.000013
1122	Glutamine synthetase + Unidentified	116		gil37956277			−1.43**	0.0067
1118	Alcohol dehydrogenase [<i>P. tremula</i>] + Aspartic proteinase nepenthesin-2 precursor, putative	82		gil52851028			2.64**	0.003
1236	Aspartyl protease family protein + glycosylated protein	88	gil38572690	gil15238250			−1.89**	0.0012
785	Adenosylhomocysteinase + Enolase + 20S proteasome subunit α-1	98	gil60206618				−2.51**	0.0023
796	Glutamate decarboxylase + leucine aminopeptidase, putative	80 (+67)	gil38581604	gil21536919			−1.47**	0.0037

a) Spot number on the master gel.

b) Protein obtained by blasting the EST against the NCBI database.

c) MASCOT score (protein score as given by the GPS software (Applied Biosystems)).

d) Accession number of the EST sequence in the NCBI database.

e) Accession number of the corresponding protein in the NCBI database.

f) Average ratio of the protein abundance (Cadmium/control). Positive values of ratio are given as such, negative values are given according to the following formula: given value = −1/average ratio. The average ratio of the protein abundance was calculated between treated and control plants.

g) p-Value of Student's t-test.



Figure 1. 2-D electrophoresis gel with leaf proteins of *P. tremula* × *P. alba* genotype 717-1B4 labeled by CyDye 2. Identified proteins are indicated with their respective spot numbers.

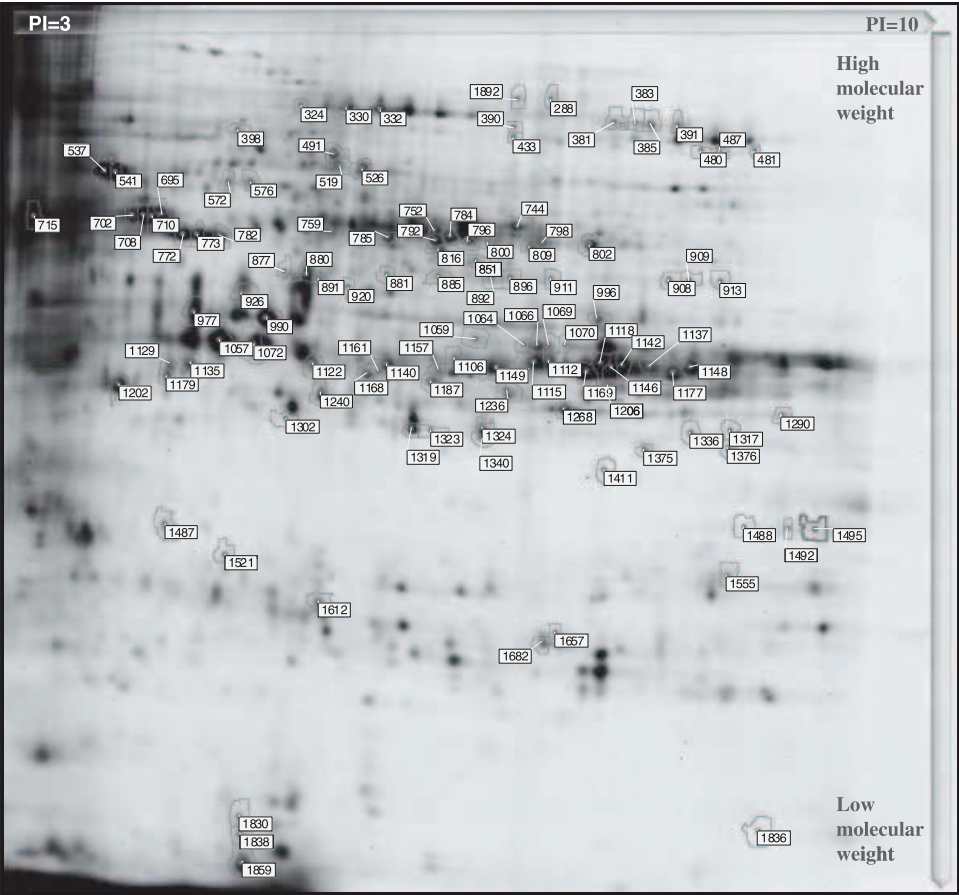


Figure 2. 2-D electrophoresis gel with cambial proteins of *P. tremula* × *P. alba* genotype 717-1B4 labeled by CyDye 2. Identified proteins are indicated with their respective spot numbers.

Briefly, the significant changes in protein abundance occurred in the following functions (Table 4): photosynthesis (44 protein spots), carbon and carbohydrate metabolism (21), energy metabolism (9), proteins metabolism, catabolism and folding (9), citrate cycle (5), oxidoreduction (6) and glutathione metabolism (2). Other functions that were influenced include an inositol-3-phosphate synthase (spot

572), a potassium channel β subunit (spot 1300), an auxin-binding protein ABP19a precursor (spot 1756), an α -tubulin (spot 1192) and a translation elongation factor (spot 225).

When the same protein was identified in several spots, as is for instance the case for Ferredoxin-NADP oxidoreductase in spot 1340, 1332, 1342, 1338, 1365 and 1359, the MS spectra were compared in order to find posttranslational regulatory events. For none of the proteins for which this comparison was done supplementary information was obtained.

Table 3. Effect of 61 days of exposure to 360 mg Cd/kg SDW on different physiological parameters of *P. tremula* $\times$ *P. alba*, genotype 717-1B4

Physiological parameter	Effect of Cd treatment
Stem height	–64%
Radial growth	–95%
CO ₂ assimilation	–94%
Stomatal conductance	–56%
Cd ²⁺ content in leaves	84.0 mg/kg
Cd ²⁺ content in cambial zone	123 mg/kg
Zn ²⁺ content in leaves	+127%
Mg ²⁺ content in leaves	+91%
Ca ²⁺ in leaves	+49%
K ⁺ content in leaves	+132%
K ⁺ content in cutting	–48%

3.2 Cambium proteome profiles

The 2-D electrophoretic cambium pattern presented 1144 spots (Fig. 2). Among them, 153 exhibited a significant absolute variation greater than 1.3-fold between control and treated conditions ($p < 0.05$). Compared with control conditions, the Cd treatment resulted in the increased intensity of 47 proteins spots, while 106 spots were less intense. The MS analysis of the differential spots resulted in the confident identification of the proteins in 108 spots among which seven presented a co-migration of more than one protein (Table 2 and Supporting Information Table 2). The remaining 30% of the selected spots are still unidentified

Table 4. Summary of the principle proteome changes in the leaf and in the cambial zone of *P. tremula* $\times$ *P. alba*, genotype 717-1B4 exposed 61 days to 360 mg Cd kg^{–1}SDW

Metabolic functions	Leaf	Cambial zone
Photosynthesis	3↑ (593, 503, 648) 41↓ (e.g. 1464, 1043)	0 0
Carbon and carbohydrate metabolism	12↑ (e.g. 501, 1127, 1571) 9↓ (e.g. 284, 1120, 1200)	7↑ (e.g. 288, 1892, 390, 481, 1070) 15↓ (e.g. 480, 802, 851)
Energy metabolism	3↑ (1660, 594, 599) 6↓ (620, 632, 633, 1598, 1616, 1592)	0 0
Protein metabolism	1↑ (548) 1↓ (1290)	0 8↓ (e.g. 381, 885, 1302, 1240)
Protein catabolism	0 2↓ (1678, 435)	0 3↓ (796, 896, 1555)
Protein folding	1↑ (357) 4↓ (1011, 1635, 1518, 1752)	0 4↓ (537, 541, 715, 1161)
Transcription and translation factors	0 1↓ (225)	2↑ (1836, 877) 6↓ (332, 920, 892, 911, 1830, 1838)
Cytoskeleton and cell wall	0 1↓ (1192)	2↑ (926, 977) 16↓ (e.g. 772, 1168, 990)
Stress response – defense	1↑ (1552) 0	0 1↓ (1179)
Citrate cycle	3↑ (418, 902, 903) 2↓ (1200, 1316)	0 3↓ (1268, 1290, 1336)
Oxidoreduction	3↑ (1061, 936, 1637) 2↓ (1202, 1821)	1↑ (1137) 0
Glutathione metabolism	2↑ (1659, 1667) 0	2↑ (1657, 1744) 2↓ (908, 909)
Lipid metabolism	0 0	3↑ (1064, 1066, 1059) 2↓ (572, 576)
DNA-binding aspartyl peptidase	0 0	4↑ (1140, 913, 996, 1157) 12↓ (e.g. 1146, 1106, 1169)
Nucleotide metabolism	0 0	0 2↓ (1129, 1135)

because of the weak intensity of the spectra resulting from faintly stained spots. Furthermore, few ESTs corresponding to cambial tissue are available.

Among the cambial proteins, eight spots were identified as “aspartyl protease family protein” (spot numbers 398, 913, 996, 1140, 1146, 1157, 1488 and 1495) and eight others as “nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein” (spots 1106, 1115, 1142, 1148, 1149, 1169, 1177 and 1206). As these two groups of proteins exhibited common MS/MS peptides, like “TYTIVFDGAKER” or “ITASDYIVNV-GIGTPKK”, an InterProscan interrogation was realised. Both of them designated proteins that possess a chloroplast nucleoid DNA-binding domain as well as an aspartyl peptidase domain. Therefore, they were gathered in Tables 2 and 4 under the label “DNA-binding aspartyl peptidase” (DAP).

Briefly, the significant changes in protein abundance induced by Cd treatment occurred in the following functions (Table 4): carbon and carbohydrate metabolisms (22), cytoskeleton and cell wall (18), DNA binding peptidase (16), protein metabolism and catabolism (10) and protein folding (6), transcription and translation factors (8), antioxidation and stress-related functions (6), lipid metabolism (5), the citrate cycle (3), and others functions among which a cupin family protein (spot 1179), two β subunits of K^+ channels (spots 1375 and 1376) and two putative adenosine kinase (spots 1129 and 1135) were down-regulated in Cd-treated poplars whereas a Phi-1 (spot 1492), an eukaryotic initiation factor 4A (spot 880) and a DEAD box RNA helicase (spot 877) were up-regulated in Cd-treated poplars.

4 Discussion

Young *P. tremula* $\times$ *P. alba* 717-1B4 genotype plants were exposed to 360 mg Cd/kg SDW; this resulted in a soil solution concentration of 20.8 μ M Cd^{2+} . An in-soil experiment permitted to follow the dynamic ion partition between soil and plant, which may be a determining factor in the response of the plant [33, 34]. The study aimed at analyzing tissues that have grown and developed under metal constraints. This allowed to focus on distal equilibrium rather than on the alarm phase of stress. Thus, control and stressed plants were compared after 61 days of Cd exposure.

The Cd treatment resulted in a Cd accumulation in the leaves (84 mg Cd/kg) and in the cambial zone (123 mg Cd/kg). The treatment drastically reduced the growth of the plants. Net photosynthesis and stomatal conductance were inhibited. Increases in the content of K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} in tissues, especially in leaves, were observed. These results are summarized in the Table 3 (adapted from [29]). The physiological data demonstrate that Cd^{2+} triggered an acute stress in poplar plants from which ensues important changes in leaf and cambial proteome (Figs. 1 and 2).

4.1 Leaf proteome response to Cd

The proteomic data gave two levels of information that can hardly be distinguished. Some changes occurred as a consequence of the stress endured, while others constitute the concrete and active response of the plant defense system. The impact factor (IF) on protein abundance was calculated as the ratio of the volume of protein spots between treated and control conditions.

In leaf and cambial tissues the Cd stress mainly affected the carbon metabolism. In the leaf, negative IF was salient on the carbon fixation, especially on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) and RuBisCO activase. Other proteins involved in the Calvin Cycle were also affected (spots 284, 1116, 1120, 1124, 1127, 1566 and 1571). Additionally three out of four spots wherein carbonic anhydrase was identified decreased in intensity in Cd-treated plants (spots 1592, 1598, 1616 and 1660).

These data are consistent with our previous results, which describe the inhibition of CO_2 assimilation under Cd stress, which was mainly unrelated to stomatal closure [29]. The literature diversely reports on the stomatal response to Cd stress, although stomatal closure is often regarded as a typical response [35–37]. Shi and Cai [38] observed a Cd-induced xerophytes-like leaf morphology with more frequent but smaller stomata, accompanied by a reduced stomatal conductance in peanut (*Arachis hypogaea*). On the contrary Zhu *et al.* [39] reported that Cd-exposed *Brassica juncea* showed fewer although larger stomata. In both cases, the reduced stomatal aperture only partly explained the decreased photosynthetic activity.

Whatever the stomatal response, the Cd toxicity mostly arises through other processes than gas exchange. In this study, the strongest negative influence of Cd on spot intensity was observed for photosynthesis-related proteins. This reduced intensity was particularly observed for proteins implied in the electron transport: chlorophyll a/b binding proteins (ten spots down-regulated, with IF from -2.08 , spot 1584, to -11.02 , spot 1517, Table 1), oxygen evolving enhancer (five OEE1 spots and five OEE2 spots, *i.e.* 33 and 23 kDa subunits, respectively, all down-regulated, with IF from -2.75 , spot 1456, to -7.03 , spot 1441) and ferredoxin-NADP oxidoreductase (five spots down-regulated, *e.g.* spot 1340, two other up-regulated, *e.g.* spot 1338). The decrease of the photosynthetic activity, inferred from the diminished CO_2 assimilation (Table 3), is further suggested by the drop in abundance of a FtsH protease 8, which contributes to the turnover of the Photosystem II D1 protein [40]. These results incline to show a major impact on proteins of the Photosystem II, which is contradictory with a recent study on spinach where Photosystem I was described as more sensitive to Cd^{2+} [4]. Among the five ATPase spots differentially expressed, three were down-regulated (spots 620, 632 and 633), all of them chloroplastic ATPase. The two up-regulated ATPase are localized in the mitochondrion, according to the databases (spots 594 and 599). This

suggests that photosynthetic processes are inhibited by Cd stress, while respiration, on the contrary, is promoted. Supporting the latter, the increase in quantity of a succinate dehydrogenase spot was recorded (spot 418). This enzyme takes part in the mitochondrial respiratory chain. Changes in the abundance of TCA cycle enzymes, increased accumulation of citrate synthase (spots 902 and 903) and decreased abundance of malate dehydrogenase (spots 1200 and 1316) do not result in a consensus on how the respiration is affected during Cd stress but confirm that there is an effect. Consistent with an increased respiration concomitant to a suppressed photosynthesis, an induction of glycolysis-involved enzymes was observed: uridine diphosphate (UDP)-glucose pyrophosphorylase (spot 597), glycosyl hydrolase family 38 protein (spot 553), 3-phosphoglycerate kinase (spot 1051). Such a relation between suppressed photosynthesis and stimulated respiration from glucose catabolism in leaves was previously reported under Cd stress [41], ozone stress [42], drought and heat stress [43].

Besides the inhibition of the carbon and carbohydrate metabolism, the analysis of the leaf proteome gives clues of an inhibited protein metabolism. The proteome change patterns suggest reduced protein synthesis (aminomethyl-transferase, spot 1290, and translation elongation factor EF-G, spot 225, inhibited), reduced protein transport (2 nascent polypeptide associated complex α chain inhibited, spots 1518 and 1752) and reduced protein degradation (proteasome subunit PRGB inhibited, spot 1678). Modifications of protein processes are often a way to avoid damage or to ensure replacement of damaged molecules. Nevertheless, in this case, the observed changes rather resulted from supply shortage due to a reduced primary metabolism in a leaf tissue whose growth was heavily inhibited. Interestingly, the strongest IF in the leaf proteome was that of a phosphoglycerate dehydrogenase (+36.7, spot 548). This enzyme, involved in the synthesis of several amino acids like glycine, serine or threonine, might also play a role in the glutathione production.

Changes in the glutathione metabolism are widely reported to be part of most plant response to Cd [16, 44–46]. Direct measurement of this metabolism was not performed, but indirect hints may nonetheless be considered. Two glutathione-S-transferase were up-regulated (spots 1659 and 1667), as was a formate dehydrogenase (spot 1061); its role is the production of reducing power (NADH). A GDP-mannose 3,5-epimerase/NAD binding protein (spot 936), implied in the ascorbate synthesis, was up-regulated. Ascorbate and glutathione are coordinated in the cell by the Halliwell–Asada Cycle. Interestingly, the strongly induced (IF +16.7, spot 1637) 1-cys peroxiredoxin is a bifunctional enzyme with phospholipase A2 and glutathione peroxidase activities [47]. This denotes, as expected, an impact of Cd on the redox status of the cell, as confirmed by the abundance of changes in a type 2 peroxiredoxin (IF –2.09, spot 1821). This impact could explain the changes of protein folding-involved HSP 70 (IF –1.59, spot 1011 and +1.6, spot 357)

and chloroplast chaperonin 21 (IF –2.23, spot 1635). This could also indicate an impact of Cd on the integrity of membranes, since one inositol-3-phosphate synthase (IF –1.99, spot 572) is negatively affected. These changes, as well as the decrease of an α -tubulin (IF –2.94, spot 1192) might also be connected to the leaf growth inhibition in spite of a sampling realized on fully expanded leaves. Indeed, the Cd-treated sampled leaves presented a significantly smaller size than control.

A stimulated potassium channel β subunit (IF +1.6, spot 1300) converged with previous results showing a significant alteration of potassium homeostasis under Cd stress [29]. The $[K^+]_{\text{leaves}}$ increased 2.3-fold compared with control plants (Table 3). In the cambial zone, on the contrary, two β subunits of K^+ channels decreased in quantity, linked to the 48% reduced $[K^+]_{\text{cutting}}$. Only few reports on the regulation of mineral homeostasis under Cd stress are available in the literature. A recently published paper indicated no change in K^+ and Mg^{2+} content in leaves of Cd-tolerant mungbean (*Vigna radiata*) under Cd exposure [48]. To our knowledge neither the mobilization of K^+ in leaves in response to Cd nor the implication of a potassium channel were reported so far.

It is not surprising that Cd disturbs metal homeostasis, even if proteomic data give little indication of it. For instance the twofold increase of $[Mg^{2+}]_{\text{leaves}}$ (Table 3) can be linked to the instability of photosynthesis proteins like the RuBisCo activase that often have Mg^{2+} as cofactor. The increased $[Mg^{2+}]$ could be needed to compete with the toxic Cd^{2+} in order to reduce proteins misfolding and inactivation.

The comparison of these results with those from a previous hydroponic poplar exposure to Cd [16, 17] exhibits some common traits that were underlined above, but also some differences. Hydroponic and soil conditions partly affect plant physiology in differential ways, notably metal bioavailability. This could account for a part of these differences in the proteomic response.

For instance, a chitinase (spot 1552) was the sole identified pathogenesis-related protein affected by Cd in leaves in this study, whereas this type of proteins was shown to accumulate, especially on the long term (day 56), in Kieffer's articles [16, 17]. Cd-responsive proteins implied in oxidoreduction were more numerous in leaf than in cambial zone, with an overall negative impact of the stress. When comparing with exposure to Cd in a hydroponic system, it appears that these protein functions are more responsive on a shorter time scale (7–14 days) than on 56 days.

4.2 Cambial proteome response to Cd

As in leaf, the carbon metabolism is the principal biological process altered in cambial proteome in response to Cd. The differentially expressed proteins are partly corresponding to the same functions as in leaf (e.g. three malate dehydrogenase spots 1268, 1290 and 1336; one triosephosphate isomerase, spot 759, and one UDP-glucose pyropho-

sphorylase, spot 752; all of them were inhibited in the cambial zone). In addition to these proteins, the overall changes linked with carbohydrate metabolism indicate an impact on glycolysis and glycogenesis. Five spots of enolase were down-regulated (e.g. spots 784, 798, 800, 802 and 816). Three spots of UDP-glucose dehydrogenase (spots 744, 752 and 809), one phosphofructokinase family protein (spot 851), one 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (spot 526) and one fructokinase (spot 1202) decreased, whereas two alcohol dehydrogenase (spots 1069 and 1070) increased in quantity. Two spots of α -D-xylosidase (spots 288 and 1892) were more intensively stained. This enzyme is reported to be analogous to α -glucosidase [49]. Hence, the overall carbohydrate metabolism was reduced.

In cambial zone as in the leaf, the great disturbance in the carbohydrate metabolism is obviously a distal consequence of Cd stress. A previous work on poplar response to Cd showed changes in sugar content [17]. Such changes, beyond stress symptomatology, probably take part in the sensing and signaling of the constraint [50] even if the alarm phase is very likely to have ceased before day 61. Most sugars are known to improve osmoprotection during stress; this is a role they could also play in the metal stress [51].

The protein metabolism is the second biological process influenced by Cd stress in the cambial zone. Protein synthesis was reduced, as attested by the decreased abundance of four spots containing methionine synthase (spots 381, 383, 385 and 391), three spots containing S-adenosylmethionine synthetase (spots 881, 885 and 891), an O-acetylserine (thiol)lyase (spot 1240) and a 60S acidic ribosomal protein P0 (spot 1302). There was also one differentially displayed spot of eukaryotic initiation factor 4A (spot 902), and three others of elongation factor 1- γ (spots 332, 892 and 911). One calreticulin-1 (spot 715) and three protein disulfide-isomerase precursors (spots 537, 541, and 1161) related to protein folding exhibited a reduced abundance. Proteolysis was also affected, with the decreased abundance of two proteasome subunits (spots 896 and 1555) and of a Zn-dependent leucine aminopeptidase (spot 796) and also two more abundant α -mannosidase (spots 390 and 433) involved in the vacuolar degradation of glycoproteins. So protein metabolism, folding and catabolism appear to be impaired by Cd treatment.

Cd stress also induced changes in proteins involved in cell structure and cell wall, thus related to the growth function of the meristem. Two spots of rhamnose biosynthesis 1 (spots 480 and 487) were less abundant; one was more abundant (spot 481); this enzyme participates to the production of rhamnose, an important constituent of the cell wall [52]. Also in relation with cell wall synthesis, three spots of phenylcoumaran benzylic ether reductase dropped in intensity (spots 1319, 1323 and 1340). This enzyme is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells of poplar [53]. One cinnamoyl-CoA reductase (spot 1324), involved in the synthesis of lignin and a leucine-

rich repeat protein (spot 1317) also implied in cell wall synthesis [54] decreased in amount. Two spots of reversibly glycosylated polypeptides (spots 1168 and 1187) dropped in intensity; these proteins, supposed to be plasmodesmata-associated [55], are linked to cell elongation and related to cell wall formation, even if their precise role in the cell remains unsolved [56]. Consistent with an inhibition of growth, two spots containing adenosine kinase (spots 1129 and 1135) implied in nucleic acid synthesis exhibited lower content.

According to Garnier *et al.* [57], Cd cytotoxicity arises notably through three waves of oxidative stress in tobacco cells. In the present study, in cambial tissue as it was the case in leaves, the redox balance appears to be disturbed. A class III peroxidase (spot 1137) was more abundant. Two 6-phosphogluconate dehydrogenase family proteins (spots 908 and 909), involved in the glutathione metabolism, decreased in amount, whereas a glutathione-S-transferase was more abundant (spot 1657). The lower accumulation of a glutamate decarboxylase (spot 796) was observed, but a putative leucine aminopeptidase was identified in the same spot, preventing any interpretation concerning this calmodulin-binding protein that produces γ -aminobutyric acid.

The suppression of cytoskeletal-linked proteins such as α and β chain tubulin (seven spots down-regulated, e.g. spot 772) or actin (spots 977 and 990) in Cd-exposed poplar confirms the main role of cambium as an actively growing tissue, and the different growth rates between control and exposed plants. Two spots of glycine-rich RNA-binding protein (spots 1836 and 1838) appeared differentially expressed. This protein family of post-transcriptional regulators has been showed playing a role in cold acclimation of *Arabidopsis* [58]. Cd induced antagonistic changes in two putative proline-rich protein (spots 926 and 1057). These cell wall structural proteins are reported to accumulate under water deficit in *Phaseolus vulgaris* cells [59]. When the respective EST sequences for these spots were used in BLAST analysis, the results indicated that they contain a "GDSL" motif close to the N-terminus. In addition two GDSL-motif lipase/hydrolase family protein spots decreased in amount (spots 572 and 576). These proteins could have a role in the degradation of complex polysaccharides [60, 61]. The GDSL family has been repeatedly reported to be implied in diverse stress responses [62].

The quantitatively most prominent information about cambial proteome response concerns plastidial DAP. Increased abundance in proteolytic enzymes has already been observed in studies on poplar leaves and roots under Cd exposure, but no influence on the abundance of DAP in this study under hydroponic condition was observed [16]. A total of 16 DAP spots showed a differential expression under Cd stress (e.g. spot 1140); 12 were up-regulated, with IF up to 5.05 (spot 398). Kato *et al.* [63] reported a link between nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein – which is a DAP – and the degradation of RuBisCO in tobacco leaves during senescence. However, no differences in the expres-

sion of DAP were observed in the leaves of poplar plants. Although some cambium cells express photosynthetic genes, including at least RuBisCO subunits [64], it seems unlikely that RuBisCO degradation plays such a major role in cambial response to Cd so as to involve about 20% of the identified proteome changes. Therefore, the precise role of these proteins remains intriguing.

Among the 159 Cd-affected proteins in the cambial zone, seven have Zn as cofactor (spots 796, 1069, 1070, 537, 541, 1161 and 715), and four others potentially bind Zn (1302, 1836, 1838 and 1179). All of them, except the two alcohol dehydrogenase and one of the two glycine-rich RNA-binding protein were reduced in quantity. In the leaf proteome seven out of 114 identified Cd-affected proteins need Zn for functioning (spots 435, 1548, 1563, 1592, 1598, 1616 and 1660). When compared with the counted 2367 Zn-related proteins of *A. thaliana* [65], out of 159 162 entries in database for this species (according to “porgn: txid3702” request on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), the present proportion of Zn-related proteins affected by Cd stress did not clearly suggest a particular and quantitative involvement of them in the response.

The proteomic changes described in this study, when compared with the literature, are implied in other constraints as part of a generic stress pattern and do not show any Cd- or even metal-stress specificity [31, 66–68]. This is not the case of the overexpression of DAP, which constitutes a putative Cd-specific response of cambial tissue

This study focused on young fully developed leaves, as it is probable that other leaf levels would exhibit nuances in their response profiles, for it is known that stress response depends on the age of the tissue [69], that Cd affects more strongly basal leaves of spinach [4] and that some plants achieve tolerance towards metals by preferential storage in organs, tissues, cells or organelles [13, 70]. Besides, we reported that lack of compartmentalization could be linked to *P. tremula* × *P. alba* sensitivity to Cd²⁺ [29].

4.3 Conclusions

In leaves containing 84 mg Cd/kg, the Cd toxicity principally impaired photosynthesis and primary metabolism. Consequently, primary growth was reduced. The resulting loss of photosynthates in all plant tissues, like cambium, partly accounts for the decreased activity of these tissues. So, cambial proteome changes resulted in part from a systemic toxicity, and in part from the 123 mg Cd/kg present inside the tissue. The proteomics data presented here showed contrasted responses to Cd between leaf and cambial zone.

It now seems important to explore whether the patterns of the proteome response of the different tissues persist whatever the constraint (*e.g.* under drought or heat stress). If so, the General Adaptation Syndrome description for plant under stress could be enriched with tissue-localized markers.

The authors are grateful to Thomas Udelhoven for his helpful expertise in statistics and to Vanessa Caruso for English correction. Thomas Durand was supported by a PhD fellowship of the Luxembourg Ministry of Culture, Higher Education and Research (BFR 05/094) and a National funds for Research grant (AFR).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Cui, Y., Zhu, Y. G., Zhai, R., Huang, Y. *et al.*, Exposure to metal mixtures and human health impacts in a contaminated area in Nanning, China. *Environ. Int.* 2005, **31**, 784–790.
- [2] Sanita di Toppi, L., Gabbriellini, R., Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 1999, **41**, 105–130.
- [3] Cosio, C., Vollenweider, P., Keller, C., Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 2006, **58**, 64–74.
- [4] Fagioni, M., D’Amici, G. M., Timperio, A. M., Zolla, L., Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J. Prot. Res.* 2009, **8**, 310–326.
- [5] Shute, T., Macfie, S. M., Cadmium and zinc accumulation in soybean: a threat to food safety? *Sci. Total Environ.* 2006, **371**, 63–73.
- [6] Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G. *et al.*, Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environ. Pollut.* 2007, **148**, 107–114.
- [7] Renaut, J., Bohler, S., Hausman, J.-F., Hoffmann, A. A. *et al.*, The impact of atmospheric composition on plants. A case study of ozone and poplar. *Mass Spectrom. Rev.* 2008, **28**, 495–516.
- [8] Caruso, A., Cheddor, F., Carpin, S., Depierreux, C. *et al.*, Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *J. Plant Physiol.* 2008, **165**, 932–941.
- [9] Robinson, B. H., Mills, T. M., Petit, D., Fung, L. E. *et al.*, Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant Soil* 2000, **227**, 301–306.
- [10] Hall, J. L., Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 2002, **53**, 1–11.
- [11] Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C. *et al.*, Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ. Exp. Bot.* 2007, **59**, 381–392.
- [12] Sarry, J.-E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A. *et al.*, The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 2006, **6**, 2190–2199.
- [13] Fagioni, M., Zolla, L., Does the different proteomic profile found in apical and basal leaves of spinach reveal a strategy

- of this plant toward cadmium pollution response? *J. Prot. Res.* 2009, **8**, 2519–2529.
- [14] Tuomainen, M. H., Nunan, N., Lehesranta, S. J., Tervahauta, A. I. *et al.*, Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* 2006, **6**, 3696–3706.
- [15] Ahsan, N., Renaut, J., Komatsu, S., Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* 2009, **9**, 2602–2621.
- [16] Kieffer, P., Schröder, P., Dommès, J., Hoffmann, L. *et al.*, Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. Proteomics* 2009, **72**, 379–396.
- [17] Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J. *et al.*, Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *J. Prot. Res.* 2009, **8**, 400–417.
- [18] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004, **9**, 244–251.
- [19] Wasternack, C., Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 2007, 681–697.
- [20] Trovato, M., Mattioli, R., Costantino, P., Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rend. Lincei Sci. Fis. Nat.* 2008, **19**, 325–346.
- [21] Foyer, C. H., Noctor, G., Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 2005, **28**, 1056–1071.
- [22] Selye, H., The General-Adaptation-Syndrome. *Ann. Rev. Med.* 1951, **2**, 327–342.
- [23] Leshem, Y. Y., Kuiper, P. J. C., Erdei, L., Lurie, S., Perl-Treves, R., Do Selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998, **851**, 199–208.
- [24] Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtílek, M., Šetlík, I., Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 2007, **175**, 655–674.
- [25] Celedon, P. A. F., de Andrade, A., Meireles, K. G. X., Costa da Cruz Gallo de Carvalho, M. *et al.*, Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. *Proteomics* 2007, **7**, 2258–2274.
- [26] Gion, J.-M., Lalanne, C., Le Provost, G., Ferry-Dumazet, H. *et al.*, The proteome of maritime pine wood forming tissue. *Proteomics* 2005, **5**, 3731–3751.
- [27] Lippert, D., Chowira, S., Ralph, S. G., Zhuang, J. *et al.*, Conifer defense against insects: proteome analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*). *Proteomics* 2007, **7**, 248–270.
- [28] Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Kohler, A. *et al.*, Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* 2006, **6**, 6509–6527.
- [29] Durand, T. C., Hausman, J.-F., Carpin, S., Albéric, P. *et al.*, Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus tremula* × *Populus alba*. *Biol. Plant* 2010, in press.
- [30] Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 1986, **7**, 52–54.
- [31] Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S. *et al.*, A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* 2007, **7**, 1584–1599.
- [32] Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A. *et al.*, InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res.* 2009, **37**, D211–D215.
- [33] Anderson, R. H., Basta, N. T., Application of ridge regression to quantify marginal effects of collinear soil properties on phytoaccumulation of arsenic, cadmium, lead, and zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009, **28**, 619–628.
- [34] Ruttens, A., Mench, M., Colpaert, J. V., Boisson, J. *et al.*, Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environ. Pollut.* 2006, **144**, 524–532.
- [35] Barcelo, J., Poschenrieder, C., Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 1990, **13**, 1–37.
- [36] Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H. *et al.*, Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol.* 2004, **45**, 1681–1693.
- [37] Clemens, S., Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 2006, **88**, 1707–1719.
- [38] Shi, G., Cai, Q., Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to cadmium stress. *Photosynthetica* 2008, **46**, 627–630.
- [39] Zhu, R., Macfie, S. M., Ding, Z., Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy. *J. Exp. Bot.* 2005, **56**, 2831–2838.
- [40] Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B. *et al.*, The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the Photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 2000, **12**, 419–432.
- [41] Kieffer, P., Dommès, J., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Renaut, J., Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 2008, **8**, 2514–2530.
- [42] He, X. Y., Fu, S. L., Chen, W., Zhao, T. H. *et al.*, Changes in effects of ozone exposure on growth, photosynthesis, and respiration of *Ginkgo biloba* in Shenyang urban area. *Photosynthetica* 2007, **45**, 555–561.
- [43] Mittler, R., Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 2006, **11**, 15–19.

- [44] Mendoza-Cozatl, D. G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J. W. *et al.*, Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J.* 2008, **54**, 249–259.
- [45] Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F. *et al.*, Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol. Plant.* 2007, **129**, 519–528.
- [46] Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., Edwards, R., Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998, **1**, 258–266.
- [47] Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., Fisher, A. B., 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 28421–28427.
- [48] Wahid, A., Ghani, A., Javed, F., Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. *Agron. Sustain. Dev.* 2008, **28**, 273–280.
- [49] Crombie, H., Chengappa, S., Jarman, C., Sidebottom, C. *et al.*, Molecular characterisation of a xyloglucan oligosaccharide-acting α -D-xylosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons that resembles plant “apoplastic” α -D-glucosidases. *Planta* 2002, **214**, 406–413.
- [50] Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006, **57**, 675–709.
- [51] Jouve, L., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. *Plant Biol.* 2004, **6**, 74–80.
- [52] Wang, J., Ji, Q., Jiang, L., Shen, S. *et al.*, Overexpression of a cytosol-localized rhamnose biosynthesis protein encoded by *Arabidopsis* RHM1 gene increases rhamnose content in cell wall. *Plant Phys. Biochem.* 2009, **47**, 86–93.
- [53] Mijnsbrugge, K. V., Meyermans, H., Van Montagu, M., Bauw, G. *et al.*, Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* 2000, **210**, 589–598.
- [54] Xu, S. L., Rahman, A., Baskin, T. I., Kieber, J. J., Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008, **20**, 3065–3079.
- [55] Sagi, G., Katz, A., Guenoune-Gelbart, D., Epel, B. L., Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the Golgi apparatus. *Plant Cell* 2005, **17**, 1788–1800.
- [56] De Pino, V., Boran, M., Norambuena, L., Gonzalez, M. *et al.*, Complex formation regulates the glycosylation of the reversibly glycosylated polypeptide. *Planta* 2007, **226**, 335–345.
- [57] Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J.-P. *et al.*, Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ.* 2006, **29**, 1956–1969.
- [58] Kim, Y.-O., Kim, J. S., Kang, H., Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2005, **42**, 890–900.
- [59] Battaglia, M., Solorzano, R., Hernandez, M., Cuellar-Ortiz, S. *et al.*, Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta* 2007, **225**, 1121–1133.
- [60] Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H. *et al.*, GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 2004, **43**, 534–552.
- [61] Dalrymple, B. P., Cybinski, D. H., Layton, I., McSweeney, C. S. *et al.*, Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology* 1997, **143**, 2605–2614.
- [62] Hong, J., Choi, H., Hwang, I., Kim, D. *et al.*, Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* 2008, **227**, 539–558.
- [63] Kato, Y., Yamamoto, Y., Murakami, S., Sato, F., Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* 2005, **222**, 643–651.
- [64] Goué, N., Lesage-Descauses, M.-C., Meller, E. J., Magel, E. *et al.*, Microgenomic analysis reveals cell type-specific gene expression patterns between ray and fusiform initials within the cambial meristem of *Populus*. *New Phytol.* 2008, **180**, 45–56.
- [65] Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. *et al.*, Zinc in plants. *New Phytol.* 2007, **173**, 677–702.
- [66] Xiao, X., Yang, F., Zhang, S., Korpelainen, H. *et al.*, Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiol. Plant.* 2009, **136**, 150–168.
- [67] Renaut, J., Lutts, S., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Responses of poplar to chilling temperatures : proteomic and physiological aspects. *Plant Biol.* 2004, **6**, 81–90.
- [68] Alvarez, S., Berla, B. M., Sheffield, J., Cahoon, R. E. *et al.*, Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics* 2009, **9**, 2419–2431.
- [69] Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., Response to abiotic stresses, in: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD 2000, p. 1158–1203.
- [70] Vollenweider, P., Cosio, C., Keller, C., Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): II. Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 2006, **58**, 64–74.

2.10. Cd and Zn are differentially distributed in *Populus tremula* x *P. alba* exposed to metal excess. Submitted to *Plant Biosystems*

Thomas C. Durand^{1,2,3,4}; Patrick Baillif⁵; Patrick Albéric⁵; Sabine Carpin^{1,2}; Philippe Label⁴; Jean-François Hausman³; Domenico Morabito^{1,2*}

¹ Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France.

² Institut National de la Recherche Agronomique,, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), 45067 Orléans, France.

³ CRP-Gabriel Lippmann. Department Environment and Agro-biotechnologies, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, GD, Luxembourg.

⁴ Institut National de la Recherche Agronomique, CS40001 Ardon, 2163 Avenue de la pomme de pin, 45075 Orléans CEDEX 2, France.

⁵ Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, UMR 6113 - CNRS/Université d'Orléans. 1A, rue de la Férollerie F-45071 Orléans Cedex 2, France.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: domenico.morabito@univ-orleans.fr

Email adress

Thomas C. Durand: thomas.durand@univ-orleans.fr

Patrick Baillif: patrick.baillif@univ-orleans.fr

Patrick Albéric: patrick.alberic@univ-orleans.fr

Sabine Carpin: sabine.carpin@univ-orleans.fr

Philippe Label: philippe.label@orleans.inra.fr

Jean-François Hausman: hausman@lippmann.lu

Domenico Morabito: domenico.morabito@univ-orleans.fr

Corresponding author

Domenico Morabito, Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France. Tel : 00 33 (0)2 38 41 72 35, Fax : 00 33 (0)2 38 49 40 89. Email adress:

domenico.morabito@univ-orleans.fr.

Abstract

Poplar plants were exposed during 61 days to a soil added with heavy metals so as to contain $300 \text{ mg Zn}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil dry weight (SDW) or $50 \text{ mg Cd}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{SDW}}$. The Cd treatment induced a delayed growth of poplar, whereas Zn induced no change in physiological parameters. Both treatments resulted in a significant metal accumulation in plants. Zn^{2+} and Cd^{2+} exhibited contrasting distribution within tissues, indicating dissimilar handling by the plant. The main difference was the efficient compartmentalization of Zn^{2+} in specific organ parts: old leaves and bark, while Cd^{2+} did not exhibit such a compartmentalization.

Résumé

Des plants de peuplier ont été exposés durant 61 jours à un sol contaminé de manière à contenir $300 \text{ mg Zn}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$ ou $50 \text{ mg Cd}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$. Le traitement par Cd cause un retard de croissance alors qu'aucun changement dans les paramètres physiologique n'est observé suite à l'exposition au Zn. Les deux traitements entraînent une accumulation significative de métal dans la plante. Les distributions de Zn^{2+} et Cd^{2+} dans les tissus de la plante sont divergentes, indiquant que la plante les gère de manières différentes. Le Zn^{2+} se retrouve compartimenté dans des organes spécifiques : les feuilles âgées et l'écorce. La plante ne compartimentalise pas le Cd^{2+} .

Introduction

Environmental constraints affect many aspects of plants metabolisms, impacting on their growth and yield. Abiotic factors causing plant stresses can be linked to natural phenomena, such as drought or can be due to anthropogenic activities, *e.g.* industrial discharge of heavy metals.

In the soil the presence of heavy metals decreases microbial activity and soil fertility, leading to inhibition of plant growth by indirect and direct effects (Gu *et al.* 2007). Though some heavy metals display a high cellular toxicity, some of them can be readily taken up by many plants, and accumulate all along the food chains. This is the case of cadmium (Cd) (Sanita di Toppi *et Gabbrielli* 1999). Cd has no known physiological role, except for one Cd-carbonic anhydrase in marine diatoms (Lane *et Morel* 2000). Its accumulation in the environment is mainly resulting from industrial emissions, use of Cd-rich phosphate fertilisers, sewage sludge spreading and runoff water from roadways. Moreover, Cd pollution is often accompanied by zinc (Zn) pollution (Garrett 2000).

Conversely to Cd, Zn is an essential element for plants metabolisms (Sommer *et Lipman* 1926). After iron, zinc is the most abundant biological heavy metal, it is involved as a cofactor in numerous enzymes activities, especially some SODs (Broadley *et al.* 2007). Nevertheless, Zn can reach toxic levels, like Cd, causing a decrease in chlorophyll content and photosynthetic activity (Gallego *et al.* 1996), hence decreasing growth and biomass production (Arisi *et al.* 2000). Cd-hyperaccumulator species described so far are mostly reported to also accumulate Zn (Verbruggen *et al.* 2009). While Cd accumulation and Cd tolerance are two independent traits in these species (Zha *et al.* 2004), a co-segregation of Cd and Zn accumulation and a co-segregation of Cd and Zn tolerance traits have been shown in at least one of them, namely *Arabidopsis halleri* (Bert *et al.* 2003). Moreover Aravind *et al.* (2005a) showed that Zn could prevent Cd toxicity in *Ceratophyllum demersum*. This indicates a link between Cd and Zn homeostasis which should prompt studies to compare Cd and Zn behavior and impact in plants.

It is generally admitted that plants do not possess specific Cd²⁺-transporters, except perhaps for Cd-hyperaccumulator species (Liu *et al.* 2008). However, Cd²⁺ is shown to accumulate also in non-hyperaccumulator plants like poplar (Unterbrunner *et al.* 2007). It

means that adventitious Cd^{2+} uptake and translocation involve molecular agents that are still unknown (Cosio *et al.* 2004; Plaza *et al.* 2007).

In plants, the metal homeostasis imply an organised combination of mechanisms: its uptake from soil to roots, the buffering realised by cell wall binding, the symplastic or apoplastic pathways towards cells, the transfer from xylem to phloem and the trafficking of metals into the cells. The same processes, associated with chelation in roots exsudates, vacuolization and storage in specific organs like trichomes help the plant to cope with metal excess and could avoid its potential toxicity (Zhao *et al.* 2000; Clemens 2001; Clemens *et al.* 2002; Song *et al.* 2003). Thus tolerance can arise from two contrasting strategies: metal exclusion or metal accumulation, which imply two distinct sets of mechanisms (Baker 1987). Exclusion is a more common behavior which inhibits root-to-shoot metal translocation. This explains why most of studies performed on tree species show that heavy metals particularly accumulate in roots (Zacchini *et al.* 2009). On the contrary metals accumulate more in the aerial parts of hyperaccumulators than in their roots (Tanhan *et al.* 2007). Thus, root-to-shoot metal translocation is a crucial step of metal accumulation (Papoyan *et al.* 2007) that constitutes one limiting factor for the use of trees in a phytoremediation perspective. Hyperaccumulation ability seems to depend on metal pumps and transporters (Hanikenne *et al.* 2008) that ensure the final destination of metal ions in plants' organs, tissues and cells. Hence, it appears important to understand xylem loading processes and the distribution of heavy metals in the whole-plant.

So far published studies on woody plants and metal stress were mostly performed on willow and poplar which present an overall ability to accumulate heavy metals like Cd and Zn, but also Cu, Mn, *etc.* (Laureysens *et al.* 2004; Dos Santos Utmazian *et al.* 2007; Kieffer *et al.* 2008). However scarcely any studies have attempted to describe the profile of metal distribution among the tree organs and the wood tissues.

In this regard, we harvested poplar plants after 61 days of exposure to a soil containing $50 \text{ mg Cd.kg}^{-1}_{\text{SDW}}$, and $9.5 \text{ }\mu\text{M Cd}$ in the soil solution or to a soil containing $300 \text{ mg Zn}^{2+}.\text{kg}^{-1}_{\text{SDW}}$, and $140.4 \text{ }\mu\text{M}$ in the soil solution. As plants exhibited no change in gas exchanges despite a delayed growth for Cd stressed plants, it was possible to describe the profile of metal distribution among the organs in a functional context.

Materials and methods

Plant material and metal treatments

Young rooted cuttings of *Populus tremula* L. x *P. alba* L. (*Populus x canescens* (Aiton) Smith) genotype INRA 717-1B4 were obtained as described in [Caruso et al. \(2002\)](#) from 1-year-old cut-back stems. The plants were cultivated in a growth chamber at $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% of relative humidity $\pm 5\%$ and an irradiance of $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provided during 16 h per day, they were watered each second day to field capacity.

At the beginning of the metal treatment, the 3 months old rooted cuttings were transferred from 0.5 dm^3 pots to 10 dm^3 pots containing sand and peat moss (25:75%, v/v, pH 6.9). Concomitantly, plants were pruned in order to make sure that the new leafy stems were entirely formed while plants were exposed to metal. The initial soil which corresponded to the control samples contained $72.3 \text{ mg Zn}^{2+}.\text{kg}^{-1}$ soil dry weight (SDW) and no trace of Cd^{2+} . Soils of Zn-treated plants were enriched at the beginning of the experiment with zinc in order to reach $300 \text{ mg Zn}^{2+}.\text{kg}^{-1}_{\text{SDW}}$ whereas Cd-treated soils were enriched with cadmium in order to reach $50 \text{ mg Cd}^{2+}.\text{kg}^{-1}_{\text{SDW}}$. During the 2 months of experiment, plants were watered only with tap water.

At the end of the treatment, plant samples were divided into roots, cutting, new stem entirely formed during the experiment, and leaves entirely formed during the experiment.

Leaves and stems were further separated into three groups depending on their position on the foliar axis. The first group reassembled the mature or senescent organs which corresponded to the region of the leaves which were already present in the bud which have produced the newly formed tissues (low part). The second group corresponded to the young mature organs (middle part); these leaves had achieved their growth at the time of the sampling. The third group corresponded to the young growing tissues (high part). The cutting was also dissected into three parts: xylem, cambial zone and bark.

Growth and water content

During the treatment, the stem height as well as the total leaf surface area were estimated as described by [Brignolas et al. \(2000\)](#) on 5 replicates. The assessment of the secondary growth was carried out through the monitoring of the time course of the plant cutting diameter with an automatic point dendrometer described in [Morabito et al. \(2006\)](#).

The leaf Relative Water Content (RWC) was calculated as follow, $RWC (\%) = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) \times 100 / (\text{saturated weight} - \text{dry weight})$. The root and stem Water Content was calculated as $WC = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) \times 100 / \text{fresh weight}$.

Metal content determination in soil and plant

Metal concentration in the soil, in the soil solution and in the plant organs were measured using a Jobin-Yvon® HR-ICP-AES as described in (Marchand *et al.* 2006), from 3 biological replicates.

Statistics

SPSS MANOVA was used to compare metal concentrations and metal partitioning in organs between treatments. Relative partitioning data expressed in percentage (x%) were transformed by $\arcsin(x^{\frac{1}{2}})$ before statistical analyses were completed. Physiological measurements (primary, secondary growth, gas exchanges) were given as the mean of 3 to 5 biological replicates. Statistical comparison of the means resulted from Student t-test.

Table 1. Physiological traits of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 after 61 days of exposure to a soil containing 300 mg Zn.kg⁻¹ SDW (Zinc) or 50 mg Cd.kg⁻¹ SDW (Cadmium). Means were compared to control (n=3 or 5, * p<0.05).

	Treatment		
	Control	Zinc	Cadmium
Total leaf area (cm ²)	6060 ± 235	5249 ± 578	4325 ± 79 *
Stem height (cm)	98.2 ± 6.9	79.8 ± 4.2	72.5 ± 1.5 *
Stem diameter increase during 61 days (µm)	1126 ± 221	1100 ± 483	822 ± 555
Root dry weight (g)	4.07 ± 1.67	3.48 ± 0.63	2.76 ± 0.39
Cutting dry weight (g)	18.86 ± 1.35	19.97 ± 2.51	14.79 ± 2.69
Stem dry weight (g)	13.33 ± 1.40	10.64 ± 0.94	7.81 ± 0.27 *
Leaves dry weight (g)	29.81 ± 2.11	25.53 ± 2.66	17.45 ± 0.59 *
Root Water Content (%)	86.9 ± 1.3	88.8 ± 1.0	89.7 ± 1.0
Cutting Water Content (%)	59.8 ± 1.2	58.8 ± 0.8	61.7 ± 2.3
Stem Water Content (%)	70.2 ± 4.2	75.5 ± 2.2	74.5 ± 0.3
Leaf Relative Water Content (%)	74.2 ± 2.1	73.6 ± 0.6	75.3 ± 0.3
Net CO ₂ assimilation (µmol CO ₂ . m ² .s ⁻¹)	12.2 ± 1.91	11.43 ± 2.26	11.5 ± 1.95
Stomatal conductance (mmol H ₂ O. m ² .s ⁻¹)	155.67 ± 29.04	154.0 ± 27.86	190.0 ± 21.78

Results

Physiological impact of metal treatment

After 61 days of experiment, the Cd treatment resulted in the inhibition of the total leaf area (-28%) and the stem height (-26%) of plants, whereas no significant changes occurred under Zn exposure (Table 1).

The dry weight of roots and cutting was not significantly changed under Cd treatment, whereas tissues entirely developed during the experiment, exhibited lower dry weight: -41% for stem, and -42% for leaves (Table 1). Zn treatment had no effect on the dry weight of organs. The CO₂ assimilation and the stomatal conductance were not affected by Cd nor by Zn constraint. No change in organ water content occurred consequently to Zn or Cd treatments.

The stem diameter increase, measured throughout the experiment was summarized in the Table 1 by a final measurement. This parameter exhibited no changes under metal treatments.

Table 2. Ion content (mg.kg⁻¹_{DW}) in different organs of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 after 61 days of exposure to a soil containing 300 mg Zn.kg⁻¹_{SDW} (Zinc) or 50 mg Cd.kg⁻¹_{SDW} (Cadmium). Means were compared to control (n=3, **p<0.01, ***p<0.001). The relative distribution in the plant (%) is given between brackets. nd = non detectable.

Ion	Treatment	Roots	Cutting	Stem	Leaves
Zn ²⁺	Control	65.8 ± 2.12 (4.9%)	48.4 ± 4.8 (20.5%)	61.3 ± 1.9 (17.5%)	86.6 ± 3.4 (57.1%)
	Zinc	224.3 ± 22.4*** (5.1%)	64.1 ± 5.2** (8.2%**)	240.4 ± 12.4** (16.5%)	427.5 ± 23.7*** (70.2%**)
	Cadmium	60.2 ± 6.2 (3.9%)	46.3 ± 3.6 (15.2%)	139.2 ± 12.2** (24.5%***)	143.7 ± 12.2** (56.4%)
	Control	nd	nd	nd	nd
Cd ²⁺	Zinc	nd	nd	nd	nd
	Cadmium	79.0 ± 8.3*** (8.4%)	36.7 ± 3.8*** (20.3%)	63.8 ± 8.5*** (18.8%)	79.7 ± 7.7*** (52.6%)

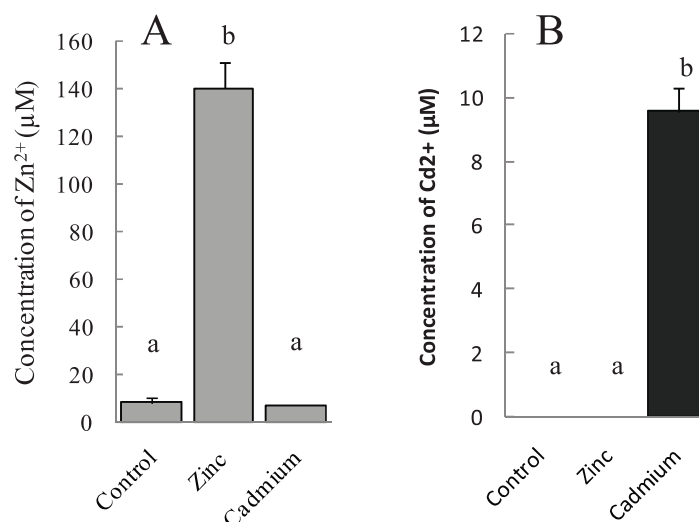


Fig. 1. Concentration of Zn^{2+} (A) and Cd^{2+} (B) in the solution of soils containing $300 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ SDW (Zinc) or 50 mg Cd.kg^{-1} SDW (Cadmium). Letters indicate differences between values ($n=3$, $p<0.001$). Bars refer to standard error.

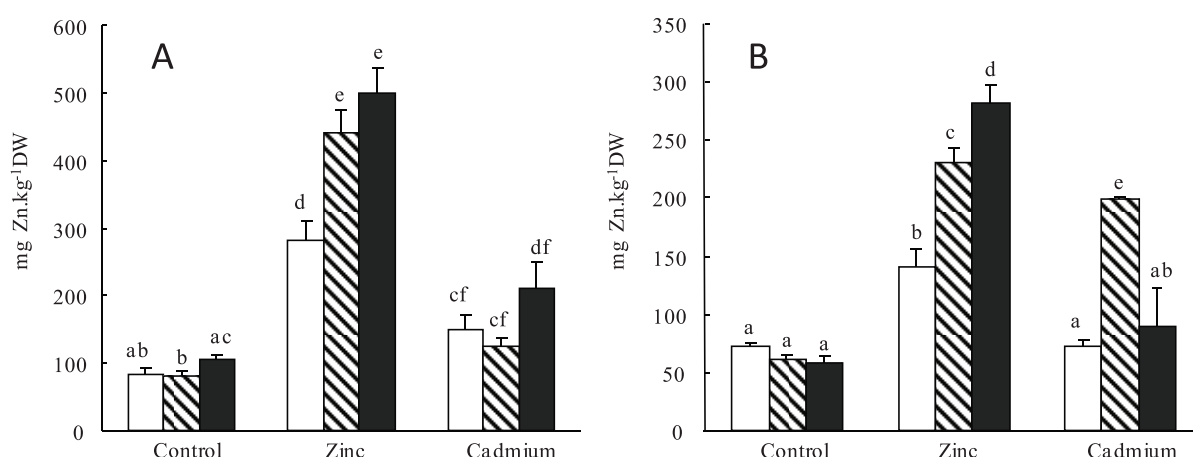


Fig. 2. Zn^{2+} content (mg.kg^{-1} DW) in leaves (A) and stem (B) of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 after 61 days of exposure to a soil containing $300 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ SDW (Zinc) or 50 mg Cd.kg^{-1} SDW (Cadmium). Leaves and stems were separated into three parts depending on their position on the foliar axis. High part (□), middle part (▨) and Low part (■). Letters indicate differences between means ($n=3$, $p<0.05$). Bars refer to standard error.

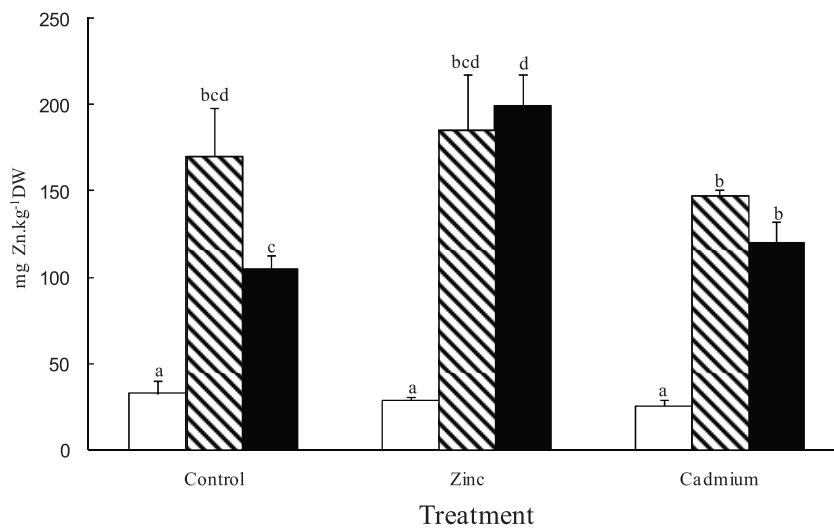


Fig. 3. Zn²⁺ content (mg.kg⁻¹ DW) in xylem (□), cambial zone (▨) and bark (■) of the cutting of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 after 61 days of exposure to a soil containing 300 mg Zn.kg⁻¹ SDW (Zinc) or 50 mg Cd.kg⁻¹ SDW (Cadmium). Letters indicate differences between means (n=3, p<0.05). Bars refer to standard error.

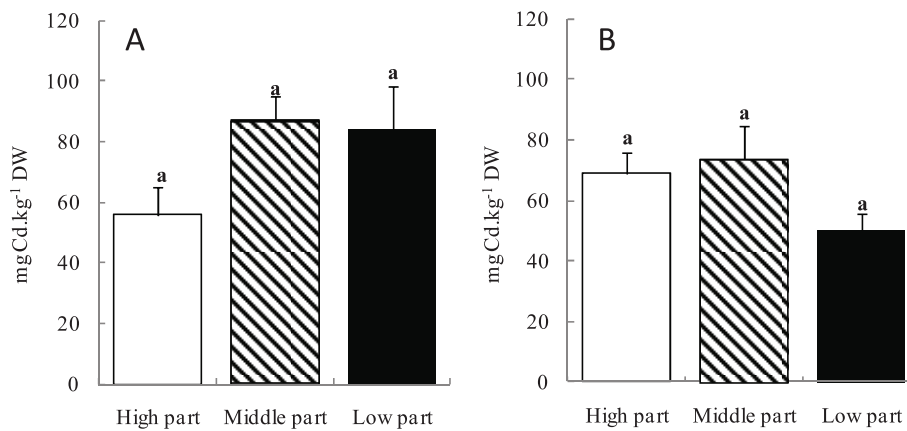


Fig. 4. Cd²⁺ content (mg.kg⁻¹ DW) in leaves (A) and stem (B) of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 after 61 days of exposure to a soil containing 50 mg Cd.kg⁻¹ SDW. Leaves and stems were separated into three parts depending on their position on the foliar axis. In control and Zn-treated plants, no cadmium was detected. Letters indicate differences between means (n=3, p<0.05). Bars refer to standard error.

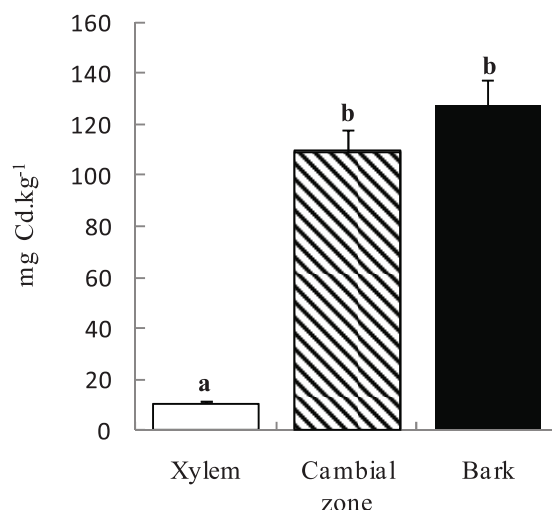


Fig. 5. Cd²⁺ content (mg.kg⁻¹ DW) in xylem, cambial zone and bark of the cutting of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 after 61 days of exposure to a soil containing 50 mg Cd.kg⁻¹ SDW. In control and Zn-treated plants, no cadmium was detected. Letters indicate differences between means (n=3, p<0.05). Bars refer to standard error.

Metal quantification in soil and plant organs

Zinc plant content

On day 1, [Zn²⁺]_{soil solution} was 8.3 μM in control conditions and reached 140.4 μM in Zn-treated conditions (Fig. 1). [Zn²⁺]_{soil solution} was not significantly altered by the addition of 50 mg Cd²⁺.kg⁻¹ SDW treatment.

On day 61 (Table 2), under Zn treatment, while the [Zn²⁺] content significantly augmented, compared to control, in leaves, stem, roots and cutting by a ratio of 4.9, 3.9, 3.4 and 1.3 respectively, the Zn²⁺ distribution was significantly higher in leaves (+13.1%) and lower in cutting (-12.3%). The relative Zn²⁺ distribution in stem and roots did not change.

[Zn²⁺] was measured in stems and leaf in 3 separated position along the foliar axis (Fig. 2). Under control conditions, [Zn²⁺] presented a homogenic distribution, with a slightly greater content in the oldest leaves; the 3 levels of stem tissue had the same [Zn²⁺]. Zn-treated plants exhibited a greater [Zn²⁺] when the tissues are older: old leaves contained 500.4 mg Zn²⁺.kg⁻¹ DW, i.e. 1.8 fold more than the youngest leaves, whereas the oldest part of stem contained 281 mg Zn²⁺.kg⁻¹ DW, i.e. twice as much as the youngest part. Among the cutting

tissues, and for all three treatments, $[Zn^{2+}]_{xylem}$ (Fig. 3) was between 3.2 and 7 fold lower compared to $[Zn^{2+}]_{bark}$, and between 5.1 and 5.8 times lower compared to $[Zn^{2+}]_{cambial\ zone}$. Compared to control plants, the Zn^{2+} exposure-induced highest increase of $[Zn^{2+}]$ in the bark where it raised from 104.9 to 199.6 mg $Zn.kg^{-1}_{DW}$ (Fig. 3). Xylem and cambial zone $[Zn^{2+}]$ were not significantly affected by Zn or Cd treatments.

Under Cd exposure, and compared to control, the $[Zn^{2+}]_{leaf}$ increased from 86.6 to 143.7 mg $Zn.kg^{-1}_{DW}$, but the relative distribution of Zn^{2+} in leaves showed no variation {Table 2}. The Cd treatment also resulted in an increase of $[Zn^{2+}]_{stem}$ from 61.3 to 139.2 mg $Zn.kg^{-1}_{DW}$, and modified the incorporated Zn^{2+} distribution in this organ from 17.5% to 24.5%. No change occurred in content and distribution of Zn^{2+} in cutting and root. The quantification of Zn in the leaves and stems collected along the foliar axis at 3 parts of distinct ages showed that the Cd treatment induced an increase of $[Zn^{2+}]$ only in young mature stem, compared to control (Fig. 2).

Cadmium plant content

No Cd^{2+} was detected in control nor in Zn-treated plants (Table 2). Under Cd exposure, Cd^{2+} was mainly localized in leaves (Table 2) which contained 79.7 mg $Cd^{2+}.kg^{-1}_{DW}$ and represent 52.6% of the Cd^{2+} present in the plant. Woody aerial parts, *i.e.* 'stem' and 'cutting' contained 39.1% of the Cd taken up by the plant, with a greater $[Cd^{2+}]$ in the stem tissues (63.8 mg $Cd^{2+}.kg^{-1}_{DW}$). For leaves and stem organs, their position on the foliar axis had no significant effect on the $[Cd^{2+}]$ (Fig. 4).

Among the cutting tissues, Cd content of the xylem was significantly lower than those in the cambial zone or in the bark which reached 115.4 and 122.5 mg $Cd^{2+}.kg^{-1}_{DW}$ respectively (Figure 5).

Discussion

Young poplar plants grown in a growth chamber were exposed to a soil content of 300 mg Zn.kg⁻¹_{SDW} which exceeds the natural average content of 64 mg Zn.kg⁻¹_{SDW} in the majority of soils (Emsley 2003). In parallel, other poplar plants were exposed to 50 mg Cd.kg⁻¹_{SDW}, which corresponds to a heavily polluted soil (Peters et Shem 1992). Metal toxicity in soil has complex dependencies towards total soil composition and, often more closely, free-ions partition in soil solution (Sauvé et al. 2000; Oorts et al. 2006) in relation with, e.g. pH, soil organic matter and dissolved organic carbon. Typically, less than 10% of the Zn²⁺ is under soluble or exchangeable form in soil, hence available for the plant (Broadley et al. 2007) whereas for Cadmium the part of soluble or exchangeable Cd varies between 2 and 20% of total soil load (Ma et Rao 1997; Sauvé et al. 2000).

Poplar exhibits a zinc management strategy.

Under Zn treatment, [Zn²⁺]_{soil solution} reached 140.4 µM; this was 17-fold higher than the control value. Nevertheless, the Zn treatment did not induce any change in primary or secondary growth, in organs dry weight or water content, in stomatal conductance nor net CO₂ assimilation (Table 1). Thereby the fate of Zn²⁺ within poplar organs under Zn exposure should be considered as the result of an efficient metal homeostasis. Moreover, as compartmentalization is part of the mechanisms involved in metal homeostasis, the metal localization reflects the plant strategy to cope with metal excess.

[Zn²⁺]_{roots} was equal to 65.8 mg Zn.kg⁻¹_{DW} in control and to 224.3 mg Zn.kg⁻¹_{DW} in Zn-treated plants. In both cases, it represents 5% of the Zn incorporated in the plant (Table 2) ; thus control and Zn-treated plants showed an equivalent root-to-shoot translocation of Zn²⁺. In above-ground parts, although [Zn²⁺] increased in all organs, the distribution patterns were contrasted. The Zn treatment induced a significantly increased localization of Zn²⁺ in the leaves, where its highest value was reached. This is in accordance with existing literature where Zn²⁺ is shown to predominantly distribute in the leaves, and particularly into trichomes, according to Zhao et al. (2000). As *P. canescens* 717-1B4 presents an important density of trichomes on the abaxial face of its leaves, the involvement of these trichomes in Zn²⁺ handling could be investigated. While [Zn²⁺] exhibited a significant increase in all organs, the relative distribution in the cutting was reduced from 20.5% to 8.2% due to a weaker loading of Zn²⁺ in this organ. This can result from different causes: it is likely that Zn²⁺ is not

heavily loaded into mature xylem; the cutting tissues that developed during the 61 days of metal exposure represent less than those already formed prior to the experiment (this is especially true for metal incorporated in xylem that was 'diluted' in the total xylem mass). It is noteworthy that $[Zn^{2+}]_{\text{cambial zone}}$ was not significantly altered by Zn treatment, whereas $[Zn^{2+}]_{\text{bark}}$ was 1.9 fold higher. This suggests an efficient targeting of excessive Zn^{2+} in specific tissues. Under Zn exposure, in leaf and stem, $[Zn^{2+}]$ reached 427.5 and 240.4 mg Zn.kg⁻¹_{DW}, respectively. When considering leaf position along the stem and corresponding stem sections, a significant $[Zn^{2+}]$ gradient could be observed (Fig. 2). Zn^{2+} was preferentially stored in older tissues; oldest leaves contained 1.8 fold more Zn^{2+} than the youngest. Such a $[Zn^{2+}]$ gradient was not observed in control plants. This raises the hypothesis of an inducible strategy for Zn compartmentalization.

The cadmium management strategy, if existing, differs from the zinc one.

The Cd treatment exposure to 50 mg Cd²⁺.kg⁻¹_{DW} that resulted in 9.5μM $[Cd^{2+}]_{\text{soil solution}}$ was comparable in intensity to many studies presented in the literature in hydroponic conditions (Thomine *et al.* 2000; Aravind et Prasad 2005b; Mishra *et al.* 2006; Cosio *et al.* 2006; Kieffer *et al.* 2008). This treatment caused a 26 to 28% reduction of the plants primary growth rates. The organs dry weight were also reduced. However, in the same time, the secondary growth was sustained, the stomatal conductance and the net CO₂ assimilation of young mature leaves were not affected (Table 1). There were no visible toxicity symptoms on the plants to which correlate the retarded primary growth. Since Cd²⁺ actually accumulated in the tissues while the plant showed a narrowed but healthy development, it should be considered that the potential Cd toxicity was partly avoided.

The highest $[Cd^{2+}]$ occurred in leaves and stem. The determination of $[Cd^{2+}]_{\text{leaf}}$ and $[Cd^{2+}]_{\text{stem}}$ according to the position of the organs showed a continuum of the $[Cd^{2+}]$ along the foliar axis. Hence, Cd was not preferentially compartmentalized in older leaves as it was observed in *Salix viminalis* (Cosio *et al.* 2006) or in *Salix fragilis* (Luyssaert *et al.* 2001). Among the tissues of the cutting, Cd²⁺ presented a lower content in xylem than in cambial zone and bark. A previous study on poplar showed similar results with a greater $[Cd^{2+}]$ in bark than in wood (Gu *et al.* 2007). To our knowledge the determination of $[Cd^{2+}]_{\text{cambial zone}}$

has never been reported so far. A measurement of metal ions content in the xylem layers formed during the metal constraint would be informative.

Cd and Zn distribution in above ground organs of Cd- and Zn-exposed plants, respectively, exhibited discrepancies (Table 2). Excessive Zn^{2+} was significantly more present in the leaves than Cd^{2+} (70.2% vs 52.6%), while Cd^{2+} was more localized in the cutting than Zn^{2+} (20.3% vs 8.2%). This pattern deviance must be balanced with the 40% reduced mass of leaf organ under Cd constraint, which is part of the plant response to Cd. The measurement of metal content in leaf and stem according to the age and position of the organs showed that the handling of Cd^{2+} at the organ level does not fit in the model of the Zn^{2+} compartmentalization.

Effect of Cd treatment on Zn in plant.

Results also underlined interactions or hindrances between Cd^{2+} and Zn^{2+} homeostasis. Under the Cd constraint, although $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{soil solution}}$ was not modified compared to control (Fig. 1), significant changes occurred in Zn^{2+} distribution and content among organs (Table 2). $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{leaf}}$ increased by 66% and $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{stem}}$ increased by 127%. Hence the tissues developed and formed during the exposure to Cd showed an important increase in their $[\text{Zn}^{2+}]$. In a previous publication, we showed a 127% increase of $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{leaf}}$ in *P. canescens* after a 61 day exposure to $360 \text{ mg Cd}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{SDW}}$ (Durand *et al.* – submitted in *Biologia Plantarum*⁵). Interestingly, literature reported both decrease (Zornoza *et al.* 2002) or increase (Yang *et al.* 2004) in $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{plant}}$ consequently to a Cd exposure.

Cd^{2+} can disturb Zn^{2+} homeostasis in a direct or an indirect way. Indeed interferences can intervene directly on Zn^{2+} transport, by a deregulation of Zn^{2+} transporters. This would be consistent with the hypothesis of Cd^{2+} being conveyed by unspecific –or insufficiently specific– Zn^{2+} transporters (Bert *et al.* 2003; Gitan *et al.* 2003). Based on all current knowledge on plant metal transporters, the existence of specific Cd^{2+} transporters in plants seems unlikely (Clemens 2006). The observed changes can also result from a rise in the demand for Zn^{2+} in active tissues where an increase $[\text{Zn}^{2+}]$ would help preventing the binding

⁵ Durand T.C., Hausman J.-F., Carpin S., Albéric P., Baillif P., Label P., & Morabito D. Zinc and cadmium effect on *Populus tremula* × *Populus alba* genotype 717-1B4: growth and ion distribution. Submitted to *Biologia Plantarum*.

of Cd^{2+} to biomolecules. This would be in accordance with the thesis of Cd^{2+} toxicity resulting from the competition with Zn^{2+} and other divalent cations for the binding to biomolecules, in plants as in animals (Waalkes et Poirier 1984; Jemai *et al.* 2007).

Conclusion

The Zn compartmentalization response to Zn treatment appears to be an inducible mechanism that allows a tuned regulation of Zn homeostasis, a kind of response that is lacking for Cd. As a consequence Cd can disturb the homeostasis of other metals: K, Mg, Ca (Durand *et al.*— submitted to *Biologia Plantarum*) or Fe (Besson-Bard *et al.* 2009), as it disturbs Zn, suggesting negative interactions between Cd^{2+} and proteins involved in these homeostasis. The results also show that the control of Zn homeostasis is based on the compartmentation of the metal ion in aged tissues.

Acknowledgment

The authors are grateful to Vanessa Caruso for the correction of the English version. Thomas Durand was supported by a PhD fellowship of the Luxembourg Ministry of Culture, Higher Education and Research (BFR 05/094). The authors are grateful to Alain Guichard, Gilles Moreau and Julie Jumeau (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures) for their excellent technical assistance.

2.11 Discussion synthétique

Lors d'une contrainte métallique, la réponse de stress de la plante a plusieurs composantes (ou dimensions) parmi lesquelles : 1) la nature du métal, 2) la dose, 3) le temps d'exposition, 4) les conditions culturales —la réponse n'est pas identique en sol ou en condition hydroponique (Narasimhamoorthy *et al.* 2007; Zabloudowska *et al.* 2009), ni entre le plein champ et la chambre de culture— 5) l'existence d'un stress simultané, 6) le tissu considéré et son état physiologique.

Les données présentées ci-avant montrent qu'une exposition à des concentrations supra-optimales n'a pas les mêmes conséquences s'il s'agit de Zn ou de Cd, ni les mêmes effets selon la [Cd].

Pour aller un peu plus loin dans la caractérisation de la réponse, nous allons revoir les résultats de l'exposition au zinc, nous allons également nous intéresser à l'effet dose du cadmium.

2.11.1. Gestion du zinc par la plante

Dans nos expériences, des plants de peuplier ont été exposés durant 61 jours à une concentration de $265 \text{ mg Zn.kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$. Au-delà des mesures physiologiques, une analyse protéomique a été menée ; ses résultats n'ont pas été publiés. En effet la comparaison des contraintes a mis en évidence une dissymétrie importante, le Cd induisant un stress sévère alors que le Zn, dont il est vrai que la concentration ne dépassait que légèrement les concentrations habituelles, n'avait que peu d'effets. La discussion des changements dans les protéomes foliaire et cambial ne pouvait pas se permettre d'apprécier la spécificité liée au Cd dans la réponse du stress métallique. Il a été décidé de ne traiter que les effets du Cd. Les données de la réponse au traitement par le Zn sont toutefois intéressantes et seront discutées ci-dessous.

La dose de Zn correspond à 9,1 fois celle du sol témoin (29 mg Zn.kg^{-1}) et se trouve légèrement au-delà des concentrations habituellement rencontrées dans la nature. La concentration dans la solution du sol atteint $140,4 \text{ }\mu\text{M Zn}^{2+}$; cette concentration est de $8 \text{ }\mu\text{M Zn}^{2+}$ dans la solution du sol témoin. L'effet de ce traitement par le Zn sur les plantes est très

limité. Pour rappel, on n'observe aucun effet sur la croissance primaire, estimée par la croissance apicale et la surface foliaire totale. Il n'y a pas non plus d'effet mesurable sur la croissance radiale de la bouture initiale et pas de changement dans les concentrations ni dans la distribution de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et Fe^{2+} dans les différents organes de la plante. Les échanges gazeux (conductance stomatique, assimilation du CO_2) restent inchangés. On observe pourtant une accumulation du métal dans la plante : +800% dans les feuilles où on atteint $325 \text{ mg Zn.kg}^{-1}_{\text{poids sec.}}$. On a montré une plus forte [Zn] dans les feuilles âgées, confirmant que l'accumulation du métal dans les feuilles est un mécanisme régulé. Dans les tissus de la bouture, l'exposition au Zn n'a pas d'effet sur la concentration en Zn du xylème et de la zone cambiale. C'est au niveau de l'écorce que l'essentiel du Zn supplémentaire se localise (+90%).

L'analyse protéomique de la feuille où [Zn] augmente fortement, ne montre que 10 spots protéiques différentiels. Sept d'entre eux répondent aussi à l'exposition au Cd. Les spots spécifiques à la réponse au Zn ont été identifiés (voir tableau 2.2). Il s'agit de protéines similaires à celles observées dans la réponse au Cd : anhydrase carbonique, light harvesting complex protein, ATP synthase. Au niveau cambial, le profil protéomique est très peu altéré, ce qui est cohérent avec la [Zn] qui y reste comparable à celle des plants témoins. Seuls 10 spots protéiques sont significativement modifiés par le traitement, dont 4 le sont également par une exposition au cadmium. Les spots identifiés sont listés dans le tableau 2.2.

Ces données physiologiques et protéomiques montrent que 61 jours d'exposition à un sol contenant $265 \text{ mg.Zn kg}^{-1}$ constituent pas une contrainte suffisante pour entraîner ce qu'il est convenu d'appeler un état de stress chez *Populus tremula* x *P. alba*. Sans modification substantielle de son protéome aux niveaux foliaire et cambial, sans altérer sa croissance ou ses échanges gazeux, la plante absorbe et gère une quantité de zinc supérieure aux conditions normales. La gestion du Zn est réalisée *via* une compartimentation régulée dans les feuilles les plus âgées et dans l'écorce. Il est très probable que les racines et leur environnement microbiologique jouent également un rôle de première importance dans la compartimentation du zinc (Adriaensen *et al.* 2004; Van De Mortel *et al.* 2006).

Pour déterminer les aspects spécifiques de la réponse au stress induit par le Cd, il serait intéressant de le comparer à des situations de stress déclenchés par d'autres métaux, et

donc d'exposer le peuplier à des doses de zinc beaucoup plus massives, de l'ordre de 1000 mg.kg^{-1} .

Tableau 2.2. Protéines différentiellement exprimées dans les tissus foliaire ou cambial de *Populus tremula* x *P. Alba* génotype 717-1B4 en réponse à une exposition à un sol contenant 265 mg Zn.kg⁻¹.

Numéro de spot	Identifications ²	Score ³	Numéro accession EST ⁴	Nb de peptides	% de couverture	Impact Factor Cd / Ctr ratio ⁶	Zn / Ctr ratio ⁶
Protéines foliaires différentiellement exprimées lors d'une exposition au Zn							
1610	light-harvesting complex II protein Lhcb1 [Populus trichocarpa].	154	gi 24058814	5	45	-1.73	-2,78*
1366	ATP synthase beta subunit	365	gi 46360728	6	66	-1.41	1,5*
1597	Carbonic anhydrase	210	gi 1354517	6	44	-1.49	1,66*
1238	RuBisCO large subunit	466	gi 60101630	7	36	-2.39*	-1,39**
1471	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1	198	gi 12644171	2	32	-4.81**	-1,4*
1480	Oxygen-evolving enhancer protein 1	83 (+62)	gi 27410837	4	54	-3,65***	-1,37*
1672	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor,	261	gi 55734950	6	52	-4,15***	-1,35*
1200	NAD-dependent malate dehydrogenase	87 (+57)	gi 15982948	2	37	-1,84***	-1,36*
902	Citrate (si)-synthase [Populus trichocarpa]	177	gi 53783182	6	33	2,11**	1,34*
1202	Aldo/keto reductase family-like protein	121	gi 60216418	5	63	-2,62**	-1,47*
Protéines cambiales différentiellement exprimées lors d'une exposition au Zn							
324	Os05g053000 [homology with mitochondrial F1-ATPase beta subunit]	129	gi 115465323	3	15	1.21	-1,53*
330	Adenosylhomocysteinase	140	gi 79325087	2	67	1.53	-1.53**
1487	Glycine-rich RNA-binding protein [Euphorbia esula].	214	gi 24004265	3	66	-1.17	1,58**
1070	Alcohol dehydrogenase [Populus tremula]	220	gi 52851054	4	74	1,62***	-1,23**
1066	Acetylcholinesterase [Macropitilium atropurpureum].	323	gi 24064109	2	39	1,89***	-1,29**

1: Numéro du spot sur le gel master

2: Identification protéique obtenue après interrogation sur la base de données NCBIInr

3: Score MASCOT (donné par le logiciel GPS (Applied Biosystems))

4: Numéro d'accèsion de la séquence EST dans la base de données NCBIInr

5: Numéro d'accèsion de la protéine correspondante dans la base de données NCBIInr

6: Ration moyen de l'abondance de la protéine (traité / témoin). Les valeurs positives sont données telles quelles, les valeurs négatives sont transformées selon la formule: (-1/ratio moyen).

2.11.2. L'effet-dose du cadmium

Dans les articles qui précèdent, deux doses de Cd ont été testées sur les plants de peuplier : $50 \text{ mg Cd.kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$ et $360 \text{ mg Cd.kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$. Ces concentrations totales dans le sol aboutissent à de fortes différences de concentration dans la solution du sol : $9,5 \mu\text{M}$ pour la première, $20,8 \mu\text{M}$ pour la deuxième (Figure 2.4).

On constate également un effet du Cd sur la solubilité du Zn. Dans un sol contenant 50 mg.Cd kg^{-1} de Cd, la concentration de Zn dans la solution du sol n'est pas affectée. Lorsque la dose de Cd est de 360 mg.kg^{-1} , en revanche, on observe une diminution de la concentration du Zn en solution : $4,3 \mu\text{M}$ contre $8,3 \mu\text{M}$ en condition témoin. A cette concentration de Cd, la compétition Cd/Zn commence donc dans le sol.

Les deux doses de Cd ont des effets différents sur la physiologie de la plante. 50 mg.Cd kg^{-1} induit un simple retard de croissance alors que $360 \text{ mg.Cd kg}^{-1}$ conduit à des chloroses, une forte inhibition de la croissance et des métabolismes primaires. Il est intéressant de comparer la teneur en Cd dans les tissus des plantes après 61 jours d'exposition à ces deux doses de Cd. Dans les deux cas la [Cd] dans les feuilles est similaire ($79,7$ et $83,5 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$), ce qui indique que les dommages du Cd dans les feuilles, s'ils ont pu conduire à l'altération de l'état général de la plante ne sont qu'une cause secondaire. Dans les autres organes considérés, la [Cd] est significativement supérieure sous la contrainte la plus forte.

Le cas des tissus de la bouture initiale est présenté dans la Figure 2.5. Le xylème, la zone cambiale et l'écorce présentent des [Cd] comparables sous les deux traitements. La distribution du métal entre ces tissus à l'issue des deux traitements est également comparable, exception faite de la zone cambiale qui contient une portion deux fois plus importante du Cd absorbé lors de la contrainte par 50 mg.Cd kg^{-1} , ce qui peut s'expliquer par le maintien de l'activité cambiale (croissance secondaire) au cours de ce traitement, alors qu'elle est très fortement inhibée (-95%) lors de l'exposition au sol contenant $360 \text{ mg.Cd kg}^{-1}$. Ces données, au niveau des tissus de la bouture invitent à penser que la toxicité métallique est davantage le résultat d'un affaiblissement général et d'un manque de photosynthétats plutôt que celui d'une toxicité locale.

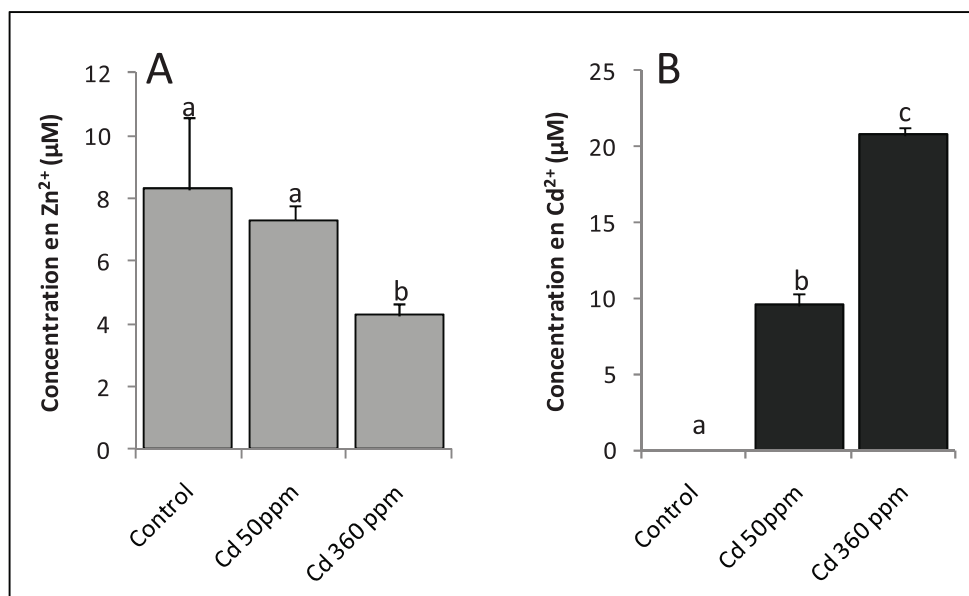


Figure 2.4. Concentration en zinc (A) et en cadmium (B) dans la solution de sols contenant 300 mg Zn.kg⁻¹, 50 mg Cd.kg⁻¹ et 360 mg Cd.kg⁻¹. Les barres représentent l'erreur standard. Les lettres a, b et c indiquent une différence significative entre les moyennes (p<0.05).

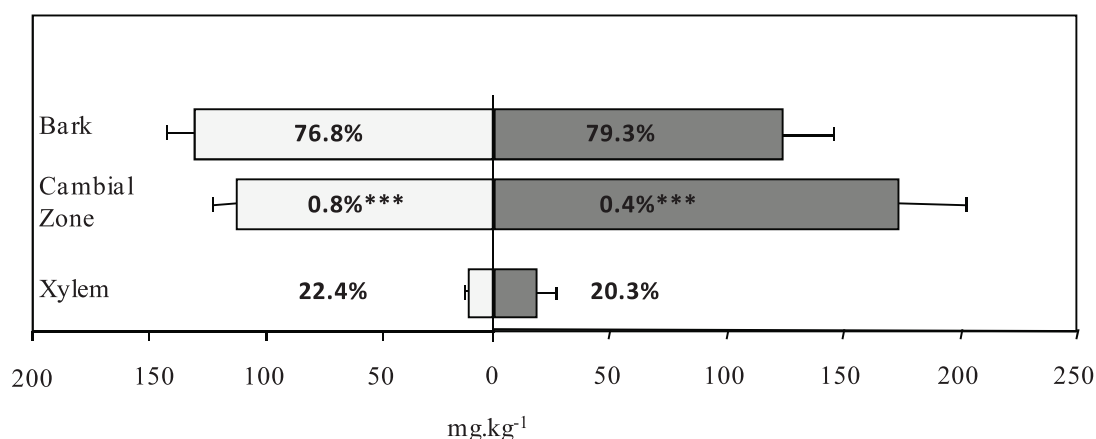


Figure 2.5. Concentration et distribution du Cd dans les tissus de la bouture initiale de peupliers après 61 jours d'exposition à un sol contenant 50 mg Cd.kg⁻¹ (en blanc) ou 360 mg Cd.kg⁻¹ (en gris). Les barres représentent l'erreur standard. Les pourcentages indiquent la répartition relative du Cd entre les tissus.

La plus importante différence de [Cd] entre les traitements se situe dans la racine. La concentration y est 3,2 fois plus grande sous 360 mg.Cd kg⁻¹ que sous 50 mg.Cd kg⁻¹.

L'accumulation de métal dans les racines est considérée comme l'un des premiers moyens pour la plante de gérer un stress métallique (Das *et al.* 1997) tandis que la

translocation vers la tige est un facteur décisif de l'hyperaccumulation (Xing *et al.* 2008). Le cas du peuplier semble frontalier ; il présente une forte translocation du cadmium, mais aussi une importante accumulation dans les racines lorsque la dose est toxique. La sensibilité du peuplier au stress métallique semble être déterminée en bonne partie au niveau racinaire.

2.11.3. Le peuplier et le métal

L'utilisation du peuplier à des fins de phytoremédiation, évoquée il y a presque vingt ans (Huiyi *et al.* 1991), fait depuis lors l'objet d'études qui confirment ce potentiel, généralement vis à vis du cadmium et du zinc, mais aussi, par exemple, du sélénium (Robinson *et al.* 2000; French *et al.* 2006; Zalesny *et al.* 2006; Gu *et al.* 2007; Dhillon *et al.* 2009). On a montré que le peuplier était également utilisable pour l'extraction de polluants organiques persistants (Mills *et al.* 2006; El-Gendy *et al.* 2009). La sensibilité des espèces et cultivars est variable, ainsi *Populus alba* semble être relativement sensible à l'excès de Zn (Castiglione *et al.* 2007). On a proposé plusieurs approches transgéniques pour améliorer la remédiation de la pollution par le Zn (Bittsanszky *et al.* 2005) ou par les polluants organiques (Van Aken 2008).

La propension du peuplier à accumuler les métaux dans ses feuilles, que l'on retrouve dans nos résultats ainsi que dans la littérature (Sebastiani *et al.* 2004; Pietrini *et al.* 2009) le rend impropre à une utilisation en phytostabilisation (Mertens *et al.* 2004), mais elle peut en faire un bon bioindicateur de l'état de la pollution métallique des eaux et des sols (Madejon *et al.* 2004). Les résultats de notre étude suggèrent que l'amélioration des qualités du peuplier dans une finalité de phytoremédiation du Cd devrait passer par l'étude des transporteurs racinaires qui présentent une affinité avec le Cd. Les mécanismes de l'incorporation du Cd dans le bois sont également une piste de recherche importante en vue de limiter les risques de dispersion des métaux lors de la chute des feuilles.

Chapitre 3

Le stress thermique

- 3.1 Introduction au stress thermique
- 3.2 Définir le stress thermique
- 3.3 Réponse végétale aux fortes températures
- 3.4 Réponse moléculaire
- 3.5 Questions et stratégie
- 3.6 Screening of changes in leaf and cambial proteome of poplars under heat stress. In preparation for submission to *Journal of Proteomics*.
- 3.7 Discussion et perspectives

3.1. Introduction

Ces trente dernières années, la température moyenne de la Terre a augmenté de 0,2°C par décade (Hansen *et al.* 2006, voir figure 3.1.) Un réchauffement de 1,4 à 5,8°C est prévu au cours du 21^{ème} siècle (IPCC 2001). Si la Terre a déjà connu par le passé des climats plus chauds que celui que nous connaissons actuellement, le changement en cours dépasse nettement tous ceux qui sont survenus ces 4 derniers millions d'années en terme de vitesse et d'amplitude (Overpeck *et al.* 2005). Son imputation à l'activité humaine ne fait plus guère débat, et, de manière simplifiée, le rôle du CO₂ atmosphérique semble prépondérant (Cox *et al.* 2000).

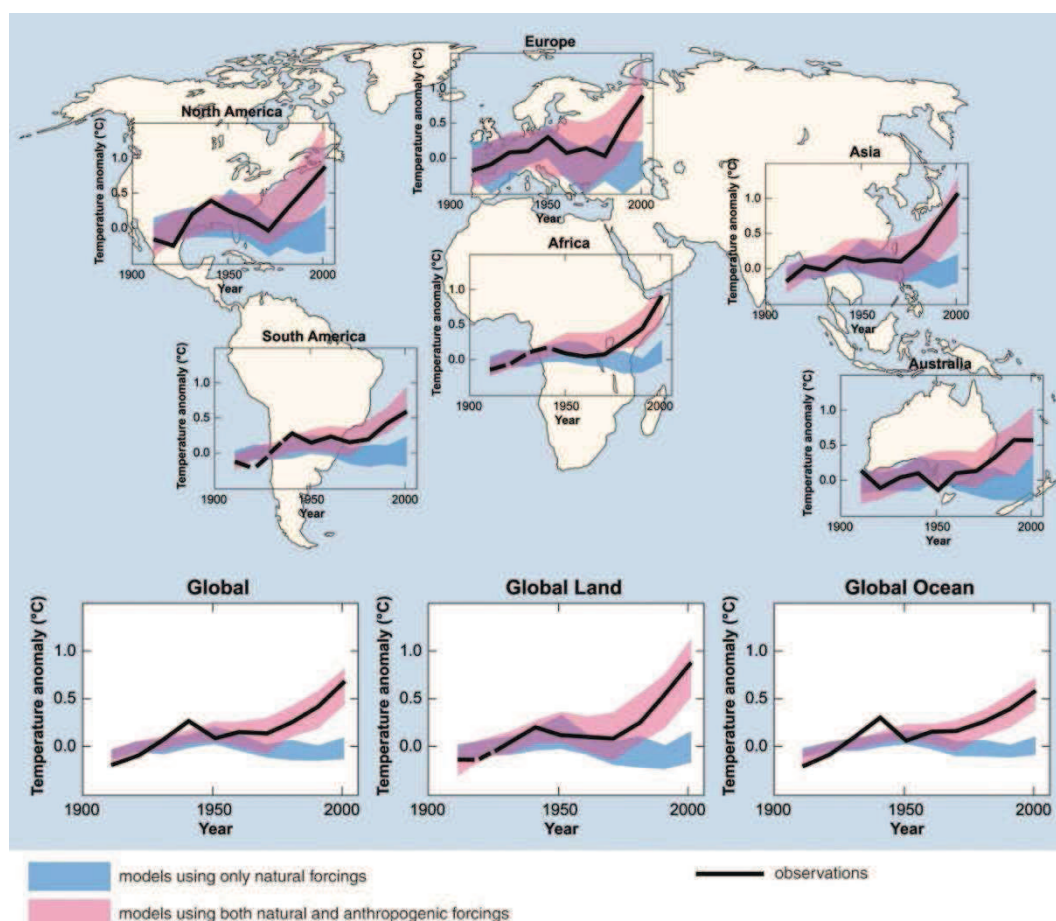


Figure 3.1. Changement climatique observé à l'échelle globale et continentale. La courbe noire indique l'évolution d'une moyenne de température décennale entre 1906 et 2005 (IPCC Fourth Assessment Report [AR4] 2007)

La teneur atmosphérique en CO₂ était de 280 ppm avant l'ère industrielle (avant l'an 1750), elle est aujourd'hui de 370 ppm et augmente de 1,5 ppm par an (IPCC 2001). Cette augmentation est due au déstockage de 5,5 Gt de carbone par an par la combustion des énergies fossiles, ainsi que 1,4 Gt de carbone libéré par la déforestation. Le niveau atmosphérique du CO₂ n'a jamais été aussi élevé depuis au moins 200 000 ans (Mortier 1995) et il pourrait atteindre le double de sa valeur actuelle, soit 700 ppm, à la fin du 21^{ème} siècle (Schimel 1995).

Le changement climatique a de nombreuses conséquences sociologiques, politiques, économiques, médicales et biologiques (Yohe *et al.* 2007); il s'est imposé ces vingt dernières années dans la littérature scientifique comme une problématique de premier ordre (figure 3.2).

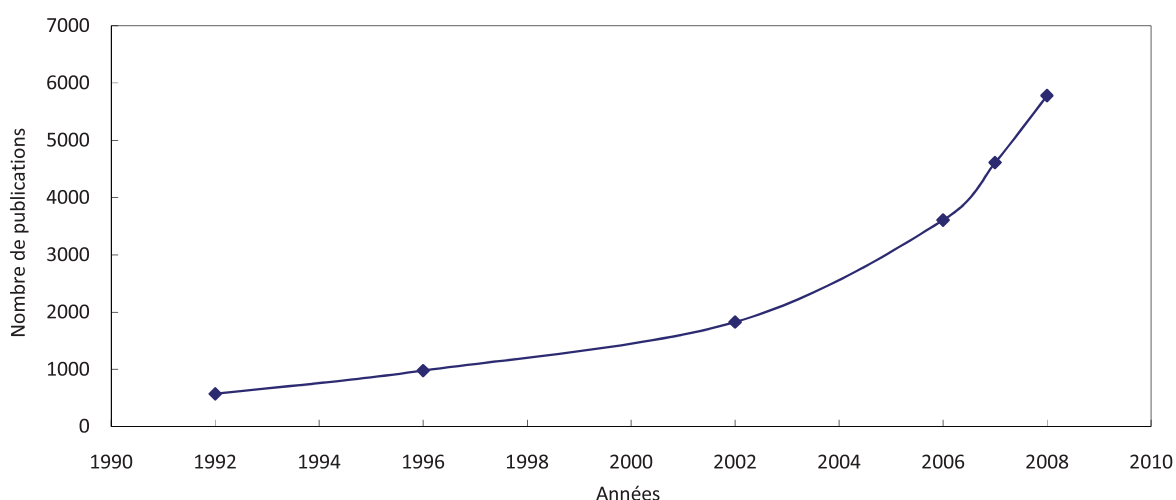


Figure 3.2. Accroissement du nombre de publications scientifiques traitant ou évoquant le réchauffement climatique entre 1992 et 2008 (source : Isi Web of knowledge¹, critère de recherche : "global warming" or "climate change" le 15.07.09).

Le régime thermique est un paramètre déterminant en biologie. La température est l'un des principaux facteurs de différenciation des populations sur les gradients d'altitude ou de latitude (Saxe *et al.* 2001). L'existence de l'homéothermie chez les animaux illustre l'importance du paramètre thermique dans le succès ou l'échec écologique des espèces. A l'échelle de l'organisme, la température va influencer plusieurs paramètres tels que la solubilisation des gaz dans l'eau ou les tissus biologiques, la fluidité des membranes, la

¹ http://proxy.bnl.lu:2328/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=T28cdh5L3A@DiMc7peJ&preferencesSaved=

structure et donc le fonctionnement des protéines, le taux du métabolisme *via* la vitesse des réactions enzymatiques, et le statut hydrique. A l'échelle d'un écosystème, la température détermine notamment la production primaire nette. Elle affecte en effet les niveaux de photosynthèse, de respiration et de minéralisation des nutriments dans le sol, ainsi que la phénologie et l'acclimatation thermique au froid hivernal (Saxe *et al.* 2001).

Du point de vue de la physiologie végétale, le réchauffement global présente deux aspects à considérer. Le premier aspect est une élévation moyenne des températures à l'échelle mondiale. En réponse, le printemps (phénologique) d'un grand nombre d'espèces débute de plus en plus précocement, avançant de 2 à 5 jours par décade dans les écosystèmes terrestres de l'hémisphère nord (Cleland *et al.* 2007). D'après la méta-analyse de Parmesan & Yohe (2003), 62% des 1 700 taxons étudiés (dont plus de 530 espèces végétales) montrent un décalage dans le temps de la reproduction et des migrations, avec un déplacement des populations en direction des pôles de 6 km par décade. Le plus souvent, une augmentation de la température moyenne accroît la respiration de la plante davantage qu'elle n'accroît la photosynthèse lors d'expériences à court terme. Sur le long terme, toutefois, l'équilibre respiration/photosynthèse ne semble pas modifié (Dewar *et al.* 1999). Récemment, Lenoir *et al.* ont confirmé que le changement climatique s'accompagne d'un glissement des optima thermiques de la physiologie des plantes forestières (Lenoir *et al.* 2008). Par conséquent l'allongement de la période de végétation, associé à la plus grande teneur en CO₂ de l'atmosphère (bien souvent facteur limitant de la photosynthèse), induit un gain net de production des végétaux, en particulier des arbres. De plus, l'accroissement de la teneur atmosphérique en CO₂ augmente de manière générale la température optimale de la photosynthèse (Brooks et Farquhar 1985) et, en améliorant l'efficacité d'utilisation de l'eau, devrait réduire la sensibilité de la photosynthèse aux contraintes hydriques (Chaves et Pereira 1992). Par ailleurs, la réduction de l'évapotranspiration occasionnée par l'accroissement de la teneur atmosphérique en CO₂ devrait, d'après les modélisations, réduire le réchauffement estival des régions à fort couvert végétal (Levis *et al.* 2000).

Ce premier aspect n'est pas particulièrement menaçant pour la survie des végétaux, même si cet effet 'positif' du changement climatique est moins évident pour les écosystèmes tropicaux où les espèces rencontrent davantage de problèmes de saturation lumineuse (Saxe *et al.* 2001). Par ailleurs l'avancement du printemps phénologique peut avoir pour

conséquence une exposition des bourgeons à des gelées tardives qui se traduisent par des pertes de production.

Le deuxième aspect du changement climatique, au-delà d'une élévation de la température moyenne, consiste en l'accentuation des événements extrêmes (Easterling *et al.* 2000; canicules et leurs "nuits chaudes", sécheresses, inondations ; Alexander *et al.* 2006). Ces derniers ont un impact particulièrement fort sur les écosystèmes, modifient les équilibres entre compétiteurs, et peuvent conduire à des extinctions locales (Hughes *et al.* 2003; Thuiller *et al.* 2005). Les phénotypes tolérants aux stress vont donc être favorisés (Bijlsma et Loeschcke 2005), et certains auteurs posent la question de l'existence d'une *évolution* des espèces en réponse au changement climatique (Parmesan 2006; Gienapp *et al.* 2008). Les perspectives actuelles laissent craindre la disparition de près d'un quart des espèces de la planète d'ici à 2050 (Thomas *et al.* 2004).

Dans ce contexte alarmant, il est important de comprendre comment les plantes, premier maillon des chaînes trophiques dont dépendent directement 75% des humains, sont capables de réagir à ces changements à venir. L'étude des essences ligneuses présente un autre intérêt puisque leur photosynthèse assure 70% de la fixation du carbone émis par les écosystèmes terrestres (Melillo *et al.* 1993). Elle constituerait un moyen de fixer le carbone atmosphérique dans le but de limiter l'effet de serre (Ward et Kelly 2004).

En parallèle, la respiration des végétaux, qui s'accroît avec l'élévation des températures, rejette chaque année dans l'atmosphère 30 à 80% du carbone photosynthétique, soit environ 60 Gt de carbone (Schimel 1995). Si l'on compare ce chiffre aux rejets de 7 Gt de carbone anthropique, on mesure l'importance de prévoir l'évolution prochaine du métabolisme des végétaux pour modéliser les changements atmosphériques qui sont de première importance dans l'évolution du climat.

3.2. Définir le stress thermique

Une température assez extrême pour tuer un organisme sans qu'il existe pour lui de moyen de survivre est un cas hors limite dans le cadre d'une étude qui vise à élucider les mécanismes d'accoutumance. La plupart des auteurs s'accordent à confiner le stress thermique dans les limites réalistes des températures auxquelles les plantes sont amenées à faire face dans un habitat donné.

En conditions naturelles, un stress dû à une élévation de température est rarement un phénomène isolé. Il est souvent associé à un fort rayonnement solaire, et la température des feuilles dépasse souvent celle de l'air ambiant de 5 à 15°C (Braun *et al.* 2002). A cet égard on note que le Photosystème 2 (PSII) est le complexe protéique le plus sensible à ce type de contrainte (Yoshioka *et al.* 2006). En temps normal, 80 à 90% de l'énergie lumineuse reçue par la plante n'est pas utilisée pour la photosynthèse. Elle est dissipée par fluorescence de la chlorophylle ou via un quenching¹ non photochimique, le cycle des xanthophylles, avec dissipation de chaleur (Demmig *et al.* 1987; Johnson *et al.* 2008). Un stress en général, un stress thermique ou lumineux en particulier, en limitant la conversion photochimique, va accroître la part d'énergie à dissiper et donc augmenter sensiblement la température de la feuille (Lichtenthaler 1998). Une plante exposée à la chaleur mais qui a accès à suffisamment d'eau aura la possibilité de maintenir ses stomates ouverts afin que l'évaporation abaisse la température des feuilles, ce que l'on appelle le '*transpirational cooling*' (Salvucci et Crafts-Brandner 2004). L'effet peut dépasser 10°C (Jones *et al.* 2002). Dans la nature, contraintes thermiques et hydriques sont souvent liées. Cette réponse de la plante à une forte température peut avoir pour conséquence d'accélérer l'installation d'une carence en eau. Lorsque l'eau manque, le '*transpiration cooling*' n'est plus possible : la contrainte thermique devient plus importante. Pour autant la combinaison des contraintes est une situation habituelle pour les plantes ; au niveau de l'activité photochimique un stress hydrique peut avoir un effet bénéfique sur la réponse aux contraintes thermiques et lumineuses (Havaux 1992).

En terme de contrainte thermique, un arbre comme le peuplier, de par son aire de répartition, n'est pas particulièrement soumis à des températures élevées. La plupart des publications s'intéressent à sa réponse aux basses températures (Sakai et Sugawara 1973;

¹ "étanchement"

Sagisaka 1974; Cleve et Apel 1993; Renaut *et al.* 2004; Begum *et al.* 2008; Coccozza *et al.* 2009), et plus rares sont celles qui l'étudient dans un contexte de température élevée (Ferreira *et al.* 2006; Behnke *et al.* 2007). Pourtant les épisodes de canicule comme celui observé en France en 2003 risquent de se multiplier. A cette occasion la station Météo-France de Bourges avait enregistré des pics de température de 40°C s'étalant sur six jours (Figure 3.3). On estime l'étendue de l'optimum thermique d'une plante à environ 10°C (Mahan *et al.* 1995). La température optimale du peuplier se situant vers 25°C (Bassman et Zwier 1991), 40°C dépasse manifestement la fourchette de son optimum. On peut donc parler de contrainte thermique.

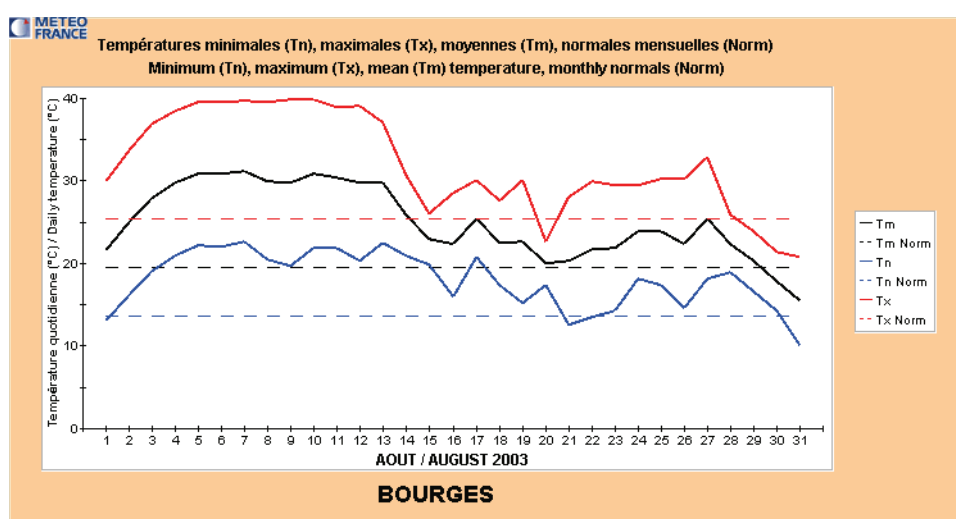


Figure 3.3. Températures relevées à la station Météo-France de Bourges en août 2003 (Météo-France).

Le cas de la canicule de 2003 en France, par son intensité et sa durée, dépasse tout ce qui a été enregistré depuis 1897 (Landmann *et al.* 2003). Les conséquences sur les forêts ont été rapidement visibles, avec des chutes de feuilles, d'aiguilles, de rameaux, et le brunissement des feuillages (source : Département de la Santé des Forêts). Le peuplier, avec les bouleaux et les charmes, figurait parmi les essences les plus sensibles. En outre les arbres affaiblis peuvent devenir la cible d'insectes ravageurs ou d'autres pathogènes qui démultiplient les dégâts causés par la contrainte hydro-thermique (Landmann *et al.* 2003).

3.3. Réponse végétale aux fortes températures

En dehors de la problématique du réchauffement climatique, la vie sur Terre peut s'accommoder de températures extrêmes qui s'étendent de -70°C jusqu'à 121°C (Kashefi et Lovley 2003; Cowan 2004). Toutefois la limite supérieure permettant le maintien de la croissance et du développement est estimée à environ 60°C pour les eucaryotes, 48°C pour les plantes (Rothschild et Mancinelli 2001), cf Tableau 3.1. Les plantes sont parfois soumises à des régimes thermiques de grande amplitude. Certaines espèces de Sibérie connaissent des températures estivales qui peuvent atteindre 30°C et des hivers où les températures avoisinent -70°C, soit une amplitude de 100°C (Iba 2002). On appelle **thermotolérance** la capacité de certains organismes à résister à l'exposition à une température significativement éloignée de leur optimum. Il existe une *thermotolérance constitutive* (ou basale), qui est immédiate et dépend en grande partie du niveau d'expression constitutif des protéines de maintenance (chaperonnes, HSP cognates....). On a montré l'intervention du niveau d'acide salicylique dans le déploiement de la thermotolérance basale chez *A. thaliana* (Clarke et al. 2004). Lorsque la plante est exposée à une température excessive pendant une durée suffisante, la réponse à la contrainte peut aboutir à un ajustement de sa physiologie qui retrouve son efficacité à cette température. Cette **accoutumance** est un processus à moyen terme qui s'installe en continuité avec l'état de stress.

On parle de *thermotolérance acquise* quand un changement métabolique, physiologique, morphologique, etc. induit par une contrainte confère à la plante une performance accrue en termes de survie, de reproduction ou de croissance lors d'un épisode ultérieur de stress. La réponse de la plante peut ainsi être 'amorcée' par une exposition à une température sublétales (Levitt 1980; Kapoor et al. 1990; Vierling 2003; Larkindale et al. 2005a), ou à un stress hydrique (Arora et al. 1998; Gonzalez-Cruz et Pastenes 2008). Certaines réponses de la plante semblent exclusivement orientées vers la tolérance acquise car elles ne s'initient qu'en période de recouvrement, donc après la contrainte (Plieth et al. 1999).

L'accoutumance thermique semble avoir évolué en réponse aux changements de la température diurne, ce qui explique le caractère éphémère de la tolérance qu'elle apporte ; la plupart des modifications impliquées dans l'accoutumance thermique sont réversibles en l'espace de 24 heures (Gulen et Eris 2003). On observe aussi que la thermotolérance du PSII est variable au cours de la journée et augmente avec la température ambiante, avec des différences pouvant atteindre 12°C (Braun et al. 2002) en constante relation avec

l'ajustement du potentiel osmotique par le niveau de sucres (Hüve *et al.* 2006). Chez *Loiseleuria procumbens* une modification de la température ambiante de 3°C augmente la thermotolérance de la feuille de 0,6°C (de 49,4 à 50°C) et provoque un déplacement du seuil supérieur de thermo-photoinhibition de 3°C (Braun *et al.* 2002). La thermotolérance peut être limitée à un stade de la vie de l'organisme, comme la larve de moustique qui, seule, supporte l'hiver (Ragland *et al.* 2009), ou les graines de plantes pyrophiles qui résistent au feu pour ensuite germer et pousser dans un environnement modifié présentant une faible pression de compétition. Ceci montre que l'organisme, même sensible, possède un potentiel de réponse à des températures extrêmes.

En l'absence de tolérance, le stress thermique conduit à divers dommages : une coagulation du protoplasme, une liquéfaction des lipides, une perturbation de l'intégrité membranaire, ou encore une dénaturation des protéines (Arora *et al.* 1998). L'un des premiers symptômes observé est cependant une inhibition de la photosynthèse.

Tableau 3.1. Température seuil pour la croissance de certaines espèces agronomiques (Wahid *et al.* 2007).

Crop plants	Threshold temperature (°C)	Growth stage	References
Wheat	26	Post-anthesis	Stone and Nicolás (1994)
Corn	38	Grain filling	Thompson (1986)
Cotton	45	Reproductive	Rehman <i>et al.</i> (2004)
Pearl millet	35	Seedling	Ashraf and Hafeez (2004)
Tomato	30	Emergence	Camejo <i>et al.</i> (2005)
Brassica	29	Flowering	Morrison and Stewart (2002)
Cool season pulses	25	Flowering	Siddique <i>et al.</i> (1999)
Groundnut	34	Pollen production	Vara Prasad <i>et al.</i> (2000)
Cowpea	41	Flowering	Patel and Hall (1990)
Rice	34	Grain yield	Morita <i>et al.</i> (2004)

Température & photosynthèse

La photosynthèse est très vite affectée par un changement de température (Camejo *et al.* 2005). Le processus photosynthétique le plus sensible aux stress en général, au stress thermique en particulier, est le photosystème 2 (PSII) (Havaux 1992; Tang *et al.* 2007; Murata *et al.* 2007). Le complexe producteur d'oxygène (*Oxygen Evolving Complex* : OEC) du PSII est le composant le plus thermolabile de l'appareil photosynthétique. L'oxydation de l'eau en oxygène dans le lumen du PSII nécessite l'activité de métalloprotéines contenant 4 Mn²⁺ (McEvoy *et al.* 2006), stabilisés par plusieurs protéines extrinsèques du OEC sensibles à la chaleur, notamment PsbO, PsbP et PsbQ. Le stress thermique provoque la perte de ces protéines extrinsèques et de deux Mn²⁺, conduisant à l'inactivation du PSII

(Allakhverdiev *et al.* 2008). Parmi les composants intrinsèques du PSII, la protéine D1 est la plus fragile et peut se cliver dès 40°C quand les autres protéines restent intactes (Yoshioka *et al.* 2006). Les mêmes modes d'inactivation sur les mêmes acteurs moléculaires se produisent lors d'un stress lumineux (Ohnishi *et al.* 2005).

Le transport d'électrons entre les photosystèmes PSII et PSI, réalisé par le *Light Harvesting Complex 2* est inhibé dès 35°C (Pastenes et Horton 1996; Busch *et al.* 2008; Shibata *et al.* 2008). La thermotolérance du PSII est liée à la stabilité des thylakoïdes dont les membranes subissent une réorganisation dans l'intervalle 35-45°C (Nishiyama *et al.* 2006). Les dommages irréversibles n'interviennent généralement qu'au-delà de 45°C (Sharkey 2005; Haldimann et Feller 2005).

L'une des autres causes de la réduction de la photosynthèse par une température élevée est l'inhibition de la RuBisCO activase, ce qui empêche la fixation du CO₂ (Law et Crafts-Brandner 1999; Salvucci et Crafts-Brandner 2004). La solubilité du CO₂ est également en cause car elle est réduite, même à des températures qui n'affectent pas la RuBisCO activase ni le transport d'électrons des photosystèmes (Crafts-Brandner et Law 2000). Enfin la contrainte thermique provoque la production d'espèces actives de l'oxygène qui peuvent causer des dommages aux biomolécules et inhiber leur réparation et leur remplacement (Allakhverdiev *et al.* 2008).

A cette réaction à court terme peut succéder une réponse d'accoutumance visant à rétablir une efficacité maximale, d'une manière qui est encore mal comprise (Ow *et al.* 2008). Par exemple quand des plants de pois cultivés à 25°C ou bien accoutumés 5 jours à 35°C sont placés à 45°C, tous subissent une baisse de la photosynthèse nette similaire, une baisse de plus de 80% en corrélation avec une diminution d'activité de la RuBisCO. Le prétraitement n'a donc pas d'effet sur cette inhibition. En revanche, les plants accoutumés à 35°C obtiennent un meilleur rétablissement de la photosynthèse après la contrainte thermique (Haldimann et Feller 2005). Les auteurs expliquent cela par une stabilité des membranes des thylakoïdes accrue par l'accoutumance à 35°C, qui va limiter les dommages à l'appareil photosynthétique. L'accoutumance de la photosynthèse semble également liée à la concentration en azote, un paramètre assez peu étudié (Ow *et al.* 2008).

Température & respiration

Trente à 80% du carbone photosynthétique est consommé par la respiration de la plante. Cette respiration représente 30 à 65 % des sources de CO₂ à l'échelle des écosystèmes, le reste étant dû à la respiration hétérotrophe (Reichstein *et al.* 2002). Les rapports entre respiration et température ambiante présentent donc un intérêt majeur dans le cadre du changement climatique et de la question des équilibres du carbone. Ces rapports sont assez complexes et sont liés à d'autres paramètres : surface spécifique des feuilles, concentrations en sucres et en azote (Lee *et al.* 2005).

La respiration diminue après une courte exposition (moins d'une heure) à une température élevée (Bolstad *et al.* 2003). Sur un plus long terme, qui permet une accoutumance de la plante à la température, on observe après retour à une température moyenne qu'une exposition à une température élevée va réduire la respiration, alors qu'une exposition à une température basse va l'augmenter (Atkin *et Tjoelker* 2003). En pratique, des plantes originaires de climats froids ou de hautes altitudes, quand elles se développent dans un milieu plus commun présentent une respiration nocturne ou une concentration en azote dans leurs feuilles plus importantes que les espèces originaires de climats plus chauds (Oleksyn *et al.* 1998). Il existe donc, au moins chez certaines plantes, un changement métabolique qui tend à compenser l'effet d'une modification durable de la température sur la respiration, en particulier dans les tissus en développement (Ow *et al.* 2008).

En dehors de la respiration cellulaire habituelle, les stress peuvent induire l'augmentation de la photorespiration (Noctor *et al.* 2002; Bagard *et al.* 2008), ce qui constitue une voie métabolique alternative de dissipation des équivalents réducteurs. Elle limite la production de ROS dans la cellule et évite ainsi le stress oxydant (Juan *et al.* 2005).

3.4. Réponses moléculaires

Il existe de nombreuses molécules dont l'effet sur la thermotolérance a été prouvé : l'acide salicylique aurait un rôle dans la thermotolérance basale mais pas dans la tolérance acquise (Larkindale et Knight 2002b; Clarke *et al.* 2004). L'éthylène pourrait agir *via* une réduction du stress oxydant (Nie *et al.* 2002; Dziubinska *et al.* 2003). L'acide β -aminobutyrique améliore la thermotolérance de *A. thaliana* (Zimmerli *et al.* 2008) sans lien apparent avec l'acide salicylique ou l'éthylène. Le tréhalose augmente la viscosité intracellulaire et améliore la thermostabilité des protéines (Hottiger *et al.* 1994). L'ascorbate peroxydase et la catalase réduisent les dommages membranaires (Chakraborty et Tongden 2005). L'isoprène est également une molécule très étudiée dans ce contexte (Penuelas *et al.* 2005; Velikova et Loreto 2005; Behnke *et al.* 2007) et dans celui, apparenté, du stress oxydant (Vickers *et al.* 2009). Parmi les molécules ayant un impact sur la tolérance à la chaleur on peut également citer l'ubiquitine (Ortiz et Cardemil 2001; Kurepa *et al.* 2003), les lipocalines (Frenette Charron *et al.* 2002; Frenette Charron et Sarhan 2005), les thioredoxines h (Ferreira *et al.* 2006), etc. La rhizosphère peut également jouer sur la thermotolérance (McLellan *et al.* 2007) ; par exemple la synthèse d'inhibiteur de HSP90 par *Paraphaeosphaeria quadrisepata* provoque une augmentation de l'expression de HSP101 et HSP70 chez *A. thaliana*, ce qui lui confère une meilleure thermotolérance.

Les plantes possèdent une importante gamme de facteurs de transcription répondant à la chaleur, les Heat Shock Factors (HSF, Baniwal *et al.* 2004) qui se lient à la séquence consensus 'nGAAnnTCCn' que l'on trouve dans le promoteur de nombreux gènes de défense. Leur activité est étroitement liée au niveau de H₂O₂ (Miller et Mittler 2006). L'une des principales réponses à la chaleur induite par les HSF est l'expression de **Heat Shock Proteins** (HSP, Gurley 2000; Sung *et al.* 2003; Huang et Xu 2008). Il s'agit de protéines chaperonnes ayant avant tout un rôle de protection. Elles sont parmi les protéines les plus anciennes et les plus conservées dans le monde vivant (Feder et Hofmann 1999). Elles protègent notamment la chaîne de transport d'électrons lors d'un stress thermique, améliorant la thermotolérance de la plante (Heckathorn *et al.* 2002). Les HSP n'ont pas seulement un rôle de protection contre la dénaturation, elles sont capables de désagréger les protéines (Weibezahn *et al.* 2004).

Il existe 5 familles de HSP : HSP100, HSP90, HSP70 (famille DnaK), les chaperonines (HSP60 et GroEL) et les sHSP (12 à 40 kDa) (Waters *et al.* 1996; Sung *et al.* 2003). Certaines d'entre elles (des HSP70 en particulier) sont exprimées de manière constitutive : les *Heat Shock Cognates*. Une cellule en état de fonctionnement normal exprime des HSP qui assurent des fonctions importantes pour la conformation, l'assemblage, le transport et la dégradation des protéines (Lindquist 2003). Ainsi certaines HSP90 participent à l'assemblage et la maintenance du protéasome (Imai *et al.* 2003) quand des HSP70 marquent les protéines destinées à être dégradées par le protéasome (Hartl 1996). On a observé l'expression de HSP à des moments et des localisations clefs du développement de la plante, notamment en relation avec l'accumulation de protéines de stockage (Lubaretz et Nieden 2002; Su et Li 2008).

Le rôle des HSP dans la thermotolérance n'est plus à démontrer (Kumar *et al.* 1999). La protéine HspA a par exemple la faculté de se lier aux membranes des thylakoïdes soumis à un stress thermique et de renforcer leur stabilité (Nitta *et al.* 2005). Toutefois, si elles sont manifestement indispensables aux réponses à court terme, les HSP ne semblent pas impliquées dans le phénomène d'accoutumance (Tanaka *et al.* 2000; Nishiyama *et al.* 2006) qui serait davantage lié aux niveaux d'expression des protéines extrinsèques du OEC comme PsbO (Ferreira *et al.* 2006) ou à la stabilisation des membranes des thylakoïdes (Haldimann et Feller 2005).

3.5. Questions et stratégie

Dans le cadre de cette thèse, nous cherchons à établir un schéma de la réponse physiologique et protéomique du peuplier soumis à une contrainte thermique. Comme dans le chapitre précédent et dans celui qui suivra, une comparaison est effectuée entre la réponse foliaire et la réponse cambiale.

Les expériences ont été réalisées dans le but de répondre à trois questions principales :

Quels changements physiologiques se produisent chez le peuplier lors d'une exposition prolongée à une forte température réaliste ?

Quels changements protéomiques interviennent dans la feuille et dans le tissu cambial ?

Quel est l'effet d'un pré-traitement thermique sur les réponses du peuplier ?

Durand T.C., Sergeant K., Planchon S., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J-F., Renaut J. Screening of changes in leaf and cambial proteome of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 under heat stress. In preparation for submission to *Journal of Proteomics*.

3.6. Screening of changes in leaf and cambial proteome of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 under heat stress

Article préparé pour une publication dans Journal of Proteomics.

Durand, Thomas C.^{abcd}; Sergeant, Kjell^a; Planchon, Sébastien^a; Udelhoven, Thomas^a; Carpin, Sabine^{bc}; Label, Philippe^d; Morabito, Domenico^{bc}; Hausman, Jean-François^a; Renaut, Jenny^{a*}.
Hoffmann ?

^a CRP-Gabriel Lippmann, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, GD, Luxembourg. Department Environment and Agro-biotechnologies.

^b Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France.

^c Institut National de la Recherche Agronomique, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), 45067 Orléans, France.

^d Institut National de la Recherche Agronomique, CS40001 Ardon, 2163 Avenue de la pomme de pin, 45075 Orléans CEDEX 2, France.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: renaut@lippmann.lu

Abstract

Young poplar plants were exposed to different heat regimes and proteomics analyses were done on both leaf and cambial tissues. The responses of both tissues were compared.

Young poplar plants were exposed to a rapid heat constraint at 42°C (heat shock HS) alone or preceded by a stepwise increase in temperatures (heat gradient HG). Physiological and proteomic changes were analyzed.

The heat treatments negatively affected the photosynthetic rate while increasing the stomatal conductance. In the leaf, the HS had an impact on some photosynthetic proteins, and particularly induced an increase in abundance of proteins of the oxygen evolving complex. On the other hand, the HG reduced carbohydrate metabolism and induced germin-like proteins.

In the cambial zone, the HS caused a decrease in sucrose synthase content and in enzymes related to protein synthesis. The main effect of HG was the accumulation of thaumatin-like proteins as well as an increase in the abundance of proteins involved in the carbohydrate metabolism. Furthermore, both tissues underwent changes of content of heat shock proteins, but more importantly, of peroxiredoxins. The results show more 'longer-lasting' changes in leaf and cambial proteomes in response to HS compared to HG.

Keywords: Cambium, Heat stress, Poplar, Proteomic.

1.Introduction

Temperature is one of the major determinants of the global and local distribution of species on the Earth (Atkinson *et al.* 1987). Although different hypotheses result in a certain range of magnitude, global climate change is likely to be accompanied in temperate regions by an increase in the frequency and intensity of heat waves, as well as warmer summers and milder winters (Seager *et al.* 2007). Therefore, plants are likely on the one hand experience higher average annual temperatures and on the other hand to be more and more frequently exposed to excessive temperatures during more or less long heat spells in some of the world's regions (Easterling *et al.* 2000). The response of plants to such thermal regimes implies a short-term structural protection of the metabolism to cope with heat waves and, on the long run, a hardening achieved through the modification of the metabolic equilibria to fit with the shift in average temperature (Kaur *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009).

Contrary to localized (often anthropogenic) abiotic stresses (e.g. salt or metal pollution), heat stress is intimately linked with other environmental constraints such as drought or excessive irradiation, that generally exacerbate its physiological effects (Mittler 2006a). Even in the current climate heat stress is already responsible for important yield losses (Maestri *et al.* 2002). The adverse effect of heat on plant metabolism is primarily due to damage to the photosynthetic machinery, especially the photosystem II, and to impairment of the Calvin cycle caused by the inhibition of RuBisCO activase and the reduced solubility of CO₂ (Crafts-Brandner *et al.* 2000; Salvucci *et al.* 2004).

The response of a plant under stress presents generic patterns (e.g. synthesis of antioxidants, chaperone proteins) and more specific aspects linked to the specific nature and the intensity of the stress. These response patterns are furthermore modulated by the phenological or developmental stage of the plant and by previous variations in environmental conditions to which the plant was exposed. To avoid heat damage, plants possess a wide range of morphological and molecular responses. By stomatal opening the leaf temperature can be reduced in a process called transpiration cooling, resulting in improved heat resistance and yield (Radin *et al.* 1994). Heat tolerance can also be achieved through the production of proteins and metabolites able to improve the stability of membranes, the functioning of enzymes and the repair of molecular damage (Haldimann *et al.* 2005; Allakhverdiev *et al.* 2008).

The long-term heat stress response of plants, heat acclimation, seems to essentially rest upon the plasticity of organs still in development. Newly formed tissues present a greater capacity of respirational and photosynthetic acclimation than tissues which developed before the change in temperature (Stitt et Hurry 2002; Atkin et Tjoelker 2003). This can be explained by the ambivalent role of certain stress-responsive proteins which take part in developmental processes (Dafny-Yelin et al. 2008; Perez et al. 2009). An acquired tolerance is defined as the enhanced survival induced by a previous and usually milder stress episode (Lin et al. 1984; Lindquist et Craig 1988). The benefits of previous moderate heat exposure on plant survival to extreme temperatures have been described previously (Larkindale et Vierling 2008; Kaur et al. 2009a) but our knowledge on the mechanisms that underlie this acquired thermotolerance remains far from complete (Timperio et al. 2008).

There is a need for an untargeted search for proteins involved in the acclimation response to elevated temperatures in trees. The proteomic approach has already been used to study changes in the proteomes of trees exposed to a variety of stresses (Bohler et al. 2007; Xiao et al. 2009; Bonhomme et al. 2009a; Kieffer et al. 2009b), and poplar is considered as a suitable model tree for such studies (He et al. 2008; Renaut et al. 2008a). Furthermore, in order to have a complete view on acquired thermotolerance, tissue specific responses need to be discerned from general adaptive patterns.

The mechanisms involved in metabolic defence partly depend on physiological status, stress sensing and signalling pathways. Accordingly, stress tolerance arises through molecular responses, the patterns of which rely on cell and tissue specific structures. Such tissue-specificity studies in plants are few, especially concerning the cambium. In the context of current and future climate changes, and with the public concern on atmospheric CO₂ levels, most scientific programs have focused on the study and on the prediction of photosynthesis adaptations, and thus on the study of the response of leaf tissue to heat (Yordanov et al. 1995; Allakhverdiev et al. 2008). The cambium has a prominent role in the continental 'carbon trade', as the tissue where secondary growth is initiated and maintained and consequently the site where long-term fixation of carbon in woody tissues is regulated. The comprehension of its peculiar reaction to high temperature must be improved, especially since studies on thermal topics often deal with cambial reactivation after winter dormancy (Begum et al. 2008).

The present study aims at comparing the effect of a heat shock (42°C for 48h) with the effects of a progressive increase of the temperature on physiological parameters and on the proteomes of leaf and cambial tissue of young poplar plants.

2. Material and methods

2.1 Plant material

Rooted cuttings of *Populus tremula* L. x *P. alba* L. (*Populus* x *canescens* (Aiton) Smith) genotype INRA 717-1B4 were planted in 10 dm³ pots filled with a sand-peat moss soil mixture (25:75, v/v, pH 6.9) in a growth chamber. Control conditions were settled at 22°C, 70% of relative humidity, and irradiance of 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provided during 16 h per day. The rooted plantlets had a leaf total area of $1725 \pm 125 \text{ cm}^2$ in average at the beginning of the experiment. Plants were watered at field capacity.

2.2 Temperature treatments and tissue sampling

Poplar plants were submitted to two different temperature treatments (Figure 1). The Heat Shock (HS) treatment consisted in a rapid increase of the temperature from 22°C to 42°C within 2 h, the 42°C temperature was maintained 48h, then the temperature was dropped back to 22°C within 2 h and maintained during the 7 days of the recovery period. The Heat Gradient (HG) treatment consisted in a heat pretreatment (progressive increase of the temperature from 22 to 30 °C during three whole days), followed by the same heat treatment described as HS, *i.e* 48 h at 42°C followed by 7 days at 22°C. Plants were taken for tissue sampling at days 3, 5 and 12. Young fully expanded leaves were chosen for proteomic analysis. After stem lyophilisation, the bark was excised and the cambial zone was collected by softly scratching the inner face of the bark with a scalpel. Samples were flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further analysis.

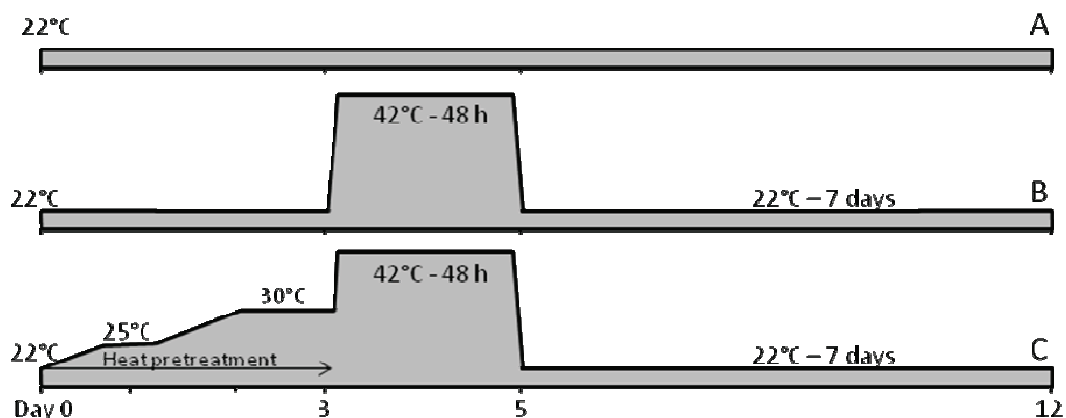


Figure 1. Experimental design of control (A), Heat Shock (B) and Heat Gradient (C) treatments applied to *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4.

2.3 Predawn leaf water potential (Ψ)

The measurement of the predawn leaf water potential (MPa) was performed from four biological replicates using a Scholander-type pressure chamber (PMS-670; PMS Instrument, Albany, OR, USA). Each replicate corresponded to an individual plant. The measurements were performed on young fully expanded leaves, collected on the same leaf level that was used for the proteomic analysis.

2.4 Gas exchange measurement

The stomatal conductance to water (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and the photosynthetic rate (P_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) were measured using a portable photosynthesis system (Ciras-2, PP Systems, Hitchin, Herts, UK) on the same leaf level as the one used for the proteomic analysis. The CO_2 concentration of the air flowing at a rate of $200 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ over the 2.5 cm^2 section of leaf clamped inside the PLC was $400 \mu\text{mol}.\text{mol}^{-1}$. The light intensity during measurements was $1000 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.5 Growth measurement and water content

Primary growth of plants was estimated on the basis of the total leaf area (cm^2), which was calculated accordingly to the formula given by [Brignolas *et al.* \(2000\)](#). The leaf relative water content (RWC) was calculated as follow, $\text{RWC (\%)} = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) \times 100 / (\text{saturated weight} - \text{dry weight})$. The stem water content was calculated as $\text{WC} = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) \times 100 / \text{fresh weight}$.

2.6 Protein extraction and separation

Proteins were extracted from ground tissues using a TCA-acetone protocol described in [Kieffer *et al.* \(2009a\)](#). The extracted proteins from tissues collected on day 3, 5 and 12 were labeled with $240 \text{ pmol CyDyes}^{\text{TM}}$ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) per $30 \mu\text{g}$ of proteins. Cy2 was used for the labelling of the internal standard consisting of a mix of equal amounts of each sample. For control and treated plant samples, a dye swap was used between Cy3 and Cy5 to avoid problems associated with preferential labelling. Four replicates were used for each sampling date. The separation of proteins was done using 2D gel electrophoresis. Isoelectrofocusing was done at 20°C using an IPGphor system on 24cm strips 3-10 non linear pH range (GE healthcare) until reaching $85,000 \text{ V.h}$. The strips were subsequently

equilibrated in two steps. First, proteins were reduced by incubation in a buffer containing 1% DTT for 15 min and, second, alkylated by incubation with 2.5% (w/v) iodoacetamide for 15 min. The SDS-PAGE was performed on 12.5% (w/v) acrylamide-bisacrylamide (37.5/1) gels. A power of 2W per gel was applied. After migration and fixing of proteins in the gel, images were captured using a Typhoon Variable Mode Imager 9400 (GE Healthcare).

2.7 Protein relative quantification and identification.

Images of gels were analyzed using DeCyder v.6.05.11 software (GE Healthcare). The automatic matching was manually confirmed for spots selected for further study and identification. The relative quantification of proteins, based on the normalized volume of spots, allowed the statistical comparison of their abundance. A Student t-test performed inside the DeCyder determined differentially expressed proteins with a variation factor of at least 1.3 in abundance (up and down) and a p-value < 0.05. A false discovery rate correction was applied in the software.

Spots were picked from the gel and digested by trypsin for 6 h at 37°C using an Ettan Dalt Spot Handling Workstation (GE Healthcare) before acquisition of MS and MS/MS spectra with a MALDI-TOF-TOF analyser (4800 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The poplar EST database, used for the interrogation, was downloaded from the NCBI server on 06/11/2009 and contained 419,944 sequences. A *Viridiplantae* protein database was also used, that was downloaded on 02/17/2009 and contained 1,214,000 sequence. Detailed search criteria were described in [Durand *et al.* \(2010\)](#). Each spectrum was manually verified, even with low MASCOT score.

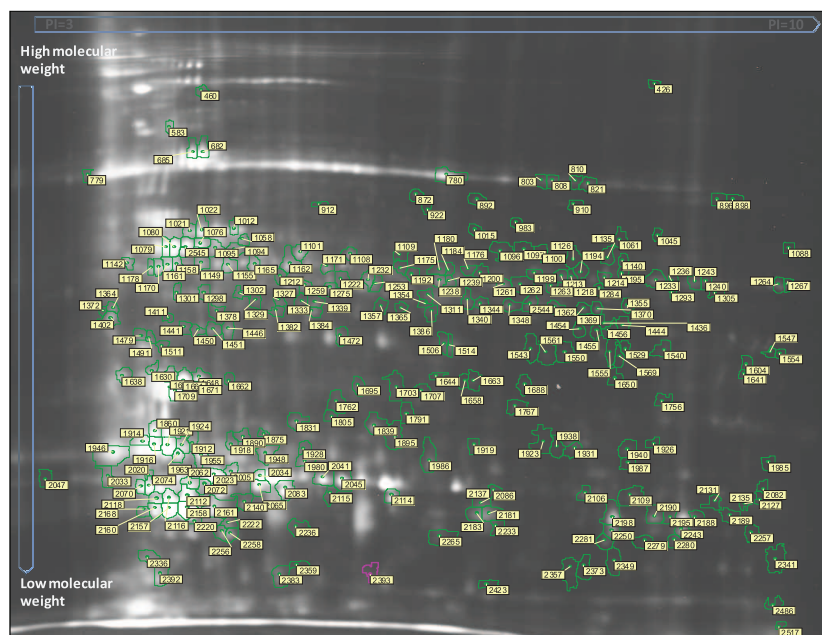


Figure 2. Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines foliaires de *Populus tremula* x *P. alba* génotype 717-1B4 marquée avec CyDye 2. Les spots différentiels au cours de l'expérience sont indiqués avec leur numéro de spot.

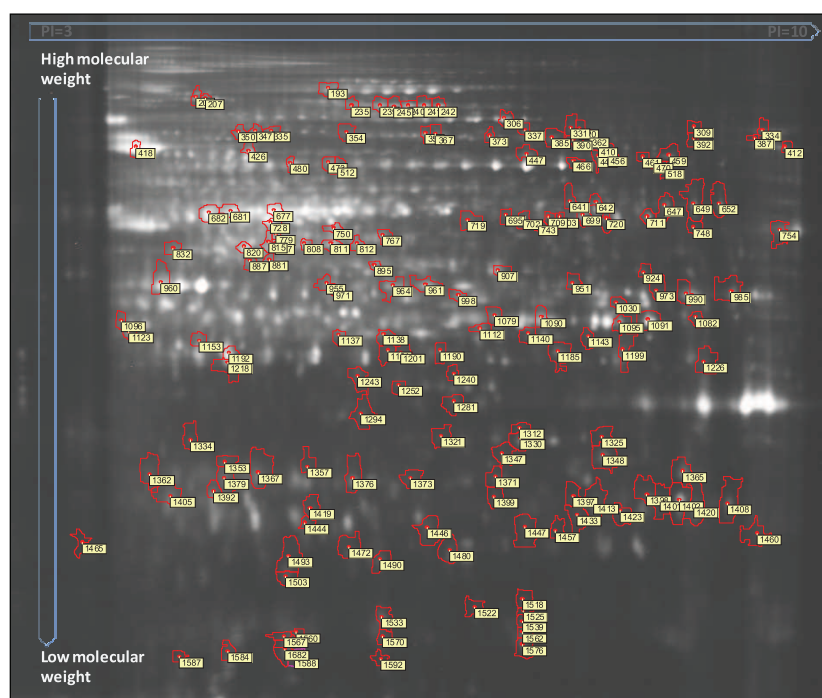


Figure 3. Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines cambiales de *Populus tremula* x *P. alba* génotype 717-1B4 marquée avec CyDye 2. Les spots différentiels au cours de l'expérience sont indiqués avec leur numéro de spot.

3. Results

3.1 Physiological results

The **predawn leaf water potential** (Ψ) of control plants was equal to -0.3 MPa throughout the experiment (Table 1). Plants submitted to the heat gradient treatment exhibited a decrease of this parameter at the end of the pretreatment (day 3, 30°C), with a value of -0.36 MPa. Subsequently, after 48h at 42°C (day 5), Ψ continued to decrease and reached -0.38 MPa. In the case of the heat shock treatment, the decrease is significantly higher, attaining -0.52 MPa on day 5. After the 7 days recovery period, the heat treated plants displayed the same Ψ as the one observed in control plants.

The **photosynthetic rate** (P_N) of control plants was equal to 15.4 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ throughout the experiment. On day 3, the HG pretreatment caused a significant 14% reduction of P_N . On day 5, the effect of HG and HS were very similar and caused a 21% reduction of P_N . However, after the 7 days of recovery, HG and HS treated plants behaved differently and exhibited significant differences in P_N . The P_N of HG treated plants remained significantly low (-18% compared to control) whereas the HS treated plants exhibited a higher P_N , although not significantly different.

The **stomatal conductance** (g_s) of control plants remained more or less constant around a value of 235.7 $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ throughout the experiment. On day 3, the HG pretreatment increased g_s by 29%. At 42°C, on day 5, HG- and HS treated plants had higher g_s than control, respectively 297.5 and 323 $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ but no statistical difference occurred between treatments. After the recovery period, treated plants returned to control value.

The **water** content (WC) of the stems collected on control plants was 52.5%. In HG plants this parameter diminished significantly after the heat pretreatment, a decrease that was maintained after 48 h at 42°C, with a value of 49.4%. The recovery period led to a return to control value. The HS treatment did not significantly affect stem WC.

The leaves **RWC** was of 87.9% in control plants. The HG treatment had a significant effect after the heat pretreatment (78.9%) and at 42°C (75.7 %). After the recovery period, RWC of HG treated plants again reached the value of the control plants. The HS treatment did not affect leaf RWC.

Table 1. Time course of physiological parameters of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 submitted to a Heat Gradient (progressive increase of temperature from 22°C to 30°C within 72 h followed by 48 h at 42°C) or to a Heat Shock treatment (48 h at 42°C), followed by a 7 days recovery period at 22°C. Given is the average value from 4 replicates $\pm$ the standard error. The letters a,b,c & d indicate statistical differences between means at 5% level.

Temperature	Day 0	Day 3		Day 5		Day 12 (Recovery)
	22°C	22°C	30°C	22°C	42°C	22°C
Predawn leaf water potential (MPa)						
Control	-0.31 $\pm$ 0.01 (a)	-0.31 $\pm$ 0.01 (a)	—	-0.31 $\pm$ 0.01 (a)	—	-0.30 $\pm$ 0.01 (a)
Heat Gradient	-0.31 $\pm$ 0.01 (a)	—	-0.36 $\pm$ 0.01 (b)	—	-0.38 $\pm$ 0.01 (c)	-0.32 $\pm$ 0.02 (ab)
Heat Shock	-0.31 $\pm$ 0.01 (a)	-0.31 $\pm$ 0.01 (a)	—	—	-0.53 $\pm$ 0.01 (d)	-0.35 $\pm$ 0.02 (abc)
Photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)						
Control	15.4 $\pm$ 0.1 (a)	15.4 $\pm$ 0.6 (a)	—	16.2 $\pm$ 0.3 (a)	—	15.1 $\pm$ 0.5 (a)
Heat Gradient	15.4 $\pm$ 0.1 (a)	—	13.3 $\pm$ 0.2 (b)	—	12.9 $\pm$ 0.2 (b)	12.4 $\pm$ 0.5 (b)
Heat Shock	15.4 $\pm$ 0.1 (a)	15.4 $\pm$ 0.6 (a)	—	—	12.8 $\pm$ 0.3 (b)	18.2 $\pm$ 1.0 (a)
Stomatal conductance ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)						
Control	227.8 $\pm$ 12.7 (a)	227.3 $\pm$ 9.9 (a)	—	239.5 $\pm$ 8.9 (a)	—	248.3 $\pm$ 17.2 (ac)
Heat Gradient	227.8 $\pm$ 12.7 (a)	—	293.3 $\pm$ 14.5 (bd)	—	297.5 $\pm$ 9.1 (bc)	288.3 $\pm$ 14.7 (abd)
Heat Shock	227.8 $\pm$ 12.7 (a)	227.3 $\pm$ 9.9 (a)	—	—	323.0 $\pm$ 22.6 (b)	241.5 $\pm$ 9.0 (ad)
Stem water content (%)						
Control	52.4 $\pm$ 0.4 (a)	52.5 $\pm$ 0.5 (a)	—	52.7 $\pm$ 0.5 (a)	—	52.2 $\pm$ 0.3 (a)
Heat Gradient	52.4 $\pm$ 0.4 (a)	—	50.3 $\pm$ 0.7 (b)	—	49.4 $\pm$ 0.9 (b)	50.8 $\pm$ 1.0 (ab)
Heat Shock	52.4 $\pm$ 0.4 (a)	52.5 $\pm$ 0.5 (a)	—	—	51.6 $\pm$ 0.3 (a)	54.3 $\pm$ 1.0 (a)
Leaf relative water content (%)						
Control	86.7 $\pm$ 2.1 (ad)	87.0 $\pm$ 1.3 (ad)	—	88.6 $\pm$ 1.4 (ad)	—	89.1 $\pm$ 0.8 (a)
Heat Gradient	86.7 $\pm$ 2.1 (ad)	—	78.9 $\pm$ 2.2 (bc)	—	75.7 $\pm$ 2.0 (b)	90.3 $\pm$ 1.7 (a)
Heat Shock	86.7 $\pm$ 2.1 (ad)	87.0 $\pm$ 1.3 (ad)	—	—	83.6 $\pm$ 1.9 (cd)	87.3 $\pm$ 0.6 (ad)

3.2 Proteomic results

The Impact Factor (IF) on protein abundance was calculated as the ratio of the volume of protein spots between different conditions (Table 2). When positive, the ratio or IF constituted an induction factor under metal stress; when negative, it constituted an inhibition factor on protein abundance. Analysis of the 2D gels realized for HS and HG treatments in leaf and cambial zone for days 3, 5 and 12 resulted in the detection of 109 leaf protein spots and 146 cambial protein spots that changed in abundance under the different heat treatments (Figures 2 & 3).

In the leaf tissue, after the HG pretreatment 14 proteins were more abundant upon heat stress while 14 showed a reduced volume. At the end of the 42°C period (*i.e.* at 5 days), 14 proteins were more abundant, 30 others were less abundant. After recovery, 15 spots showed a greater volume whereas 8 showed a reduced volume. The HS treatment, after 48

h at 42°C, caused the increased abundance of 29 proteins and the reduced abundance of 9 proteins. After recovery there were 19 up regulated spots and 9 down regulated spots.

In the cambial tissue, the HG pretreatment (day 3) resulted in 38 spots to be more abundant and 10 others to be less abundant. After 42°C, 32 more abundant proteins and 57 less abundant proteins were observed. After recovery to HG, 15 cambial proteins increased in quantity, 4 decreased. In the cambial tissue, HS induced 35 proteins while 59 were reduced. After recovery to HS, all the 27 differential proteins were increased in quantity.

Among the 109 leaf protein spots, 79 were confidently identified (Table 2). Among the 146 cambial proteins, 131 were confidently identified (Table 3). The 16 leaf spots and the 9 cambial spots containing more than one protein are presented in the supplementary data (Tables S1 & S2). Some spots showed the same behavior under HG and HS conditions, while some could be specifically related to one or the other treatment (cf figure 4). The recovery period was characterized by salient changes in proteins involved in photosynthesis in leaf tissue and for osmotin in cambial tissue when comparing HG and control plants. At the same date, in HS treated plants, the changes occurred in photosynthesis and carbohydrate metabolism in leaves, and in protein metabolism, HSP, oxidoreductases and C1 pathway in the cambial zone.

In the particular case of the spot 2083 of the leaf proteome, which was identified as an oxygen evolving enhancer protein 1, the spectra analysis enables the identification of a non-tryptic peptide with a m/z equal to 1381.76. Manual sequence determination resulted in the sequence "AYGESANIFGKPKT" corresponding to the peptide 77-89 of the identified protein. Submitting the entire sequence of the protein to software tools aimed at identifying signal sequences resulted in a shorter signal peptide, residue 1-38 instead of 1-76. However looking at homologous proteins from other species indicated the transit peptide in some of the other species is indeed corresponding to the sequence identified in this experiment, for instance GI:11134156, thereby confirming the plastidic localization of the protein. No similar features were observed in others spots.

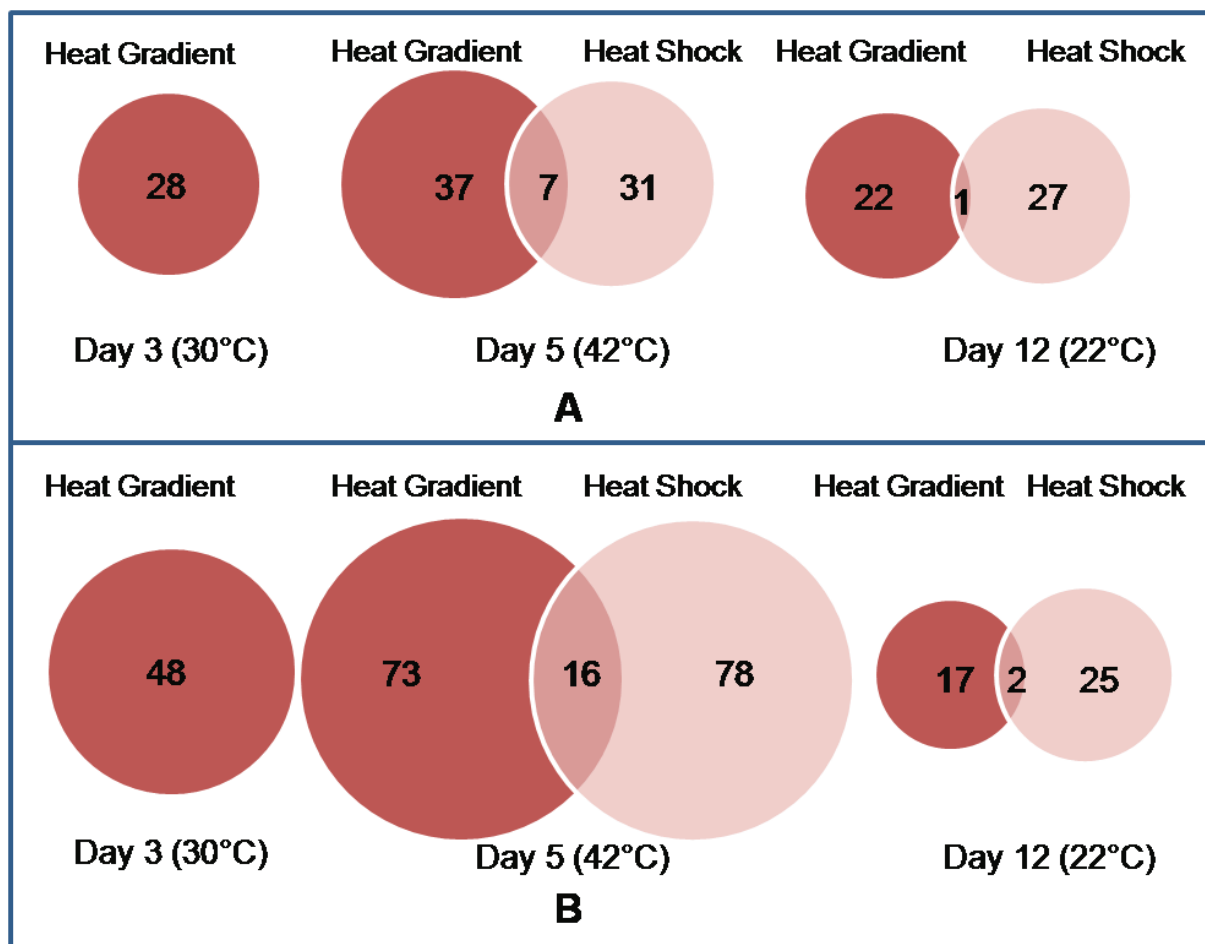


Figure 4. Venn diagram of differentially expressed proteins in leaf (A) and cambial zone (B) of *Populus tremula* x *P. alba*, genotype 717-1B4 at the end of the heat treatment (day 5) or at the end of the recovery period (day 12). Plants were exposed to a heat shock (48 h of exposure to 42°C) or to a heat gradient (3 days heat pretreatment from 22°C to 30°C, then 48 h at 42°C)

Discussion

The first step of the heat-induced impairment on plant physiology is commonly considered to be a reduction of the photosynthetic rate. Several mechanisms alone or in combination have been proposed to describe the influence of high temperatures on photosynthesis, *e.g.* heat-inhibition of RuBisCO activase, unfolding of PSII related proteins, and destabilization/destacking of the thylakoid membranes (Salvucci et Crafts-Brandner 2004; Tang *et al.* 2007). Therefore, the decrease of the photosynthetic rate registered at 30°C and 42°C is not surprising (Table 1). At the same time, the heat treatments caused significant increases of the stomatal conductance: the well-watered poplar plants opened their stomata, very likely for transpirational cooling. The decreased P_N observed under both treatments is then uncorrelated with the higher stomata opening, and indicates a thermal alteration of the photosynthetic machinery. Through a stimulated stomatal conductance, and despite an optimal water supply in the soil, the HG treatment impacted water fluxes in the plant. Indeed, the water content of leaves and stems were decreased compared to control plants growing at 22°C. The HS did not have such an effect (Table 1). In this regard, leaf and stem water content seems to be affected by the duration rather than by the intensity of the thermal constraint, which suggests that the regulation of these parameters is linked to acclimation processes.

Leaf tissue is the site of the plants nourishment. Water in the soil-plant-air continuum is of paramount importance for the functioning of the photosynthetic machinery and the exchange of CO₂ and O₂ between the ambient air and the tissues. At 30°C as well as at 42°C and for HG as well as for HS, the predawn leaf water potential was decreased. At 42°C the HS had a significantly greater effect on Ψ than the HG. This indicates a stronger binding of water to leaf tissues under HS, notwithstanding the unaffected water content. Thus, HG and HS resulted in contrasting physiological effects, which is to be related to contrasting proteome changes.

The intermediate timescale of the results presented here (48 h) focused on a proceeding acclimation. Hydric parameters of sugarcane leaves exposed to 40°C are reported to acclimate within 24 h, sharp impact in the first 12 hours followed by a gradual return to control values (Wahid et Close 2007). Therefore, in our samples the early stages of stress sensing and signaling were probably finished after 48h at the respective elevated

temperatures. The plants were withstanding the constraint by metabolic adjustment. Acclimation mechanisms are thus expected to be active and this explains, at least partly, the differences observed between HS and HG.

Leaf proteome response to heat

Photosynthesis

The heat gradient treatment negatively impacted the abundance of RuBisCO at 30°C and 42°C (spots 1357, 1805, 2020 and 2383, Table 2). Together with the reduced intensity of a RuBisCO activase (spot 1604), this consists of a classical response to heat exposure ([Salvucci et al. 2006](#)). This effect ceased after 7 days of recovery (Table 1). Applying a heat shock affected RuBisCO in an opposite way by increasing the intensity of 3 spots (spots 1354, 1695, 1707), 2 spots were also up-regulated after recovery (spots 1707 and 2072). Similarly, a RuBisCO activase containing spot was more intense at 42°C and recovery (spot 1604), while another was less abundant at recovery (spot 1791). These changes are in agreement with the higher photosynthetic rate at recovery in plants subjected to heat shock. The oxygen evolving complex was particularly affected by HS, with 2 spots of Oxygen Evolving Enhancer protein 1 (OEE1) and 2 containing OEE2 (spots 1661, 1671, 2083 and 2114) more abundant at 42°C; 2 OEE1 (spots 1651 & 1661) also increased in amount after recovery. One light harvesting complex II, protein 1 (Lhcb 1), (spot 1921) was more abundant at 42°C under both HG (IF = 1.59) and HS (IF= 1.89). The HG induced fewer changes in the chloroplastic electron transport chain, *e.g.* the increased abundance of an OEE1 (spot 1339) at 42°C and the reduced abundance of a Lhca1 after recovery (spot 2222). Hence the PSII seems particularly prone to rearrangement, especially under HS, a result consistent with the high thermolability of PSII reported in literature ([Chen et al. 2004](#); [Tang et al. 2007](#)). In general there is an increased abundance of the photosynthesis related proteins in heat shocked plants, this increase may serve to compensate for its loss of activity ([Yamori et al. 2006](#)), but did not enables the plant to keep a P_N equal to control during the heat shock. However after a 7 day recovery period the photosynthetic rate of heat shocked plants was higher than that of plants exposed to a heat gradient. The higher abundance of RuBisCO protein in heat shocked plants may have an importance in the priming for protection against future constraint. This

could be due to the control of RuBisCO level which is supposed to be exerted by adjustment of biosynthetic, rather than proteolytic pathways (Irving et Robinson 2006).

Carbohydrate metabolism

During HG treatment a decreased abundance in some key enzymes of the carbohydrate metabolism was noticed. The intensity of spots containing phosphoglycerate kinase (spot 1094) and in particular fructose biphosphate aldolase was reduced at 30°C (spots 1162, 1101 & 1108), and 6 at 42°C (*ibid* + spots 1165, 1171 & 1212), were reduced. HS had a totally different effect on this metabolism. No significant changes were observed during the heat treatment itself but 2 fructose biphosphate aldolase-containing spots were increased after recovery period (spots 1176 & 1155) as were 2 sedoheptulose biphosphatase (spots 1161 & 1170). Fructose biphosphate aldolase was recently shown to be up-regulated in heat-acclimated *Agrostis scabra* (Tian et al. 2009). The leaf sugar concentration has been correlated to the optimum temperature of electron transport (Hüve et al. 2006).

Protein folding

The HG did not affect any identified proteins involved in the protein folding function. On the other hand, the HS caused a lasting decreased abundance of a nascent polypeptide associated complex alpha subunit (NAC, spot 1402) involved in the *de novo* folding of proteins (Hartl et Hayer-Hartl 2009). No role in stress has yet been found for this protein. Mutants lacking NAC did not exhibit any obvious defects in protein degradation (Andersen et al. 2007). The HS also caused an increased quantity of 2 proteins identified as groES chaperonin (spots 1955 & 1980), so named from their ability to bind bacterial groEL. Overexpression of the groESL operon enhances the heat and salinity stress tolerance of the cyanophyceae *Anabaena* (Chaurasia et Apte 2009). The plant proteins homologous to bacterial groES, referred to as cpn20 or cpn21, are plastid specific (Weiss et al. 2009). A cpn20 was shown to decrease in amount during high light stress in sensitive *Chlamydomonas reinhardtii* (Förster et al. 2006) whereas a cpn10 showed a transient increased expression in *P. euphratica* submitted to heat (Ferreira et al. 2006). From these proteomic changes we can not conclude on the precise effect of HS on protein folding because much is still to be learned about the behavior of co-chaperonin in cellular stress (Kawe et Plückthun 2006).

Oxidoreduction

Both HG and HS induced a decrease in amount of one glycolate oxidase at 42°C (GLO, spots 2127 & 1364). HG also caused the increased in quantity of another GLO after recovery (spot 1365). The GLO is a key enzyme of photorespiration that precludes the accumulation of toxic glycolate (Zelitch *et al.* 2009) and provides an alternative sink for excess electrons (Allan *et al.* 2009) but the protein is also known to cause oxidative stress (Fahnenstich *et al.* 2008). According to Rizhsky *et al.*, the overexpression of a GLO induced during a drought stress in *Nicotiana tabacum* was suppressed by the combination of drought and heat stress (Rizhsky *et al.* 2002). The HS treatment also resulted, after reestablishment of the normal growth temperature, in the increased abundance of 2 hydroxypyruvate reductase (spots 1178 & 1199) which is the last enzyme of the glycolate pathway (Allan *et al.* 2009).

At 42°C, the HS induced an increased in abundance of 3 peroxiredoxin (spots 2070, 2074 & 2393). One is a mitochondrial IIF peroxiredoxin (spot 2393), so far reported not to be substantially affected by abiotic stress in poplar (Gama *et al.* 2007). Peroxiredoxins have been reported to be overexpressed in *Arabidopsis* under combined heat and drought stress (Rizhsky *et al.* 2004) and to accumulate during cold acclimation of *P. tremula* x *P. tremuloides* (Renaut *et al.* 2004). Under heat stress, the photorespiration of poplar plants appeared to become an issue; the redox homeostasis was modified in several cell compartments.

Other leaf proteome changes

The HG caused the decreased abundance of a germin-like protein (spot 2135), while two other spots containing a germin-like protein (spot 2195 and 2236) had an increased abundance under these conditions. Germins are a family of diverse and ubiquitous proteins (Bernier *et al.* 2001). Some are thermostable apoplastic proteins with a proposed role of H₂O₂ production in plants' defense pathway (Carter *et al.* 1998). Some germins have been shown to possess oxalate oxidase activity (Pan *et al.* 2007) or SOD activity (Gucciardo *et al.* 2007). Although the exact role of germins is not completely understood they are thus generally considered to combine redox, structural and/or receptor functions (Bernier *et al.* 2001). Under HG, the quantity of SHOOT1 was decreased (spot 1446), this is a protein with no defined function (Majeran *et al.* 2005). It has been associated with stabilization of

chloroplast mRNA, with PSI assembly (Boudreau *et al.* 2000). The HS induced an augmented abundance of a plastid-lipid-associated protein (spot 1638). This protein has an effect on plastid structure (Rey *et al.* 2000), confirming the impact of heat shock on plastid membranes.

Cambial proteome response to heat

Carbohydrate metabolism

HG and HS treatments had very contrasting effects on the carbohydrate metabolism in the cambial zone. The HG treatment resulted in a global increase of the abundance of glycolysis/glucogenesis enzymes at 30°C: 2 fructose biphosphate aldolase (spots 985, 1079), 3 triosephosphate isomerase (1373, 1399 and 1376), 5 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (spots 1082, 1091, 1095, 1138 and 1140). At 42°C, this effect was diminished, with only 4 up regulated spots: 1 triosephosphate isomerase (spot 1376), 1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (spot 1090), 1 phosphoglucomutase (spot 480) and 1 enolase (spot 677).

HS had above all a strong negative effect on sucrose synthase abundance (spots 235, 239, 240, 241, 242, 245, 347). The overexpression of sucrose synthase has been reported to be linked with heat tolerance in *Agrostis* (Xu *et al.* 2008) and with cold tolerance in Chickpea (Kaur *et al.* 2009b). The decreased observed here may be a sign of thermosensibility of poplar cambium.

The HS induced the decreased abundance of other enzymes, a transketolase (spot 335), a beta-D-glucosidase (spot 412) and a rhamnose biosynthesis 1 (spot 390). The ratio in spot intensity of most spots between control and heat shocked plants returned to 1 after the recovery period in the cambial tissue in contrast to the observations in leaves.

Taken together these data suggest an adaptive mechanism in the HG treatment, an increased use of sugars to supply the increasing demand for energy required for metabolic adjustments. This kind of response exists during water stress (Xue *et al.* 2008; Regier *et al.* 2009), and besides, HG treatment triggered changes in water content of leaves and stem that may have mimic a water deficit.

Protein metabolism

Under HG, several enzymes involved in protein degradation were affected. These include a putative amino peptidase (spot 207), a proteasome α subunit (1348) and a 26S proteasome RPT4a subunit (spot 951) that was more abundant only at 42°C. After recovery, the up and down regulations of a putative adenosine kinase (spot 1123) and a Arg/Ser rich splicing factor (spot 1446), respectively, do not help to assess the kind of response of protein metabolism to HG. The response to HS was clearer with a reduced abundance of several enzymes involved in protein synthesis (spots 807, 811, 815, 881, 456, 461, 812, 193), except for a translation initiation factor 5 (spot 1587). The effect on the protein degradation is more mitigate, with an increased quantity of a 26S proteasome RPT4a subunit (spot 924) and a reduced quantity of a serine protease (337), the former constituting a common response with HG.

Protein folding

The expression of heat shock proteins (HSP) is the most frequently documented response of plants to heat ([Baniwal et al. 2004](#)). The HG treatment induced the increased abundance of a HSP 20 (spot 1682) at 30°C and 42°C and of a 18.5 kDa HSP (spot 1570) at 42°C. The HS triggered stronger changes in HSP's levels; 4 spots of HSP increased in intensity with a ratio up to 38.9 (spots 1682, 1592, 1570 and 1576). The weak induction of HSP by HG was unexpected, given that it is proposed to explain the acquired tolerance provided by heat pretreatment ([Charng et al. 2006](#)). This may indicate that other molecular adjustments induced by the temperature gradient eliminated the need for the massive induction of proteins required to protect the plant from cellular damage ([von Koskull-Döring et al. 2007](#)). Therefore these plants do not have to dissipate the energy required for protein synthesis as the heat shocked plants.

Stress protein / defense

The prominent feature of the cambial response to HG was the accumulation of thaumatin-like proteins, especially at 30°C. These are pathogenesis related proteins. Hence were up-

regulated one thaumatin-like cytokinin-binding protein (spot 1420), osmotin-like proteins (spot 1397, 1398, 1401, 1402, 1413, 1423 & 1433) and zeamatin (spot 1408). Conversely the HS caused a decreased abundance of 2 osmotin-like at 42°C (spots 1401 & 1402). Osmotin-like proteins are known to play a role in the drought tolerance (Parkhi *et al.* 2009) and the cold tolerance (D'Angeli *et al.* 2007). Some osmotins are expressed under salt stress, (Tachi *et al.* 2009) or under combined drought and heat stress in *Arabidopsis* (Koussevitzky *et al.* 2008). Some "stress-inducible proteins" were increased in abundance by HG and HS (spots 367 & 373). They possess a TPR-1 region and a Heat shock chaperonin-binding motif. A remarkable finding is that a glycine-rich protein (spot 1490), a cell wall associated protein containing a cold shock and nucleotide-binding domain (Graumann *et al.* 1998) is specifically upregulated in the HS treatment. This family of proteins, conserved in both eukaryotes and bacteria (Karlson *et al.* 2003), has been linked to heat stress, probably used for the stabilization of the stress induced-transcripts (Sahi *et al.* 2007). The significant and high IF observed in our experiment may suggest a similar role for this protein during heat stress in poplar.

Oxidoreduction

HG induced a rise in content of redox enzymes 2-peroxiredoxins (spots 1539, 1562) but a decline in quantity of proteins involved in the ascorbate-glutathione cycle: dehydroascorbate reductase (spot 1472), ascorbate peroxidase (spot 1362) and glutathione-S-transferase (spot 1447). An aldo/keto reductase (spot 1137) was more abundant at 30°C and 42°C, this enzyme is related to osmoregulation and to desiccation and freezing tolerance (Olsen *et al.* 2008).

The HS caused a strong increase in abundance (ratio up to 94) of the same peroxiredoxins affected by HG (1539 and 1562) plus a third one (spot 1588). Some peroxiredoxins were overexpressed under combined drought and heat stress in *Arabidopsis* (Rizhsky *et al.* 2004). A thioredoxin reductase 2 was less abundant at 42°C (spot 1243). HS also had an impact on polyamine oxidase (PAO), with 2 spots reduced in intensity (748 & 720) and one increased (652) at 42°C whereas 2 others were more intensely stained for recovery samples (spots 647 and 649). PAO are H₂O₂ producing enzymes implied in wound healing (Angelini *et al.* 2008).

One-carbone pathway (Photorespiration).

HG had an ambiguous effect on photorespiration enzymes (spots 410 & 702) while HS induced a clear reduction in quantity of a formate-tetrahydrofolate ligase (spot 466) and 5 serine hydroxymethyltransferase (SHMT, spots 695, 699, 702, 709 and 743). Active C1 metabolism has been described in non-photosynthetic tissues of aspen (Wang *et al.* 2004b). The role of SMHT besides photorespiration-related containment of ROS production in the chloroplast has been proposed to consist in giving priority to purine synthesis over amino acid metabolism so as to improve DNA repairing (Fox et Stover 2008). SHMT has been shown to decrease in quantity in roots of *Agrostis* exposed to heat (Xu et Huang 2008). This decreased was attributed to limitation of protein synthesis.

Miscellaneous

The other proteins affected by heat are involved in several functions. HG responsive spots (1218 & 1252), related to the cytoskeleton and cell wall synthesis suggest a reinforcement of the cell wall formation after HG recovery. HG caused an increase in the amount of tropinone reductase (spot 1365), an enzyme reported to be involved in the response to salt stress in *P. euphratica* (Gu *et al.* 2004). The HS also caused some changes in the secondary metabolism (spots 1405 & 1480).

Finally, heat induced changes in some proteins related to signaling, most of them have similarities to GTP-binding proteins (spots 1199, 1201, 1330, 1347). The changes in abundance of one dead box ATP-dependent RNA helicase in both treatments (spots 362 & 385) associated to the increased in a glycine-rich protein suggests an alteration in RNA metabolism under HS (Cordin *et al.* 2006). A link between dead box RNA helicase and stress tolerance has previously been pointed out (Vashisht et Tuteja 2006).

Conclusion

A huge amount of proteins are reported to be related to stress response, sensitivity or tolerance. In general the relationship stress-protein is non-specific as most of the proteins

are involved in several stress contexts. The present study draws some particular trends of the poplar response under two heat constraint modalities. The plant response to 'heat gradient' or 'heat shock' treatment showed contrasted features, and leaf response was very different from cambial response. In leaves photosynthesis and carbohydrate related proteins represented the major changes. HS induced HSP and antioxidant proteins like peroxiredoxin whereas HG induced germin-like proteins. These changes did not persist after the end of the heat constraint. In the cambial zone the metabolisms of carbohydrate and proteins were the most altered by heat. The salient features were a sucrose synthase and a serine hydroxymethyl transferase inhibition by HS accompanied by the induction of HSP whereas the HG induced enzymes of glycolysis/gluconeogenesis and caused the accumulation of osmotin-like proteins.

After recovery few proteins were still significantly affected by the treatments. In both leaf and cambial proteomes, the HS triggered more sustainable changes than HG. This suggests that the proteic fraction studied here was more involved in the setting-up of an acquired tolerance when it is induced by HS. Leaf and cambial zone exhibited differences in the sustained changes that occurred. Sketchily, leaf proteome displayed lasting changes in the abundance of carbohydrate metabolism proteins or of hydroxypyruvate reductase, whereas, in cambial zone, the lasting changes concern HSP, polyamine oxidases and peroxiredoxins.

Table 2. Differentially expressed proteins in the leaf proteome of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 exposed to 42°C during 48h after a heat pretreatment consisting in a progressive increase in temperature (Heat gradient), or directly from 22°C (Heat shock). The average ratio of the protein abundance was calculated between treated and control plants, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$. In this table, only the significant values have been indicated.

Spot number ¹	Leaf protein identifications ²	Heat Gradient				Heat Shock				Protein score ³	Accession Number		No of peptides	Sequence coverage (%)	
		Day 3: pretreatment (30°C)		Day 5: 42°C		Day 12: Recovery		Day 5: 42°C			EST ⁴	NCBI ⁵			
		Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value						
Photosynthesis															
1357	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	-1,75	0.014	-1,52	0.0044					153 (+110)	gi 50062249	GI:209867579			
1805	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Misodendrum linearifolium]	-1,44	0.025	-1,27	0.036					166	gi 532207	gi 532207	4	42	
2020	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Ascarina cursii]	-1,64	0.044							192	gi 30143319	gi 30143319	3	41	
2383	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Ixerba brexioides]			-1,74	0.019	-1,62	0.035			274	gi 4530132	gi 4530132	5	24	
2188	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chloranthus serratus]	1,51	0.037			1,32	0.027			166	gi 30143303	gi 30143303	3		
1756	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Leptopus chinensis]					1,72	0.022			106	gi 55792693	gi 55792693	3	38	
1354	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit							1,96	0.021	128 (+107)	gi 50062249	GI:209867579	5	54	
1695	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Populus alba]							2,47	0.023	322	gi 110227087	gi 110227087	7	50	
1707	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Leptopus chinensis]							8,16	0.003	298	gi 532207	gi 532207	7	52	
2072	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Strychnos spinosa]									509	gi 167891466	gi 167891466	6	45	
1444	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Duguetia sessilis]					1,19	0.026			424	gi 60101630	gi 60101630	5	27	
1791	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2									337	gi 50061059	GI:12620883	4	60	
1604	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplast			-1,29	0.014			1,47	0.012	234	gi 73874006	GI:223536483	2	54	
1709	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic			-1,47	0.018					557	gi 131384	gi 131384	7	13	
2222	Light-harvesting complex I protein Lhca 1 [Populus trichocarpa]					-1,38	0.028			198	gi 224109746	gi 224109746	4	28	
1921	Light-harvesting complex II protein Lhcb1 [Populus trichocarpa]			1,59	0.011			1,89	0.035	308	gi 224083006	gi 224083006	7	79	
1339	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor [Bruguiera			1,44	0.0044					207 (+78)	gi 57892741	GI:119952178	2	55	
1651	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor [Bruguiera gymnorhiza]									300	gi 190898996	gi 190898996	3	34	
1661	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor [Bruguiera gymnorhiza]							1,82	0.028	443	GI:119952178	GI:119952178	7	46	
1671	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor [Bruguiera gymnorhiza]							1,63	0.0095	284	GI:119952178	GI:119952178	6	40	
2083	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor, putative							1,53	0.0057	402	GI:223539254	GI:223539254	8	47	

2114	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor, putative [Ricinus communis]	1.6	0.0046			352	GI:223539254	7	47
2359	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit,	3.97	0.0054	1.48	0.031	353	gi 50064700	4	41
Carbohydrate metabolism									
1162	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]			-1.55	0.044	-1.64	0.025	6	50
1165	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]					-1.5	0.046	6	50
1171	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]					-1.67	0.049	6	50
1101	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]			-1.66	0.025	-1.7	0.019	8	43
1108	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]			-1.74	0.046	-1.84	0.034	8	44
1212	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Arabidopsis thaliana]					-1.56	0.041	3	28
1176	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]							2	39
1155	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]							7	48
1161	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast, putative [Ricinus communis]							6	55
1170	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast, putative [Ricinus communis]			-1.11	0.05			7	36
1094	Phosphoglycerate kinase, putative [Ricinus communis]			-1.43	0.042			7	40
1058	Phosphoglycerate kinase, putative [Ricinus communis]							5	54
1109	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]							3	39
1938	Triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis]							4	42
Nitrogen & protein metabolism									
910	Alanine aminotransferase [Vitis vinifera]							7	55
1402	Nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative [Ricinus communis]							3	37
1955	Groes chaperonin, putative [Ricinus communis]							2	51
1980	Groes chaperonin, putative [Ricinus communis]							3	48
TCA cycle									
1311	Malate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]							5	36
1355	Malate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]							7	36

Oxidoreductase											
1365	Glycolate oxidase [Mesembryanthemum crystallinum]			1.57	0.041		107 (+23)	gi 56832359	GI:1773330	4	64
2127	Glycolate oxidase [Mesembryanthemum crystallinum]	-1.43	0.034				128	gi 52397976	GI:1773330	4	61
1178	Hydroxypyruvate reductase [Bruguiera gymnorhiza]						234 (+48)	gi 73870709	GI:13873334	4	57
1199	Hydroxypyruvate reductase, putative [Ricinus communis]						234		GI:223528624	7	46
1364	Peroxisomal glycolate oxidase [Glycine max]						123 (+20)	gi 56831342	GI:167961875	4	48
2070	Peroxioredoxins, prx-1, prx-2, prx-3, putative [Ricinus communis]						356		gi 223530313	4	36
2074	Peroxioredoxins, prx-1, prx-2, prx-3, putative [Ricinus communis]						312		gi 223530313	7	36
2393	Type IIF peroxiredoxin [Populus trichocarpa]						155	gi 33454235	GI:224144638	4	44
Miscellaneous											
1472	Predicted protein [Populus trichocarpa]	1.58	0.04				185	gi 73887416	GI:224073126	8	47
2423	Predicted protein [Populus trichocarpa]						107	gi 23997351	GI:224112154	3	58
2392	RPL12-A (RIBOSOMAL PROTEIN L12-A); structural constituent of ribosome [Arabidopsis thaliana]	-1.52	0.013				261		GI:15232274	7	36
1275	Alcohol dehydrogenase, putative [Ricinus communis]			1.3	0.02		549		GI:223535342	5	67
1446	Putative SHOOT1 protein [Oryza sativa Japonica Group]	-1.28	0.0077				183		GI:50509325	3	44
1638	Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic						338		GI:62900641	8	43
1875	Class IV chitinase [Galega orientalis]						191	gi 57894052	GI:33414046	4	55
2135	Germin-like protein [Chimonanthus praecox]	-1.63	0.016						GI:157058854	3	12
2195	Germin-like protein [Chimonanthus praecox]	1.69	0.038				132	gi 52530576	GI:157058854	5	18
2236	Germin-like protein [Chimonanthus praecox]	1.5	0.021				76	gi 52398886	GI:157058854	4	39

1: spot number on the master gel
2: Protein obtained by blasting the EST against the NCBI nr database
3: MASCOOT score (protein score as given by the GPS software (Applied Biosystems)). Between brackets: value of ion score determined manually
4: Accession number of the EST sequence in the NCBI nr database
5: Accession number of the corresponding protein in the NCBI nr database
6: Average ratio of the protein abundance (Treated/Control). Positive values of ratio are given as such, negative values are given according to the following formula: given value = -1/average ratio
7: p-value of Student's t-test.

Table 3: Differentially expressed proteins in the cambial zone proteome of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 exposed to 42°C during 48h after a heat pretreatment consisting in a progressive increase in temperature (Heat gradient), or directly from 22°C (Heat shock). The average ratio of the protein abundance was calculated between treated and control plants, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. In this table, only the significant values have been indicated.

Spot number ¹	Cambial protein identifications ²	Heat gradient				Heat Shock				Protein score ³	Accession Number		No of peptides	Sequence coverage (%)	
		30°C		42°C		42°C		Recovery			EST ⁴	NCBI ⁵			
		Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value						
Carbohydrate metabolism															
235	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.6	0.028			333 (+88)		gi 158635120	7	44	
239	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.69	0.009			352		gi 158635120	6		
240	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.99	0.013			436		gi 158635120	6	44	
241	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.7	0.0077			315 (+55)		gi 158635120	5	44	
242	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.74	0.0017			311		gi 158635120	6	49	
245	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.99	0.0031			371 (+41)		gi 158635120	7	49	
347	Sucrose synthase [Populus tremuloides]					-1.95	0.0023			170		gi 158635120	5	33	
335	Transketolase 1 [Capsicum annuum]					-1.36	0.024			208		GI:223548870	7	38	
390	RHM1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 1)					-1.43	0.016	1.41	0.019	112	gi 15231926	GI:15218420	5	28	
412	Beta-D-glucosidase [Gossypium hirsutum].					-2.62	0.0081			97	gi 73871392	GI:33391721	4	36	
480	Phosphoglucosyltransferase, cytoplasmic (PGM) (Glucose phosphomutase)									467		gi 12585330	8	72	
641	Pyruvate kinase [Glycine max]	2.03	0.0031	1.9	0.026			1.41	0.043	109 (+132)		GI:22296818	5	43	
973	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Solanum tuberosum]							1.38	0.043	129	gi 73878080	GI:78191410	3	53	
985	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Solanum tuberosum]	1.72	0.03							529		gi 118482443	7	67	
1079	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Arabidopsis thaliana]	1.33	0.027							280 (+33)	gi 24080307	GI:186505865	6	83	
1373	Triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis]	1.5	0.0076							194	gi 24066554	GI:223527042	4	63	
1399	Triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis]	1.34	0.011							123		GI:223527042	5	46	
1376	Triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis]	1.4	0.023	1.54	0.024					265	gi 57894878	GI:223527042	5	70	
1082	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Populus maximowiczii x Populus nigra]	2.12	0.049							265 (+35)	gi 24019046	GI:74419004	5	60	
1091	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Nicotiana tabacum]	1.52	0.046							159 (+24)		gi 118482565	3	56	
1095	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Nicotiana tabacum]	1.68	0.026							165		gi 118488824	4	60	
1112	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Nicotiana tabacum]	-1.4	0.031							273 (+24)		gi 118488824	6	60	
1138	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Nicotiana tabacum]	1.46	0.015							364 (+82)		GI:4539543	8	64	
1140	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.47	0.037							304 (+51)		gi 118488824	6	58	

[illegible]

[illegible]

720	Polyamine oxidase [Amaranthus hypochondriacus]		-1.44	0.00072				87 (+18)	gij 38580961	Gf:21217451	3	46
647	Polyamine oxidase, putative [Ricinus communis]		1.49	0.044				147 (+88)	gij 56818016	Gf:2223550531	4	56
649	Polyamine oxidase, putative [Ricinus communis]		1.44	0.025				125 (+42)	gij 38580961	Gf:2223550531	3	50
652	Polyamine oxidase, putative [Ricinus communis]		1.97	0.021				93		Gf:2223550531	4	47
Glutathione metabolism												
1472	Dehydroascorbate reductase [Sesamum indicum]	-1.53	0.0049	-1.46	0.024	-1.5	0.0049	486	gij 24009326	Gf:82698815	6	80
1447	Glutathione S-transferase [Medicago sativa]							84	gij 57888779	Gf:16416392	1	17
1379	Cytosolic ascorbate peroxidase [Vitis vinifera]							206		Gf:161778778	3	27
1362	Cytosolic ascorbate peroxidase [Vitis vinifera]	-1.57	0.0072	-1.7	0.0087			141	gij 73902626	Gf:161778778	3	34
1367	Cytosolic ascorbate peroxidase [Vitis vinifera]							148	gij 52396856	Gf:161778778	3	50
Cytoskeleton & cell wall												
955	Actin [Malva pusilla]		-1.39	0.037				676	gij 5230841		8	71
960	Actin [Stevia rebaudiana]			1.44	0.037			740	gij 118481204		8	86
1252	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase precursor XTH-30 [Populus tremula]		1.78	0.038				152	gij 124109197		3	47
One-carbone pathway												
410	10-formyltetrahydrofolate synthetase [Populus trichocarpa]	1.31	0.045					142	gij 224073194		3	40
466	Formate-tetrahydrofolate ligase (ADP forming) [Populus tremuloides]		-2.11	0.024				133 (+77)	gij 90186828	Gf:2507455	5	60
695	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]		-1.43	0.0043				153	gij 134142065		5	34
699	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]		-1.33	0.021				406	gij 134142065		8	43
702	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]	-1.37	0.011	-1.48	0.043			83	gij 134142065		3	30
709	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]		-1.37	0.0066				239	gij 134142065		6	36
711	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]		1.37	0.026				439	gij 134142065		8	53
743	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]		-1.47	0.042				126	gij 118481215		4	27
Citrate Cycle												
703	Mitochondrial lipamide dehydrogenase [Populus tremuloides]		-1.44	0.00037				294 (+64)	gij 27411349	Gf:134142802	7	75
1185	Putative mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase [Solanum tuberosum]	-1.39	0.041					276	gij 60710026	Gf:21388544	7	76
Signal transduction												
1199	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein		1.43	0.025	1.61	0.032		111	gij 24011821	Gf:3023858	5	59

1201	Fiber annexin [Gossypium hirsutum]	-1.42	0.0024	422	gj 118482646	7	58
Secondary metabolism							
1365	Tropinone reductase [Cochlearia officinalis]			102	gj 23977229	4	55
1405	Diene lactone hydrolase family protein [Arabidopsis thaliana]	1.48	0.0091	233	gj 90187928	4	52
1480	Flavoprotein wrbA, putative [Ricinus communis]	-1.87	0.026	287	GI:223542437	6	60
1218	Phenylcoumaran benzylic ether reductase [Populus trichocarpa]	1.58	0.027	188	gj 33453463	5	53
ATP synthesis coupled proton transport							
682	Mitochondrial beta subunit of F1 ATP synthase [Populus trichocarpa]	-1.35	0.0081	607	gj 224111564	8	62
Miscellaneous							
1096	GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein [Arabidopsis thaliana]	1.58	0.028	148	gj 23973657	4	31
367	stress-inducible protein, putative [Arabidopsis thaliana]	1.32	0.028	131 (+49)	gj 118487408	4	42
832	RPT3 (root phototropism 3); ATPase [Arabidopsis thaliana]	-1.56	0.021	203	GI:15237159	4	52
895	VEP1 (VEIN PATTERNING 1); binding / catalytic [Arabidopsis thaliana]			107	gj 50070561	2	52
1240	Unknown [Populus trichocarpa]	-1.84	0.029	91	gj 118481091	3	36
961	Alcohol dehydrogenase [Populus tremula]	1.37	0.0012	262	gj 52851054	6	67
964	Alcohol dehydrogenase [Populus tremula x Populus alba]	1.69	0.0038	263	gj 118486976	5	64
998	Alcohol dehydrogenase [Populus tremula]	1.57	0.018	214	gj 52851054	4	56
1321	Esterase/lipase/thioesterase [Medicago truncatula]	1.68	0.039	157	gj 38579897	2	53
1330	Ran3 GTP binding protein [Iberis amara]	1.4	0.048	156	gj 157467219	4	78
1347	GTP-binding protein [Cicer arietinum]	1.54	0.0063	287	GI:10334503	4	65
1353	Binding / catalytic/ coenzyme binding [Arabidopsis thaliana]	1.45	0.018	107	gj 56816733	3	33
1357	Aluminum-induced protein [Elaeis guineensis]	1.48	0.029	117	gj 38584549	4	48

- 1: spot number on the master gel
- 2: Protein obtained by blasting the EST against the NCBI nr database
- 3: MASCOT score (protein score as given by the GPS software (Applied Biosystems))
- 4: Accession number of the EST sequence in the NCBI nr database
- 5: Accession number of the corresponding protein in the NCBI nr database
- 6: Average ratio of the protein abundance (Treated/Control). Positive values of ratio are given as such, negative values are given according to the following formula: given value = -1/average ratio
- 7: p-value of Student's t-test.

3.7. Discussion et perspectives

L'exposition des plants de peupliers à la chaleur montre des effets significatifs sur la photosynthèse dès 30°C. Cette température n'a rien d'inhabituel lors des étés des régions tempérées ([Source Météo-France](#)) et ne représente *a priori* pas de danger en soi pour la survie des plantes. Cet effet significatif dès 30°C est peut-être à attribuer à la photopériode artificielle de la chambre de culture. En effet, dans la nature l'évolution de la photopériode au cours de l'année est corrélée à des changements dans la thermotolérance chez plusieurs espèces végétales ([Froux et al. 2004](#)). Par ailleurs, des variations quotidiennes de la thermostabilité du PSII sont liées à l'évolution des radiations solaires ([Braun et al. 2002](#)). On suppose que la thermotolérance acquise est initialement apparue pour répondre à la demande induite par les changements d'irradiation au cours de la journée ([Larkindale et al. 2005b](#)).

L'exposition à 42°C constitue une contrainte importante, relativement proche du seuil à partir duquel les dommages irréversibles se produisent ([Sharkey 2005](#)). La stabilité et l'activité de nombreuses protéines sont alors remises en cause, ce qui caractérise un état de stress. La réduction de la photosynthèse est donc un phénomène attendu à cette forte température. La synthèse de protéines chaperonnes, d'enzymes et d'antioxydants, l'expression de divers gènes de défense, l'augmentation de la photorespiration sont autant de causes qui réduisent la productivité de la plante et affecteront les échanges entre l'arbre et l'atmosphère. Cela peut toutefois s'avérer bénéfique dans la mesure où une température suffisamment forte pour produire ce résultat peut également provoquer une sécheresse. Or, le déclenchement du stress thermique, c'est-à-dire la mise en place des défenses cellulaires, peut améliorer la résistance de la plante à des stress concomitants ([Havaux 1992](#)). L'étude de stress engendrés par des combinaisons de contraintes serait un prolongement logique à ce travail, mais il faut au préalable que l'effet de contraintes isolées soit caractérisé.

Les données protéomiques de la présente étude montrent une grande disparité dans la réponse des tissus foliaire et cambial en cohérence avec leurs spécificités respectives. Une comparaison directe des modifications des profils protéiques apporte quelques informations. Tout d'abord, dans les feuilles, les protéines liées à la photosynthèse sont parmi les plus touchées. Dans les deux tissus, la chaleur affecte des protéines similaires

impliquées dans le métabolisme, mais avec une cinétique différente. Toutefois la réduction en quantité de sucrose synthase est un aspect spécifique de la réponse cambiale sous choc thermique. A 42°C, le métabolisme des protéines est beaucoup plus altéré dans le cambium que dans les feuilles. Le rythme de la synthèse protéique est vraisemblablement plus élevé dans le cambium, zone où a lieu une forte division cellulaire, que dans les feuilles utilisées pour l'analyse qui venaient d'atteindre leur taille définitive. Cela est particulièrement vrai sous l'effet du traitement HS.

Les réponses à HG et HS présentent un contraste plus important dans le cambium que dans la feuille. D'une manière générale, les protéines foliaires affectées par HG et HS sont de nature et fonction identiques, et, même si les spots communs ne sont pas plus nombreux que dans le protéome cambial, il y a peu de changements que l'on puisse spécifiquement lier à un traitement plutôt qu'à un autre. Les seules exceptions sont 3 peroxiredoxins liées à HS.

La situation est toute autre dans le cambium. Certains changements du protéome cambial semblent spécifiquement liés au HS. C'est le cas des modifications d'abondance de 7 isoformes de sucrose synthase, d'enzymes de la synthèse protéique, de HSP et peroxyredoxins, et d'enzymes du métabolisme du C1. Dans le même temps, on note une augmentation des teneurs en protéines "osmotin-like" qui semble spécifique au HG.

Ainsi il apparaît que HG et HS constituent deux contraintes très proches pour la feuille, bien que leurs effets sur le cambium indique qu'il s'agit de deux situations différentes. Il est tentant de faire le rapprochement entre ces différences au niveau protéomique et les effets distincts sur les contenus en eau des organes, notamment la tige. En effet, HG modifie les équilibres hydriques de la plante de façon plus prononcée que HS, si bien que HG peut éventuellement conduire la plante à percevoir un déficit hydrique. On peut dès lors se demander si les changements protéomiques induits par une contrainte hydrique présentent des points communs avec ceux entraînés par HG.

Chapitre 4

Le stress hydrique

- 4.1 *Introduction*
- 4.2 *Effets physiologiques de la sécheresse*
- 4.3 *Mécanismes de défense*
- 4.4 *Réponses physiologiques à la sécheresse*
- 4.5 *Questions et stratégie*
- 4.6 *Article : Poplar under water stress : comparison of leaf and cambial proteomic responses. In preparation for submission to Trees- Structure and Function*
- 4.7 *Discussion et perspectives*

4.1 Introduction

Le Vivant est un système aqueux qui ne s'est affranchi du milieu aquatique qu'il y a environ 500 millions d'années sur une histoire de près de 4 milliards d'années. L'eau, H₂O est la molécule la plus répandue dans les tissus vivants, elle représente par exemple 50 à 90% de la masse des plantes (Kramer et Kozlowski 1979). Eau et systèmes biologiques sont à ce point indissociables qu'en astrobiologie la recherche de vie extraterrestre est avant tout une recherche d'eau (Ganti *et al.* 2003). On peut résumer cette importance en citant les principales caractéristiques de l'eau liquide. Elle est d'abord un milieu de diffusion stable vis-à-vis de la chaleur et des UV. C'est un solvant sélectif qui permet de structurer les biopolymères. L'eau est aussi capable d'hydrolyser des liaisons riches en énergie et donc de libérer une énergie chimique. L'eau est aussi un très bon dissipateur thermique qui permet aux organismes de conserver leurs équilibres thermodynamiques (Brack 2001). Enfin l'eau est un réactif de certaines équations biochimiques, comme la photosynthèse.

Tout changement du régime hydrique d'un système biologique aura donc des conséquences importantes. L'eau est le premier facteur limitant de la croissance et de la productivité de la plupart des cultures végétales humaines (Schulze *et al.* 1987; Araus *et al.* 2002; Chaves *et al.* 2002).

Ces multiples caractéristiques cruciales de l'eau conduisent à des situations divergentes communément rassemblées sous le vocable *stress hydrique*. Un stress hydrique peut ainsi être dû à un excès d'eau qui provoque l'anoxie des tissus. Le gel, en rendant l'eau inaccessible pour l'organisme déclenche une autre situation de stress hydrique. Les fortes températures augmentent l'évapotranspiration, ce qui peut conduire à une baisse des teneurs en eau des tissus et avoir des conséquences que l'on peut associer à un stress hydrique. La sécheresse, toutefois, reste la cause principale conduisant au stress hydrique, celui que le changement climatique rend le plus menaçant à l'échelle mondiale (IPCC 2001).

Dans le cadre de cette thèse, le stress hydrique désignera la situation de la plante soumise à une sécheresse, ainsi que sa réponse. Dans la nature, une sécheresse se caractérise d'abord par un déficit pluviométrique dont les conséquences varient en fonction des propriétés du sol, notamment sa capacité de stockage, et de la demande évaporatoire de l'air (Jones 1992). La sécheresse devient un agent stressant lorsqu'elle modifie le

fonctionnement de la plante, réduit son rendement, et l'oblige à mettre en place des défenses contre les dommages moléculaires.

L'eau de l'environnement est au cœur de la cohésion de la physiologie de la plante, puisque la transpiration est le moteur des mouvements d'eau et donc à la base des échanges de minéraux, de nutriments et de gaz. Le stress osmotique est le principal stress secondaire induit par une carence en eau qui apparente les stress hydriques et salins. La sécheresse a par ailleurs des effets indirects sur la physiologie des plantes en affectant notamment la disponibilité et l'accumulation des minéraux du sol ([Sardans et al. 2008](#)).

Les effets de la sécheresse peuvent affecter les écosystèmes forestiers. La forêt tempérée représente 20% de la biomasse végétale mondiale et 10% du carbone continental ([Bonan 2008](#)). Le taux de séquestration de carbone des forêts tempérées est globalement plus élevé que celui des forêts tropicales, plus proches de la "neutralité carbone". Au vu des changements actuels de la température globale et dans la teneur atmosphérique en CO₂, ce biome retient l'attention, car les forêts tempérées sont négativement affectées par des épisodes de sécheresse comme celui de l'été 2003 en Europe ([Landmann et al. 2003](#); [Ciais et al. 2005](#)).

4.2 Effets physiologiques de la sécheresse

Le stress hydrique induit par la sécheresse s'accompagne d'une perte d'eau tissulaire. Le déficit d'eau ainsi obtenu peut aboutir à une concentration des solutés, à une modification du volume cellulaire et de la forme de la membrane, à une perte de turgescence, à une rupture de l'intégrité membranaire et à une dénaturation des protéines (Bray 1997). Le métabolisme est alors fragilisé, et la photosynthèse fortement affectée (Reddy *et al.* 2004). En dépit de ses défenses et de la fermeture de ses stomates, la plante ne peut totalement éviter la transpiration. Une sécheresse prolongée finit par dessécher le végétal, et souvent par le tuer, soit en provoquant une cavitation des vaisseaux, soit en privant son métabolisme des échanges nécessaires à son fonctionnement (McDowell *et al.* 2008, Figure 4.1).

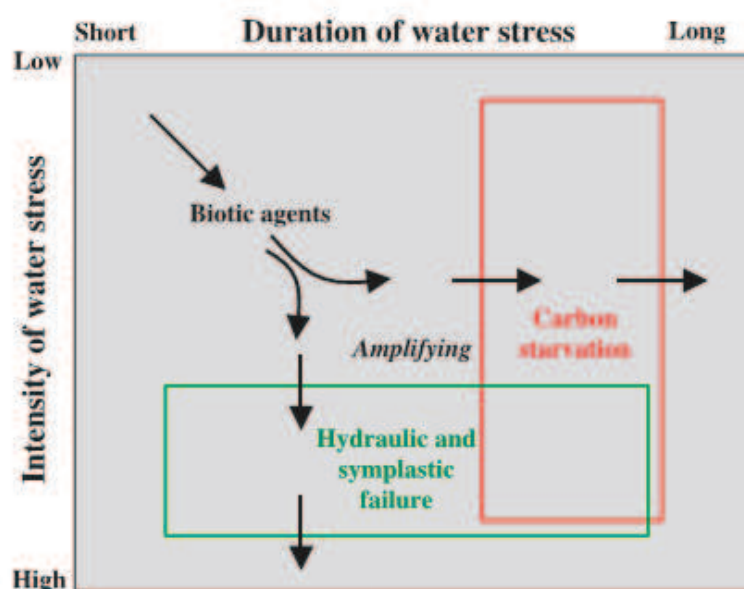


Figure 4.1. Schéma théorique présentant les causes de mortalité d'une plante soumise à une sécheresse (d'après McDowell *et al.* 2008).

La perte de turgescence du végétal provoque une déformation des parois cellulaires. Elles contiennent en temps normal environ 60% d'eau (Brett et Hillman 1985). La déformation associée à la perte d'eau provoque une désorganisation de la paroi, et des liaisons anormales entre polymères de polysaccharides (Moore *et al.* 2008). Avec les dommages causés aux photosystèmes et aux antennes collectrices d'électrons se développe un stress oxydant qui, à son tour, cause des dommages moléculaires (Sanchez-Rodriguez *et al.* 2009).

Le degré de tolérance d'une plante au stress hydrique est notamment corrélé aux variations de l'activité de son système antioxydant (Arora *et al.* 2002).

Si la contrainte se prolonge, l'activité photosynthétique réduite associée à la photorespiration et aux mécanismes de réparation mobilisés va conduire à une carence énergétique des cellules (*carbon starvation*, fig 4.1). Les organes végétatifs ne peuvent généralement pas gérer un tel niveau de stress et la plante meurt. Toutefois, le plus souvent les plantes sont installées dans des régions où les conditions hydro-climatiques conviennent à leur développement et à leur survie. Les espèces pérennes possèdent donc les capacités suffisantes pour résister aux contraintes environnementales ordinaires d'une zone phytogéographique donnée.

4.3 Mécanismes de défense

Au fil de l'évolution, les plantes ont développé de très nombreux moyens de lutte contre les dommages causés par la sécheresse, généralement aux dépens de leur productivité. Nombre d'entre elles possèdent une véritable stratégie de limitation des pertes d'eau. Au niveau morpho-anatomique les xérophytes présentent généralement un appareil aérien de taille et surface réduites, couvert d'une cuticule épaisse ; leurs stomates sont protégés au fond de cryptes creusées dans la feuille. Le métabolisme particulier des plantes CAM (Crassulacean Acid Metabolism) leur permet d'éviter l'ouverture des stomates dans la journée. L'adaptation des éphémérophytes ne réside pas dans une modification de leur anatomie, mais de leur cycle biologique. Très rapide, il dure quelques jours seulement. Leur développement se produit à la faveur d'un épisode humide et aboutit très vite à la production de graines ou de spores qui sont les formes de résistance de la plante (Niklas 1997). L'abscission des feuilles et la décurtation des rameaux des arbres sont également un moyen de limiter les pertes en eau (Zhang *et al.* 1999; Tardieu 2005). A côté des limitations de perte d'eau, certaines plantes ont la capacité d'en maximiser l'absorption ; c'est le cas des phréatophytes, comme l'eucalyptus dont les racines profondes plongent parfois jusqu'à la nappe phréatique. Elles peuvent aussi optimiser leurs réserves, telle la succulence des feuilles et des tiges que l'on rencontre par exemple chez les cactées et certaines euphorbiacées. On observe chez les plantes adaptées à la sécheresse une altération de l'allocation des ressources en faveur de la croissance racinaire aux dépens de la croissance des parties aériennes (Markesteijn et Poorter 2009). Toutes ces adaptations appartiennent à la stratégie d'**évitement** du déficit hydrique.

En parallèle il existe des adaptations qui améliorent la **tolérance** au déficit hydrique ; elles permettent à la plante de supporter d'importantes pertes d'eau sans dommage permanent. On peut ainsi citer l'ajustement osmotique (Clifford *et al.* 1998) et l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau (Farquhar *et al.* 1989; Bonhomme *et al.* 2009b). On citera également le cas le plus extrême de la tolérance à la sécheresse, celui de la tolérance à la dessiccation rencontré chez les plantes dites de résurrection (*resurrection plants*) comme la Sélaginelle ou le Polypode polypodioïde. Ces plantes peuvent survivre à la perte de 98% de leur eau et supporter un potentiel hydrique inférieur à -100 MPa (Farrant 2000). Il existe de fortes similitudes entre les mécanismes moléculaires de la tolérance à la dessiccation de ces

plantes de résurrection (souvent des bryophytes) et ceux qui existent dans les graines orthodoxes grâce auxquelles les plantes supérieures supportent les saisons extrêmes (sécheresse et gel) (Illing *et al.* 2005).

La diversité des mécanismes de résistance, et les exemples de convergences évolutives, entre cactées et euphorbiacées notamment, illustrent l'importance de l'adaptation à la sécheresse, en particulier chez les espèces pérennes. Aux niveaux physiologique et métabolique, d'autres mécanismes de résistance sont encore pour partie inconnus ou mal compris. Pour explorer les processus moléculaires qui protègent la plante, le **choix du peuplier**, notoirement sensible aux carences en eau (Dreyer *et al.* 2004), peut sembler étonnant. En effet *P. canescens* (*P. tremula* x *P. alba*) ne possède aucune des adaptations décrites ci-dessus, hormis l'abscission foliaire et la décurtation des rameaux. Le genre *Populus* rassemble des espèces de grande taille à tendance riparienne et à forte consommation en eau (Monclus *et al.* 2009). *P. euphratica*, parfois cité comme exemple d'un peuplier résistant à la sécheresse, est en réalité une espèce phréatophyte dont le succès écologique s'explique probablement davantage par sa tolérance au sel et à la chaleur (Ferreira *et al.* 2006; Bogeat-Triboulot *et al.* 2007). Les peupliers, toutefois, sont capables de s'acclimater à des milieux changeants ; ce sont des espèces pionnières (Francis *et al.* 2005). Essence ligneuse pérenne, le peuplier doit faire face à de multiples conditions stressantes au cours de son cycle de vie étendu. Or, il ne possède pas d'adaptation morpho-anatomique particulière, c'est essentiellement sa plasticité physiologique qui assure sa survie. Placé dans une condition de contrainte hydrique, le peuplier va donc exprimer toute une gamme de réponses moléculaires qui seront cruciales pour supporter la contrainte.

4.4 Réponses physiologiques à la sécheresse

Lors d'un déficit hydrique, l'une des réactions les plus précoces d'une plante possédant une stratégie isohydrique⁸ est la fermeture de ses stomates (Cornic 2000). Ce comportement est le résultat de l'action de multiples acteurs moléculaires. La synthèse de l'acide abscissique (ABA) durant la contrainte hydrique est l'un des principaux messagers de la fermeture des stomates (Wilkinson et Davies 2002). On sait désormais que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est un intervenant précoce de cette signalisation à laquelle participe aussi le monoxyde d'azote NO dans les cellules de garde (Bright *et al.* 2006).

Le **stress oxydant** qui accompagne la contrainte hydrique menace l'intégrité des membranes et le fonctionnement des protéines de la plante (Sanchez-Diaz *et al.* 2007). La première ligne de défense contre les dégâts du stress oxydant vise à empêcher, ou pour le moins à limiter la formation d'espèces activées de l'oxygène (ROS) en régulant notamment les chaînes de transport des électrons (Gratao et Polle 2005). C'est ainsi qu'une augmentation de la photorespiration, en consommant l'excès d'électrons non employés par la photosynthèse, évite en partie la formation de ROS (Wingler *et al.* 1999; Bai *et al.* 2008). Cette protection n'est toutefois pas absolue, notamment parce que les ROS, en particulier H_2O_2 , sont activement produits par la cellule dans un but de signalisation (Foyer et Noctor 2005). C'est pourquoi, même en dehors de tout contexte de stress, le taux d'antioxydants est généralement élevé dans la cellule végétale (Andre *et al.* 2008).

Les membranes sont les premières cibles d'un stress oxydant. La cellule possède donc un arsenal dévolu à limiter la peroxydation des lipides dans lequel on recense ascorbate peroxydase, glutathion-S-transférases (GST), et phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPX) (Edwards *et al.* 2000; Blokhina *et al.* 2003). Les protéines contenant des résidus cystéines sont les plus exposées, mais il existe des enzymes capables de les régénérer, comme les thiorédoxines et glutarédoxines (Lemaire 2004; Vieira Dos Santos et Rey 2006). L'activation d'enzymes de détoxification (He *et al.* 2008) et la synthèse d'antioxydants font partie intégrante de la réponse-type de la plante à la sécheresse (Selote et Khanna-Chopra 2006). L'expression de protéines chaperonnes protège les protéines et les

⁸ Une plante isohydrique (c'est le cas de la plupart des ligneux) cherche à maintenir son potentiel hydrique aux dépens de sa conductance stomatique. Une plante anisohydrique (comme le tournesol ou l'orge) maintient g_s et laisse décroître Ψ (Tardieu et Simonneau 1998).

ARN des dommages oxydants induisant dénaturation et agrégation (Bösl *et al.* 2006). Ce rôle est aussi dévolu à certaines LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins), parmi lesquelles les déhydrines (Close 1996; Caruso *et al.* 2002) qui peuvent être associées à une thermotolérance (Arora *et al.* 1998). En dépit de ces protections, les dommages moléculaires interviennent et le stress hydrique est généralement marqué par une augmentation de l'activité protéolytique (Hieng *et al.* 2004; Simova-Stoilova *et al.* 2009).

Le stress hydrique présente une composante osmotique qui déclenche des réponses ciblées, telle que la synthèse de composés osmoprotecteurs : comme la proline, la glycine bêtaïne, les polyamines et le mannitol (Bray 1997; Rontein *et al.* 2002; Prabhavathi *et al.* 2002). La réponse peut également impliquer l'induction d'aquaporines (Yamada *et al.* 1997; Johansson *et al.* 2000; Maurel *et al.* 2008). Sur le long terme, la réponse d'accoutumance passe notamment par une réorganisation pariétale, au moins au niveau de certains tissus foliaires (Moore *et al.* 2008).

Le stress hydrique comprend donc une très vaste gamme de réponses moléculaires aux divers dommages que peut entraîner le déficit en eau.

4.5 Questions et stratégie

La réponse du peuplier à un déficit hydrique est un phénomène dépendant de nombreuses variables et possédant une cinétique particulière. Plus encore que la plupart des autres contraintes abiotiques, le déficit hydrique est un phénomène graduel ; il faut un certain temps pour que la carence s'installe. Ce temps peut être mis à profit par la plante si elle sait détecter de manière précoce la contrainte qui se met en place.

L'expérience présentée dans la section 4.6 cherche à répondre à quelques questions :

Quelle est l'évolution des échanges d'eau et de gaz carbonique entre la plante et l'air, du contenu en eau des organes et de la croissance primaire au cours d'un arrêt d'arrosage ?

Quels changements protéomiques interviennent lors d'une contrainte hydrique, d'abord modérée, puis sévère, dans la feuille et le cambium ?

Quel effet un rétablissement de l'arrosage qui restitue les paramètres physiologiques de la plante a-t-il sur son profil protéomique ?

Quelle proportion de ces changements est spécifique au tissu analysé ?

Durand T.C., Sergeant K., Planchon S., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J-F., Renaut J. Poplar under drought : comparison of leaf and cambial proteomic responses. In preparation for submission to *Trees- Structure and Function*.

4.6 Poplar under drought: comparison of leaf and cambial proteomic responses.

Article en preparation pour une soumission à *Trees- Structure and Function*.

Durand, Thomas C.^{abcd}; Sergeant, Kjell^a; Renaut, Jenny^a; Planchon, Sébastien^a; Carpin, Sabine^{bc}; Label, Philippe^d; Morabito, Domenico^{bc¶}; Hausman, Jean-François^{a¶}.

^a CRP-Gabriel Lippmann, 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, GD, Luxembourg. Department Environment and Agro-biotechnologies.

^b Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France.

^c Institut National de la Recherche Agronomique,, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), 45067 Orléans, France.

^d Institut National de la Recherche Agronomique, CS40001 Ardon, 2163 Avenue de la pomme de pin, 45075 Orléans CEDEX 2, France.

¶ These authors contributed equally as senior author.

* To whom correspondence should be addressed. hausman@lippmann.lu

Abstract

Poplar plants exposed to drought exhibited commonly reported drought stress traits like stomatal closure, photosynthetic rate limitation, water potential reduction and loss of water. Leafy rooted cuttings of poplar were investigated through a proteomic approach in order to compare the water constraint response of two organs, namely leaf and cambium. Sampling was realised during the drought period at 2 time points with increased drought intensity and 7 days after rewatering.

Data show a different time perception of the water constraint, cambium being affected later on. In leaves, drought induced decrease in RuBisCO, and increase in light harvesting complex proteins abundance as well as changes in membrane-related proteins. In the cambial tissue, the salient proteome pattern change was the decrease of multiple proteins identified as bark storage proteins. After rewatering, almost all changes in cambial proteome disappeared whereas a significant number of leaf proteins appeared to be differentially regulated only during the recovery from drought.

1. Introduction

Water deficit represents the most recurrent and the most serious environment drawback for plants (Boyer 1982). Considering the worldwide increasing frequency of extreme events forecasted by climate modeling (Easterling *et al.* 2000), intensive efforts are made to appreciate plant adjustment abilities to environmental stresses, especially to drought (Breshears *et al.* 2009).

The forest ecosystem is of particular importance from economic, biologic, atmospheric and hydrologic perspectives. At the regional scale, CO₂ and water vapor exchanges between woody species and air have been demonstrated to influence the climate (Bonan 2008). As harsher climate conditions threaten forest health, distribution and composition (Ciais *et al.* 2005), it becomes important to decipher the stress coping mechanisms implied in stress tolerance of trees.

Poplar is one of the fastest growing woody species of the temperate forest. This productivity comes with great dependency on water supply (Barigah *et al.* 1994). Although poplar is among the most sensitive woody plants to water stress (Marron *et al.* 2008), there are some reasons to study its response to environmental stresses. First, the *Populus* genus presents a huge number of species and cultivars which exhibit a great variability in traits related to water deficit tolerance (Bogeat-Triboulot *et al.* 2007; Monclus *et al.* 2009; Bonhomme *et al.* 2009a). Second, poplar, whose genome was recently fully sequenced (Tuskan *et al.* 2006) has become a model plant for molecular studies in forestry. Its study brings insights to phenomena specific to trees such as wood formation or seasonality. Its ranges of reactions to biotic and abiotic factors are widely considered in the literature, especially at leaf (Bohler *et al.* 2007; Berta *et al.* 2009), root (Chefdor *et al.* 2006; Kreuzwieser *et al.* 2009) and xylem (Escalante-Perez *et al.* 2009) levels. Hence, the use of poplar enables not only to understand specific aspects of the tree response to each type of stress in each kind of tissue, but also the common features of the plant cell exposed to a stressing agent.

Poplar drought stress responses at the root level (Salekdeh *et al.* 2002), the leaf level (He *et al.* 2008), or both (Plomion *et al.* 2006; Bogeat-Triboulot *et al.* 2007) have been extensively

documented. Given that these organs are responsible for the water dynamics inside the whole plant, they must react rapidly to a stress in order to allow plant survival. On the long run, a successful reaction ends up to an acclimation, which requires that each part of the organism fine-tunes to suboptimal conditions. The perception of the constraint largely depends upon the position, the age and physiological stage of the organ (Marron *et al.* 2006; Cosio *et al.* 2006). Among the tree tissues, further investigation is needed to unravel the cambium response to stress, as this specific tissue is responsible for secondary growth and wood formation, an exclusive histological trait of woody plant species (Mellerowicz *et al.* 2001).

Since gene transcription level is not automatically correlated to the actual abundance of active proteins, and given that poplar genome, although sequenced, is not fully annotated yet, untargeted approaches such as proteomic studies keep on constituting effective tools for the identification and for the time-dynamics assessment of biological functions affected by a constraint.

The present research paper aims at characterizing the physiological state of a poplar plants at 2 timepoints of a water constraint: mild stress, severe stress and recovery. A quantitative proteomic analysis was undertaken for the identification of proteome changes in leaf and cambium in response to the constraint.

2. Material and methods

2.1 Plant material & water constraint

Rooted cuttings of *Populus tremula* L. x *P. alba* L. (*Populus x canescens* (Aiton) Smith) genotype INRA 717-1B4 were placed in 10 dm³ pots filled with a sand-peat moss soil mixture (25:75, v/v, pH 6.9) in a growth chamber. Control conditions were set at 22°C, 70% of relative humidity, and irradiance of 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provided during 16 h per day. All initial cuttings were 15 cm in length and 15 mm $\pm$ 1mm in diameter. The rooted plantlets had a leaf total area of 1725 $\pm$ 125 cm² in average at the beginning of the experiment. Water stress was induced by withholding water during 12 days. Once the plants reached a predawn leaf water potential equivalent to -0.9 MPa they were re-watered to field capacity during 7 days. Control plants were watered to field capacity every second day.

2.2 Predawn leaf water potential (Ψ)

Soil water availability was estimated by predawn leaf water potential (Ψ_{wp} , MPa) with a Scholander-type pressure chamber (PMS-670; PMS Instrument, Albany, OR, USA) as previously reported (Monclus *et al.* 2006). Three biological replicates from different plants were made. This parameter was used to assess the intensity of the constraint so as to perform the samplings at the appropriate moment.

2.3 Gas exchange measurement

The stomatal conductance to water (g_s , mmol H₂O m⁻².s⁻¹) and the photosynthetic rate (P_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) were measured using a portable photosynthesis system (Ciras-2, PP Systems, Hitchin, Herts, UK) on young fully expanded leaves. The same leaf level was chosen for the proteomic analysis. Temperature in the photosynthetic leaf chamber (PLC) was controlled at 23 °C $\pm$ 1°C. The CO₂ concentration of the air flowing at a rate of 200 mL.min⁻¹ over the 2.5 cm² section of leaf clamped inside the PLC was 400 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$. The light intensity during measurements was 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.4 Growth measurement

Primary growth of plants was estimated on the basis of the total leaf area (cm²), which was calculated according to the formula given by [Brignolas *et al.* \(2000\)](#). The cutting secondary growth was monitored using an automatic point dendrometer described in [Morabito *et al.* \(2006\)](#) to measure the diameter increase (μm).

2.5 Water contents

Fresh and dry weights of plants organs were used to estimate the water content (WC). In the case of the leaves, the measurement of saturated mass after 16 hours immersion in water allowed to calculate the relative water content (RWC). The calculation was made as follow. $RWC (\%) = (fresh\ weight - dry\ weight) \times 100 / (saturated\ weight - dry\ weight)$.

The water content of the stem was calculated as $WC (\%) = (fresh\ weight - dry\ weight) \times 100 / fresh\ weight$.

2.6 Tissue sampling

Three fully expanded leaves per plant as well as the cambial cells of three plants were collected on day 0-8-12 and 19, from stressed and control plants. Tissues were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C prior to protein extraction. The cambial cells have been obtained as described in [Durand *et al.* \(2010, in press\)](#).

2.7 Protein extraction and separation

Proteins were extracted from ground tissues using a TCA-acetone protocol described in [Durand *et al.* \(2010, in press\)](#). The extracted proteins were labeled with 240 pmol CyDyes™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) per 30 μg of proteins. Cy2 was used for the labelling of the internal standard consisting of a mix of equal amounts of each sample. For control and treated plant samples, a dye swap was used between Cy3 and Cy5 to avoid problems associated with preferential labelling. The separation of the proteins was performed by bidimensional electrophoresis. The isoelectrofocusing was done using an IPGphor system on 24cm strips 3-11 non linear pH range (GE healthcare) until reaching 85,000 V.h at 20°C. The

strips were then equilibrated in two steps. First, proteins were reduced by 1% DTT for 15 min and, second, alkylated by 2.5% (w/v) iodoacetamide for 15 min. The SDS-PAGE was performed on 12.5% (w/v) acrylamide-bisacrylamide (37.5/1) gels. A power of 2W per gel was applied. After migration and fixing of proteins in the gel, images were captured using a Typhoon Variable Mode Imager 9400 (GE Healthcare).

2.8 Protein relative quantification and identification.

Images of gels were analyzed using DeCyder v.6.05.11 software (GE Healthcare). The automatic matching was manually confirmed for spots selected for further study and identification. The relative quantification of proteins, based on the normalized volume of spots, allowed the statistical comparison of their abundance. A Student t-test performed inside the DeCyder determined differentially expressed proteins with a variation factor of at least 1.3 in abundance (up and down) and a p-value < 0.05. A false discovery rate correction was applied in the software.

Spots were picked from the gel and digested by trypsin for 6 h at 37°C using an Ettan Dalt Spot Handling Workstation (GE Healthcare) before acquisition of MS and MS/MS spectra with a MALDI-TOF-TOF analyser (4800 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The NCBI poplar Expressed Sequence Tags (EST) database used for the interrogation contained 419,944 poplar sequences and was downloaded from the NCBI database on 06/11/2009. A viridiplantae protein database was also used, that was downloaded on 02/17/2009 and contained 1,214,000 sequences. Detailed search criteria were described in [Durand *et al.* \(2010, *in press*\)](#). Each spectrum was manually verified, even with low MASCOT score.

3. Results

3.1 Physiological results

The **predawn leaf water potential** (Ψ) of control plants was equal to -0.2 MPa throughout the experiment (Figure 1). Withholding water induced a significant decrease in Ψ from day 6 on. At day 8 and 12 Ψ of stressed plants reached -0.50 MPa, and -0.90 MPa respectively. Four days after rewatering, Ψ returned to control values, -0.2 MPa.

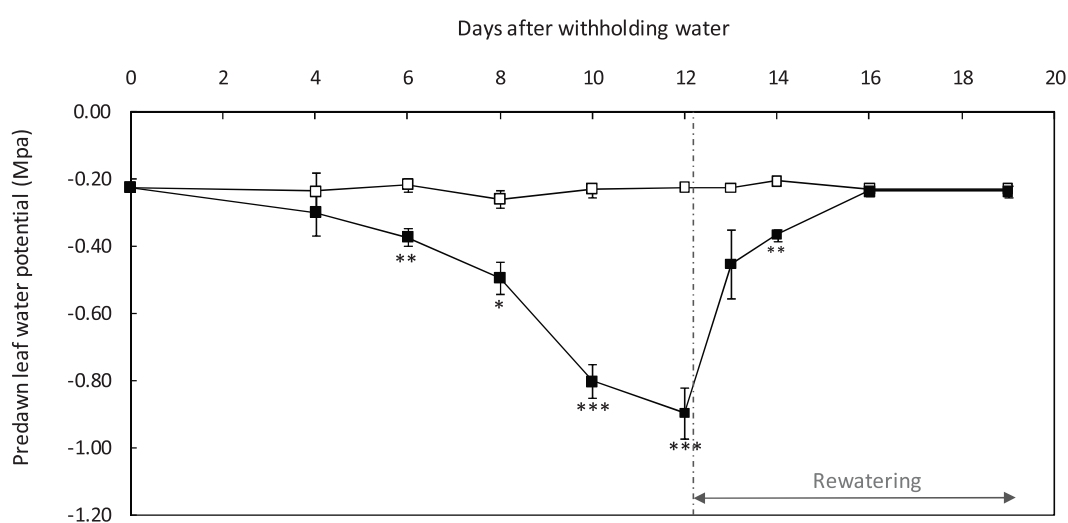


Figure 1. Time course of predawn leaf water potential of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 of control and drought exposed poplars. Plants were rewatered at the end of day 12 for a 7 days recovery period. Bars represent the standard error of 4 replicates (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; open squares indicate values for control plants, plants exposed to water stress are represented by filled squares).

The **stem water content** of control plants oscillated during the experiment between 54.8 and 56.2% (Table 1). Withholding water did not significantly modify this parameter on day 8, but a significant 7% decrease was observed on day 12. After rewatering, this parameter was equivalent to control values. The leaf **relative water content (RWC)** of control plants was between 90.1 and 92.0%. Stressed plants exhibited significant 6.0% and 5.0% reduction of leaf RWC on days 8 and 12, respectively. RWC was back to control value on day 19 (Table 1). The **total leaf area** of control and stressed plants were similar at the beginning of the experiment and no changes could be observed during the water starvation. On day 19, 7 days after rewatering, the abscission of lower leaves from stressed plants resulted in a 22% reduction of the total leaf area (Table 1). The **stem height** of stressed plants was significantly

reduced (-12%) compared to control plants starting from day 12 on and remained lower after rewatering (Table 1).

The **stomatal conductance** (g_s) of control plants was between 138 and 166 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the experiment. Water-starved plants exhibited a reduced g_s equal to 32 and 19 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on days 8 and 12, respectively (Table 1). The g_s returned to control values after 7 days of rewatering. The **photosynthetic rate** (P_N) of control plants was between 17.8 and 19.7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the experiment. Stressed plants exhibited a reduced P_N equal to 4.68 and 4.65 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on days 8 and 12, respectively. The P_N returned to control values after 7 days of rewatering.

The **stem diameter** of stressed plants did not show significant difference compared to control, even if the shape of the curve suggests that a longer constraint of the same intensity should lead to significant reduction of secondary growth (Figure 2).

Table 1. Physiological parameters of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 plants that were well-watered (Control) or that were subjected to drought stress by withholding water for 12 days followed by a 7 days recovery period during which water supply was equal for control and water stressed plants (Water Stress).

Day of withholding water	0	8	12	19
Stem water content (%)				
Control	55.0 ± 0.5	54.8 ± 1.0	56.2 ± 0.3	55.8 ± 1.3
Water Stress		53.8 ± 1.9	52.3 ± 0.9**	54.6 ± 0.5
Leaf relative water content (RWC %)				
Control	90.5 ± 2.1	92.0 ± 0.8	90.6 ± 1.9	90.1 ± 1.3
Water Stress		86.0 ± 0.3***	85.6 ± 2.2*	92.1 ± 1.1
Total Leaf Area (cm ²)				
Control	1589 ± 123	2249 ± 89	2609 ± 59	2958 ± 79
Water stress	1860 ± 127	2383 ± 98	2446 ± 98	2307 ± 98***
Stem height (cm)				
Control	44.3 ± 2.5	56.1 ± 2.3	62.5 ± 2.4	72.3 ± 2.5
Water stress	46.2 ± 2.5	54.4 ± 2.1	55.0 ± 2.4*	64.5 ± 2.7*
Stomatal conductance ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)				
Control	155 ± 43	138 ± 19	152 ± 16	166 ± 30
Water stress		32 ± 7**	19 ± 3***	241 ± 28
Photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)				
Control	17.8 ± 1.0	17.9 ± 1.6	18.8 ± 1.4	19.7 ± 1.7
Water stress		4.68 ± 1.9***	4.65 ± 1.1***	23.0 ± 1.0

3.2 Proteomic changes

After analysis, the electrophoresis gels revealed that 82 leaf protein spots and 65 cambial protein spots changed in abundance during or after water stress (Figure 3). Among them, 62 leaf spots and 41 cambial spots were identified (Tables 2 and 3). The main part of the leaf proteome changes occurred on day 19 (45 spots out of 82) whereas most of the cambial proteome variations were observed on day 12 (57 spots out of 65). The functions of the identified proteins affected by the drought are summarized in table 4.

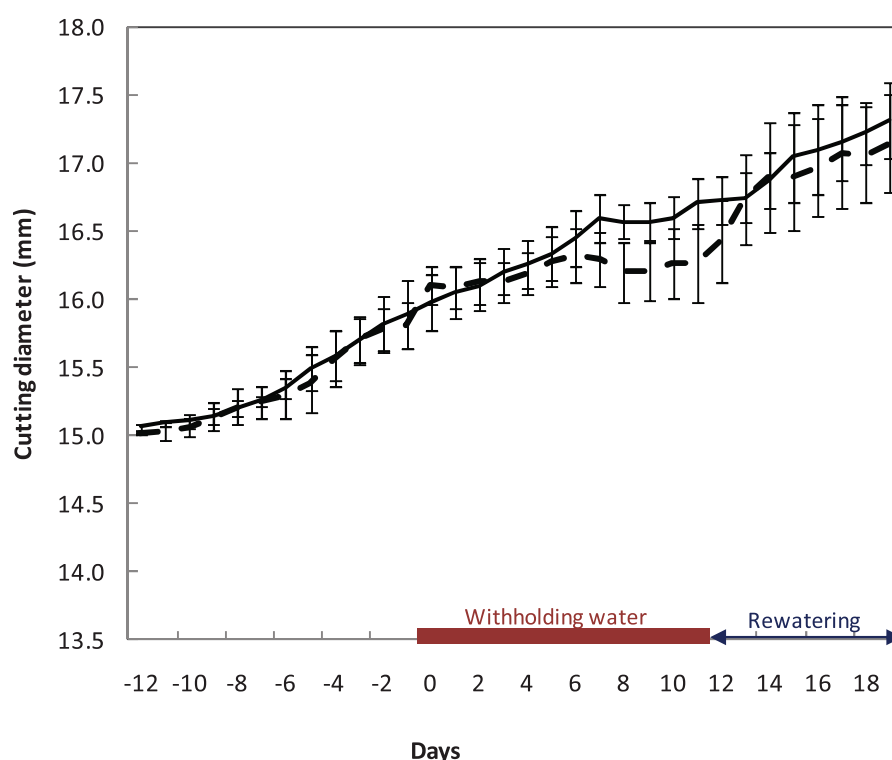


Figure 2. Evolution of the cutting diameter of *Populus tremula* x *P. alba* in control condition (full black line) or when exposed to water stress (interrupted line). Stressed plants were rewatered at the end of day 12 and allowed to recover for 7 days. Bars represent standard error of 6 replicates. No statistical differences were observed between treatments.

Table 2: Identification of differentially expressed proteins in the leaf proteome of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 exposed to withholding water and undergoing mild- and severe water stress on days 8 and 12, respectively, before being rewetted during 7 days until day 19 for recovery. The average ratio of the protein abundance was calculated between treated and control plants, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Spot number ¹	Leaf protein identifications ²	Day 8 mild stress		Day 12 severe stress		Day 19 recovery		Protein score ³	Accession Number		No of peptides	Sequence coverage (%)
		Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value		EST ⁴	NCBI ⁵		
Photosynthesis												
1569	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Samolus valerandi]	1.01	0.97	-1.63*	0.028	-1.01	0.99	292		gi 4100347	6	53
1441	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit.	-1.17	0.57	-1.01	0.79	2.06*	0.033	213	gi 60693247	GI:403160	4	37
2157	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Strychnos spinosa]	1.75	0.36	1.02	0.99	3.07*	0.017	466		gi 167891466	5	50
2158	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Strychnos spinosa]	1.45	1	-1.17	0.51	2.7*	0.011	508		gi 167891466	6	50
2161	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Populus grandidentata]	1.26	0.55	1.06	0.93	2.5*	0.024	558		gi 188037629	7	57
2220	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Allophylus javensis]	-1.16	0.83	-1.7*	0.011	2.27*	0.031	121		gi 52001641	2	24
2116	RubisCO large subunit [Mosammona pacifica]	1.16	0.87	1.02	0.83	3.44*	0.011	355		gi 54306774	4	30
1236	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Ascarina polystachya]	1.12	0.56	-1.43**	0.0048	-1.24	0.62	219		gi 30143315	4	48
1444	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Duguetia sessilis]	1.02	0.87	-1.33*	0.045	-1.16	0.26	424		gi 60101630	5	27
1860	Light-harvesting complex II protein Lhcb1 [Populus trichocarpa]	1.7	0.25	2.06**	0.0041	1.78*	0.011	176		gi 224085884	4	54
1914	Light-harvesting complex II protein Lhcb1 [Populus trichocarpa]	1.65	0.11	1.87*	0.016	1.71*	0.028	112		gi 224085884	3	61
1916	Light-harvesting complex II protein Lhcb1 [Populus trichocarpa]	1.62	0.13	1.74*	0.027	1.83*	0.013	267		gi 224085884	3	65
1630	Chlorophyll a-b binding protein 3 (lhcbII type 1)	2.57	0.11	2.92* 0.04		2.58*	0.038	146		gi 158562859	3	100
2041	Light-harvesting complex I protein Lhca3 [Populus trichocarpa].	1.75	0.27	-1.02	0.99	1.58*	0.015	252		GI:224131950	6	50
2045	Light-harvesting complex I protein Lhca3 [Populus trichocarpa].	1.78	0.17	1	0.87	1.51*	0.03	455		GI:224131950	7	43
2114	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor, Putative [Ricinus communis].	1.58*	0.015	-1.04	0.98	-1.11	0.64	352		GI:223539254	7	47
1514	Chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor [Capsicum annuum]	-1.16	0.39	-1.46*	0.041	-1.17	0.32	247		I:6899972	6	47
Carbohydrate metabolism												
1140	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	-1.48*	0.022	-1.1	0.5	-1.52	0.054	404	gi 73869561	GI:56122688	6	52

1218	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	-1.65	0.055	-1.55*	0.025	-1.96*	0.026	84	GI:223541223	2	40
1233	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	-1.09	0.54	-1.36*	0.043	-1.42*	0.027	503	GI:223541223	7	64
1240	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	-1.43	0.055	-1.34	0.061	-1.62***	8.60E-05	251	GI:223541223	3	64
1149	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [Ricinus communis]	-1.61*	0.038	1.07	0.65	1.04	0.71	317	gi 73869561	6	52
1109	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	-1.16*	0.018	1.16	0.62	-1.3	0.26	136 (+104)	GI:223547801	3	39
1213	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	-1.59**	0.0025	-1.14	0.29	-1.27	0.25	123	GI:223550350	3	81
1238	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	-1.13	0.67	1.01	0.85	-1.28*	0.039	209	GI:223547801	5	44
1239	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	1.08	0.99	1.37*	0.032	-1.17	0.4	226 (+179)	GI:223549471	3	90
1261	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	-1.19	0.35	-1.21	0.24	-1.52*	0.036	235	GI:223550350	5	55
1912	Triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis]	1.36	0.24	1.52	0.056	1.8*	0.031	263	GI:223531284	5	43
1362	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative [Ricinus communis]	1.31**	0.0066	-1.55*	0.0047	-1.22	0.14	372	GI:223548502	7	46
1370	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative [Ricinus communis]	-1.32**	0.0088	-1.6**	0.0085	-1.25	0.051	380	GI:223548502	7	46
2047	Carbonic anhydrase	1.67	0.3	1.61*	0.045	2.11*	0.033	130	gi 1354517	3	40
Nitrogen & protein metabolism											
1284	O-acetylserine (thiol)lyase [Populus alba x Populus tremula]	-1.96*	0.029	-1.01	0.92	-2.15	0.18	266	gi 52535615	4	50
2112	20S proteasome beta subunit PBG1 [Arabidopsis thaliana]	-1.18	0.74	1.04	0.86	3.16*	0.04	73	gi 73874868	2	54
Protein folding											
1955	Groes chaperonin, putative [Ricinus communis]	1.52	0.11	-1.13	0.69	1.47*	0.028	300	GI:223544718	2	51
1963	Groes chaperonin, putative [Ricinus communis]	1.4	0.19	1.23	0.31	1.76*	0.014	145	GI:223544718	4	48
Energy metabolism											
682	ATPase beta subunit - chloroplast [Populus tomentosa]	1.47*	0.019	1.06	0.89	1.32	0.42	817	gi 110227086	8	79
685	ATPase beta subunit - chloroplast [Populus tomentosa]	1.43*	0.019	1.13	0.71	1.3	0.56	733	gi 110227086	8	79
1263	Malate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	-1.13	0.26	-1.3*	0.048	-1.34	0.081	244	GI:223536453	6	36
1663	Malate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	1.05	0.69	1.11	0.6	-2.45**	0.0023	114	gi 52515482	3	35
2127	Glycolate oxidase [Mesembryanthemum crystallinum]	1.07	0.88	-1.01	0.68	3.28**	0.0025	128	gi 52397976	4	61

Oxidoreduction

1088	Peroxidase 3 precursor, putative [Ricinus communis]	-1.51*	0.043	-1.16	0.48	-1.33	0.45	139 (+23)	gi 28607691	GI:223545186	4	50
2074	2-cys peroxidoxin, putative [Ricinus communis]	1.19	0.96	-1.07	0.61	1.55*	0.033	312		gi 223530313	7	36
2109	Catalase isozyme 1	1.58	0.49	1.03	0.92	1.73*	0.023	203		gi 1345673	5	32

Miscellaneous

1454	Predicted protein [Populus trichocarpa]	-1.31	0.083	-1.2	0.18	-1.36*	0.038	185	gi 73887416	GI:224073126	4	47
1126	Hydroxypyruvate reductase [Solenostemon scutellarioides]	-1.49**	0.0047	-1.03	0.83	-1.61	0.11	152		GI:223528624	3	59
1135	Hydroxypyruvate reductase [Solenostemon scutellarioides]	-1	0.84	-1.1	0.53	-1.36*	0.025	227		GI:223528624	5	??
1446	Putative SHOOT1 protein [Oryza sativa Japonica Group]	1.05	0.73	-1.42**	0.0038	1.01	0.81	183		GI:50509325	3	44
1451	Putative SHOOT1 protein [Oryza sativa Japonica Group]	1.31*	0.044	1.07	0.58	1.32	0.057	378		GI:50509325	7	44
1638	Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic	1.51*	0.044	1.21	0.15	1.58*	0.037	338		GI:62900641	8	43
1648	Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic	2.31*	0.022	-1.01	0.53	1.92	0.34	325		GI:62900641	6	37
2135	Germin-like protein [Chimonanthus praecox]	1.1	0.95	1.05	0.78	2.76**	0.0081			GI:157058854	3	12
2181	Auxin-binding protein ABP19a precursor, putative [Ricinus communis]	-1.05	0.81	-1.25	0.19	-1.66*	0.017	82	gi 52530576	gi 157058854	6	17
2198	Germin-like protein [Chimonanthus praecox]	1	0.97	-1.18	0.36	-1.81*	0.013	180	gi 52396799	gi 11134054	3	12

1: spot number on the master gel

2: Protein obtained by blasting the EST against the NCBI database

3: MASCOT score (protein score as given by the GPS software (Applied Biosystems))

4: Accession number of the EST sequence in the NCBI database

5: Accession number of the corresponding protein in the NCBI database

6: Average ratio of the protein abundance (Treated/Control). Positive values of ratio are given as such, negative values are given according to the following formula: given value = -1/average ratio

7: p-value of Student's t-test.

Table 3: Identification of differentially expressed proteins in the cambial proteome of *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 exposed to withholding water and undergoing mild- and severe water stress on days 8 and 12, respectively, before being rewetted during 7 days until day 19 for recovery. The average ratio of the protein abundance was calculated between treated and control plants, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Spot number ¹	Cambial protein identifications ²	Day 8 mild stress		Day 12 severe stress		Day 19 recovery		Protein score ³	Accession Number		No of peptides	Sequence coverage (%)
		Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value		EST ⁴	NCBI ⁵		
Carbohydrate metabolism												
239	Sucrose synthase [Populus tremuloides]	-1	0.9	1.74*	0.011	1.03	0.66	352		gi 158635120	6	
245	Sucrose synthase [Populus tremuloides]	1.04	0.79	1.7*	0.022	1.07	0.61	371 (+41)		gi 158635120	7	49
985	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Solanum tuberosum]	-1.02	0.89	-1.42***	0.0049	1.01	0.93	529		gi 118482443	7	67
1072	Fructose-bisphosphate aldolase-like [Solanum tuberosum]			1.42*	0.028			454	gi 58310719	gi 78191410	6	
Protein metabolism												
354	Putative elongation factor EF-2 [Arabidopsis thaliana]	-1.07	0.68	1.37*	0.04	-1.01	0.9	181 (+277)	gi 29824421		7	48
1325	Aspartyl protease [Populus tremula]	-1.06	0.84	-1.48*	0.04	-1.26	0.17	78 (+19)	gi 33449727	gi 190896608	5	23
1407	Cysteine proteinase inhibitor [Glycine max]	1.33	0.66	-2.27*	0.046	-1.03	0.72	135		gi 1944319	4	48
Storage proteins												
1273	Storage protein, bark - cottonwood	1.7	0.51	-1.86*	0.033	1.45	0.32	465	gi 23976184	gi 421813	6	81
1275	Storage protein, bark - cottonwood	1.44	0.55	-2.7*	0.014	1.74	0.26	229 (+24)	gi 23976184	gi 421813	5	49
1278	Storage protein, bark - cottonwood	1.64	0.22	-2.38*	0.039	1.82	0.17	310 (+36)	gi 23976184	gi 421813	6	68
1279	Storage protein, bark - cottonwood	1.53	0.45	-2.04*	0.04	2.42	0.12	227 (+118)	gi 23976184	gi 421813	6	38
1281	Storage protein, bark - cottonwood	1.75	0.24	-2.15**	0.0076	1.47	0.26	353	gi 23976184	gi 421813	5	66
1282	Storage protein, bark - cottonwood	1.78	0.31	-2.42**	0.0025	1.45	0.31	528	gi 23976184	gi 421813	6	84
1286	Storage protein, bark - cottonwood	1.56	0.4	-2.39***	0.0003	1.37	0.26	337 (+39)	gi 23976184	gi 421813	5	39
1287	Storage protein, bark - cottonwood	1.36	0.61	-2.42**	0.0025	1.48	0.24	411	gi 23976184	gi 421813	6	73
1305	Storage protein, bark - cottonwood	1.5	0.57	-1.6**	0.002	1.52	0.22	256 (+22)	gi 24063259	gi 421813	5	41
1307	Storage protein, bark - cottonwood	1.05	0.71	-1.54***	0.0095	-1.04	0.91	489 (+51)	gi 24062421	gi 421813	6	72
Oxidoreduction												
617	Putative ketol-acid reductoisomerase [Capsicum annuum]	1.48*	0.018	-1.2	0.4			131	gi 33184027	gi 193290660	7	27

1492	Glutathione peroxidase [Populus trichocarpa]		-1.69*	0.017	-1.22	0.43	403 (+110)	gi 56828206	gi 224071850	8	76
1495	Glutathione peroxidase [Populus trichocarpa]	1.37	-1.41*	0.025	1.09		272	gi 23981037	gi 224071850	8	82
1367	Cytosolic ascorbate peroxidase -Apx1- [Vitis vinifera]	1.2	-1.32**	0.0016	-1.07	0.87	148	gi 52396856	gi 161778778	3	50
Cytoskeleton & cell wall											
1683	Tubulin alpha-1 chain	1.2	1.35**	0.0031	1.27	0.52	384 (+116)	gi 464840		7	60
739	Tubulin alpha chain. putative [Ricinus communis]	1.06	1.3**	0.0062	1.12*	0.044	384	gi 223543503		5	59
955	Actin [Malva pusilla]	1.02	1.15**	0.0078	-1.02	0.67	676	gi 5230841		8	71
957	Actin 1 [Actinidia deliciosa]	1.53*	-1.14		1.39	0.28	636 (+27)	gi 149938964		7	75
1606	Actin depolymerizing factor 1 [Populus trichocarpa]	1.2	-1.52*	0.025	-1.05	0.61	486	gi 56833130	gi 224059520	6	48
1490	Glycine-rich protein 2	1.18	1.37*	0.03	1.03	0.84	183 (+53)	gi 24012211	gi 121631	3	26
1471	Glycine-rich protein 2	1.28	1.36*	0.041	1	0.74	103 (+26)	gi 24004348	gi 121631	2	76
ATP synthesis coupled proton transport											
497	Vacuolar H+-ATPase catalytic subunit [Pyrus communis]	-1.34*	-1.14	0.4	1.16	0.075	142	gi 60592632		4	43
718	Putative mitochondrial ATP synthase beta subunit [Oryza sativa Japonica Group]	-1.16	1.59**	0.014	1.11	0.68	165 (+60)	gi 56784991		5	65
Miscellaneous											
1014	Predicted protein [Populus trichocarpa]	-1.59**	1.13	0.59	1.18	0.32	268 (+60)	gi 23973657	gi 224126101	4	40
1020	Predicted protein [Populus trichocarpa]	-1.67*	1.15	0.92	1.25	0.85	282 (+122)	gi 23973657	gi 224126101	5	44
1023	Predicted protein [Populus trichocarpa]	-1.69**	1.16	0.75	1.22	0.51	247 (+69)	gi 23973657	gi 224126101	4	44
1330	Ran3 GTP binding protein [Iberis amara]	-1.22	-1.4**	0.003	1.13	0.83	156		gi 157467219	4	78
695	Serine hydroxymethyltransferase [Populus tremuloides]	1.08	1.5*	0.014	1.05	0.61	153		gi 134142065	5	34
789	UDP-glucosyltransferase, putative [Ricinus communis]	-1.22	-1.09	0.58	-1.52*	0.045	73 (+61)	gi 33185420	gi 223535064	6	73

1: spot number on the master gel

2: Protein obtained by blasting the EST against the NCBIInr database

3: MASCOT score (protein score as given by the GPS software (Applied Biosystems))

4: Accession number of the EST sequence in the NCBIInr database

5: Accession number of the corresponding protein in the NCBIInr database

6: Average ratio of the protein abundance (Treated/Control). Positive values of ratio are given as such, negative values are given according to the following formula: given value = -1/average ratio

7: p-value of Student's t-test.

4. Discussion

Physiological status

Drought or water deprivation is detrimental to plant growth and physiology since the water flux from the soil to the air is the driving force of cell feeding in minerals. As a first reaction to water deficit, a plant in general, and particularly poplar, tends to close its stomata (Caruso *et al.* 2002; Silim *et al.* 2009). This limits water losses and damage in tissues, and especially the irreversible cavitation of xylem, although this also induces a putative shortage in supply that can affect the whole metabolism (Cochard *et al.* 2007).

In the present study, the watering starvation resulted in a significant decrease of the predawn leaf water potential of the plant (Ψ) within 4 days (Figure 1). According to the monitoring of Ψ , it was possible to realize two samplings. The first sampling, on day 8 was done on poplar plants which already perceived and reacted to the water deficit: the stomatal conductance exhibited a 77% reduction, correlated with a 74% decrease in the photosynthetic rate (Table 1). In the same time, the leaf RWC was lessened by 6%. On day 8 the water constraint induced changes that impaired the functioning of the plant, leading to the observation that plants underwent a creeping drought stress.

The second sampling was realized on day 12. The leaf Ψ reached -0.90 MPa, which represents a strong constraint for trees as drought-sensitive as poplars (Monclus *et al.* 2009). As the soil became dryer, the stomatal conductance displayed a 88% inhibition compared to control plants while the leaf RWC remained significantly lower in stressed plants. In parallel, the stem height ceased expanding (Table 1). Similarly, the stem diameter of stress exposed plants did not further expand between days 8 and 12 (Figure 2) even if no significant difference occurred compared to control plants. Considering the changes in stem water content (Table 1), and that, after rewatering, the two trunk diameter curves meet again within 2 days, it is obvious that the water reserve of the stem was mobilized during the stress. Consequently on day 12 the plants faced an installed drought stress.

Proteomic changes in the leaf

The proteins of the photosynthetic apparatus were among the most affected by water stress. The mild stress that occurred on day 8 (-0.5 MPa) only induced a more abundant oxygen evolving enhancer 2 (spot 2114). The proteins of the water-splitting complex are known to be among the most sensitive indicators of drought (Blodner *et al.* 2007). On day 12, 4 RuBisCO spots (1236, 1444, 1569 & 2220) were less abundant, whereas 4 light harvesting complex II (lhcb) spots (1630, 1860, 1914 & 1916) were increased in quantity. This can be explained by a need for replacement of less active or damaged proteins that would be consistent with the high stress sensitivity of the photosystem 2 (PSII) (Murata *et al.* 2007). One ferredoxin oxidoreductase (spot 1514) was also reduced on day 12. During and after the water constraint, a hydroxypyruvate reductase was less abundant (spots 1126 & 1135), which is bound to the regeneration of glycerate 3-phosphate used in the Calvin cycle. After recovery, 12 proteins related to photosynthesis were increased in intensity: 6 RuBisCO (spots 1441, 2116, 2157, 2158, 2161 & 2220), the 4 lhcb proteins previously altered on day 8, and 2 spots of the lhca (spots 2041 & 2045).

The quantitative changes that occurred in the carbohydrate metabolism during the experiment were globally negative for every sampling date. The principal proteins affected by drought were some fructose-bisphosphate aldolase (spots 1140, 1149, 1218, 1233 & 1240) and some glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (spots 1109, 1213, 1238 & 1261). However, one carbonic anhydrase increased on days 12 and 19 (spot 2047). This enzyme is involved in CO₂ fixation and in processes of photosynthesis and respiration (Moroney *et al.* 2001).

The protein metabolism was marginally affected. The reduction in quantity of an O-acetylserine (thiol)lyase (spot 1284), also implied in sulfur metabolism, and the up regulation of a 20S proteasome beta subunit on day 19 (spot 2112) are insufficient to conclude about general effects on protein metabolism and catabolism.

Several proteome modifications indicate an effect of drought stress on cell membranes. Two plastid-lipid-associated proteins were increased in quantity by drought on day 8 (spots 1638 & 1648), one of those was also up regulated on day 19. The same response was previously observed under heat stress (Durand *et al.* unpublished). One SHOOT 1 protein was more abundant on day 8 (spot 1451), one another was reduced in quantity in day 12

(spot 1446). This protein possesses a tetratricopeptide repeat (TPR) domain and a PDZ domain that suggests an interaction with the plasma membrane. The "predicted protein" in the spot 1454, reduced in quantity on day 19, was another protein with a TPR domain. One protein with a TPR domain has recently been shown to be required for the ABA-mediated response of *Arabidopsis thaliana* to osmotic stress (Rosado *et al.* 2006).

Two chloroplastic ATPase increased in amount on day 8, (682 & 685), therefore, the energy metabolism was affected early in the drought stress. A chloroplast ATPase was shown to accumulate under water stress in rice leaf (Ali *et Komatsu* 2006). There is a link between mitochondrion and photosynthesis; the reduction of TCA enzymes has been correlated to augmented ascorbate acid synthesis and improved photosynthesis (Nunes-Nesi *et al.* 2008). Indeed, stressed plants exhibited a reduced abundance in 2 malate dehydrogenase (spots 1263 & 1663). Furthermore, the increased amount of a glycolate oxidase (spot 2127) on day 19 is consistent with a role of the glycolate oxidation in the metabolic flexibility towards environment changes (Niessen *et al.* 2007), and suggests that it could be involved in acquired tolerance.

Among stress related proteins, 2 germin-like and one auxin-binding protein were affected on day 19 (spots 2135, 2181 & 2198). These two families of proteins are very close (Ohmiya *et al.* 1998) and play multiple roles in development, cell wall synthesis, osmotic regulation, carbohydrate catabolism, etc. (Caliskan 2000; Timpote 2001). Interestingly 2 GroES chaperonin (1955 and 1963), a 2-cys peroxiredoxin (2074) and a catalase 1 (2109) were not affected during the constraint, but increased in amount only at day 19. A 2-cys Peroxiredoxin, a nuclear-encoded chloroplastic protein, was up regulated in rice leaf during drought (Ali *et Komatsu* 2006).

Proteomic changes in the cambial zone

The majority of the protein changes in the cambial zone occurred on day 12, *i.e.* during the acute phase of the stress. The prominent proteomic feature of the early cambial response to drought was the decreased abundance of 3 spots of a predicted protein (1014, 1020 & 1023, ratios from -1.69 to -1.59). An Interproscan⁹ interrogation showed the presence of a lipase-

⁹ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

GDSL domain in these unnamed proteins. GDSL-motif proteins have been associated with salt stress and wound stress resistance in plants (Naranjo *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008). Some GDSL-motif proteins have also been shown to be reduced in quantity in cambium of poplar under Cd stress (Durand *et al.* 2010, *in press*). No precise role has been allocated to them yet.

Two sucrose synthase were more abundant on day 12 (spots 239 & 245), possibly involved in osmotic adjustment, or to meet the increased glycolytic demand caused by stress (Déjardin *et al.* 1999). The transcription of sucrose synthase is up-regulated under drought stress in leaves of *Arabidopsis* (Baud *et al.* 2004) whereas its abundance is decreased by heat shock in cambium of poplar (Durand *et al.*, unpublished).

Some changes in the protein metabolism on day 12 tend to show a decrease in protein degradation (spots 1325 & 1407). In the same time, a putative elongation factor EF-2 (spot 354) increased in abundance, which intervene in the cold response of *Arabidopsis* (Guo *et al.* 2002), and, potentially, in the drought tolerance of *Prosopis juliflora* (George *et al.* 2007). Altogether with the 2 glycine-rich proteins (1471 & 1490), which own a cold shock domain, and are reported to stabilize RNA for translation improvement under stress (Sahi *et al.* 2007), this suggests an active stress response of the cambial tissue at the translational level.

During the acute phase of the water stress, 2 glutathione-S-transferase and one class 1 ascorbate peroxidase (APX1) decreased in abundance (spots 1492, 1495 & 1367), signs of a redox modification in the tissue. APX1 is part in the apoplastic antioxidant system which is involved in the regulation of H₂O₂ levels that participates to the lignification process (Ros-Barcelo *et al.* 2006).

The most quantitative feature of the cambial proteome response to drought was a decrease in abundance of 10 28 kDa bark storage proteins (BSP, spots 1273, 1275, 1278, 1279, 1281, 1282, 1286, 1287, 1305 & 1307). This change occurred while the curve representing the diameter growth of the trunk showed a clear although non-significant inflection (Figure 2). The BSPs have an important role in relation to short-time and seasonal nitrogen and carbon trade-off between storage and mobilization (Coleman *et al.* 1994; Chantuma *et al.* 2009). The mobilization of storage proteins and carbohydrate has already been related to drought response in Oak (Jorge *et al.* 2006). In leaves of *Populus trichocarpa* under water stress, Plomion *et al.* (2006) observed an accumulation of BSP. The mobilization

of nitrogen and carbohydrates stored in BSP may allow the cambium to remain active in spite of the drastic limitation of photosynthesis and the consequent shortage of photosynthates.

Others

The drought induced response exhibited changes in functions involved in the cytoskeleton and cell wall synthesis: tubulin (spots 739 & 1683) and actin (955, 957 & 1606) ; the cell wall adaptation to water deficit tolerance is an important issue in the comprehension of plant growth under constraint (Moore *et al.* 2008). A vacuolar ATPase decreased in amount on day 8 (spot 497). The involvement of V-type ATPase in stress response, possibly linked to cell turgor, is far from being clarified yet (Dietz *et al.* 2001). A mitochondrial ATPase was found to increase in abundance on day 12 (spot 718). A serine hydroxymethyltransferase was more abundant on day 12 (spot 695). This serine producing enzyme is linked to photorespiration and C1 metabolism and has been described in stress context; its abundance increased in leaf of rice under water stress (Ali et Komatsu 2006) but decreased in leaves of poplar under ozone stress (Bagard *et al.* 2008).

Conclusion

In accordance with what is known, poplar exhibited constancy in the drought response pattern : stomatal closure (Marron *et al.* 2002), leaf water potential reduction (Bonhomme *et al.* 2009b) leaf abscission (Marron *et al.* 2003), growth inhibition (Monclus *et al.* 2006). The response exhibited contrasted proteomic patterns depending on the tissue. Proteomic data indicate a delay between the response in leaves, which stressed state was clear on day 8, and cambial zone which was unaffected at this date, except for the inhibition of 3 GDLS-motif proteins. When stem water content was altered by water shortage, on day 12, then the cambial proteome changes indicated a stress. Differences arose between tissues. The leaf tissue particularly exhibited increased abundance in proteins of the light harvesting complex, as was reported by Ali & Komatsu (2006). This did not avoid a reduction in P_N . Leaf proteome also displayed changes in proteins related to membrane stability, consistently with membrane integrity being jeopardized by water stress and having a key role in stress

sensing. On the other hand, the bark storage protein decrease was a marked cambial specific feature in this experiment.

Another noteworthy difference appears when comparing sustainable changes. After recovery, only very few changes were observed in cambial proteome (1 out of 65 differential proteins) whereas an important fraction of the leaf proteome changes occurred specifically at this date (45 out of 82). This can be correlated to stress acclimation or to 'priming' (Bruce *et al.* 2007) that enables an acquired tolerance towards future stress. From these data, it seems that the foliar tissue is more propitious to prophylactic arrangement than cambium, probably due to its more precocious stress sensitivity.

4.7 Discussion et perspectives

Au cours de cette étude, les plants de peupliers ont été soumis à un stress réversible ; 100% des plants y survivent, reprennent leur croissance et retrouvent un niveau photosynthétique similaire aux témoins. L'abscission des feuilles inférieures peut être considérée comme un dommage chronique, mais également comme une réponse adaptée de réduction de la surface foliaire visant à limiter les pertes d'eau (Tardieu 2005).

Après 8 et 12 jours d'arrêt de l'arrosage, la teneur en eau du sol représentait respectivement une réduction de 34 et de 48% de la capacité au champ (données non publiées). Sans surprise, les changements protéomiques traduisent une différence dans la perception de la contrainte. A partir du prélèvement du 8^{ème} jour, alors que le cambium n'est quasiment pas affecté, les feuilles, davantage exposées, subissent des changements. Au 12^{ème} jour, alors que la teneur en eau de la tige est significativement altérée (-7%), se produit l'essentiel des changements dans le protéome cambial. Ces changements indiquent un ralentissement d'activité métabolique et une mobilisation des réserves (bark storage proteins).

Les changements hypothétiquement liés à une réponse de type *stress* se limitent à la diminution en abondance de 3 protéines possédant un domaine GDSL au 8^{ème} jour et à la (légère) diminution de 3 enzymes du cycle Halliwell-Asada au 12^{ème} jour. Il semble donc que, la diminution de son activité mise à part, la zone cambiale ne subisse pas de dommages particuliers au cours de cette expérience. La sensibilité du peuplier à la sécheresse ne se joue vraisemblablement pas à ce niveau.

Au niveau foliaire, un phénomène intéressant se produit après la période de réarrosage, au jour 19. La contrainte est terminée, les plantes ont retrouvé un état normal d'après tous les paramètres mesurés. Le profil protéique foliaire montre néanmoins une amplitude de changements aussi importante que lors de la contrainte, et concernant des spots qui n'avaient pas été significativement affectés au cours de cette contrainte. Les teneurs en RuBisCO, en lhca, en fructose biphosphate aldolase, par exemple, sont supérieures à celles des plants témoins. C'est aussi le cas de deux chaperonnes GroES.

De nombreux exemples de tolérance acquise par une exposition préalable à un agent stressant (Uenishi *et al.* 2006; Fujita *et al.* 2006) ont fondé le principe de l'amorçage des défenses par un épisode de stress (Bruce *et al.* 2007), et l'on peut supposer que c'est ce phénomène qui se produit dans les feuilles de peupliers après un stress hydrique. Les données indiquent qu'une fois revenue aux conditions optimales, les feuilles ne retournent pas à leur état initial, comme on peut le voir dans le tissu cambial, mais présentent un nouveau profil protéomique.

Il semble logique que l'amorçage ait lieu au niveau des organes les plus sensibles, c'est-à-dire les feuilles, plus précocement affectées par la contrainte comme l'expérience l'a montré, et où une réponse rapide est primordiale pour la gestion du stress, ce qui tendrait à expliquer l'absence de réponse dans le cambium après 7 jour de retour à la capacité au champs.

La manière dont cet amorçage permet à la plante de se prémunir contre une contrainte à venir est encore discutée (Goellner et Conrath 2008; Beckers *et al.* 2009) et représente un aspect important de la réponse du végétal, une adaptation au fait qu'une contrainte environnementale se produit rarement de manière isolée.

Chapitre 5

Discussion générale

- 5.1 *État de stress en relation avec les contraintes*
- 5.2 *Réponses foliaires au stress chez le peuplier*
- 5.3 *Réponses cambiales au stress chez le peuplier*
- 5.4 *Perspectives*

5.1 État de stress en relation avec les contraintes

Dans chacun des trois types de stress étudiés au cours de cette thèse, à savoir les stress métallique, thermique et hydrique, le suivi des paramètres physiologiques et morphologiques de la plante nous a permis d'observer l'impact des contraintes appliquées afin de les définir comme telles. C'est ainsi que l'exposition du peuplier à un sol contenant 265 ou 300 mg Zn.kg⁻¹, par son absence d'effet sur les paramètres mesurés (croissance primaire et secondaire, échanges gazeux, homéostasie de minéraux essentiels) s'est avérée ne pas correspondre à une contrainte : la plante n'était pas dans un état de stress, ce que confirment les très faibles changements observés dans l'analyse protéomique (chapitre 2 : stress métallique).

Dans les autres cas étudiés, l'impact du traitement est clairement visible. L'exposition à 360 mg Cd.kg⁻¹ dans le sol perturbe fortement la croissance et la photosynthèse des plantes. L'exposition à 50 mg Cd.kg⁻¹ présente des symptômes moins sévères, néanmoins ces deux traitements provoquent un stress métallique caractérisé et une accumulation des métaux dans les organes de la plante. L'élévation de température de 22 à 42°C sur un mode graduel (HG) ou sous forme de choc (HS) affecte la plante de manière contrastée, mais l'affecte significativement (Chapitre 3 : stress thermique). L'arrêt d'arrosage a un impact clairement démontré sur la physiologie de la plante dès le 6^{ème} jour (Chapitre 4 : stress hydrique). Ces contraintes sont suivies d'une période d'exposition aux conditions 'normales' considérées comme étant optimales ; sauf pour le stress métallique, la pollution du sol étant irrémédiable. Là encore, le suivi des paramètres physiologiques a permis de constater un retour au fonctionnement normal de la plante.

Les contraintes étant de natures différentes, elles ont des effets distincts, et il est difficile de quantifier l'intensité du stress produit en vue de comparer les expériences réalisées. La mesure de l'activité des enzymes du cycle Halliwell-Asada ou la quantification des antioxydants cellulaires (glutathion, ascorbate, polyphénols, etc.) sont parfois évoquées pour estimer l'intensité du stress (Grene 2002; Arora *et al.* 2002). En effet, le stress oxydant intervient dans tous les types de stress jusqu'ici décrits (Mittler 2006b). Les mesures en question s'avèrent toutefois d'une interprétation délicate, d'une part parce qu'il existe un

grand nombre de protocoles qui ne mesurent pas exactement la même chose (Huang *et al.* 2005), et d'autre part parce que les niveaux de ROS, régulés par plus de 150 gènes constituent une réponse cellulaire de protection sans nécessaire corrélation avec un fort degré de stress (Mittler *et al.* 2004). Ainsi, la poussée oxydante¹⁰, qui peut conduire à la mort cellulaire programmée, est également médiatrice de la réponse de la cellule dans le cadre de stress abiotiques ou du développement. Par conséquent, la mesure du niveau de stress subi par la plante reste problématique.

Afin de pouvoir exploiter les résultats présentés dans cette thèse, nous fonderons l'estimation de l'intensité de la contrainte, d'une part sur les données physiologiques présentée plus haut et qui montrent des effets de même amplitude pour les stress thermiques et hydriques, et un effet plus sévère du stress métallique induit par le cadmium ; et d'autre part sur le niveau de perturbation du protéome : le nombre de spots protéiques significativement altérés lors du traitement (figure 5.1). Cette estimation est uniquement indicative ; elle ne tient compte ni du nombre total de spots protéiques détectés sur les gels d'électrophorèse ni du nombre de protéines effectivement présentes dans le tissu, ni de la quantité d'isoformes affectées, ni de l'intensité des variations subies par ces protéines. Elle va toutefois nous permettre de faire quelques observations qu'il conviendra de traiter avec prudence, puisque les durées des différents traitements sont également variables.

On note ainsi que l'exposition à un sol contenant 360 mg Cd.kg⁻¹ est la contrainte qui entraîne les plus nombreux changements dans les profils protéomiques, à la fois dans les feuilles et dans le cambium, tandis que l'exposition au Zn est celle qui en provoque le moins. Cela est cohérent avec les conclusions présentées ci-avant sur la sévérité du stress provoqué par Cd et sur l'absence de stress lors de l'exposition au Zn. Cela semble valider notre approche de l'estimation de l'intensité du stress par le biais du nombre de spots différentiels.

¹⁰ 'Oxidative burst' qui intervient en réaction à une élicitation par un pathogène (Bolwell *et al.* 1995), suite à un stress osmotique ou mécanique (Yahraus *et al.* 1995) ou encore thermique (Avsian-Kretchmer *et al.* 1999) et déclenche des réponses variées aux niveaux enzymatique et transcriptomique.

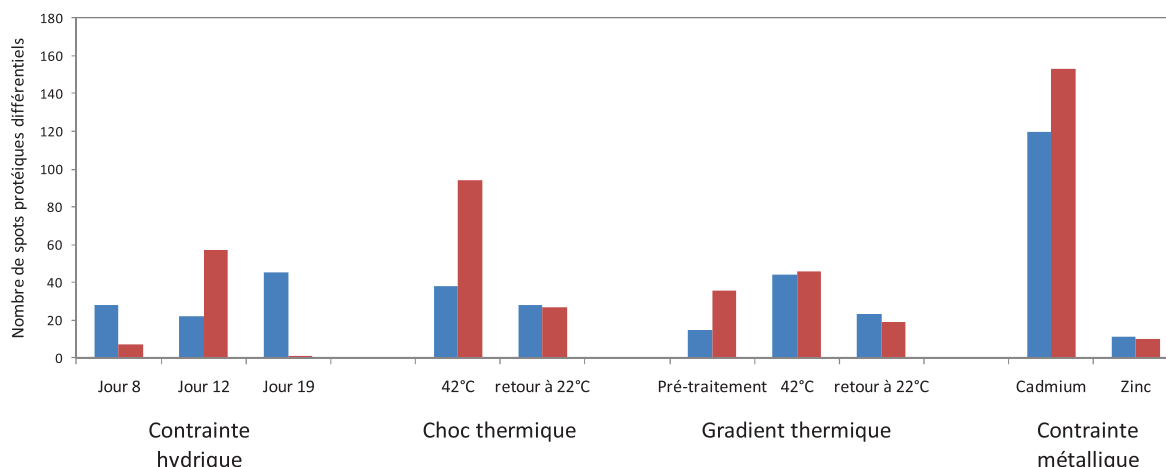


Figure 5.1 Spots protéiques présentant une intensité significativement altérée (ratio >1.3, $p < 0.05$) dans les feuilles (bleu) ou le tissu cambial (rouge) de jeunes plants de *Populus tremula* x *P. alba* 717-1B4 soumis à divers contraintes environnementales. Le retour aux conditions normales se déroule sur 7 jours pour les contraintes hydriques et thermiques.

La figure 5.1 permet de supporter les conclusions faites sur l'effet de la contrainte hydrique, à savoir que la feuille est le premier à subir un stress (jour 8), alors que le tissu cambial ne présente des changements protéomiques que lors de la phase aiguë de la contrainte (jour 12). Après 7 jours de réarrosage, le recouvrement des fonctions physiologiques s'accompagne d'un retour à la normale du profil protéomique cambial alors que la feuille présente des changements durables (c'est-à-dire, dans notre cas, visibles 7 jours après l'arrêt de la contrainte) potentiellement liés à l'amorçage d'une tolérance acquise.

Lors des contraintes thermiques, on observe une plus faible proportion de changements durables, c'est-à-dire visibles 7 jours après la fin de la contrainte (retour à 22°C), et aucune différence n'apparaît à cette date entre la feuille et le tissu cambial en terme de nombre de spots variables.

On remarque également que lors de la phase aiguë de la contrainte (jour 12 en stress hydrique ou HS 42°C), les changements sont plus nombreux dans le protéome cambial que dans la feuille : +159% lors du stress hydrique, et +147% lors du stress thermique. Cette différence est négligeable lors de l'élévation graduelle de la température (HG 42°C). Ce résultat est potentiellement dû au caractère 'peu' varié des fonctions impliquées dans l'activité cambiale qui a pour principale spécificité une division cellulaire importante. La feuille, en revanche, possède des capacités de synthèse multiples pour assurer ses fonctions,

il doit notamment, même en situation optimale, réguler les ROS produits par la photosynthèse et la respiration, et combattre les dégâts induits, notamment, par la lumière. Ainsi, schématiquement, les fonctions protéiques requises pour la réponse de stress sont moins présente dans le tissu cambial non stressé que dans la feuille, ce qui peut éventuellement expliquer les changements moins nombreux dans ce dernier.

On observe enfin sur la figure 5.1 que les traitements HS et HG, en termes quantitatifs, n'ont pas le même effet sur le protéome cambial. Pour aller plus loin dans la comparaison, il faut s'intéresser à l'identification des protéines différentielles.

5.2 Réponses foliaires de stress chez le peuplier

Les stress thermique, hydrique et métallique ont tous un effet drastique sur le niveau de la photosynthèse. Les changements protéomiques reflètent cet effet. La **RuBisCO** et la **RuBisCO activase** figurent parmi les protéines les plus affectées : leur teneur est réduite lors du stress, comme on peut le voir dans la littérature ([Romero-Puertas et al. 2002](#); [Vincent et Zivy 2007](#); [Allakhverdiev et al. 2008](#)). La chaîne de transport d'électrons et la fixation du carbone sont des étapes clairement affectées par le stress. Dans chacune des expériences, on observe que le stress touche de manière prononcée les protéines du PSII, comme les Lhcb et les OEE2. Cela confirme que le PSII est le complexe protéique de l'appareil photosynthétique le plus sensible aux contraintes abiotiques ([Murata et al. 2007](#)).

A partir des produits de la photosynthèse, la feuille procède à la synthèse des glucides, synthèse qui subit les conséquences d'une baisse de l'activité photosynthétique. Au cours des contraintes, le métabolisme des sucres est fortement diminué, ainsi que le métabolisme énergétique en général. Les profils protéomiques suggèrent également une augmentation de la photorespiration.

Le niveau de redox de la cellule est modifié par le stress oxydant qui accompagne les contraintes. Les biomolécules oxydées peuvent devenir toxiques, c'est pourquoi on observe des changements d'abondance (généralement dans le sens d'une augmentation) des enzymes de détoxification du cycle Halliwell-Asada et surtout de peroxyredoxines qui, avec les HSP, sont les protéines qui présentent les modifications les plus importantes et les plus systématiques.

Ces fonctions représentent l'essentiel de la partie identifiée de la réponse protéomique foliaire, c'est-à-dire 78% de cette dernière, et expliquent la réduction de croissance primaire et secondaire observée lors des contraintes hydriques et métalliques ; la durée limitée des contraintes thermiques empêche de conclure quant à leur effet sur la croissance.

Parmi les changements minoritaires, on observe d'autres similitudes, en particulier entre les réponses à l'arrêt d'arrosage et au gradient thermique : des modifications en abondance de germin-like proteins. Cette réponse est partagée, dans une moindre mesure, avec le stress métallique. Les germes et les germin-like appartiennent à une famille multigénique liée à la tolérance envers diverses contraintes (Manosalva *et al.* 2009). Elles interviennent potentiellement dans le métabolisme pariétal lors du stress ou au cours du développement (Mathieu *et al.* 2006).

La réponse foliaire envers les différentes contraintes appliquées apparaît globalement identique. Au niveau du protéome analysé, l'état de stress semble générique. La cinétique de la réponse est, quant à elle, dépendante de la nature biophysique de la contrainte. Les données recueillies ne permettent pas d'expliquer pourquoi le stress hydrique est le seul à produire une importante durabilité des modifications protéomiques.

5.3 Réponses cambiales de stress chez le peuplier

Le cambium est un tissu beaucoup moins accessible à l'observation que la feuille. La mesure de son état physiologique nécessite une approche histologique ou un suivi de la croissance radiale dont il est le moteur. L'une comme l'autre de ces méthodes ne peuvent s'inscrire dans l'étude de stress de courte durée comme c'est le cas de la plupart des traitements effectués durant cette thèse. L'analyse superficielle de coupes histologiques de tiges à l'issue des 61 jours d'exposition des plantes au Cd ou au Zn n'a pas permis de montrer un effet du traitement sur la structure du xylème (épaisseur des parois, ratio vaisseaux / fibres) ; cette démarche n'a donc pas été entreprise pour les autres contraintes.

Le suivi de la croissance radiale de la tige a été réalisé grâce à la pose de dendromètres mis au point à l'INRA d'Orléans. Situés 5 cm sous la nouvelle pousse de la bouture, ils permettent la capture à intervalles réguliers (par exemple toutes les 5 minutes) de l'accroissement du diamètre de la bouture initiale (figure 5.2).



Figure 5.2 Dendromètre mesurant en permanence l'accroissement du diamètre de la tige de la plante.

La durée des contraintes thermiques (2 jours pour HS, 5 jours pour HG) n'a pas permis d'observer d'effet significatif d'une élévation de la température sur l'accroissement du diamètre de la tige. Le traitement par arrêt d'arrosage s'est déroulé sur 12 jours. Le potentiel hydrique foliaire de base était significativement affecté au 6^{ème} jour, on considérera que la contrainte hydrique a duré 6 jours. Les données sur l'accroissement radial (figure 5.3, également présentée dans l'article au chapitre 4.6) montrent un infléchissement à partir du 6^{ème} jour. L'accroissement radial semble stoppé jusqu'au jour 12 où la teneur en eau de la tige est significativement réduite, même si aucun effet statistique sur le diamètre n'est mesuré.

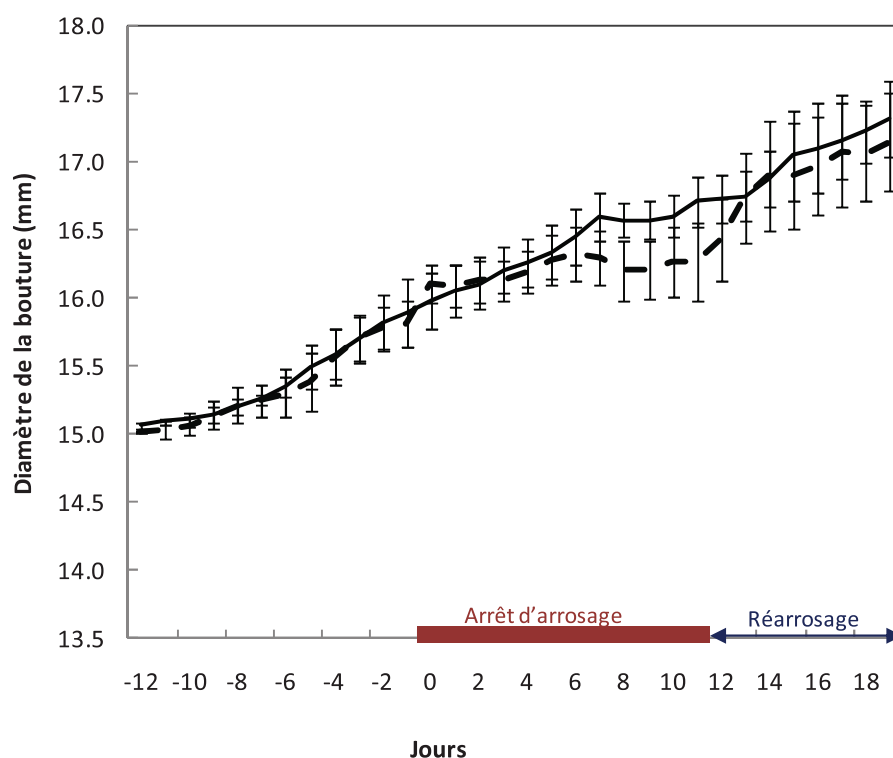


Figure 5.3 Evolution du diamètre de la bouture de *Populus tremula* x *P. alba* en condition témoin (ligne continue) ou soumis à un arrêt d'arrosage (ligne discontinue). Les plants stressés sont à nouveau arrosés au jour 12 sur une durée de 7 jours. Les barres représentent l'erreur standard pour 6 réplicats.

L'exposition au Cd induit une inhibition de la croissance radiale qui est clairement significative (voir chapitre 2.8 et figure 5.4). Cet effet est visible dès que le débourrement de la nouvelle tige donne les premières feuilles qui réamorcent la croissance radiale des plants témoins (les plantes ont été recépées afin que l'ensemble des tissus se forme en présence du métal).

On voit ici que l'intensité du stress au niveau du tissu cambial est plus délicate à apprécier encore que dans le cas de la feuille, en particulier pour des contraintes de courte durée.

L'ensemble des contraintes présentées ici déclenche une série de changements génériques dans le cambium du peuplier. Pour toutes on observe une réduction du métabolisme du carbone et des glucides, une inhibition de la synthèse protéique, une abondance réduite de protéines impliquées dans la formation du cytosquelette et de la paroi. L'activité méristématique du tissu cambial semble clairement inhibée, ce qui tend à confirmer que la

croissance radiale est bien affectée par la contrainte hydrique, au moins au jour 12. Au-delà de ce noyau commun de la réponse de stress, les différentes contraintes ont chacune provoqué une réponse singulière.

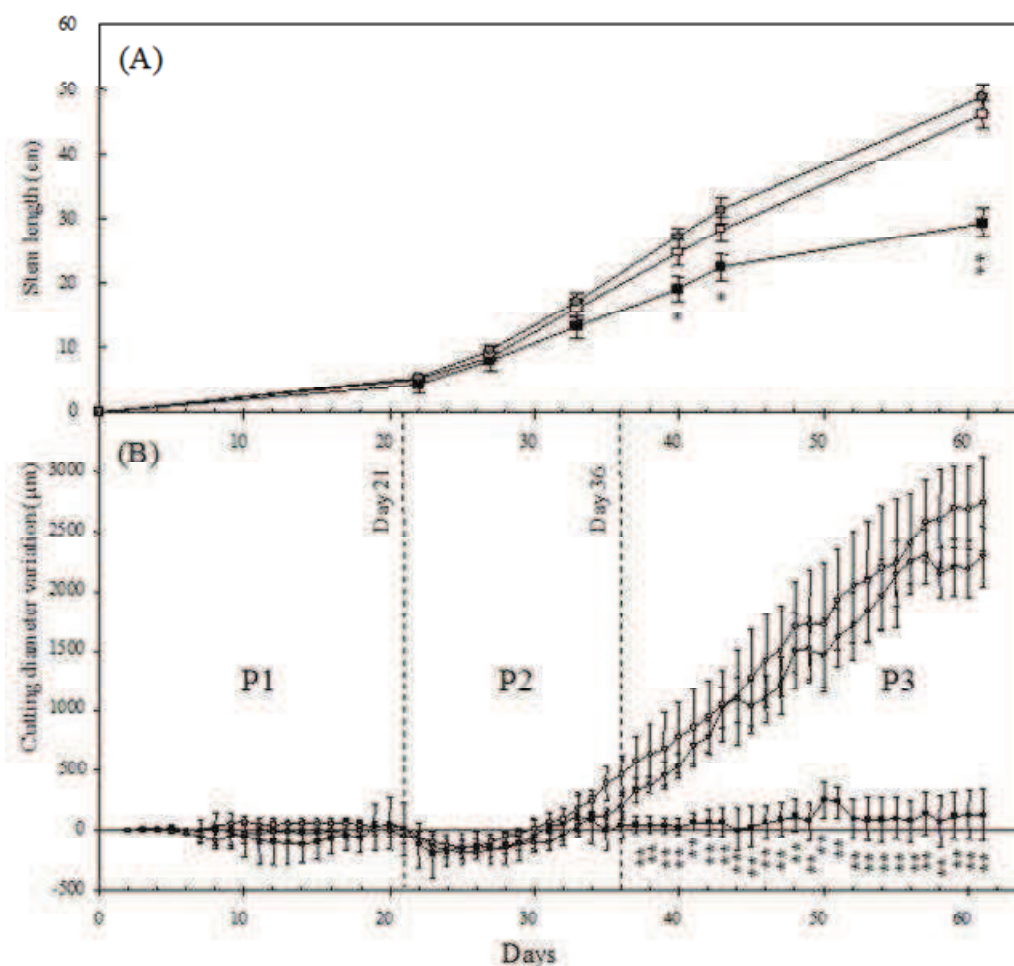


Figure 5.4 Croissance en hauteur de la tige (A) et accroissement du diamètre de la bouture de *Populus tremula* x *P. alba* en condition témoin (carrés blancs) ou exposé à un sol contenant 265 mg Zn.kg⁻¹ de Zinc (cercles gris) ou 360 mg Cd.kg⁻¹ (carrés noirs). Les barres représentent l'erreur standard pour 4 réplicats.

Aspects spécifiques de la réponse cambiale

Le **stress métallique** s'accompagne spécifiquement d'une plus grande abondance de 12 spots de **DNA-binding aspartyl protease**, des protéines chloroplastiques. Cette famille de protéines n'apparaît dans aucun des autres stress étudiés. Il existe 51 gènes putatifs d'aspartyl peptidase chez *A. thaliana* ; leur rôle reste à définir (Faro et Gal 2005).

Au cours du **stress hydrique** a lieu une baisse dans l'abondance de 10 spot de **bark storage protein**. 2 spots de BSP sont également affectés lors du choc thermique, mais de manière contradictoire. Cet effet massif sur un grand nombre d'isoformes de protéines de stockage de l'azote est spécifique à la réponse au déficit en eau.

L'élévation graduelle de la température, **HG**, induit l'augmentation dès le jour 8 (pré-traitement progressif pour atteindre 30°C) de 10 spots de thaumatin-like proteins, essentiellement des protéines proches de l'**osmotine**. Il s'agit d'une réponse précoce, mais elle est également durable, avec 6 spots induit à 42°C et 2 spots 7 jours après le retour à 22°C. HS n'induit que deux spots d'osmotin-like protein. Ces protéines ont été mise en évidence dans plusieurs contextes de stress (Sadat Noori et Sokhansanj 2008; Parkhi *et al.* 2009).

Le choc thermique, **HS**, est la contrainte qui provoque la plus importante réponse en nombre de spots (figure 5.1), c'est également le stress qui montre le plus de spécificités dans les modifications protéomique du cambium. En effet, HS induit la baisse de 10 spots de sucrose synthase à 42°C. Cette réponse a disparu 7 jours après la fin de la contrainte. Seul le stress hydrique au jour 12 affecte également la **sucrose synthase**, mais les deux spots sont plus abondants. HS réduit l'abondance de 5 spots de **serine-hydroxymethyltransferase**, une enzyme impliquée dans la photorespiration dans les tissus foliaires (Juan *et al.* 2005), ce qui est peu vraisemblable dans le cambium. Cette enzyme prend aussi part au métabolisme en C₁¹¹ (Li *et al.* 2003) dont les liens avec le stress cellulaire n'ont, à notre connaissance, jamais été mis en évidence (Hourton-Cabassa *et al.* 1998; Hanson *et al.* 2000). Enfin HS produit une induction forte et durable de **HSP** et de **péroxyrédoxines**, deux types de protéines dont l'induction s'avère être la réponse la plus partagée entre les feuilles et le cambium, et quelle que soit la contrainte.

¹¹ One-carbon metabolism

Le tissu cambial montre donc une plus grande disparité de la réponse que la feuille. Le socle commun des modifications du protéome, ce que l'on pourrait qualifier de 'stress générique' représente une part moindre, alors que les traits singuliers sont plus nombreux que dans la feuille.

On constate que les éléments du stress générique, aussi bien dans un tissu que dans l'autre, sont des protéines dont la fonction est relativement bien connue. *A contrario*, les protéines spécifiques aux différentes contraintes, dans le cambium font le plus souvent partie des *proteins with obscure feature* évoquée dans l'introduction et que nous proposons de mettre en évidence.

Ainsi, ces résultats exploratoires confirment l'intérêt d'une approche non ciblée pour améliorer les connaissances sur les réactions des plantes aux changements de leur environnement.

En terme de **récapitulatif** de l'ensemble des résultats de ce travail, aussi bien au niveau foliaire que cambial, la figure 5.5 dresse le bilan des modifications physiologiques provoquées par les contraintes en relation avec les métabolismes affectés au niveau protéomique. La figure met en exergue les protéines dont l'abondance relative constitue une réponse spécifique et quantitativement importante vis-a-vis de chaque contrainte. Ces protéines spécifiquement affectées ont été observées dans le tissu cambial.

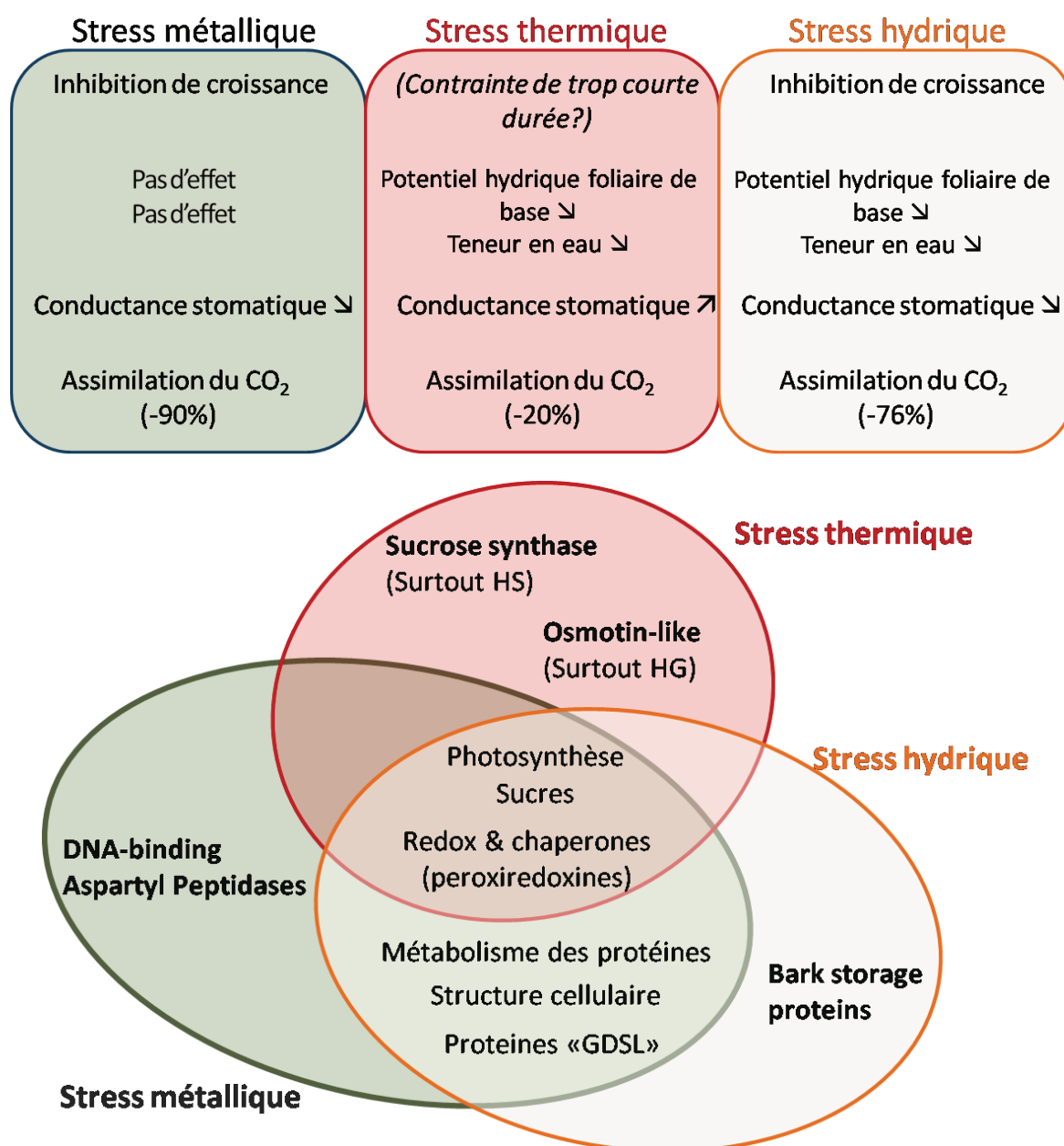


Figure 5.5. Changements provoqués par les contraintes sur les paramètres physiologiques (rectangles) et sur l'abondance relative de protéines impliqués dans divers métabolismes (cercles) chez *Populus tremula* x *P. alba*.

5.4 Perspectives

Bien que les données physiologiques et protéomiques se complètent et permettent d'appréhender l'état de la plante sous stress, un certain nombre d'informations sont requises pour confirmer ou infirmer les hypothèses qui ont été formulées.

Ainsi, la réponse du métabolisme des sucres ne peut pas être comprise sans un dosage des sucres du tissu considéré, qui permettrait par exemple d'enquêter sur le possible remaniement des voies métaboliques vers la production d'osmoprotecteurs lors du stress.

Le phénomène de stress pouvant être lié à virtuellement tous les aspects du fonctionnement de l'organisme, une approche holistique d'un stress bien caractérisé semble une stratégie prometteuse. On pourra ainsi combiner les données physiologiques, transcriptomiques, protéomiques, métabolomique, interactomiques, etc. Parmi les perspectives analytiques on pourra citer l'étude des phosphorylations protéiques et les recherches de localisation de protéines (cf le spot 2083 et sa séquence d'adressage chloroplastique, Chapitre 3.6), et les travaux sur des organites isolés.

Les études sur le stress mettent régulièrement en évidence l'intervention de protéines dont la fonction est mal connue, tels les protéines possédant des motifs GDSL ou TRP. La description des interactions de ces protéines sera une étape incontournable.

La comparaison des stress entre eux, qui a motivé cette thèse, nécessite de nouveaux efforts pour définir, par des observations physiologiques et morphologiques, des contraintes plus proches en terme d'effets et de durée. Il sera ensuite très instructif de comparer la réponse à ces contraintes de cultivars connus pour leurs différents degrés de tolérance ou de sensibilité, notre étude s'étant limitée à un seul génotype. Enfin, il semble acquis que la combinaison des contraintes soit la prochaine étape de ce genre d'études qui doit tendre à reproduire un peu plus fidèlement les conditions réelles d'exposition des plantes. A terme les expériences en phytotron trouveront avantage à être couplées avec des expériences en plein champ où les micro-facteurs de l'environnement jouent un rôle pour l'instant méconnu.

Ces thématiques, qui participent de la prospective des capacités d'ajustement des plantes, notamment des essences forestières, aux changements climatiques, trouvent par ailleurs des applications pratiques dans l'utilisation des plantes, et notamment du peuplier, en phytoremédiation, ou encore dans l'amélioration des espèces pour produire des cultures sur des sols ou des climats rigoureux.

Références

- Adkinson, A., Watmough, S. A., and Dillon, P. J. (2008) Drought-induced metal release from a wetland at Plastic Lake, central Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65, 834-845.
- Adriaensen, K., Van der Lelie, D., Van Laere, A., Vangronsveld, J., and Colpaert, J. V. (2004) A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist* 161, 549-555.
- Adriano, D. C. (1986) Trace elements in the terrestrial environment. 533p. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Ahsan, N., Renaut, J., and Komatsu, S. (2009) Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* 9, 2602-2621.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., and Citterio, S. (2007) Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany* 59, 381-392.
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., and Shaw, J. F. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* 43, 534-552.
- Alcantara, E., Romera, F. J., Canete, M., and De la Guardia, M. D. (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1893-1898.
- Alexander, L. V., Zhang, X., Peterson, T. C., Caesar, J., Gleason, B., Klein Tank, A. M. G., Haylock, M., Collins, D., Trewin, B., Rahimzadeh, F., Tagipour, A., Rupa Kumar, K., Revadekar, J., Griffiths, G., Vincent, L., Stephenson, D. B., Burn, J., Aguilar, E., Brunet, M., Taylor, M., New, M., Zhai, P., Rusticucci, M., and Vazquez-Aguirre, J. L. (2006) Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *Journal of Geophysical Research* 111: doi 10.1029/2005JD006290
- Ali, G. M. and Komatsu, S. (2006) Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *Journal of Proteome Research* 5, 396-403.
- Allakhverdiev, S., Kreslavski, V., Klimov, V., Los, D., Carpentier, R., and Mohanty, P. (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* 98, 541-550.
- Allan, W. L., Clark, S. M., Hoover, G. J., and Shelp, B. J. (2009) Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. *Biochemical Journal* 423, 15-22.
- Alloway, B. J. and Jackson, A. P. (1991) The behaviour of heavy metals in sewage sludge amended soils. *Science of the Total Environment* 100, 151-176.
- Altaf, W. (2007) Botanical environmental monitors for zinc pollution resulting from vehicular traffic. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 271, 665-670.
- Alvarez, S., Berla, B. M., Sheffield, J., Cahoon, R. E., Jez, J. M., and Hicks, L. M. (2009) Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics* 9, 2419-2431.

- Andersen, K., Semple, C., and Hartmann-Petersen, R. (2007) Characterisation of the nascent polypeptide-associated complex in fission yeast. *Molecular Biology Reports* 34, 275-281.
- Anderson, R. H. and Basta, N. T. (2009) Application of ridge regression to quantify marginal effects of collinear soil properties on phytoaccumulation of arsenic, cadmium, lead, and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 619-628.
- Andre, C. M., Schafleitner, R., Guignard, C., Oufir, M., Aliaga, C. A. A., Nomberto, G., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Evers, D., and Larondelle, Y. (2008) Modification of the health-promoting value of potato tubers field grown under drought stress: emphasis on dietary antioxidant and glycoalkaloid contents in five native andean cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 599-609.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A. (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research* 5, 196-201.
- Andrews, S. M., Johnson, M. S., and Cooke, J. A. (1989) Distribution of trace element pollutants in a contaminated grassland ecosystem established on metalliferous fluorspar tailings. 1: Lead. *Environmental Pollution* 58, 73-85.
- Angelini, R., Tisi, A., Rea, G., Chen, M. M., Botta, M., Federico, R., and Cona, A. (2008) Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiology* 146, 162-177.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Reynolds, M. P., and Royo, C. (2002) Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* 89, 925-940.
- Aravind, P. and Prasad, M. N. V. (2005a) Cadmium-induced toxicity reversal by zinc in *Ceratophyllum demersum* L. (a free floating aquatic macrophyte) together with exogenous supplements of amino- and organic acids. *Chemosphere* 61, 1720-1733.
- Aravind, P. and Prasad, M. N. V. (2005b) Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 107-116.
- Arduini, I., Masoni, A., Mariotti, M., and Ercoli, L. (2004) Low cadmium application increase *Miscanthus* growth and cadmium translocation. *Environmental and Experimental Botany* 52, 89-100.
- Arisi, A.-C. M., Mocquot, B., Lagriffoul, A., Mench, M., Foyer, C. H., and Jouanin, L. (2000) Responses to cadmium in leaves of transformed poplars overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Physiologia Plantarum* 109, 143-149.
- Arora, A., Sairam, R. K., and Srivastava, G. C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82, 1227-1238.
- Arora, R., Pitchay, D. S., and Bearce, B. C. (1998) Water stress-induced heat tolerance in geranium leaf tissues : A possible linkage through stress protein ? *Physiologia Plantarum* 103, 24-34.

- Assunção, A. G. L., Bookum, W. M., Nelissen, H. J. M., Vooijs, R., Schat, H., and Ernst, W. H. O. (2003) Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist* 159, 411-419.
- Atkin, O. K. and Tjoelker, M. G. (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* 8, 343-351.
- Atkinson, T. C., Briffa, K. R., and Coope, G. R. (1987) Seasonal temperatures in Britain during the past 22,000 years, reconstructed using beetle remains. *Nature* 325, 587-592.
- Avsian-Kretchmer, O., Eshdat, Y., Gueta-Dahan, Y., and Ben-Hayyim, G. (1999) Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta* 209, 469-477.
- Bagard, M., Le Thiec, D., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M. P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., and Jolivet, Y. (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum* 134, 559-574.
- Bai, J., Xu, D., Kang, H., Chen, K., and Wang, G. (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. *Photosynthetica* 46, 232-237.
- Baize, D. (1997) Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols, 410p., INRA Editions, Paris, France.
- Baker, A. J. M. (1987) Metal tolerance. *New Phytologist* 106, 93-111.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., and Smith, J. A. C. (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Phytoremediation of contaminated soils and water* (ed Terry, N. and Banuelos, G.). pp. 188-232, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. C., and Preston, C. A. (2006) Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: "Talking Trees" in the Genomics Era. *Science* 311, 812-815.
- Baniwal, S., Bharti, K., Chan, K., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S., Nover, L., Port, M., Scharf, K. D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., and von Koskull-Döring, P. (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Biosciences* 29, 471-487.
- Barcelo, J. and Poschenrieder, C. (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition* 13, 1-37.
- Barigah, T. S., Saugier, B., Mousseau, M., Guittet, J., and Ceulemans, R. (1994) Photosynthesis, leaf area and productivity of 5 poplar clones during their establishment year. *Annals of Forest Sciences* 51, 613-625.
- Bassman, J. H. and Zwier, J. C. (1991) Gas exchange characteristics of *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* clones. *Tree Physiology* 8, 145-159.

- Battaglia, M., Solorzano, R., Hernandez, M., Cuellar-Ortiz, S., Garcia-Gomez, B., Marquez, J., and Covarrubias, A. (2007) Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta* 225, 1121-1133.
- Baud, S., Vaultier, M. N., and Rochat, C. (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 55, 397-409.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., and Conrath, U. (2009) Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 21, 944-953.
- Beckers, G. J. and Conrath, U. (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 1-7.
- Begum, S., Nakaba, S., Bayramzadeh, V., Oribe, Y., Kubo, T., and Funada, R. (2008) Temperature responses of cambial reactivation and xylem differentiation in hybrid poplar (*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*) under natural conditions. *Tree Physiology* 28, 1813-1819.
- Behnke, K., Ehling, B., Teuber, M., Bauerfeind, M., Louis, S., Hänsch, R., Polle, A., Bohlmann, J., and Schnitzler, J.-P. (2007) Transgenic, non-isoprene emitting poplars don't like it hot. *The Plant Journal* 51, 485-499.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 21-34.
- Bernier, F. and Berna, A. (2001) Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 545-554.
- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., and Verbruggen, N. (2003) Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil* 249, 9-18.
- Berta, M., Giovannelli, A., Potenza, E., Traversi, M. L., and Racchi, M. L. (2009) Type 3 metallothioneins respond to water deficit in leaf and in the cambial zone of white poplar (*Populus alba*). *Journal of Plant Physiology* 166, 521-530.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Taconnat, L., Renou, J. P., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* 149, 1302-1315.
- Bhargava, P., Srivastava, A. K., Urmil, S., and Rai, L. C. (2005) Phytochelatin plays a role in UV-B tolerance in N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Journal of Plant Physiology* 162, 1220-1225.
- Bijlsma, R. and Loeschcke, V. (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 744-749.

- Bittsanszky, A., Komives, T., Gullner, G., Gyulai, G., Kiss, J., Heszky, L., Radimszky, L., and Rennenberg, H. (2005) Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress. *Environment International* 31, 251-254.
- Blodner, C., Majcherczyk, A., Kues, U., and Polle, A. (2007) Early drought-induced changes to the needle proteome of Norway spruce. *Tree Physiology* 27, 1423-1431.
- Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194.
- Bogeat-Triboulot, M. B., Brosche, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J. F., Polle, A., Kangasjarvi, J., and Dreyer, E. (2007) Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology* 143, 876-892.
- Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S., Hoffmann, L., Jolivet, Y., Hausman, J. F., Dizengremel, P., and Renaut, J. (2007) A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* 7, 1584-1599.
- Bolstad, P. V., Reich, P., and Lee, T. (2003) Rapid temperature acclimation of leaf respiration rates in *Quercus alba* and *Quercus rubra*. *Tree Physiology* 23, 969-976.
- Bolwell, G. P., Butt, V. S., Davies, D. R., and Zimmerlin, A. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23, 517-532.
- Bonan, G. B. (2008) Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science* 320, 1444-1449.
- Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Claverol, S., Lomenech, A. M., Labas, V., Plomion, C., Brignolas, F., and Morabito, D. (2009a) Genetic variation and drought response in two *Populus x euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. *Phytochemistry* 70, 988-1002.
- Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Lomenech, A.-M., Plomion, C., Brignolas, F., and Morabito, D. (2009b) Leaf proteome analysis of eight *Populus x euramericana* genotypes: Genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics* 9, 4121-4142.
- Borsani, O., Diaz, P., Agius, M. F., Valpuesta, V., and Monza, J. (2001) Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science* 161, 757-763.
- Bösl, B., Grimminger, V., and Walter, S. (2006) The molecular chaperone Hsp104—A molecular machine for protein disaggregation. *Journal of Structural Biology* 156, 139-148.
- Boudreau, E., Nickelsen, J., Lemaire, S. D., Ossenbühl, F., and Rochaix, J.-D. (2000) The NAC2 gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *The EMBO Journal* 19, 3366-3378.
- Bourrelier, P.-H. and Berthelin, J. (1998) Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion). 413p., Tec et Doc, Paris, France.

- Boyd, R. S. and Martens, S. N. (1992) The raison d'être for metal hyperaccumulation by plant. In: The vegetation of ultramafic (Serpentine) soils, pp. 279-289. Baker, Alan J. M., Proctor, J., and Reeves, R. D., Intercept Limited, Andover, Hampshire, UK.
- Boyer, J. S. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218, 443-448.
- Brack, A. (2001) Water, the spring of life. In: Astrobiology. The Quest for the conditions of life. pp 79-88. Horneck, G. and Baumstark-Khan, C., Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Braun, V., Buchner, O., and Neuner, G. (2002) Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine plant species under field conditions. *Photosynthetica* 40, 587-595.
- Bray, E. A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2, 48-54.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. (2000) Response to abiotic stresses. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants (ed Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R.), pp. 1158-1203, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA.
- Breshears, D. D., Myers, O. B., Meyer, C. W., Barnes, F. J., Zou, C. B., Allen, C. D., McDowell, N. G., and Pockman, W. T. (2009) Tree die-off in response to global change-type drought: mortality insights from a decade of plant water potential measurements. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7, 185-189.
- Brett, C. T. and Hillman, J.R. (1985) Biochemistry of Plant Cell Walls. 312p., Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., and Neill, S. J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* 45, 113-122.
- Brignolas, F., Thierry, C., Guerrier, G., and Boudouresque, E. (2000) Compared water deficit response of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. *Annals of Forest Science* 57, 261-266.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., and Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677-702.
- Brooks, A. and Farquhar, G. D. (1985) Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165, 397-406.
- Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A., and Pickett, J. A. (2007) Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science* 173, 603-608.
- Brunner, A. M., Busov, V. B., and Strauss, S. H. (2004) Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science* 9, 49-56.
- Buchanan, K. L. (2000) Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 156-160.
- Burukoglu, D. and Baycu, C. (2008) Protective effects of zinc on testes of cadmium-treated rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 521-524.

- Busch, F., Huner, N. P. A., and Ensminger, I. (2008) Increased air temperature during simulated autumn conditions impairs photosynthetic electron transport between Photosystem II and Photosystem I. *Plant Physiology* 147, 402-414.
- Cakmak, I. (2004) Identification and correction of widespread zinc deficiency in Turkey - a success story (a NATO-science for stability project). *Proceedings of the International Fertiliser Society* 552, 1-26.
- Cakmak, I. (2008) Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil* 302, 1-17.
- Caliskan, M. (2000) Germin, an oxalate oxidase, has a function in many aspects of plant Life. *Turkish Journal of Biology* 24, 717-724.
- Callahan, D. L., Baker, A. J. M., Kolev, S. D., and Wedd, A. G. (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biology and Inorganic Chemistry* 11, 2-12.
- Camejo, D., Rodriguez, P., Morales, M. A., Dell'Amico, J. M., Torrecillas, A., and Alarcon, J. J. (2005) High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* 162, 281-289.
- Cannon, W. B. (1932) *The wisdom of the body*. 864p., Norton, New York, USA.
- Carter, C., Graham, R. A., and Thornburg, R. W. (1998) Arabidopsis thaliana contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Molecular Biology* 38, 929-943.
- Caruso, A., Cheddor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F. M., Kahlem, G., and Morabito, D. (2008) Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology* 165, 932-941.
- Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G., and Carpin, S. (2002) Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 1033-1042.
- Castiglione, S., Franchin, C., Fossati, T., Lingua, G., Torrigiani, P., and Biondi, S. (2007) High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* L. cv. Villafranca). *Chemosphere* 67, 1117-1126.
- Celedon, P. A. F., de Andrade, A., Meireles, K. G. X., Costa da Cruz Gallo de Carvalho, M., Gregorio Gomes Caldas, D., Moon, D. H., Carneiro, R. T., Franceschini, L. M., Oda, S., and Labate, C. A. (2007) Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. *Proteomics* 7, 2258-2274.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M. H., and Masclaux-Daubresse, C. (2004) Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant and Cell Physiology* 45, 1681-1693.
- Chakraborty, U. and Tongden, C. (2005) Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. *Current Science* 89, 384-389.

- Chaney, R. L. (1993) Zinc phytotoxicity. In: Zinc in soil and plants (ed Robson, A. D.). pp 135-150, Kluwer Academy, Dordrecht, the Netherlands.
- Chantuma, P., Lacoïnte, A., Kasemsap, P., Thanisawanyangkura, S., Gohet, E., Clement, A., Guilliot, A., Ameglio, T., and Thaler, P. (2009) Carbohydrate storage in wood and bark of rubber trees submitted to different level of C demand induced by latex tapping. *Tree Physiology* 29, 1021-1031.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., and El Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127, 139-147.
- Chardonnens, A. N., ten Bookum, W., Kuijper, L. D. J., Verkleij, J. A. C., and Ernst, W. H. O. (1998) Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 104, 75-80.
- Chang, Y. Y., Liu, H. C., Liu, N. Y., Hsu, F. C., and Ko, S. S. (2006) *Arabidopsis* Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation. *Plant Physiology* 140, 1297-1305.
- Chaurasia, A. K. and Apte, S. K. (2009) Overexpression of the groESL operon enhances the heat and salinity stress tolerance of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6008-6012.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osorio, M. L., Carvalho, I., Faria, T., and Pinheiro, C. (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 907-916.
- Chaves, M. M. and Pereira, J. S. (1992) Water Stress, CO₂ and Climate Change. *Journal of Experimental Botany* 43, 1131-1139.
- Chefdor, F., Bénédicti, H., Depierreux, C., Delmotte, F., Morabito, D., and Carpin, S. (2006) Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system. *FEBS Letters* 580, 77-81.
- Chen, H.-X., Li, W.-J., An, S.-Z., and Gao, H.-Y. (2004) Characterization of PSII photochemistry and thermostability in salt treated *Rumex* leaves. *Journal of Plant Physiology* 161, 257-264.
- Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. (2000) 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28421-28427.
- Cho, U. H. and Seo, N. H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168, 113-120.
- Ciais, Ph., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogée, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchman, N., Bernhofer, C., Carrara, A., Chevalier, F., de Noblet, N., Friend, A. D., Friedlingstein, P., Grünwald, T., Heinesch, B., Keronen, P., Knohl, A., Krinner, G., Loustau, D., Manca, G., Matteucci, G., Miglietta, F., Ourcival, J. M., Papale, D., Pilegaard, K., Rambal, S., Seufert, G., Soussana, J. F., Sanz, M. J., Schulze, E. D., Vesala, T., and Valentini, R. (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437, 529-533.

- Cieslinski, G., Van Rees, K. C. J., Szmigielska, A. M., Krishnamurti, G. S. R., and Huang, P. M. (1998) Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant and Soil* 203, 109-117.
- Cipollini, D., Purrington, C. B., and Bergelson, J. (2003) Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology* 4, 79-89.
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S., and Berta, G. (2005) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere* 59, 21-29.
- Citterio, S., Santagostina, A., Fumagalli, P., Prato, N., Ranalli, P., and Sgorbati, S. (2003) Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. *Plant and Soil* 256, 243-252.
- Clarke, N. D. and Berg, J. M. (1998) Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. *Science* 282, 2018-2022.
- Clarke, S. M., Mur, L. A. J., Wood, J. E., and Scott, I. M. (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 38, 432-447.
- Cleland, E. E., Chuine, I., Menzel, A., Mooney, H. A., and Schwartz, M. D. (2007) Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 357-365.
- Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-486.
- Clemens, S., Antosiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P., and Schroeder, J. I. (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 12043-12048.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., and Krämer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7, 309-315.
- Cleve, B. and Apel, K. (1993) Induction by nitrogen and low temperature of storage-protein synthesis in poplar trees exposed to long days. *Planta* 189, 157-160.
- Clifford, S., Arndt, S., Corlett, J., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M., and Jones, H. (1998) The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *Journal of Experimental Botany* 49, 967-977.
- Close, T. J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97, 795-803.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. B. (2002) Phytochelatins and metallothioneins : roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 159-182.

- Cochard, H., Casella, E., and Mencuccini, M. (2007) Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiology* 27, 1761-1767.
- Cocoza, C., Lasserre, B., Giovannelli, A., Castro, G., Fragnelli, G., and Tognetti, R. (2009) Low temperature induces different cold sensitivity in two poplar clones (*Populus x canadensis* Monch 'I-214' and *P. deltoides* Marsh. 'Dvina'). *Journal of Experimental Botany* 60, 3655-3664.
- Colangelo, E. P. and Guerinot, M. L. (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 322-330.
- Coleman, G. D., Banados, M. P., and Chen, T. H. H. (1994) Poplar bark storage protein and a related wound-induced gene are differentially induced by nitrogen. *Plant Physiology* 106, 211-215.
- Collin, V. C., Eymery, F., Genty, B., Rey, P., and Havaux, M. (2008) Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant, Cell & Environment* 31, 244-257.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., Garcia-Augustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., and Mauch-Mani, B. (2006) Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 1062-1071.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., and Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37.
- Cornic, G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5, 187-188.
- Cosio, C., DeSantis, L., Frey, B., Diallo, S., and Keller, C. (2005) Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 56, 465-775.
- Cosio, C., Martinoia, E., and Keller, C. (2004) Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular Level. *Plant Physiology* 134, 716-725.
- Cosio, C., Vollenweider, P., and Keller, C. (2006) Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58, 64-74.
- Costa, G., Michaut, J. C., and Guckert, A. (1997) Amino acids exuded from axenic roots of lettuce and white lupin seedlings exposed to different cadmium concentrations. *Journal of Plant Nutrition* 20, 883-900.
- Cowan, D. A. (2004) The upper temperature for life - where do we draw the line? *Trends in Microbiology* 12, 58-60.
- COWI, A. (2003) Cadmium review. Nordic Council of Ministers Report No. 1, Issue No. 4, 26p. Available from: <www.norden.org/miljoe/uk/NMR_Cadmium.pdf>

- Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A., and Totterdell, I. J. (2000) Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature* 408, 184-187.
- Crafts-Brandner, S. J. and Law, R. D. (2000) Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. *Planta* 212, 67-74.
- Crafts-Brandner, S. J. and Salvucci, M. E. (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13430-13435.
- Crombie, H., Chengappa, S., Jarman, C., Sidebottom, C., Grant, R., and Reid, J. G. (2002) Molecular characterisation of a xyloglucan oligosaccharide-acting α -D-xylosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons that resembles plant 'apoplastic' α -D-glucosidases. *Planta* 214, 406-413.
- Cui, Y., Zhu, Y. G., Zhai, R., Huang, Y., Qiu, Y., and Liang, J. (2005) Exposure to metal mixtures and human health impacts in a contaminated area in Nanning, China. *Environment International* 31, 784-790.
- D'Angeli, S. and Altamura, M. (2007) Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta* 225, 1147-1163.
- Dafny-Yelin, M., Tzfira, T., Vainstein, A., and Adam, Z. (2008) Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 67, 363-373.
- Dalrymple, B. P., Cybinski, D. H., Layton, I., McSweeney, C. S., Xue, G. P., Swadling, Y. J., and Lowry, J. B. (1997) Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. *Microbiology* 143, 2605-2614.
- Dalton, T. P., He, L., Wang, B., Miller, M. L., Jin, L., Stringer, K. F., Chang, X., Baxter, C. S., and Nebert, D. W. (2005) Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 3401-3406.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52-54.
- Das, P., Samantaray, S., and Rout, G. R. (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98, 29-36.
- De Pino, V., Boran, M., Norambuena, L., Gonzalez, M., Reyes, F., Orellana, A., and Moreno, S. (2007) Complex formation regulates the glycosylation of the reversibly glycosylated polypeptide. *Planta* 226, 335-345.
- Degryse, F., Buekers, J., and Smolders, E. (2004) Radio-labile cadmium and zinc in soils as affected by pH and source of contamination. *European Journal of Soil Science* 55, 113-122.

- Déjardin, A., Sokolov, L. N., and Kleczkowski, L. A. (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 344, 503-509.
- Delhaize, E. and Ryan, P. R. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology* 107, 315-321.
- Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., and Czygan, F. C. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiology* 84, 218-224.
- Deng, H., Ye, Z. H., and Wong, M. H. (2006) Lead and zinc accumulation and tolerance in populations of six wetland plants. *Environmental Pollution* 141, 69-80.
- Deram, A., Denayer, F.-O., Petit, D., and Van Haluwyn, C. (2006) Seasonal variations of cadmium and zinc in *Arrhenatherum elatius*, a perennial grass species from highly contaminated soils. *Environmental Pollution* 140, 62-70.
- Dewar, R. C., Medlyn, B. E., and McMurtrie, R. E. (1999) Acclimation of the respiration/photosynthesis ratio to temperature: insights from a model. *Global Change Biology* 5, 615-622.
- Dhillon, K. S., Dhillon, S. K., and Thind, H. S. (2009) Evaluation of different agroforestry tree species for their suitability in the phytoremediation of seleniferous soils. *Soil Use and Management* 24, 208-216.
- Dickinson, N. M., Turner, A. P., and Lepp, N. W. (1991) How do trees and other long-lived plants survive in polluted environments? *Functional Ecology* 5, 5-11.
- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genot, G., Mariver, J., and Burkard, G. (1996) Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta* 199, 1-8.
- Dietz, K. J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S. S., Harris, G. C., Chardonnens, A. N., and Golldack, D. (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* 52, 1969-1980.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P. C., Suresh, S., Udaykiran, Y., and Damodharam, T. (2008) Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 20, 199-206.
- Dixit, V., Pandey, V., and Shyam, R. (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52, 1101-1109.
- Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 258-266.
- Dong, J., Wu, F., and Zhang, G. (2006) Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64, 1659-1666.

- Dos Santos Utmazian, M. N. and Wenzel, W. W. (2007) Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170, 265-272.
- Dos Santos Utmazian, M. N., Wieshammer, G., Vega, R., and Wenzel, W. W. (2007) Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environmental Pollution* 148, 155-165.
- Drazic, G., Mihailovic, N., and Stojanovic, Z. (2004) Cadmium toxicity: the effect on macro- and micro-nutrient contents in soybean seedlings. *Biologia Plantarum* 48, 605-607.
- Dreyer, E., Bogeat-Triboulot, M.-B., Le Thiec, D., Guehl, J.-M., Brignolas, F., Villar, M., Bastien, C., Martin, F., and Kohler, A. (2004) Tolérance des peupliers à la sécheresse : peut-on espérer l'améliorer ? : Le peuplier à l'ère génomique = Drought tolerance of poplars : is it possible to breed for it ? *Biofutur* 247, 54-58.
- Durand, T. C., Baillif, P., Albéric, P., Carpin, S., Label, P., Hausman, J.-F., and Morabito, D. (2010) Cd and Zn are differentially distributed in *Populus tremula* x *P. alba* exposed to metal excess. *Plant Biosystems*, submitted.
- Durand, T. C., Hausman, J.-F., Carpin, S., Albéric, P., Baillif, P., Label, P., and Morabito, D. (2009) Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus tremula* x *Populus alba*. *Biologia Plantarum* 54, 191-194.
- Durand, T. C., Sergeant, K., Planchon, S., Carpin, S., Label, P., Morabito, D., Hausman, J.-F., and Renaut, J. (2010) Acute metal stress in *Populus tremula* x *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by Cd²⁺. *Proteomics* 10, 349-368.
- Dziubinska, H., Filek, M., Koscielniak, J., and Trebacz, K. (2003) Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of *Vicia faba* minor seedlings. *Journal of Plant Physiology* 160, 1203-1210.
- Easterling, D. R., Meehl, G. A., Parmesan, C., Changnon, S. A., Karl, T. R., and Mearns, L. O. (2000) Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science* 289, 2068-2074.
- Edwards, R., Dixon, D. P., and Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5, 193-198.
- Eide, D. J. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 711-722.
- El-Gendy, A. S., Svingos, S., Brice, D., Garretson, J. H., and Schnoor, J. (2009) Assessments of the efficacy of a long-term application of a phytoremediation system using hybrid poplar trees at former oil tank farm sites. *Water Environment Research* 81, 486-498.
- Emsley, J. (2003) Nature's building blocks: An A-Z guide to the elements. 560p., Oxford University, Oxford, UK.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1, 529-539.

- Escalante-Perez, M., Lautner, S., Nehls, U., Selle, A., Teuber, M., Schnitzler, J. P., Teichmann, T., Fayyaz, P., Hartung, W., Polle, A., Fromm, J., Hedrich, R., and Ache, P. (2009) Salt stress affects xylem differentiation of grey poplar (*Populus x canescens*). *Planta* 229, 299-309.
- Evangelou, M. W. H., Daghan, H., and Schaeffer, A. (2004) The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere* 57, 207-213.
- Fagioni, M., D'Amici, G. M., Timperio, A. M., and Zolla, L. (2009) Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *Journal of Proteome Research* 8, 310-326.
- Fagioni, M. and Zolla, L. (2009) Does the different proteomic profile found in apical and basal leaves of spinach reveal a strategy of this plant toward cadmium pollution response? *Journal of Proteome Research* 8, 2519-2529.
- Fahnenstich, H., Scarpeci, T. E., Valle, E. M., Flugge, U. I., and Maurino, V. G. (2008) Generation of hydrogen peroxide in chloroplasts of *Arabidopsis* overexpressing glycolate oxidase as an inducible system to study oxidative stress. *Plant Physiology* 148, 719-729.
- FAO (2008) Les peupliers, les saules et le bien-être des populations. Synthèse des rapports d'activité nationaux. 23^{ème} session de la Commission internationale du Peuplier. 83p.
- Faro, C. and Gal, S. (2005) Aspartic proteinase content of the *Arabidopsis* genome. *Current Protein and Peptide Science* 6, 493-500.
- Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., and Hubick, K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 503-537.
- Farrant, J. M. (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology* 151, 29-39.
- Feder, M. E. and Hofmann, G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61, 243-282.
- Ferreira, S., Hjerno, K., Larsen, M., Wingsle, G., Larsen, P., Fey, S., Roepstorff, P., and Pais, M. S. (2006) Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. *Annals of Botany* 98, 361-377.
- Finney, L. A. and O'Halloran, T. V. (2003) Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300, 931-936.
- Förster, B., Mathesius, U., and Pogson, B. (2006) Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 6, 4309-4320.
- Fox, J. and Stover, P. (2008) The IRES-mediated translation of cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase (cSHMT) is stimulated by UV-induced DNA damage. *The FASEB Journal* 22, 786-792.

- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28, 1056-1071.
- Francis, R. A., Gurnell, A. M., Petts, G. E., and Edwards, P. J. (2005) Survival and growth responses of *Populus nigra*, *Salix elaeagnos* and *Alnus incana* cuttings to varying levels of hydric stress. *Forest Ecology and Management* 210, 291-301.
- Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R.J.P. (2001) The biological chemistry of the elements. 561p., Clarendon Press, Oxford, UK.
- French, C., Dickinson, N. M., and Putwain, P. D. (2006) Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141, 387-395.
- Frenette Charron, J.-B., Breton, G., Badawi, M., and Sarhan, F. (2002) Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 517, 129-132.
- Frenette Charron, J.-B. and Sarhan, F. (2005) Plant Lipocalins. In: Lipocalins (ed Akerstrom, Bo, Borregaard, Niels, Flower, Darren R., and Salier, Jean-Philippe).
- Froux, F., Ducrey, M., Epron, D., and Dreyer, E. (2004) Seasonal variations and acclimation potential of the thermostability of photochemistry in four Mediterranean conifers. *Annals of Forest Science* 61, 235-241.
- Fujishiro, H., Okugaki, S., Yasumitsu, S., Enomoto, S., and Himeno, S. (2009) Involvement of DNA hypermethylation in down-regulation of the zinc transporter ZIP8 in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* In Press, Corrected Proof.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 436-442.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., and Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121, 151-159.
- Gama, F., Keech, O., Eymery, F., Finkemeier, I., Gelhaye, E., Gardeström, P., Dietz, K. J., Rey, P., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2007) The mitochondrial type II peroxiredoxin from poplar. *Physiologia Plantarum* 129, 196-206.
- Gamberg, M., Braune, B., Davey, E., Elkin, B., Hoekstra, P. F., Kennedy, D., Macdonald, C., Muir, D., Nirwal, A., Wayland, M., and Zeeb, B. (2005) Spatial and temporal trends of contaminants in terrestrial biota from the Canadian Arctic. *Science of the Total Environment* 351, 148-164.
- Ganti, T., Horvath, A., Berczi, S., Gesztesi, A., and Szathmary, E. (2003) Dark dune spots: possible biomarkers on Mars? *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 33, 515-557.
- Garbisu, C. and Alkorta, I. (2003) Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection* 13, 58-66.

- Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J.-P., Blein, J.-P., Ranjeva, R., and Montillet, J.-L. (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell & Environment* 29, 1956-1969.
- Garrett, R. G. (2000) Natural sources of metals to the environment. *Human and Ecological Risk Assessment* 6, 945-963.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.-F., and Dommes, J. (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37, 263-285.
- George, S., Venkataraman, G., and Parida, A. (2007) Identification of stress-induced genes from the drought-tolerant plant *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. through analysis of expressed sequence tags. *Genome* 50, 470-478.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J. S., Mills, J. A., and Merila, J. (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17, 167-178.
- Gion, J.-M., Lalanne, C., Le Provost, G., Ferry-Dumazet, H., Paiva, J., Chaumeil, P., Frigerio, J.-M., Brach, J., Barré, A., de Daruvar, A., Claverol, S., Bonneu, M., Sommerer, N., Negroni, L., and Plomion, C. (2005) The proteome of maritime pine wood forming tissue. *Proteomics* 5, 3731-3751.
- Gitan, R. S., Shababi, M., Kramer, M., and Eide, D. J. (2003) A cytosolic domain of the yeast Zrt1 Zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *Journal of Biological Chemistry* 278, 39558-39564.
- Goellner, K. and Conrath, U. (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121, 233-242.
- Gong, M., Chen, B., Li, Z.-G., and Guo, L.-H. (2001) Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology* 158, 1125-1130.
- Gonzalez-Cruz, J. and Pastenes, C. (2008) Water stress induced thermotolerance of photosynthesis in two bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) In: Photosynthesis. Energy from the Sun, pp 1459-1463. Springer Netherlands. 10.1007/978-1-4020-6709-9_314
- Goué, N., Lesage-Descauses, M.-C., Meller, E. J., Magel, E., Label, P., and Sundberg, B. (2008) Microgenomic analysis reveals cell type-specific gene expression patterns between ray and fusiform initials within the cambial meristem of *Populus*. *New Phytologist* 180, 45-56.
- Gratao, P. L. and Polle, A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32, 481-494.
- Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 286-290.
- Green, C. E., Chaney, R. L., and Bouwkamp, J. (2003) Interactions between cadmium uptake and phytotoxic levels of zinc in hard red spring wheat. *Journal of Plant Nutrition* 26, 417-430.

- Greene, R. (2002) Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. In: The Arabidopsis Book (ed Somerville, C. R. and Meyerowitz, E. M.), pp1-19. American Society of Plant Biologists, Rockville.
- Griffin, J. J., Ranney, T. G., and Pharr, D. M. (2004) Heat and drought influence photosynthesis, water relations, and soluble carbohydrates of two ecotypes of redbud (*Cercis canadensis*). *Journal of American Society of Horticultural Science* 129, 497-502.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.
- Grime, J. P. (2001) Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties, Wiley, Weinheim, Germany.
- Grime, J. P. (1989) The stress debate: symptom of impending synthesis? *Biological Journal of the Linnean Society* 37, 3-15.
- Gu, J., Qi, L., Wusheing, J., and Liu, D. (2007) Cadmium accumulation and its effects on growth and gas exchange in four *Populus* cultivars. *Acta Biologica Cravoviensia* 49, 7-14.
- Gu, R., Fonseca, S., Puskas, L. G., Hackler, L., Jr., Zvara, A., Dudits, D., and Pais, M. S. (2004) Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiology* 24, 265-276.
- Gucciardo, S., Wisniewski, J. P., Brewin, N. J., and Bornemann, S. (2007) A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany* 1161-1171.
- Gulen, H. and Eris, A. (2003) Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* 166, 739-744.
- Guo, Y., Xiong, L., Ishitani, M., and Zhu, J. K. (2002) An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7786-7791.
- Gurley, W. B. (2000) HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *The Plant Cell* 12, 457-460.
- Haghiri, F. (1974) Plant uptake of cadmium as influenced by cation exchange capacity, organic matter, zinc, and soil temperature. *Journal of Environmental Quality* 3, 180-183.
- Haldimann, P. and Feller, U. (2005) Growth at moderately elevated temperature alters the physiological response of the photosynthetic apparatus to heat stress in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant, Cell & Environment* 28, 302-317.
- Halim, M., Conte, P., and Piccolo, A. (2003) Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere* 52, 265-275.
- Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1-11.

- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141, 312-322.
- Hambidge, K. M. and Krebs, N. F. (2007) Zinc Deficiency: A Special Challenge. *Journal of*
- Hanikenne, M., Talke, I. N., Haydon, M. J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D., and Kramer, U. (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* 453, 391-395.
- Hänsch, R. and Mendel, R. R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12, 259-266.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D. W., and Medina-Elizade, M. (2006) Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 14288-14293.
- Hanson, A. D., Gage, D. A., and Shachar-Hill, Y. (2000) Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends in Plant Science* 5, 206-213.
- Harada, M. (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology* 25, 1-24.
- Harrison, R. M. and Chirgawi, M. B. (1989) The assessment of air and soil as contributors of some trace metals to vegetable plants I. Use of a filtered air growth cabinet. *The Science of the Total Environment* 83, 13-34.
- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580.
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16, 574-581.
- Hassinen, V., Vallinkoski, V. M., Issakainen, S., Tervahauta, A., Kärenlampi, S., and Servomaa, K. (2009) Correlation of foliar MT2b expression with Cd and Zn concentrations in hybrid aspen (*Populus tremula x tremuloides*) grown in contaminated soil. *Environmental Pollution* 157, 922-930.
- Havaux, M. (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo: antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology* 100, 424-432.
- Hawf, L. R. and Schmid, W. E. (1967) Uptake and translocation of zinc by intact plants. *Plant and Soil* 27, 249-260.
- He, C., Zhang, J., Duan, A., Zheng, S., Sun, H., and Fu, L. (2008) Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Populus euramericana* cv. '74/76'. *Trees - Structure and Function* 22, 803-813.
- He, X. Y., Fu, S. L., Chen, W., Zhao, T. H., Xu, S., and Tuba, Z. (2007) Changes in effects of ozone exposure on growth, photosynthesis, and respiration of *Ginkgo biloba* in Shenyang urban area. *Photosynthetica* 45, 555-561.
- Heckathorn, S. A., Mueller, J. K., LaGuidice, S., Zhu, B., Barrett, T., Blair, B., and Dong, Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during metal stress. *American Journal of Botany* 91, 1312-1318.

- Heckathorn, S. A., Ryan, S. L., Baylis, J. A., Wang, D., Hamilton III E., William, C. L., and Luthe, D. S. (2002) In vivo evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress. *Functional Plant Biology* 29, 935-946.
- Heil, M. and Baldwin, I. T. (2002) Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7, 61-67.
- Hernandez, L. E., Carpena-Ruiz, R., and Carate, A. (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition* 19, 1581-1598.
- Hernandez, L. E. and Cooke, D. T. (1997) Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* 48, 1375-1381.
- Hieng, B., Ugrinovic, K., Sustar-Vozlic, J., and Kidric, M. (2004) Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology* 161, 519-530.
- Holdgate, M. W. (1979) A perspective of environmental pollution. Cambridge.
- Hong, J., Choi, H., Hwang, I., Kim, D., Kim, N., Choi, D., Kim, Y., and Hwang, B. (2008) Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* 227, 539-558.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M. N., Boller, T., and Wiemken, A. (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *European Journal of biochemistry* 219, 187-193.
- Hotz, C. and Brown, K. H. (2004) Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Nutrition Bulletin* 25, 91-204.
- Houghton, Y., Ding, D. J., Griggs, M., and Noguer, P. J. (2001) Climate Change: The Scientific Basis. Contributions of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change(ed van der Linden). 183-238
- Hourton-Cabassa, C., mbard-Bretteville, F., Moreau, F., de Virville, J. D., Remy, R., and Colas des Francs-Small, C. (1998) Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves. *Plant Physiology* 116, 627-635.
- Hsu, Y. T. and Kao, C. H. (2007) Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant and Soil* 291, 27-37.
- Hu, S., Lau, K. W. K., and Wu, M. (2001) Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* 161, 987-996.
- Huang, B. and Xu, C. (2008) Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of integrative plant biology* 50, 1230-1237.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856.

- Hughes, T. P., Baird, A. H., Bellwood, D. R., Card, M., Connolly, S. R., Folke, C., Grosberg, R., Hoegh-Guldberg, O., Jackson, J. B. C., Kleypas, J., Lough, J. M., Marshall, P., Nystrom, M., Palumbi, S. R., Pandolfi, J. M., Rosen, B., and Roughgarden, J. (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301, 929-933.
- Huiyi, H., Deming, J., Chunxing, Z., Youbiao, Z., and Zhiquing, L. (1991) Study on the control of cadmium-pollution in the soil by forestry ecological engineering. *China Environmental Sciences* 2, 36-45.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Laugraud, A., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., Mistry, J., Mitchell, A., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Quinn, A. F., Selengut, J. D., Sigrist, C. J. A., Thimma, M., Thomas, P. D., Valentin, F., Wilson, D., Wu, C. H., and Yeats, C. (2009) InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research* 37, 211-215.
- Hüve, K., Bichele, I., Tobias, M., and Niinemets, Ü. (2006) Heat sensitivity of photosynthetic electron transport varies during the day due to changes in sugars and osmotic potential. *Plant, Cell & Environment* 29, 212-228.
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., and Massacci, A. (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 977-982.
- Iba, K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53, 225-245.
- Illing, N., Denby, K. J., Collett, H., Shen, A., and Farrant, J. M. (2005) The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integrative and Comparative Biology* 45, 771-787.
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and Tanaka, K. (2003) The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO Journal* 22, 3557-3567.
- Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., and Nogawa, K. (2005) Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicology Letters* 159, 192-201.
- International Programme of Chemical Safety (ICPS) (1992) Cadmium, environmental aspects. 135. Environmental Health Criteria, World Health Organization.
- IPCC (2001) Climate change 2001: the scientific basis. Contributions of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, 183-238.
- Irving, L. J. and Robinson, D. (2006) A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. *New Phytologist* 169, 493-504.

- Israr, M., Sahi, S. V., and Jain, J. (2005) Cadmium accumulation and antioxidative responses in the *Sesbania drummondii* Callus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 121-127.
- Jaffré, T., Brooks, R. R., Lee, J., and Reeves, R. D. (1976) *Sebertia acuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* 193, 579-580.
- Jarup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182.
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., and Vahter, M. (1998) Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 24, 1-51.
- Jeejeebhoy, K. N. (2007) Human Zinc Deficiency. *Nutrition in Clinical Practice* 22, 65-67.
- Jemai, H., Messaoudi, I., Chaouch, A., and Kerkeni, A. (2007) Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21, 269-273.
- Jiang, R. F., Ma, D. Y., Zhao, F.-J., and McGrath, S. P. (2005) Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). *New Phytologist* 167, 805-814.
- JOCE (2004) Commission directive 2004/73/EC. 29th Council directive 67/548EEC. Official Journal of the European Communities.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., and Kjellbom, P. (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465, 324-342.
- Johnson, M. P., Davison, P. A., Ruban, A. V., and Horton, P. (2008) The xanthophyll cycle pool size controls the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 582, 262-266.
- Jones, H. G. (1992) Drought and drought tolerance. In: *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*, pp212-237, Cambridge University Press, UK.
- Jones, H. G., Stoll, M., Santos, T., Sousa, C. d., Chaves, M. M., and Grant, O. M. (2002) Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany* 53, 2249-2260.
- Jones, R., Lapp, T., and Wallace, D. (1993) Locating and estimating air emissions from sources of cadmium and cadmium compounds, prepared by Midwest Research Institute for the U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air and Radiation. EPA-453/R-93-040.
- Jorge, I., Navarro, R. M., Lenz, C., Ariza, D., and Jorin, J. V. (2006) Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics* 6, 207-214.

- Jouve, L., Hoffmann, L., and Hausman, J.-F. (2004) Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. *Plant Biology* 6, 74-80.
- Juan, I. M., Raquel, M., n, and Carmen, C. (2005) Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 41, 451-463.
- Kapoor, M., Sreenivasan, G. M., Goel, N., and Lewis, J. (1990) Development of thermotolerance in *Neurospora crassa* by heat shock and other stresses eliciting peroxidase induction. *The Journal of Bacteriology* 172, 2798-2801.
- Karlson, D. and Imai, R. (2003) Conservation of the cold shock domain protein family in plants. *Plant Physiology* 131, 12-15.
- Karrenberg, S., Edwards, P. J., and Kollman, J. (2002) The life history of Salicaceae living in the active zone of floodplains. *Freshwater Biology* 733-748.
- Kashefi, K. and Lovley, D. R. (2003) Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301, p 934.
- Kasuya, M. (2000) Recent epidemiological studies on itai-itai disease as a chronic cadmium poisoning in Japan. *Water science and technology* 42, 147-154.
- Kato, Y., Yamamoto, Y., Murakami, S., and Sato, F. (2005) Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* 222, 643-651.
- Kaur, P., Ghai, N., and Sangha, M. K. (2009a) Induction of thermotolerance through heat acclimation and salicylic acid in *Brassica* species. *African Journal of Biotechnology* 8, 619-625.
- Kaur, S., Gupta, A. K., Kaur, N., Sandhu, J. S., and Gupta, S. K. (2009b) Antioxidative enzymes and sucrose synthase contribute to cold stress tolerance in Chickpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195, 393-397.
- Kawagashira, N., Ohtomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S., and Higo, K. (2001) Multiple zinc finger motifs with comparison of plant and insects. *Genome Informatics* 12, 368-369.
- Kawe, M. and Plückthun, A. (2006) GroEL walks the fine line: The subtle balance of substrate and co-chaperonin binding by GroEL. A combinatorial investigation by design, selection and screening. *Journal of Molecular Biology* 357, 411-426.
- Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., and Renaut, J. (2008) Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 8, 2514-2530.
- Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J. F., and Renaut, J. (2009a) Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *Journal of Proteome Research* 8, 400-417.
- Kieffer, P., Schröder, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Renaut, J., and Hausman, J.-F. (2009b) Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *Journal of Proteomics* 72, 379-396.

- Kikuchi, T., Okazaki, M., Kimura, S. D., Motobayashi, T., Baasansuren, J., Hattori, T., and Abe, T. (2008) Suppressive effects of magnesium oxide materials on cadmium uptake and accumulation into rice grains: II: Suppression of cadmium uptake and accumulation into rice grains due to application of magnesium oxide materials. *Journal of Hazardous Materials* 154, 294-299.
- Kim, K. J., Lim, J. H., Kim, M. J., Kim, T., Chung, H. M., and Paek, K. H. (2008) GDSL-lipase1 (CaGL1) contributes to wound stress resistance by modulation of CaPR-4 expression in hot pepper. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374, 693-698.
- Kim, Y.-O., Kim, J. S., and Kang, H. (2005) Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 42, 890-900.
- Knight, H. and Knight, M. R. (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6, 262-267.
- Kohler, A., Blaudez, D., Chalot, M., and Martin, F. (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* 164, 83-93.
- Komarnicki, G. J. K. (2005) Lead and cadmium in indoor air and the urban environment. *Environmental Pollution* 136, 47-61.
- Koren'kov, V., Park, S., Cheng, N. H., Sreevidya, C., Lachmansingh, J., Morris, J., and Wagner, G. J. (2007) Enhanced Cd^{2+} selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta* 225, 403-411.
- Körner, C. (2003) Limitation and stress – always or never ? *Journal of Vegetation Science* 14, 141-143.
- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., and Mittler, R. (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry* 283, 34197-34203.
- Kozlowski, T. T. (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review* 68, 270-334.
- Kramer, P. J. and Kozlowski, T.T. (1979) Physiology of woody plants, 411p., New York Academic Press.
- Krämer, U. and Clemens, S. (2006) Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*, pp216-271.
- Kreuzwieser, J., Hauberg, J., Howell, K. A., Carroll, A., Rennenberg, H., Millar, A. H., and Whelan, J. (2009) Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiology* 149, 461-473.
- Krug, E. C. and Frink, C. R. (1983) Acid rain on acid soil: a new perspective. *Science* 221, 520-525.
- Kumar, G., Krishnaprasad, B. T., Savitha, M., Gopalakrishna, G., Mukhopadhyay, K., Ramamohan, G., and Udayakumar, M. (1999) Enhanced expression of heat-shock proteins in thermo-tolerant lines of sunflower and their progenies selected on the basis of temperature-induction response. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 359-367.

- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., and McGrath, S. P. (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212, 75-84.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., Wieshammer, G., and McGrath, S. P. (2001) Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany* 52, 2291-2300.
- Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtílek, M., and Šetlík, I. (2007) Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 175, 655-674.
- Küpper, H., Zhao, F.-J., and McGrath, S. P. (1999) Cellular compartmentation of Zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 119, 305-311.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D. Y., and Vierstra, R. D. (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6862-6872.
- Landberg, T. and Greger, M. (2004) No phytochelatin (PC2 and PC3) detected in *Salix viminalis*. *Physiologia Plantarum* 121, 481-487.
- Landmann, G., Breoa, N., Houllier, F., Dreyer, E., and Flot, J.-L. (2003) Sécheresse et canicule de l'été 2003 : quelles conséquences pour les forêts françaises ? = The summer 2003 drought and heat wave: The impact on French forests. *Revue Forestière Française* 55, 299-308.
- Lane, T. W. and Morel, F. M. M. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4627-4631.
- Langille, A. and Batteese, R. (1974) Influence of zinc concentration in nutrient solution on growth and elemental content of the "Katahdin" potato plant. *American Journal of Potato Research* 51, 345-354.
- Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leple, J. C., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadai, V., and Jouanin, L. (1999) Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology* 119, 153-164.
- Larcher, W. (2003) *Physiological plant ecology*, 4nd edition , 252p, Springer Verlag, Berlin.
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R., and Vierling, E. (2005a) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* 138, 882-897.
- Larkindale, J. and Knight, M. R. (2002) Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Absciscic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiology* 128, 682-695.

- Larkindale, J., Mishkind, M., and Vierling, E. (2005b) Plant responses to high temperature. In: Plant abiotic stress (ed Jenks, Matthew A. and Hasegawa, Paul M.). 100-144, Blackwell publishing, Oxford, UK.
- Larkindale, J. and Vierling, E. (2008) Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology* 146, 748-761.
- Lasat, M. M. (2000) Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plants/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research* 2, 109-120.
- Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., and Ceulemans, R. (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 131, 485-494.
- Lauwerys, R. R., Haufroid, V., Hoet, P., and Lison, D. (2007) Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, pp203-237, Paris.
- Law, R. D. and Crafts-Brandner, S. J. (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology* 120, 173-182.
- Lazzerini, M. (2007) Effect of zinc supplementation on child mortality. *The Lancet* 370, 1194-1195.
- Lee, T. D., Reich, P. B., and Bolstad, P. V. (2005) Acclimation of leaf respiration to temperature is rapid and related to specific leaf area, soluble sugars and leaf nitrogen across three temperate deciduous tree species. *Functional Ecology* 19, 640-647.
- Lee, J. R., Lee, S. S., Jang, H. H., Lee, Y. M., Park, J. H., Park, S. C., Moon, J. C., Park, S. K., Kim, S. Y., Lee, S. Y., Chae, H. B., Jung, Y. J., Kim, W. Y., Shin, M. R., Cheong, G. W., Kim, M. G., Kang, K. R., Lee, K. O., Yun, D. J., and Lee, S. Y. (2009) Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5978-5983.
- Lemaire, S. (2004) The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research* 79, 305-318.
- Lenoir, J., Gegout, J. C., Marquet, P. A., de Ruffray, P., and Brisse, H. (2008) A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science* 320, 1768-1771.
- Leopold, I., Günther, D., Schmidt, J., and Neumann, D. (1999) Phytochelatin and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50, 1323-1328.
- Leshem, Y. Y., Kuiper, P. J. C., Erdei, L., Lurie, S., and Perl-Treves, R. (1998) Do Selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants? *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 199-208.
- Levis, S., Foley, J. A., and Pollard, D. (2000) Large-scale vegetation feedbacks on a doubled CO₂ climate. *Journal of Climatology* 13, 1313-1325.
- Levitt, J. (1980) Responses of plant to environmental stresses, 297p., Academic Press, New York, US.

- Li, R., Moore, M., and King, J. (2003) Investigating the regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 44, 233-241.
- Lichtenthaler, H. K. (1996) Vegetation stress : an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology* 148, 4-17.
- Lichtenthaler, H. K. (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 187-198.
- Lin, C. Y., Roberts, J. K., and Key, J. L. (1984) Acquisition of thermo-tolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat-shock proteins and their cellular localisation. *Plant Physiology* 74, 152-160.
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B., Adam, Z., and Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the Photosystem II D1 protein. *The Plant Cell* 12, 419-432.
- Lindquist, S. (2003) The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988) The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* 22, 631-677.
- Lippert, D., Chowira, S., Ralph, S. G., Zhuang, J., Aeschliman, D., Ritland, C., Ritland, K., and Bohlmann, J. (2007) Conifer defense against insects: proteome analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*). *Proteomics* 7, 248-270.
- Liu, M. Q., Yanai, J., Jiang, R. F., Zhang, F., McGrath, S. P., and Zhao, F. J. (2008) Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere* 71, 1276-1283.
- Lombi, E., Tearall, K. L., Howarth, J. R., Zhao, F.-J., Hawkesford, M. J., and McGrath, S. P. (2002) Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 128, 1359-1367.
- Loustau, D., Bosc, A., Colin, A., Ogee, J., Davi, H., Francois, C., Dufrene, E., Deque, M., Cloppet, E., Arrouays, D., Le Bas, C., Saby, N., Pignard, G., Hamza, N., Granier, A., Breda, N., Ciais, P., Viovy, N., and Delage, F. (2005) Modeling climate change effects on the potential production of French plains forests at the sub-regional level. *Tree Physiology* 25, 813-823.
- Lubaretz, O. and Nieden, U. z. (2002) Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. *Planta* 215, 220-228.
- Luhua, S., Ciftci-Yilmaz, S., Harper, J., Cushman, J., and Mittler, R. (2008) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* plants expressing proteins of unknown function. *Plant Physiology* 148, 280-292.
- Luyssaert, S., Van Meirvenne, M., and Lust, N. (2001) Cadmium variability in leaves of a *Salix fragilis*: simulation and implications for leaf sampling. *Canadian Journal of Forest Research* 31, 313-321.
- Ma, G., Li, Y., Du, S., Kok, F. J., and Yang, X. (2007) Assessment of intake inadequacy and food sources of zinc of people in China. *Public Health Nutrition* 10, 848-854.

- Ma, L. Q. and Rao, G. N. (1997) Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 26, 259-264.
- Macnair, M. R. (2007) Life history variation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 173, 6-8.
- Macnair, M. R., Bert, V., Huitson, S. B., Saumitou-Laprade, P., and Petit, D. (1999) Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceedings of the Royal Society of London* 2175-2179.
- Madejon, P., Maranon, T., Murillo, J. M., and Robinson, B. H. (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* 132, 145-155.
- Madlung, A. and Comai, L. (2004) The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* 94, 481-495.
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H. T., and Marmioli, N. (2002) Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology* 48, 667-681.
- Mahan, J. R., McMichael, B. L., and Wanjura, D. F. (1995) Methods for reducing the adverse effects of temperature stress on plants: a review. *Environmental and Experimental Botany* 35, 251-258.
- Majeran, W., Cai, Y., Sun, Q., and van Wijk, K. J. (2005) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *The Plant Cell* 17, 3111-3140.
- Manosalva, P. M., Davidson, R. M., Liu, B., Zhu, X., Hulbert, S. H., Leung, H., and Leach, J. E. (2009) A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology* 149, 286-296.
- Marchand, C., Lallier-Vergès, E., Baltzer, F., Albéric, P., Cossa, D., and Baillif, P. (2006) Heavy metals distribution in mangrove sediments along the mobile coastline of French Guiana. *Marine Chemistry* 98, 1-17.
- Markesteyn, L. and Poorter, L. (2009) Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *Journal of Ecology* 97, 311-325.
- Markovska, Y., Gorinova, N., Nedkovska, M., and Miteva, K. (2009) Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in Brassica juncea plants. *Biologia Plantarum* 53, 151-154.
- Marron, N., Delay, D., Petit, J. M., Dreyer, E., Kahlem, G., Delmotte, F. M., and Brignolas, F. (2002) Physiological traits of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiology* 22, 849-858.
- Marron, N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., Petit, J. M., Delmotte, F. M., and Brignolas, F. (2003) Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree Physiology* 23, 1225-1235.

- Marron, N., Gielen, B., Brignolas, F., Jian, G., Johnson, J. D., Karnosky, D. F., Polle, A., Scarascia-Mugnozza, G., Schroeder, W. R., and Ceulemans, R. (2008) Abiotic stresses. In: *Poplars and willows in the world*, Rome, Italy.
- Marron, N., Maury, S., Rinaldi, C., and Brignolas, F. (2006) Impact of drought and leaf development stage on enzymatic antioxidant system of two *Populus deltoides* × *nigra* clones. *Annals of Forest Research* 63, 323-327.
- Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 889p., London.
- Mathe, G. (2000) The need of a physiologic and pathophysiologic definition of stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 54, 119-121.
- Mathieu, M., Lelu-Walter, M., Blervacq, A., David, H., Hawkins, S., and Neutelings, G. (2006) Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Molecular Biology* 61, 615-627.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., and Santoni, V. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59, 595-624.
- McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G., and Yezpez, E. A. (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* 178, 719-739.
- McEvoy, J. P. and Brudvig, G. W. (2006) Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical Reviews* 106, 4455-4483.
- McGrath, S. P., Chaudri, A. M., and Giller, K. E. (1995) Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 14, 94-104.
- McGrath, S. P. and Zhao, F.-J. (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Environmental Biotechnology* 14, 277.
- McLellan, C. A., Turbyville, T. J., Wijeratne, E. M. K., Kerschen, A., Vierling, E., Queitsch, C., Whitesell, L., and Gunatilaka, A. A. L. (2007) A rhizosphere fungus enhances Arabidopsis thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor. *Plant Physiology* 145, 174-182.
- McTernan, W. F. and Mize, E. D. (1992) Simulated effects of irrigation management in groundwater contamination. *Agricultural Water Management* 20, 281-297.
- Meharg, A. A. (1993) The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88, 191-198.
- Melillo, J. M., McGuire, A. D., Kicklighter, D. W., Moore, B., Vorosmarty, C. J., and Schloss, A. L. (1993) Global climate change and terrestrial net primary production. *Nature* 363, 234-240.
- Mellerowicz, E. J., Baucher, M., Sundberg, B., and Boerjan, W. (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology* 47, 239-274.

- Memon, A. R., Ozdemir, A., and Aktoprakligil, D. (2001) Heavy metal accumulation in plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 15, 44-48.
- Mendoza-Cozatl, D. G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J. W., Komives, E., Kehr, J., and Schroeder, J. I. (2008) Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal* 54, 249-259.
- Menon, M., Hermle, S., Günthardt-Goerg, M., and Schulin, R. (2007) Effects of heavy metal soil pollution and acid rain on growth and water use efficiency of a young model forest ecosystem. *Plant and Soil* 297, 171-183.
- Mertens, J., Vervaeke, P., De Schrijver, A., and Luyssaert, S. (2004) Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of the Total Environment* 326, 209-215.
- Mijnsbrugge, K. V., Meyermans, H., Van Montagu, M., Bauw, G., and Boerjan, W. (2000) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* 210, 589-598.
- Miller, G. and Mittler, R. (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Annals of Botany* 98, 279-288.
- Mills, T. M., Arnold, B., Sivakumaran, S., Northcott, G., Vogeler, I., Robinson, B. H., Norling, C., and Leonil, D. (2006) Phytoremediation and long-term site management of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) and heavy metals. *Journal of Environmental Management* 79, 232-241.
- Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., and Navari-Izzo, F. (2003) Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 50, 265-276.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., and Prasad, M. N. V. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 25-37.
- Misra, U. K., Gawdi, G., Akabani, G., and Pizzo, S. V. (2002) Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cellular Signalling* 14, 327-340.
- Mittler, R. (2006a) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11, 15-19.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Mittler, R. (2006b) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11, 15-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-497.

- Moberg, G. P. (2000) Biological response to stress: implications for animal welfare. In: The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare (ed Moberg, G. P. and Mench, J. A.). 1-21
- Moffatt, B., Ewart, V., and Eastman, A. (2006) Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiologia Plantarum* 126, 5-16.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., and Hohn, B. (2006) Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442, 1046-1049.
- Monclus, R., Villar, M., Barbaroux, C., Bastien, C., Fichot, R., Delmotte, F. M., Delay, D., Petit, J. M., Bréchet, C., Dreyer, E., and Brignolas, F. (2009) Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* x *Populus trichocarpa* F1 progeny. *Tree Physiology* 1329-1339.
- Monclus, R., Dreyer, E., Villar, M., Delmotte, F. M., Delay, D., Petit, J. M., Barbaroux, C., Le Thiec, D., Bréchet, C., and Brignolas, F. (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist* 169, 765-777.
- Moore, J. P., Vitré-Gibouin, M., Farrant, J. M., and Driouich, A. (2008) Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum* 134, 237-245.
- Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Carli, C., Laurans, F., Depierreux, C., Kahlem, G., and Label, P. (2006) Cambial activity of *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 in hydroponic culture. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 719-724.
- Moreno, J. L., Hernandez, T., and Garcia, C. (1999) Effects of a cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biology and Fertility of Soils* 28, 230-237.
- Moroney, J. V., Bartlett, S. G., and Samuelsson, G. (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell & Environment* 24, 141-153.
- Mortier, F. (1995) Le CO₂ et la forêt : dynamique du CO₂ dans la biosphère et conséquences sur la photosynthèse, les arbres et la forêt. 29, 1-159.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., and Allakhverdiev, S. I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767, 414-421.
- Naranjo, M. A., Forment, J., Roldán, M., Serrano, R., and Vicente, O. (2006) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* 29, 1890-1900.
- Narasimhamoorthy, B., Blancaflor, E. B., Bouton, J. H., Payton, M. E., and Sledge, M. K. (2007) A comparison of hydroponics, soil, and root staining methods for evaluation of aluminum tolerance in *Medicago truncatula* (Barrel Medic) Germplasm. *Crop Science* 47, 321-328.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K., and Nover, L. (1994) Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194, 360-367.

- Nie, X., Singh, R. P., and Tai, G. C. C. (2002) Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome* 45, 905-913.
- Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H. J., Kreuzaler, F., and Peterhansel, C. (2007) Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 58, 2709-2715.
- Niklas, K. J. (1997) *The Evolutionary Biology of Plants*, University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Nishiyama, Y., Takechi, K., Nanjo, Y., Murata, N., and Hayashi, H. (2006) Acclimation of photosystem II to high temperature in a suspension culture of soybean (*Glycine max*) cells requires proteins that are associated with the thylakoid membrane. *Photosynthesis Research* 90, 223-232.
- Nitta, K., Suzuki, N., Honma, D., Kaneko, Y., and Nakamoto, H. (2005) Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria. *FEBS Letters* 579, 1235-1242.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., and Foyer, C. H. (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89, 841-850.
- Noret, N., Meerts, P., Vanhaelen, M., Dos Santos, A., and Escarré, J. (2007) Do metal-rich plants deter herbivores? A field test of the defence hypothesis. *Oecologia* 152, 92-100.
- Nriagu, J. O. (1996) A history of global metal pollution. *Science* 272, 223-224.
- Nriagu, J. O. (1990) Global metal pollution: poisoning the biosphere. *Environment ENVITAR* 32, 7-10.
- Nriagu, J. O. and Pacyna, J. M. (1988) Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y., and Fernie, A. R. (2008) The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59, 1675-1684.
- Ohmiya, A., Tanaka, Y., Kadowaki, K. i., and Hayashi, T. (1998) Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. *Plant and Cell Physiology* 39, 492-499.
- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S. I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., and Murata, N. (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44, 8494-8499.
- Oleksyn, J., Tjoelker, M. G., and Reich, P. B. (1998) Adaptation to changing environment in Scots pine populations across a latitudinal gradient. *Silva Fennica* 32, 129-140.
- Olsen, J., Pedersen, L., Olsen, O., and Heriksen, A. (2008) Barley aldose reductase: structure, cofactor binding, and substrate recognition in the aldo/keto reductase 4C family. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 71, 1572-1581.

- Oorts, K., Ghesquiere, U., Swinnen, K., and Smolders, E. (2006) Soil properties affecting the toxicity of CuCl_2 and NiCl_2 for soil microbial processes in freshly spiked soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 836-844.
- Ortiz, C. and Cardemil, L. (2001) Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *Journal of Experimental Botany* 52, 1711-1719.
- Oukarroum, A., Schansker, G., and Strasser, R. J. (2009) Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 137, 188-199.
- Overpeck, J., Cole, J., and Bartlet, S. G. (2005) A 'palaeoperspective' on climate variability and change. In: *Climate change and biodiversity* (ed Lovejoy, T. E. and Hannah, L.). pp91-108, Yale University Press, New Haven, CT.
- Ow, L. F., Griffin, K. L., Whitehead, D., Walcroft, A. S., and Turnbull, M. H. (2008) Thermal acclimation of leaf respiration but not photosynthesis in *Populus deltoides* × *nigra*. *New Phytologist* 178, 123-124.
- Pan, H. Y., Whittaker, M. M., Bouveret, R., Berna, A., Bernier, F., and Whittaker, J. W. (2007) Characterization of wheat germin (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 925-929.
- Papoyan, A., Pineros, M., and Kochian, L. V. (2007) Plant Cd^{2+} and Zn^{2+} status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 175, 51-58.
- Parkhi, V., Kumar, V., Sunilkumar, G., Campbell, L., Singh, N., and Rathore, K. (2009) Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Molecular Breeding* 23, 625-639.
- Parmesan, C. (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 637-669.
- Parmesan, C. and Yohe, G. (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37-42.
- Paschke, M., Perry, L., and Redente, E. (2006) Zinc toxicity thresholds for reclamation forb species. *Water, Air, & Soil Pollution* 170, 317-330.
- Pastenes, C. and Horton, P. (1996) Effect of high temperature on photosynthesis in beans (I. oxygen evolution and chlorophyll fluorescence). *Plant Physiology* 112, 1245-1251.
- Patra, M., Bhomik, N., Bandopadhyay, B., and Sharma, A. (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 52, 199-223.
- Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L., and Murphy, A. S. (2005) Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In: *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* (ed Tamas, M. J. and Martinoia, E.). p 299-340, Heidelberg.
- Penkowa, M. (2006) Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS Journal* 273, 1857-1870.

- Penuelas, J., Llusia, J., Asendio, D., and Munné-Bosch, S. (2005) Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. *Plant, Cell & Environment* 28, 278-286.
- Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Lea, P. J., and Azevedo, R. A. (2002) Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil* 239, 123-132.
- Perez, D. E., Hoyer, J. S., Johnson, A. I., Moody, Z. R., Lopez, J., and Kaplinsky, N. J. (2009) BOBBER1 is a noncanonical *Arabidopsis* small heat shock protein required for both development and thermotolerance. *Plant Physiology* 151, 241-252.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Forestier, C. (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32, 539-548.
- Peters, R. W. and Shem, L. (1992) Adsorption/desorption characteristics of lead on various types of soil. *Environmental Progress* 11, 234-240.
- Peuke, A. D. and Rennenberg, H. (2005) Phytoremediation. *EMBO reports* 6, 497-501.
- Pichtel, J., Sawyerr, H. T., and Czarnowska, K. (1997) Spatial and temporal distribution of metals on soil in Warsaw, Poland. *Environmental Pollution* 98, 169-174.
- Pierce, S., Vianelli, A., and Cerabolini, B. (2005) From ancient genes to modern communities: the cellular stress response and the evolution of plant strategies. *Ecology* 19, 763-776.
- Pietrini, F., Zacchini, M., Iori, V., Pietrosanti, L., Ferretti, M., and Massacci, A. (2009) Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. *Plant Biology* in press.
- Pilate, G., Déjardin, A., Laurans, F., and Leplé J-C. (2004) Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytologist* 164, 63-72.
- Pinot, F., Kreps, S. E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonvi, M., and Polla, B.S. (2000) Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Reviews on environmental health* 15, 299-323.
- Pinto, A. P., Mota, A. M., de Varennes, A., and Pinto, F. C. (2004) Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the Total Environment* 326, 239-247.
- Plaza, S., Tearall, K. L., Zhao, F. J., Buchner, P., McGrath, S. P., and Hawkesford, M. J. (2007) Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 58, 1717-1728.
- Plieth, C., Hansen, U. P., Knight, H., and Knight, M. R. (1999) Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *The Plant Journal* 18, 491-497.
- Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Kohler, A., Bogeat-Triboulot, M.-B., Barre, A., Le Provost, G., Dumazet, H., Jacob, D., Bastien, C., Dreyer, E., de Daruvar, A., Guehl, J.-M., Schmitter, J.-M., Martin, F., and Bonneau, M. (2006) Mapping the proteome of poplar and

application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* 6, 6509-6527.

- Prabhavathi, V., Yadav, J. S., Kumar, P. A., and Rajam, M. V. (2002) Abiotic stress tolerance in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) by introduction of bacterial mannitol phosphodehydrogenase gene. *Molecular Breeding* 9, 137-147.
- Qureshi, M. I., Qadir, S., and Zolla, L. (2007) Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* 164, 1239-1260.
- Rabitsch, W. B. (1995) Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. I. *Environmental Pollution* 90, 221-237.
- Radin, J. W., Lu, Z., Percy, R. G., and Zeiger, E. (1994) Genetic variability for stomatal conductance in Pima cotton and its relation to improvements of heat adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7217-7221.
- Ragland, G. J., Kingsolver, J. G., and McMillan, W. O. (2009) Evolution of thermotolerance in seasonal environments: the effects of annual temperature variation and life-history timing in *Wyeomyia smithii*. *Evolution* 62, 1345-1357.
- Reddy, A. R., Chaitnya, K. V., and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161, 1189-1202.
- Regier, N., Streb, S., Coccozza, C., Schaub, M., Cherubini, P., Zeeman, S. C., and Frey, B. (2009) Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. *Plant, Cell & Environment* in press.
- Reichstein, M., Tenhunen, J. D., Rouspard, O., Ourcival, J. m., Rambal, S., Miglietta, F., Peressoti, A., Pecchiari, M., tirone, G., and Valentini, R. (2002) Severe drought effects on ecosystem CO₂ and H₂O fluxes at three Mediterranean evergreen sites: revision of current hypotheses? *Global Change Biology* 8, 999-1017.
- Renaut, J., Bohler, S., Hausman, J.-F., Hoffmann, A. A., Sergeant, K., Nagib, A., Jolivet, Y., and Dizengremel, P. (2008a) The impact of atmospheric composition on plants. A case study of ozone and poplar. *Mass Spectrometry Review* 28, 495-516.
- Renaut, J., Hausman, J. F., Bassett, C., Artlip, T., Cauchie, H. M., Witters, E., and Wisniewski, M. (2008b) Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetics & Genomes* 4, 589-600.
- Renaut, J., Lutts, S., Hoffmann, L., and Hausman, J.-F. (2004) Responses of poplar to chilling temperatures : proteomic and physiological aspects. *Plant Biology* 6, 81-90.
- Rey, P., Gillet, B., Römer, S., Eymery, F., Massimino, J., Peltier, G., and Kuntz, M. (2000) Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *The Plant Journal* 21, 483-494.
- Rhodes, D. and Nadolska-Orczyk, A. (2001) Plant Stress Physiology. *Encyclopedia of Life Sciences*. 7p. Nature Publishing Group

- Rizhsky, L., Liang, H., and Mittler, R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in Tobacco. *Plant Physiology* 130, 1143-1151.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., and Mittler, R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134, 1683-1696.
- Robinson, B. H., Lombi, E., Zhao, F.-J., and McGrath, S. P. (2006) Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytologist* 158, 279-285.
- Robinson, B. H., Mills, T. M., Petit, D., Fung, L. E., Green, S. R., and Clothier, B. E. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227, 301-306.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 675-709.
- Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Rodriguez-Serrano, M., Gomez, M., Del Rio, L. A., and Sandalio, L. M. (2007) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* In press.
- Romero-Puertas, M. C., Palma, J. M., Gomez, M., Del Rio, L. A., and Sandalio, L. M. (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* 25, 677.
- Rontein, D., Basset, G., and Hanson, A. D. (2002) Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. *Metabolic Engineering* 4, 49-56.
- Roosens, N. H., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximenez-Embun, P., and Smith, J. A. C. (2003) Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant, Cell & Environment* 26, 1657-1672.
- Ros-Barcelo, A., Gomez-Ros, L., Ferrer, M., and Hernandez, J. (2006) The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-forming tissues of trees. *Trees - Structure and Function* 20, 145-156.
- Rosado, A., Schapire, A. L., Bressan, R. A., Harfouche, A. L., Hasegawa, P. M., Valpuesta, V., and Botella, M. A. (2006) The *Arabidopsis* tetratricopeptide repeat-containing protein TTL1 is required for osmotic stress responses and abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology* 142, 1113-1126.
- Ross S. (1994) Sources and forms of potentially toxic metals in soil plant systems. In: Toxic Metals in Soil-plant Systems (ed Ross, S. M.). 3-25, Chichester.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092-1101.
- Ruttens, A., Mench, M., Colpaert, J. V., Boisson, J., Carleer, R., and Vangronsveld, J. (2006) Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environmental Pollution* 144, 524-532.

- Sachs, J. (1865) Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen, In: Hofmeister W, ed. Handbuch der Physiologischen Botanik, pp153-154. Leipzig, Germany.
- Sadat Noori, S. and Sokhansanj, A. (2008) Wheat plants containing an Osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. *Russian Journal of Plant Physiology* 55, 256-258.
- Sagi, G., Katz, A., Guenoune-Gelbart, D., and Epel, B. L. (2005) Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the Golgi apparatus. *The Plant Cell* 17, 1788-1800.
- Sagisaka, S. (1974) Effect of low temperature on amino acid metabolism in wintering poplar: arginine-glutamine relationships. *Plant Physiology* 53, 319-322.
- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J.-P., Deus-Neumann, B., and Zenk, M. H. (1997) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 47, 339-347.
- Sahi, C., Agarwal, M., Singh, A., and Grover, A. (2007) Molecular characterization of a novel isoform of rice (*Oryza sativa* L.) glycine rich-RNA binding protein and evidence for its involvement in high temperature stress response. *Plant Science* 173, 144-155.
- Sakai, A. and Sugawara, Y. (1973) Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant and Cell Physiology* 14, 1201-1204.
- Salekdeh, G. H., Wade, L. J., Ghareyazie, B., and Bennett, J. (2002) A proteomic approach to analysing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research* 76, 199-219.
- Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J., and Raskin, I. (1995) Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Salvucci, M. E. and Crafts-Brandner, S. J. (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 120, 179-186.
- Salvucci, M. E., DeRidder, B. P., and Portis, A. R., Jr. (2006) Effect of activase level and isoform on the thermotolerance of photosynthesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 57, 3793-3799.
- Sanchez-Diaz, M., Tapia, C., and Antolin, M. C. (2007) Drought-induced oxidative stress in Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Tree Physiology* 27, 1415-1422.
- Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Romero, L., and Ruiz, J. M. (2009) Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science* In Press, Corrected Proof.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., and Del Rio, L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 2115-2126.

- Sanita di Toppi, L. and Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Sardans, J., Penuelas, J., and Estiarte, M. (2008) Warming and drought change trace element bioaccumulation patterns in a Mediterranean shrubland. *Chemosphere* 70, 874-885.
- Sarkar, A. and Wynjones, R. (1982) Effect of rhizosphere pH on the availability and uptake of Fe, Mn and Zn. *Plant and Soil* 66, 361-372.
- Sanchez, J.-E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J. B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., and Bourguignon, J. (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6, 2190-2199.
- Sarvajeet, S., Khan, N. A., Rahat, N., and Anjum, N. A. (2008) Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *American Journal of Plant Physiology* 3, 25-32.
- Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E. B., Williams, D. J., and Moore, M. R. (2003) A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* 137, 65-83.
- Sauvé, S., Norvell, W. A., McBride, M., and Hendershot, W. (2000) Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environmental Science & Technology* 34, 291.
- Saxe, H., Cannell, M. G. R., Johnsen, O., Ryan, M. G., and Vourlitis, G. (2001) Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist* 149, 369-399.
- Schat, H., Sharma, S., and Vooijs, R. (1997) Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101, 477-482.
- Schimel, D. S. (1995) Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. *Global Change Biology* 1, 77-91.
- Schlichting, C. D. (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17, 667-693.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., and Zeier, J. (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* 50, 1267-1280.
- Schulze, E.-D., Turner, N., Gollan, T., and Shackel, K. A. (1987) Stomatal response to air humidity and soil drought. In: Stomatal function (ed Zeiger, E., Farquhar, G. D., and Cowan, I. R.). 311-321
- Schützendübel, A. and Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53, 1351-1365.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., and Polle, A. (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots Pine roots. *Plant Physiology* 127, 887-898.

- Schwartz, G. G. and Reis, I. M. (2000) Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9, 139-145.
- Scoullou, M., Vonkerman, G., Thornton, I., and Makuch, Z. (2001) Mercury, cadmium, lead: Handbook for sustainable heavy metals policy and regulation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Seager, R., Ting, M., Held, I., Kushnir, Y., Lu, J., Vecchi, G., Huang, H. P., Harnik, N., Leetmaa, A., Lau, N. C., Li, C., Velez, J., and Naik, N. (2007) Model projections of an imminent transition to a more arid climate in southwestern North America. *Science* 316, 1181-1184.
- Sebastiani, L., Scebba, F., and Tognetti, R. (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* x *maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52, 79-88.
- Selote, D. S. and Khanna-Chopra, R. (2006) Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* 127, 494-506.
- Selye, H. (1936) A syndrome produced by various noxious agents. *Nature* 138, 32-34.
- Selye, H. (1951) The General-Adaptation-Syndrome. *Annual Review of Medicine* 2, 327-342.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., and Vangronsveld, J. (2007) Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 129, 519-528.
- Shamsi, I., Wei, K., Zhang, G., Jilani, G., and Hassan, M. (2008) Interactive effects of cadmium and aluminum on growth and antioxidative enzymes in soybean. *Biologia Plantarum* 52, 165-169.
- Sharkey, T. D. (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, RuBisCO deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell & Environment* 28, 269-277.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46, 209-221.
- Shi, G. and Cai, Q. (2008) Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to cadmium stress. *Photosynthetica* 46, 627-630.
- Shibata, Y., Akai, S., Kasahara, T., Ikegami, I., and Itoh, S. (2008) Temperature-dependent energy gap of the primary charge separation in photosystem I: study of delayed fluorescence at 77-268 K. *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 6695-6702.
- Shulaev, V. and Oliver, D. J. (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology* 141, 367-372.
- Shute, T. and Macfie, S. M. (2006) Cadmium and zinc accumulation in soybean: A threat to food safety? *Science of the Total Environment* 371, 63-73.

- Siebe, C. and Cifuentes, E. (1995) Environmental impact of wastewater irrigation in central Mexico: An overview. *International Journal of Environmental Health Research* 5, 161-173.
- Silim, S., Nash, R., Reynard, D., White, B., and Schroeder, W. (2009) Leaf gas exchange and water potential responses to drought in nine poplar (*Populus* spp.) clones with contrasting drought tolerance. *Trees - Structure and Function* 23, 959-969.
- Silver, S. (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene* 179, 9-19.
- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N., and Feller, U. (2009) Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. *Plant Growth Regulation* 58, 107-117.
- Singh, S., Eapen, S., and D'Souza, S. F. (2006) Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 233-246.
- Skorzynska-Polit, E. and Baszyski, T. (1997) Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Science* 128, 11-21.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Semane, B., Van Belleghem, F., Remans, T., Van Sanden, S., Vangronsveld, J., and Cuypers, A. (2008) Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 63, 1-8.
- Smirnoff, N. I. C. H. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9, 214-219.
- Smith, R. C., Prezelin, B. B., Baker, K. S., Bidigare, R. R., Boucher, N. P., Coley, T., Karentz, D., MacIntyre, S., Matlick, H. A., Menzies, D., and et, a. (1992) Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters. *Science* 255, 952-959.
- Sobkowiak, R. and Deckert, J. (2006) Proteins induced by cadmium in soybean cells. *Journal of Plant Physiology* 163, 1203-1206.
- Sommer, A. L. and Lipman, C. B. (1926) Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant Physiology* 1, 231-249.
- Song, W.-Y., Sohn, E. J., Martinoia, E., Lee, Y. J., Yang, Y.-Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., and Lee, Y. (2003) Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 21, 914-919.
- Stein, A. J., Nestel, P., Meenakshi, J. V., Qaim, M., Sachdev, H. P. S., and Bhutta, Z. A. (2007) Plant breeding to control zinc deficiency in India: how cost-effective is biofortification? *Public Health Nutrition* 10, 492-501.
- Sterckeman, T., Duquène, L., Perriguet, J., and Morel, J. L. (2005) Quantifying the effect of rhizosphere processes on the availability of soil cadmium and zinc. *Plant and Soil* 276, 335-345.
- Stitt, M. and Hurry, V. (2002) A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 199-206.

- Stobrawa, K. and Lorenc-Plucinska, G. (2007) Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra* L.) and cottonwood (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsch) in a heavy-metal-polluted environment. *Plant and Soil* 298, 57-68.
- Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321-336.
- Street, N. R., Skogström, O., Sjödin, A., Tucker, J., Rodriguez-Acosta, M., Nilsson, P., Jansson, S., and Taylor, G. (2006) The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *The Plant Journal* 48, 321-341.
- Su, P. H. and Li, H. m. (2008) Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology* 146, 1231-1241.
- Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K.-J., and Guy, C. L. (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* 8, 179-187.
- Tachi, H., Fukuda-Yamada, K., Kojima, T., Shiraiwa, M., and Takahara, H. (2009) Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 73-79.
- Tanaka, Y., Nishiyama, Y., and Murata, N. (2000) Acclimation of the photosynthetic machinery to high temperature in *Chlamydomonas reinhardtii* requires synthesis de Novo of proteins encoded by the nuclear and chloroplast genomes. *Plant Physiology* 124, 441-450.
- Tang, Y., Wen, X., Lu, Q., Yang, Z., Cheng, Z., and Lu, C. (2007) Heat stress induces an aggregation of the light-harvesting complex of photosystem II in spinach plants. *Plant Physiology* 143, 629-638.
- Tanhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., and Chaiyarat, R. (2007) Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere* 68, 323-329.
- Tardieu, F. and Simonneau, T. (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* 49, 419-432.
- Tardieu, F. (2005) Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geosciences* 337, 57-67.
- Taylor, G. (2002) *Populus* : arabidopsis for forestry. Do we need a model tree ? *Annals of Botany* 90, 681-689.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Bottcher, C., Trampczynska, A., and Clemens, S. (2009) Phytochelatins synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. *Plant Physiology* 149, 938-948.
- Teraoka, H. (1989) Impact of atmospheric trace metals on rice roots. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 269-275.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., de Siqueira, M. F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van

- Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Townsend Peterson, A., Phillips, O. L., and Williams, S. E. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145-148.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., and Schroeder, J. I. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4991-4996.
- Thuiller, W., Lavorel, S., Araujo, M. B., Sykes, M. T., and Prentice, I. C. (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8245-8250.
- Tian, J., Belanger, F. C., and Huang, B. (2009) Identification of heat stress-responsive genes in heat-adapted thermal *Agrostis scabra* by suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology* 166, 588-601.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G., and Zolla, L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71, 391-411.
- Timpte, C. (2001) Auxin binding protein: curiouser and curiouser. *Trends in Plant Science* 6, 586-590.
- Trovato, M., Mattioli, R., and Costantino, P. (2008) Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei* 19, 325-346.
- Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Gebre, G. M., and Todd, D. E. (1998) Drought resistance of two hybrid *Populus* clones grown in a large-scale plantation. *Tree Physiology* 18, 653-658.
- Tuomainen, M. H., Nunan, N., Lehesranta, S. J., Tervahauta, A. I., Hassinen, V. H., Schat, H., Koistinen, K. M., Auriola, S., McNicol, J., and Kärenlampi, S. O. (2006) Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* 6, 3696-3706.
- Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, S., Degroove, S., Déjardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A. T., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., and Rokhsar, D. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596-1604.

- Uenishi, R., Gong, P., Suzuki, K., and Koizumi, S. (2006) Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 1072-1077.
- Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustos, P., Zupan, M., and Wenzel, W. W. (2007) Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution* 148, 107-114.
- Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647-5659.
- Van Aken, B. (2008) Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology* 26, 225-227.
- Van Assche, F. and Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* 13, 195-206.
- Van De Mortel, J. E., mar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P. D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M., and Aarts, M. G. M. (2006) Large expression Differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 142, 1127-1147.
- Van de Velde, K., Boutron, C. F., Ferrari, C. P., Moreau, A.-L., Delmas, R. J., Barbante, C., Bellomi, T., Capodaglio, G., and Cescon, P. (2000) A two hundred years record of atmospheric cadmium, copper and zinc concentrations in high altitude snow and ice from the french-italian Alps. *Geophysical Research Letters* 27, 249-252.
- van der Zaal, B. J., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Chardonens, A. N., Schat, H., Verkleij, J. A. C., and Hooykaas, P. J. J. (1999) Overexpression of a Novel Arabidopsis Gene Related to Putative Zinc-Transporter Genes from Animals Can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation. *Plant Physiology* 119, 1047-1056.
- van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., and Ton, J. (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 5602-5607.
- Vashisht, A. A. and Tuteja, N. (2006) Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 84, 150-160.
- Vassilev, A., Tsonev, T., and Yordanov, I. (1998) Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. *Environmental Pollution* 103, 287-293.
- Velikova, V. and Loreto, F. (2005) On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell & Environment* 28, 318-327.
- Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H. (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 184, 759-776.

- Vickers, C. E., Possel, M., Cojocariu, C. I., Velikova, V. B., Laothawornkitkul, J., Ryan, A., Mullineaux, P. M., and Nicholas, H. C. (2009) Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress. *Plant, Cell & Environment* 32, 520-531.
- Vieira Dos Santos, C. and Rey, P. (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* 11, 329-334.
- Vierling, E. (2003) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 579-620.
- Vincent, D. and Zivy, M. (2007) Plant proteome responses to abiotic stress. In: *Plant Proteomics* (ed Samaj, J. and Thelen, J.). pp346-364.
- Viner, R. (1999) Putting Stress in Life: Hans Selye and the Making of Stress Theory. *Social Studies of Science* 29, 391-410.
- Vitoria, A. P., Rodriguez, A. P. M., Cunha, M., Lea, P. J., and Azevedo, R. A. (2003) Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. *Biologia Plantarum* 47, 561-568.
- Vitoria, A. P., Lea, P. J., and Azevedo, R. A. (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57, 701-710.
- Vollenweider, P., Cosio, C., and Keller, C. (2006) Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): II. Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58, 64-74.
- von Koskull-Döring, P., Scharf, K. D., and Nover, L. (2007) The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science* 12, 452-457.
- Waalkes, M. P. (2000) Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79, 241-244.
- Waalkes, M. P. and Poirier, L. A. (1984) In vitro cadmium-DNA interactions: Cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc. *Toxicology and Applied Pharmacology* 75, 539-546.
- Wagner, G. J. (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advance in Agronomy* 51, 173-212.
- Wahid, A. and Close, T. (2007) Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* 51, 104-109.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M. R. (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61, 199-223.
- Wahid, A., Ghani, A., and Javed, F. (2008) Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. *Agronomy for Sustained Development* 28, 273-280.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.

- Wang, D.-F., Gao, C., and Chen, F.-R. (2007) Characteristics of zinc distribution in soil-rape system in the vicinity of Tongling mining area, China. *Journal of Agro-Environment Science* 26, 1347-1351.
- Wang, J., Ji, Q., Jiang, L., Shen, S., Fan, Y., and Zhang, C. (2009) Overexpression of a cytosol-localized rhamnose biosynthesis protein encoded by Arabidopsis RHM1 gene increases rhamnose content in cell wall. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 86-93.
- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2004a) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9, 244-251.
- Wang, Y. S., Harding, S. A., and Tsai, C. J. (2004b) Expression of a glycine decarboxylase complex H-protein in non-photosynthetic tissues of *Populus tremuloides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1676, 266-272.
- Ward, J. K. and Kelly, J. K. (2004) Scaling up evolutionary responses to elevated CO₂: lessons from Arabidopsis. *Ecology Letters* 7, 427-440.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 681-697.
- Waters, E. R., Lee, G. J., and Vierling, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47, 325-338.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E., and Clemens, S. (2004) Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *The Plant Journal* 37, 269-281.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E. U., Dougan, D. A., Tsai, F. T. F., Mogk, A., and Bukau, B. (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119, 653-665.
- Weiss, C., Bonshtien, A., Farchi-Pisanty, O., Vitlin, A., and Azem, A. (2009) Cpn20: Siamese twins of the chaperonin world. *Plant Molecular Biology* 69, 227-238.
- Whiting, S. N., Neumann, P. M., and Baker, A. J. M. (2003) Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. *Plant, Cell & Environment* 26, 351-360.
- Wilkins, O., Waldron, L., Nathal, H., Provart, N. J., and Campbell, M. M. (2009) Genotype and time of day shape the Populus drought response. *The Plant Journal*, in press.
- Wilkinson, S. and Davies, W. J. (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* 25, 195-210.
- Wingler, A., Quick, W. P., Bungard, R., Bailey, K., Lea, P. J., and Leegood, R. (1999) The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with

reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell & Environment* 22, 361-373.

- Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Macarasin, D., Artlip, T., Gasic, K., and Korban, S. (2008) Response of apple (*Malus x domestica*) to low temperature and water deficit: an expressed-sequence tag (EST) analysis. *International Symposium on Plant Cold Hardiness*.
- Wisniewski-Knypl, J., Jablonska, J., and Myslak, Z. (1971) Binding of cadmium on metallothionein in man: an analysis of a fatal poisoning by cadmium iodide. *Archiv für Toxikologie* 28, 46-55.
- Wojcik, M. and Tukiendorf, A. (2005) Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biologia Plantarum* 49, 237-245.
- Xiao, X., Yang, F., Zhang, S., Korpelainen, H., and Li, C. (2009) Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum* 136, 150-168.
- Xing, J. P., Jiang, R. F., Ueno, D., Ma, J. F., Schat, H., McGrath, S. P., and Zhao, F.-J. (2008) Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. *New Phytologist* 178, 315-325.
- Xu, C. and Huang, B. (2008) Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59, 4183-4194.
- Xu, P., Liu, D., and Jiang, W. (2009) Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. *Biologia Plantarum* 53, 387-390.
- Xu, S. L., Rahman, A., Baskin, T. I., and Kieber, J. J. (2008) Two Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases Mediate Signaling, Linking Cell Wall Biosynthesis and ACC Synthase in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20, 3065-3079.
- Xue, G. P., McIntyre, C., Glassop, D., and Shorter, R. (2008) Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology* 67, 197-214.
- Yaaqub, R. R., Davies, T. D., Jickells, T. D., and Miller, J. M. (1991) Trace elements in daily collected aerosols at a site in south-eastern England. *Atmospheric Environment* 25, 985-996.
- Yahraus, T., Chandra, S., Legendre, L., and Low, P. S. (1995) Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiology* 109, 1259-1266.
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P. N., Kuwata, S., Kubo, T., and Imaseki, H. (1997) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant and Cell Physiology* 38, 1226-1231.
- Yamori, W., Suzuki, K., Noguchi, K. O., NAKAI, M. A. S. A., and Terashima, I. (2006) Effects of Rubisco kinetics and Rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant, Cell & Environment* 29, 1659-1670.

- Yang, X. E., Long, X. X., Ye, H. B., He, Z. L., Calvert, D. V., and Stoffella, P. J. (2004) Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant and Soil* 259, 181-189.
- Yannarelli, G. G., Fernandez-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M., and Tomaro, M. L. (2007) Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 505-512.
- Yohe, G. W., Lasco, R. D., Ahmad, Q. K., Arnell, N. W., Cohen, S. J., Hope, C., Janetos, A. C., and Perez, R. T. (2007) IPCC, 2007: Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of Intergovernmental panel on Climate Change, p 811-841.
- Yordanov, I., Goltsev, V., Tsonev, T., and Kruleva, L. (1995) Thermal acclimation of the photosynthetic apparatus depending on temperature and duration of treatment. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 21, 12-28.
- Yoshioka, M., Uchida, S., Mori, H., Komayama, K., Ohira, S., Morita, N., Nakanishi, T., and Yamamoto, Y. (2006) Quality control of photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 281, 21660-21669.
- Zabludowska, E., Kowalska, J., Jedynak, L., Wojas, S., Sklodowska, A., and Antosiewicz, D. M. (2009) Search for a plant for phytoremediation - What can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere* 77, 301-307.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Scarascia Mugnozza, G., Iori, V., Pietrosanti, L., and Massacci, A. (2009) Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air, & Soil Pollution* 197, 23-34.
- Zalesny, J., Wiese, A. H., Bauer, E. O., and Riemenschneider, D. E. (2006) Sapflow of hybrid poplar (*Populus nigra* L.x*P. maximowiczii* A. Henry 'NM6') during phytoremediation of landfill leachate. *Biomass and Bioenergy* 30, 784-793.
- Zelitch, I., Schultes, N. P., Peterson, R. B., Brown, P., and Brutnell, T. P. (2009) High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiology* 149, 195-204.
- Zha, H. G., Jiang, R. F., Zhao, F. J., Vooijs, R., Schat, H., Barker, J. H. A., and McGrath, S. P. (2004) Co-segregation analysis of cadmium and zinc accumulation in *Thlaspi caerulescens* interecotypic crosses. *New Phytologist* 163, 299-312.
- Zhang, J., Nguyen, H., and Blum, A. (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany* 50, 291-302.
- Zhao, F.-J., Lombi, E., Breedon, T., and McGrath, S. P. (2000) Zinc hyperaccumulation and cellular distribution on *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell & Environment* 23, 507-514.
- Zhou, J. and Goldsbrough, P. B. (1995) Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics MGG* 248, 318-328.
- Zhu, R., Macfie, S. M., and Ding, Z. (2005) Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy. *Journal of Experimental Botany* 56, 2831-2838.

- Zimmerli, L., Hou, B. H., Tsai, C. H., Jakab, G., Mauch-Mani, B., and Somerville, S. (2008) The xenobiotic γ -aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *The Plant Journal* 53, 144-156.
- Zoghalmi, L. B., Djebali, W., Chaibi, W., and Ghorbel, M. H. (2006) Physiological and structural modifications induced by cadmium-calcium interaction in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Comptes Rendus Biologies* 329, 702-711.
- Zornoza, P., Vazquez, S., Esteban, E., Fernandez-Pascual, M., and Carpena, R. (2002) Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 1003-1009.

Thomas DURAND
Approche protéomique des stress abiotiques
chez *Populus tremula* x *P. alba*

Résumé

Les contraintes environnementales dans un monde en changement remettent en cause la survie des plantes ; les plus drastiques sont les contraintes abiotiques, comme les stress hydriques, thermiques, ou la pollution par les métaux lourds.

Les mécanismes inductibles de la tolérance des plantes sous stress ont été étudiés par une approche physiologique combinée à une analyse protéomique. Des plants de *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 ont été exposés à plusieurs contraintes en chambre phytotronique : 1) un sol contenant des concentrations importantes de Cd^{2+} ou Zn^{2+} , 2) une sécheresse induite par arrêt d'arrosage, 3) une contrainte thermique par élévation subite ou graduelle de 22 à 42°C.

Les paramètres physiologiques des plantes ont été suivis au cours des traitements ainsi que durant la période de recouvrement qui a suivi les contraintes hydriques et thermiques. La réponse de stress a été caractérisée par ces paramètres physiologiques et par les changements dans les profils protéomiques de la feuille et de la zone cambiale. Les aspects communs et particuliers du stress induit par chaque contrainte ont été décrits.

Les données rassemblées dans cette étude, en enrichissant les connaissances sur la gamme de réponse des essences ligneuses, contribuent à déterminer la frontière entre le stress générique et les réponses plus spécifiques ; elles apportent également des éléments de réponse à l'utilisation du peuplier en phytoremédiation des sols pollués par les métaux.

Proteomic approach of abiotic stresses in ***Populus tremula* x *P. alba***

Abstract

Environmental constraints in a changing world challenge plants to survival. Among these constraints, the most drastic are the abiotic ones, e.g. water stresses or temperature stresses and dispersal of inorganic pollutants like heavy metals.

The inducible tolerance mechanisms of the stressed plant were investigated by a physiological approach coupled with an in-depth proteomic study. *Populus tremula* x *P. alba* genotype 717-1B4 cuttings were exposed to diverse constraining environments in phytotrons: 1) soil added with Cd^{2+} or Zn^{2+} , 2) drought induced by withholding water, 3) heat constraint, either through heat shock or stepwise increased temperature from 22°C to 42°C.

Physiological parameters of the plants were monitored throughout the exposure to constraint and, for water and heat stresses, recovery period as well. Plant stress responses were characterized by physiological parameters and changes in proteomic patterns in leaf and cambial tissues. Common and specific features of the stress induced by each of the constraints were described.

The data gathered during this study enrich the knowledge on trees range response capabilities, contribute to shape the borders between generic and specific stress response and open potential use of poplar in phytoremediation of metal polluted sites.

Keywords : Abiotic stress, Cambium, Drought, Heat stress, Heavy metals, Poplar, Proteomic

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes
Cultures