



UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

UNIVERSITE DE CARTHAGE  
FACULTE DES SCIENCES DE BIZERTE  
Département de Biologie et Physiologie Végétales

Thèse en cotutelle pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DES UNIVERSITÉS DE LIMOGES ET CARTHAGE  
Biosciences de l'Environnement et de la Santé  
Discipline Biologie et Physiologie Végétales

Présentée et soutenue par BEN NJA Riheb

Le 25/03/2014

**Effet d'un stress salin sur la teneur en polymères pariétaux dans les feuilles  
de luzerne (*Medicago sativacv* Gabès) et sur la distribution dans  
les cellules de transfert des fines nervures**

Rapporteurs

- Mme Rabiaa Haouala, Maître de Conférences-HDR, Université de Sousse
- Mme Bernadette Julier, Directeur de Recherche, INRA

Examineurs

- Mr Guy Costa, Maître de Conférences-HDR, Université de Limoges
- Mme Néziha Ghanem Boughanmi, Professeur, Université de Carthage
- Mme Sabine Lhernould, Maître de Conférences, Université de Limoges
- Mr Vincent Gloaguen, Professeur, Université de Limoges



## *Dédicaces*

A mes très chers parents **Neji** et **Mahbouba**, à qui je dois tout. Vous êtes pour moi l'exemple de générosité et de dévouement. Que ce travail soit pour vous une infime compensation pour tous les sacrifices que vous avez toujours consentis à mon égard. Qu'il me soit donné d'être à la hauteur de votre confiance et de vos sacrifices.

A mon cher frère **Raken** et sa femme **Besma** avec toute mon admiration et ma reconnaissance. Que Dieu vous procure santé et bonheur. A mon petit neveu **Hama**.

A toute ma famille.

A mes chères amies **Amira, Idelette, Kasia, Marietta, Yosra, Houda, Jihan, Christophe, Abdallah et Jean Karim**. Je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

A mes professeurs,

A tous ceux qui me sont chers.

*RHAB*

## *Remerciements*

Le travail qui a conduit à la soutenance de cette thèse a été réalisé dans le cadre d'une co-tutelle établie entre la Faculté des Sciences de Bizerte et l'UMR de l'Université de Limoges. J'exprime ma très profonde reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce cadre de travail en Tunisie et en France.

Je suis d'abord très heureuse de présenter un témoignage de reconnaissance à l'ensemble du personnel des deux Universités qui m'ont accueillie. Une mention spéciale est adressée à ceux qui ont contribué à mon intégration dans l'équipe de Chimie, Laboratoire des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges, et plus particulièrement à tous ceux qui ont su soutenir mon travail dans un contexte de solidarité et convivialité, en premier monsieur Vincent Sol, Directeur du LCSN, et monsieur Hubert Bril, Directeur Adjoint de l'Ecole Doctorale.

J'ai le plaisir d'adresser mes remerciements les plus chaleureux à madame Néziha Ghanem-Boughanmi, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte, qui a été à l'origine de mon inscription en thèse, et a su élargir le champ de ma formation en proposant une co-tutelle avec l'équipe du LCSN de Limoges, placée sous la responsabilité de monsieur Guy Costa.

Je présente mes remerciements les plus respectueux à monsieur Guy Costa, dont j'ai apprécié l'accueil et la compétence. Sa contribution constructive, lors de la rédaction et de la présentation du travail, m'a été d'un soutien précieux.

Je suis très reconnaissante à madame Sabine Lhernould pour m'avoir guidée, avec beaucoup d'attention et de compréhension, dans mon expérimentation et dans la rédaction de ce travail. Cette thèse n'aurait pu aboutir sans ses compétences en biochimie et cytochimie, mais aussi sans ses encouragements fréquents et ses conseils rigoureux.

Que Mesdames Bernadette Julier (INRA Lusignan) et Rabiaa Haouala (Institut Supérieur d'Agriculture, Chott Meriem), rapporteurs de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté d'établir un rapport de thèse.

Je voudrais remercier particulièrement monsieur Vincent GLOAGUEN, Professeur et Vice-Président de l'Université de Limoges pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail et ce, malgré ses nombreuses préoccupations.

Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur Renaud Léonard et Madame Josephine Grass qui ont effectué les analyses de spectrométrie de masse.

A la Faculté de Limoges, j'ai été sensible à la bienveillante sollicitude manifestée par madame Rachida ZERROUKI, qui m'a prodigué des conseils constructifs et pour son aide dans mon intégration au sein du laboratoire. Je remercie madame Pierrette Fleurat-Lessard et monsieur Emile Béré Ingénieur à Image Up (Service de microscopie de l'UFR Sciences de Poitiers) pour l'aide qu'ils m'ont prodiguée.

J'associe à ce travail tous les amis étudiants qui ont participé à mes efforts, en apportant une énergie non négligeable.

## Table des matières

AVANT PROPOS .....	1
INTRODUCTION.....	4
I Le Stress salin .....	4
I-1 Généralités .....	4
I-2 Les composantes de la contrainte saline.....	4
I-3 Modifications cellulaires induites par la contrainte saline .....	6
I-3-1 Les ajustements ioniques à l'échelle de la cellule.....	7
I-3-2 Les ajustements osmotiques à l'échelle de la cellule .....	10
I-3-3 La détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	13
I-4 Modifications tissulaires induites par la contrainte saline.....	15
I-4-1 Production de biomasse et photosynthèse .....	15
I-4-2 Flux trophiques.....	17
II Les cellules associées aux vaisseaux et le stress salin.....	20
II-1 Transport des assimilats du mésophylle vers les CAVs.....	23
II-2 Le chargement phloémien et sa régulation <i>via</i> les cellules compagnes .....	24
II-3 Effet de la salinité des sols sur la production et le transport des photoassimilats.....	25
II-3-1 Incidence du stress salin sur le contenu de la sève phloémienne.....	25
II-3-2 Modification du complexe phloémien par le sel.....	26
II-4 Implication et particularités des cellules de transfert (parenchymateuses du xylème racinaire et des cellules compagnes des veines mineures) dans respectivement, la réabsorption et la recirculation du Na <sup>+</sup> et/ ou du Cl <sup>-</sup> .....	27
III La paroi et le stress salin .....	28
III-1 Organisation moléculaire de la paroi primaire.....	29
III-1-1 Les polysaccharides .....	31
III-1-1-1 La cellulose .....	32
III-1-1-2 Les hémicelluloses .....	34
III-1-1-3 Les pectines .....	36
III-1-2 Les protéines pariétales .....	40
III-1-2-1 Les extensines (HRGP) .....	40
III-1-2-2 les Arabinogalactanes protéines (AGPs).....	41
III-1-2-3 Protéines riches en proline (PRPs).....	42
III-1-2-4 Protéines riches en glycine (GRPs).....	43
III-2 Réponse de la paroi primaire aux contraintes salines .....	43
III-2-1 Croissance de la paroi primaire. ....	43
III-2-2 La réponse pariétale au stress salin.....	44
IV <i>Medicago sativa</i> et le stress salin .....	46
IV-1 Adaptation fonctionnelle des feuilles des <i>Fabaceae</i> .....	46
IV-2 La luzerne, plante pérenne, tolérante à divers stress environnementaux.....	47

IV-2-1	Caractéristiques botaniques, taxonomie et origine du genre <i>Medicago</i> .....	47
IV-2-2	Aires de culture de la luzerne .....	50
IV-2-3	Intérêts nutritionnels .....	52
IV-2-4	Intérêts pharmaceutiques .....	52
IV-2-5	Intérêts industriel et biotechnologiques.....	52
IV-2-6	Intérêt environnemental.....	53
IV-3	Cas de <i>M. sativa</i> Gabès, une variété adaptée aux sols secs, arides et salins.....	53
OBJECTIFS DU TRAVAIL	.....	55
Argumentaire scientifique	.....	55
Actions de recherches mises en place	.....	56
MATERIELS ET METHODES	.....	57
I Matériel végétal	.....	57
I-1 Conditions de culture et de traitement des plantes	.....	57
I-2 Conditions de culture et de traitement des semences	.....	59
II Analyses morphologiques.....	.....	59
III Analyses écophysiologicals	.....	59
III-1 Mesure de la photosynthèse	.....	59
III-2 Mesures de la teneur en eau et du potentiel hydrique	.....	60
IV Analyse biochimique des composés pariétaux.....	.....	60
IV-1 Protocole d'extraction séquentielle des polymères.....	.....	60
IV-2 Dosages colorimétriques.....	.....	63
IV 2-1 Dosage des oses neutres.....	.....	63
IV 2-2 Dosage des acides uroniques	.....	63
IV 2-3 Détermination des teneurs en oses neutres et en acides uroniques.....	.....	64
IV-3 Composition monosaccharidique.....	.....	64
V Analyses histologiques	.....	65
V-1 Préparation des échantillons.....	.....	65
V-1-1 Fixation à l'alcool et coloration au Fasga.....	.....	65
V-1-2 Fixation et Inclusion des feuilles en « London Resin White » (LRW)	.....	66
V-2 Observation au microscope photonique	.....	67
VI Techniques immunologiques	.....	67
VI-1 Immuno-histocytologie.....	.....	67
VI-1-1 Préparation des échantillons	.....	67
VI-1-1-1 Immuno-marquage à l'or	.....	67
VI-1-1-2 Observation Microscopie Electronique à Transmission (MET)	.....	69
CHAPITRE 1	EFFETS DU	
STRESS SALIN SUR LA MORPHOLOGIE ET LA PHYSIOLOGIE DE <i>M. sativa</i> cv Gabès	.....	71
I Effets du stress salin sur le développement de <i>M. sativa</i> Gabès cv Gabès	.....	71
I-1 Effets du stress sur la croissance	.....	71
I-1-2 Effets du stress sur le développement des entre-noeuds	.....	73
I-1-2-1 Données biométriques.....	.....	73
I-1-2-2 Données histologiques	.....	74
II Effets du stress salin sur l'histo-morphologie foliaire de <i>M. sativa</i> cv Gabès	.....	78







## Liste des figures

- Figure 1** : Carte du pourtour de la méditerranée présentant, pour chaque pays, les pourcentages de salinité (jaune) et d'alcalinité (rouge) des terres cultivables, d'après Antipolis (2003).
- Figure 2** : Effets de la salinité (effets osmotiques et ioniques) et réponse des plantes.
- Figure 3** : Représentation schématique d'un excès de sel sur la conformation 3D des protéines.
- Figure 4** : Homéostasie cellulaire établie après l'adaptation au sel (NaCl).
- Figure 5** : Transporteurs, canaux et pompes impliqués dans l'exclusion du Na<sup>+</sup> des tiges.
- Figure 6** : Modèle de réponse au stress salin des plantes recombinantes M6PR d'*Arabidopsis thaliana* (Chan *et al.*, 2011).
- Figure 7** : Principaux sites de genèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et principales enzymes de détoxification des ROS dans les cellules de plantes soumises aux contraintes salines.
- Figure 8** : Chloroplastes de *M. sativa* cv Gabès de feuilles témoins (A), de feuilles jeunes (B) ou âgées (C) traitées avec 150 mM de NaCl durant 4 semaines.
- Figure 9** : Transport horizontal et vertical du sel dans la plante (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).
- Figure 10** : Rôles de AtHKT1 dans la réabsorption du Na<sup>+</sup> par le xylème et sa recirculation par le phloème dans la protection de la feuille contre le stress sodique.
- Figure 11** : Transport des glucides par le phloème des sources aux puits par les voies apoplasmique et symplasmique (Lemoine *et al.*, 2013)
- Figure 12** : Différentes stratégies de chargement du phloème.
- Figure 13** : Ultrastructure du complexe phloémien de feuille exportatrice de *M. sativa* cv Gabès, dans les nervures mineures (A, C, E) et la nervure principale (B, D, F). Plantes témoins (A et B) et traitées par NaCl (150 mM, 4 semaines) (C et D: jeunes, E et F: âgées).
- Figure 14** : A, Représentation schématique des niveaux d'organisation de la paroi végétale (www.spectroscience.com).
- Figure 15** : Modèle architectural des polysaccharides des cellules foliaires d'*Arabidopsis*.
- Figure 16** : Représentation schématique des deux modèles de la paroi primaire des plantes à fleurs.
- Figure 17** : Structure chimique des éléments constitutifs prédominant dans la paroi cellulaire primaire. A, monomères; B, polymères correspondants (Sarkar *et al.*, 2009).
- Figure 18** : Synthèse de cellulose par les celluloses synthases (CESA) (Cosgrove, 2005).
- Figure 19**: Représentation schématique des différentes sous-unités oligosaccharidiques constitutives des xyloglucanes (XXXG, XXLG, XXFG, XLFG et XLLG) (Fry *et al.*, 1993).
- Figure 20** : Diagramme schématique simplifié décrivant les trois polysaccharides majeurs des pectines attachés au squelette de GalA.
- Figure 21** : Représentation des chaînes d'homogalacturonanes.
- Figure 22** : Structure de rhamnogalacturonanes de type I où RGI.
- Figure 23** : Structure de rhamnogalacturonanes de type II où RGII.
- Figure 24** : Liaison de coordination entre un atome de bore et 2 résidus de D-Api de 2 chaînes de rhamnogalacturonanes de type II ou RGII (Matoh *et al.*, 1996)
- Figure 25** : A, Motif répété prédominant de la plupart des séquences connues d'extensine (EXT), contenant le motif Ser-(Hyp)<sub>4</sub>, qui est O-glycosylé. B, Les oligosaccharides présents sur le motif Ser-(Hyp)<sub>4</sub>.

**Figure 26** : Représentation schématique des AGPs suivant Ellis *et al.*, 2010.

**Figure 27** : *Medicago sativa* L., grappes de fleurs violettes et graine spiralée, représentation dans la Flore d'Europe.

**Figure 28** : Relations hypothétiques entre les taxa de *Medicago sativa* (Lesin et Lesin, 1979; Quiros et Bauchan, 1988 ; Small et Jomphe, 1989), modifié par Havananda *et al.*, (2010).

**Figure 29** : Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde (Prolea, 2002).

**Figure 30** : Développement de la partie aérienne de la luzerne ramifiée en nombreuses tiges et du réseau racinaire autour de la racine pivot profonde.

**Figure 31** : A, Système racinaire dense. B, Nodules racinaires (flèche) (symbiose avec *Rhizobium*).

**Figure 32** : Vue du dispositif expérimental à la serre (A).

**Figure 33** : Schéma représentant le numéro d'ordre basifuge des feuilles de *M. sativa* cv Gabès prélevées pour l'échantillonnage.

**Figure 34** : Schéma du protocole d'extraction des polymères pariétaux des feuilles de *M. sativa* cv Gabès (d'après Vanzin *et al.*, 2002 ; modifié).

**Figure 35** : Effets du stress salin sur la croissance en longueur de *M. sativa* cv Gabès.

**Figure 36** : Effets du stress salin sur la croissance en diamètre au collet de la tige principale de *M. sativa* cv Gabès.

**Figure 37** : Effets du stress salin sur le nombre (A) et la longueur (B) des entre nœuds et sur le diamètre (C) de la tige principale de *M. sativa* cv Gabès.

**Figure 38** : Modèle d'interaction hormonale sur le contrôle de la croissance des entre-nœuds chez le pois élaboré par Zentella *et al.* (2007) et modifié par Ross *et al.* (2010).

**Figure 39** : Coupe transversale, colorée au FASGA, d'entre-nœuds jeunes (J) et âgés (A), des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 40** : Faisceaux libéro-ligneux, colorés au FASGA, d'entre-nœuds jeunes (J) et âgés (A1, A2), des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 41** : A, Représentation schématique de la feuille composée trifoliée de *M. sativa*. B, Feuilles jeunes (J) et âgés (A), des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 42** : Effets du stress salin sur la surface foliaire (A), la longueur de la nervure principale (B), la longueur (C) et le diamètre (D) du pétiole des feuilles jeunes (FJ) et âgées (FA) de *M. sativa* cv Gabès.

**Figure 43** : Coupes transversales, colorées au FASGA, du pétiole (Pe) et détail de son faisceau vasculaire dorsal (VD), dans les feuilles âgés, des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 44** : Coupes transversales, colorées au FASGA, de *pulvinus* de la foliole impaire (Pf) et de la nervure principale de la foliole impaire (Np), dans les feuilles âgés, des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 45** : Coupes transversales du limbe de feuilles jeunes (J) et âgées (A), colorées au bleu de toluidine, des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 46** : Effets du stress salin sur l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> (A), la conductance stomatique (B), la teneur intracellulaire en CO<sub>2</sub> (C) et la transpiration foliaire (D) des feuilles jeunes (FJ) et âgées (FA) de *M. sativa* cv Gabès.

**Figure 47** : Effet du stress salin sur la conductance interne en CO<sub>2</sub> des feuilles jeunes (FJ) et âgées (FA) de *M. sativa* cv Gabès.

**Figure 48** : Métabolisme de l'amidon et du saccharose d'après Janz *et al.* (2010).

**Figure 49** : Pourcentage molaire des monosaccharides séparés et identifiés par CPG à partir des fractions (B), (C), (D) et (E) des feuilles jeunes (J) et âgées (A), de plantes témoins (T) ou traitées par 150 mM NaCl (S).

**Figure 50** : Pourcentage molaire des monosaccharides séparés et identifiés par CPG à partir des fractions (**F1**) et (**F4**) des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**), de plantes témoins (**T**) ou traitées par 150 mM NaCl (**S**).

**Figure 51** : Pourcentage d'oligosaccharides identifiés par spectrométrie de masse à partir de la fraction (**F1/F4**) des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**), de plantes témoins (**T**) ou traitées par 150 mM NaCl (**S**).

**Figure 52** : Dots blots réalisés à partir des fractions polysaccharidiques (**A, B, C, D, E, F1** et **F4**) collectées suivant le protocole de Vanzin *et al.* (2002), dans des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**), de plantes témoins (**T**) ou de plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**).

**Figure 53** : **A**, Présentation du réseau vasculaire du limbe foliaire des dicoylédones. **B**, Structure schématique transversale des veines mineures de type 2 de plantes herbacées mettant en évidence le plan de division cellulaire au cours du développement, suivant le modèle décrit par Gamalei (1990).

**Figure 54** : Ultrastructure du phloème dans les nervures mineures de *M. sativa* var Gabès. Feuilles jeunes (**A, B**) et âgées (**C, D**), de plantes témoins (**A, C**) ou de plantes traitées par 150 mM de NaCl (**B, D**).

**Figure 55** : Détail du complexe phloémien des nervures mineures de *M. sativa* var Gabès. Feuilles jeunes (**A, B**) et âgées (**C, D**), de plantes témoins (**A, C**) ou de plantes traitées par 150 mM de NaCl (**B, D**).

**Figure 56** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps JIM5 et JIM7. Nervures mineures de feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) de *M. sativa* cv Gabès témoins (Control) et traitées (NaCl) à par 150 mM. **P**, paroi primaire; **PI**, protubérance. Echelle 0,5 µm.

**Figure 57** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps LM5 et LM6, anti galactanes et arabinanes. Nervures mineures des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) de *M. sativa* cv Gabès témoins (Control) et traitées (NaCl) à 150 mM. **P**, paroi primaire; **PI**, protubérance. Echelle 0,5µm.

**Figure 58** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps LM15 et CCRCM1, anti XyG et XyG fucosylés. Nervures mineures des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**), de *M. sativa* cv Gabès témoins (**T**) et traitées (**S**) par NaCl à 150 mnM. **P**, paroi primaire; **PI**, protubérance. Echelle 0,5 µm.

**Figure 59** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps JIM13 et JIM8, anti-AGPs. Nervures mineures des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**), de *M. sativa* cv Gabès témoins (**T**) et traitées (**S**) par NaCl à 150 mM. **P**, paroi primaire; **PI**, protubérance. Echelle 0,5 µm

## *Liste des tableaux*

**Tableau 1** : Caractéristiques des différents anticorps utilisés.

**Tableau 2** : Teneur en oses totaux (**OT**), acides uroniques (**AU**) et en oses neutres (**ON**) des différentes fractions de polysaccharides (**A, B, C, D, E, F1 et F4**) extraits des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**).

**Tableau 3** : Pourcentage des polymères pectiques et hémicellulosique calculés suivant Muschitz (2009) des fractions (**B**), (**C**), (**D**) et (**E**) extrait à partir des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**).

**Tableau 4** : Pourcentage des polymères pectiques et hémicellulosiques calculés suivant Muschitz (2009) des fractions (**F1**) et (**F4**) extraits à partir des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**).

**Tableau 5** : Dénombrement des marquages immunologiques obtenus sur les coupes des feuilles jeunes (**J**) et des feuilles âgées (**A**) de *M. sativa* cv Gabès des plantes témoins (**T**) et traitées par 150 mM de NaCl (**S**). JIM5, anticorps anti HGs peu ou pas méthylestérifiés, JIM7, anticorps anti HGs méthylestérifiés, LM5, anticorps anti  $\beta(1,4)$ -galactanes, LM6, anticorps anti  $\alpha(1,5)$ -arabinanes, LM15, anticorps anti XyG, CCRCM1, anticorps anti XyG fucosylés, JIM13, anticorps anti  $\alpha(1,5)$ -arabinanes, JIM8, anticorps anti XyG.

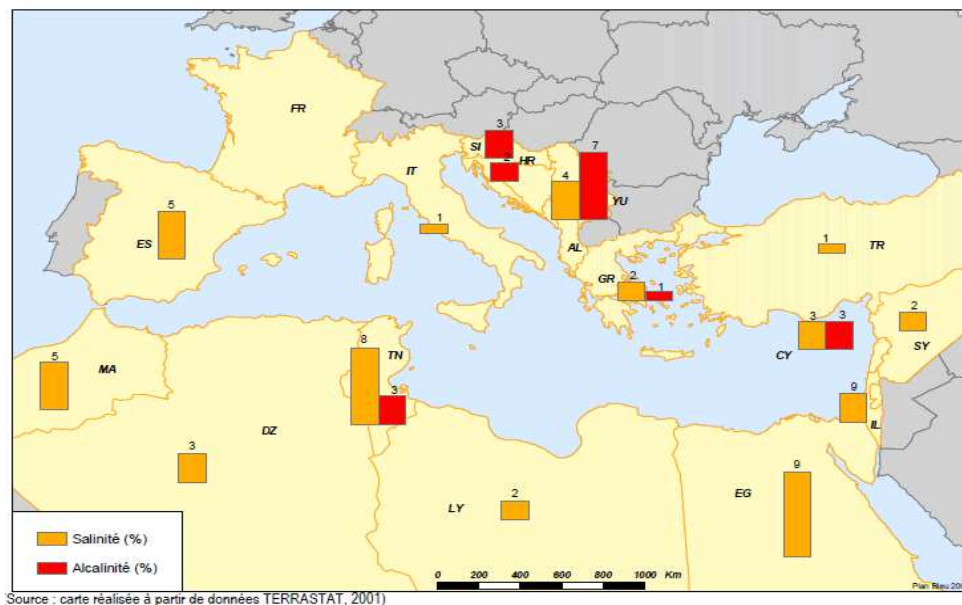
## *Liste des abréviations*

A	Taux de l'assimilation nette du CO <sub>2</sub>
ABA	Acide abscissique,
A Gal	Acide galacturonique
A Glc	Acide glucuronique
AGPs	Arabinogalactanes protéines
APXs	Peroxydases
Ara	Arabinose
AS	Plantes ou feuille âgées traités
AT	Plantes ou feuille âgées témoins
AU	Acides uroniques
BR	Brassinostéroïdes
BSTFA	<i>N, O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CLG	Chromatographie liquide-gaz
CATs	Catalases
Ci	CO <sub>2</sub> intercellulaire
CNGCs	Cyclic Nucleotide Gated Channels
CK	Cytokinine
EI	Epiderme inférieur
ES	Epiderme supérieur
F	Feuille
FID	Ionisation de flamme
FA	Feuille âgée
FJ	Feuille jeune
FT	Feuille Témoin
FS	Feuille Traitée par NaCl
Fuc	Fucose
G	Gaine périvasculaire
GA	Acide gibbérélique
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GPX	Glutathion peroxydase
Gs	Conductance stomatique
GTS	Glutathion S-transférase
HG	Homogalacturonanes
HKT	High-affinity K <sup>+</sup> Transport
Hsc70	Heat-shock cognate
IAA	<b>acide indole 3-acétique</b>
JT	Plantes ou feuille jeunes témoins
JS	Plantes ou feuille jeunes traités
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LPO	Peroxydation des lipides
m-HDP	Méta-hydroxydiphényl
Man	Mannose
MET	Microscope électronique à transmission
MJ	Méthyl jasmonate
MOPS	3-( <i>N</i> -morpholino)propanesulfonic acid
Np	Nervure principale
NSCCs	Non Selective Cation Channels
ON	Oses neutres
OT	Oses totaux
Pe	Pétiole
PeT	Pétiole des plants témoins
PeS	Pétiole des plants traités

PF	Pulvinus
Pf	Pulvinus de la foliole principale
PFA	Paraformaldéhyde,
PSII	Photosystème II
PT1	Salt-sensitive rice Pathumthani 1
$P_N$	Photosynthèse nette
RG	Rhamnogalaturonnanes
Rha	Rhamnose
ROS	Dérivé réactif d'oxygène
SOS	Salt Overly Sensitive
SODs	Superoxide dismutases
XG/XyGs	Xyloglucanes
Xyl	xylose

## AVANT PROPOS

Près de 400 millions d'hectares de terre sont affectés par **la salinisation** (Bot *et al.*, 2000), dont 80% sont d'origine naturelle et 20% d'origine anthropique (FAO et IPTRID, 2006). A travers le monde, 3 hectares des terres arables sont perdus chaque minute à cause de la salinité du sol (FAO et IPTRID, 2006) et ceci plus particulièrement dans les régions arides et semi-arides du fait des déficits d'humidité consécutifs à la fois à la forte évaporation de l'eau souterraine (Ashraf et O'Leary, 1996) et à la mauvaise gestion de l'irrigation. En région méditerranéenne, où les zones salées couvrent 16 millions d'hectares (Hamdy, 1999), les plantes sont souvent soumises à un fort ensoleillement et à une faible pluviométrie. Sous ces conditions stressantes, l'irrigation devient obligatoire, mais se fait à l'aide d'eaux saumâtres. Par conséquent, la forte demande évaporatoire et la faible infiltration dues aux précipitations entraînent l'accumulation du sel à la surface des sols (Gucci *et al.*, 1997). **En Tunisie**, les sols affectés par la salinité naturelle couvrent 1,5 million d'hectares, soit 8% du territoire national et près de 25% de la surface totale des terres arables (Antipolis, 2003) (Figure 1, Antipolis 2003).



**Figure 1 :** Carte du pourtour de la méditerranée présentant, pour chaque pays, les pourcentages de salinité (jaune) et d'alcalinité (rouge) des terres cultivables, d'après Antipolis (2003). Par comparaison avec les autres pays méditerranéens, la Tunisie dispose à la fois des terres salines salines et alcalines dans des proportions bien supérieures à la moyenne des autres pays.

Les zones affectées par les sels sont caractérisées par des sols contenant de fortes concentrations en sels solubles, essentiellement du NaCl, mais aussi Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub> et KCl (Papadopoulos, 1986). Les eaux de surface du nord de la Tunisie sont de bonne qualité avec une salinité moyenne inférieure à 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Cependant, des eaux de salinité supérieure, de 2 à 3,5 g.L<sup>-1</sup> voire de 3,5 à 4,5 g.L<sup>-1</sup> sont les plus employées pour l'irrigation des cultures. L'utilisation de ces eaux saumâtres a pour conséquence l'enrichissement en sel des terres arables. Pour le sud du pays, les problèmes sont encore plus marqués du fait de la très mauvaise qualité des eaux, dont les concentrations en sel sont en moyenne de 7 g.L<sup>-1</sup>. Dans tous ces milieux, le sel devient un facteur majeur limitant la croissance et la productivité des plantes terrestres (Parida et Das, 2005).

Les effets du sel sur les plantes dépendent à la fois de leur stade de développement (Munns *et al.*, 1995), de l'espèce, du cultivar, du génotype (Cornillon et Palloix, 1997) et de la durée de l'exposition aux contraintes salines (Munns et Termaat, 1986). Les conditions climatiques et édaphiques, notamment le taux d'évapotranspiration, la capacité de rétention de l'eau et la porosité du sol, sont des facteurs supplémentaires amplifiant et/ou réduisant les effets des stress salins sur la croissance et la survie des plantes. Selon le degré de résistance au sel, trois grandes catégories de plantes ont été définies : **(i) les halophytes**, espèces spontanées adaptées aux milieux salins, poussant sur des sols halomorphes, **(ii) les glycophytes tolérantes**, espèces qui peuvent supporter des concentrations élevées en NaCl, atteignant 7 g.L<sup>-1</sup>, et **(iii) les glycophytes sensibles** qui ne tolèrent pas plus de 2 à 3 g.L<sup>-1</sup> de sel dans l'eau de la rhizosphère. Une forte concentration de NaCl dans le sol est perçue par les glycophytes comme une sécheresse physiologique. Ce changement dans le statut hydrique de la plante serait la cause initiale de la réduction de la croissance induisant son atrophie (Takemura *et al.*, 2000) et la baisse de sa productivité (Vicente *et al.*, 2004 ; Parida et Das, 2005). La luzerne (*Medicago sativa* L.), légumineuse herbacée vivace (Teuber et Bick, 1988 ; Barnes et Sheaffer, 1995) a été introduite en Afrique du Nord à la fois pour sa rusticité au regard de la pauvreté du sol, pour sa capacité d'enracinement (Mauriès, 1994) et du fait de ses qualités nutritionnelles (richesse en protéines, vitamines et matière azotée digestible, Chaibi, 1995). Plus encore, le cultivar de luzerne *Medicago sativa cv Gabès* est remarquablement bien adapté à la salinité des sols (Boughanmi *et al.*, 2005).

Si ce cultivar est adapté aux milieux salins, de nombreuses questions restent en suspens quant aux stratégies physiologiques mises en place par cette plante. Le travail, présenté dans ce mémoire de thèse, a été réalisé en co-tutelle avec le laboratoire de Chimie des Substances



Naturelles (LCSN) de la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges, en France, et la Faculté des Sciences de Bizerte, en Tunisie. Dans cette étude, nous nous attacherons à suivre l'impact du stress salin sur les modifications du compartiment pariétal (approches biochimique et immuno-histologique) avec une attention toute particulière pour les parois primaires des cellules associées à la vascularisation du phloème. La connaissance de ces modifications doit permettre également d'estimer les effets du stress salin sur la digestibilité du fourrage par les animaux d'élevage. En effet, toutes modifications de la paroi cellulaire, qui représente pour *Medicago sativa* 43% de la matière sèche de la plante, dont 20% de lignine brute, 32% d'hémicelluloses et 48% de cellulose (Mauriès, 1994), va influencer à la fois la croissance de la plante, et donc sa richesse nutritionnelle, et la digestibilité du fourrage. Ces 2 paramètres, qualité nutritionnelle des plantes et digestibilité auront donc des conséquences sur la croissance, la nutrition et le développement des animaux d'élevage consommateur de tels fourrages.

### **I Le Stress salin**

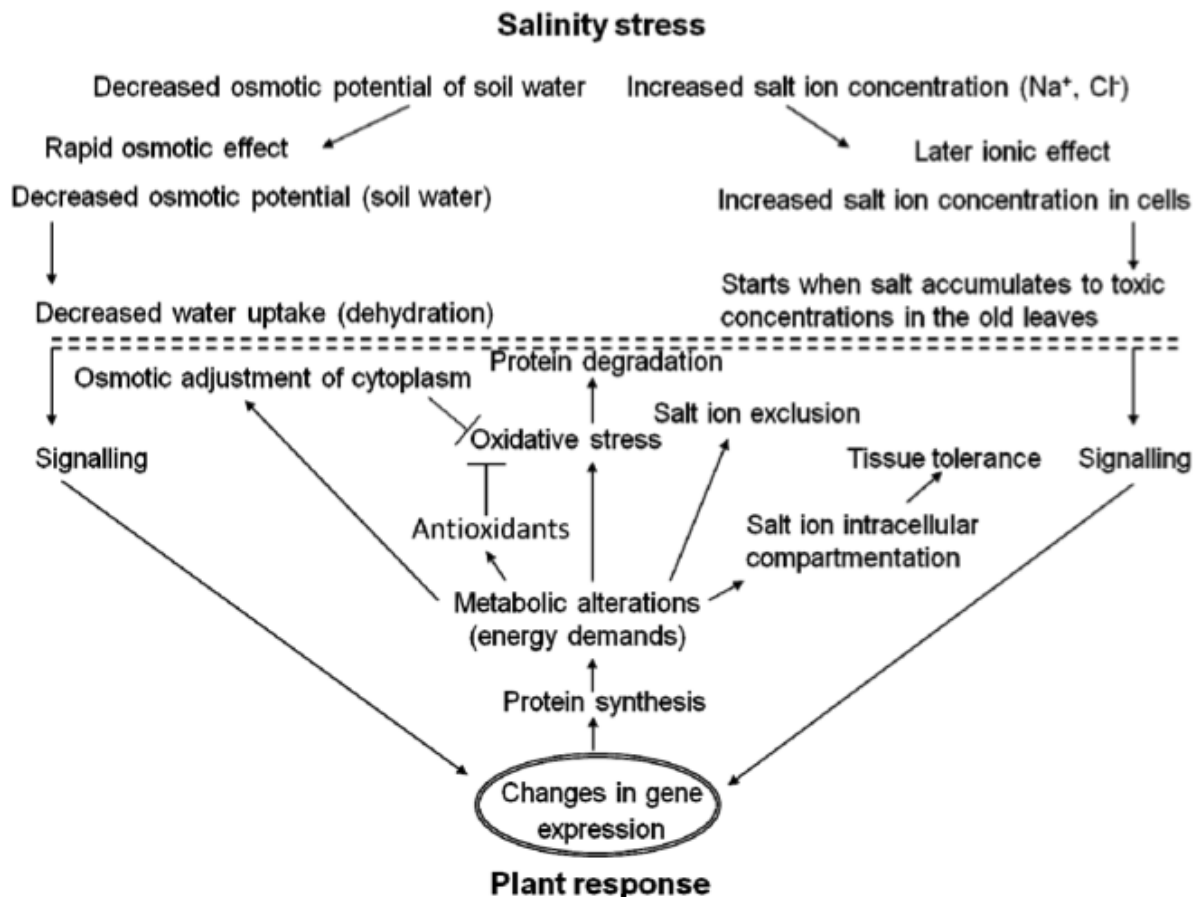
#### **I-1 Généralités**

Dans les régions arides et semi arides, les contraintes hydriques sont aggravées par la salinité accrue des milieux, qui elle même est amplifiée par l'irrigation intensive avec des eaux riches en sels (Munns and Tester 2008). A l'échelle planétaire, 20% des surfaces irriguées sont affectées par la salinité (Unesco Water Portal, 2007). En termes de sécurité alimentaire, la salinité des sols représente un obstacle au développement de l'agriculture car 20% des sols sont irrigués et produisent 1/3 de l'alimentation mondiale (FAO). En effet, la plupart des plantes cultivées, et particulièrement les plantes fourragères, sont des glycophytes dont la croissance, le développement et la productivité sont réduites par des taux trop élevés en sel. Dans la majorité des sols salins, le NaCl est la forme chimique principalement retrouvée et représente entre 50 à 80 % des sels solubles totaux (Rengasamy, 2010). En Afrique, 39 Mha, soit 2 % des terres arables, sont des sols salins et parmi eux 34 Mha sont des sols sodiques (FAO, 2008).

#### **I-2 Les composantes de la contrainte saline**

La salinité affecte la croissance des glycophytes, dont l'intensité et/ou la sensibilité, peut se solder par leur mort (Winicov, 1998; Yamaguchi et Blumwald, 2005; Munns et Tester, 2008). La réduction de la feuille est le premier effet phénotypique observable chez les glycophytes soumises à une contrainte saline. Cette modification morphologique est due à une contrainte osmotique primaire qui va être complétée plus tardivement à un stress ionique, principalement une déficience en  $K^+$  et  $Ca^{2+}$ , et une accumulation du  $Na^+$  et  $Cl^-$ . Chez ces plantes, les feuilles âgées, moins efficaces en terme de compartimentation, et plus actives en terme d'évapotranspiration foliaire, vont accumuler plus de  $Na^+$  et  $Cl^-$  que les jeunes feuilles. Cette situation ne s'observe pas chez les plantes halophytes où les teneurs en  $Na^+$  et  $Cl^-$  sont identiques, quel que soit l'âge de la feuille (Teakle et Tyerman, 2010). De plus, le stress salin induit une sénescence précoce des feuilles due à des modifications des relations hormonales (Ghanem *et al.*, 2008) et à l'émergence d'un stress oxydatif induit par les composantes osmotiques et ioniques du stress salin (Figure 2, selon Kosova *et al.*, 2013).

La survie des glycophytes **péreennes** dépend alors de leur capacité à éviter que le sel n'atteigne des niveaux toxiques dans les feuilles assimilatrices. Chez les espèces **annuelles**, la survie est plutôt reliée à la capacité des méristèmes à éviter la toxicité ionique induite par l'accumulation de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Pour ce faire, les plantes annuelles vont préférentiellement « transloquer » les nutriments des jeunes feuilles, dont la charge en sel est réduite, vers les apex peu vacuolisés (Munns, 2002).



**Figure 2 :** Effets de la salinité (effets osmotiques et ioniques) et réponse des plantes : signalisation, changement dans l'expression des gènes, des protéines et du métabolisme induisant une diminution des effets néfastes du stress (ajustement osmotique par biosynthèse des solutés compatibles, diminution du transport et exclusion des ions toxiques  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  par la compartimentation, diminution du stress oxydatif par activation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques) (Kosova *et al.*, 2013).

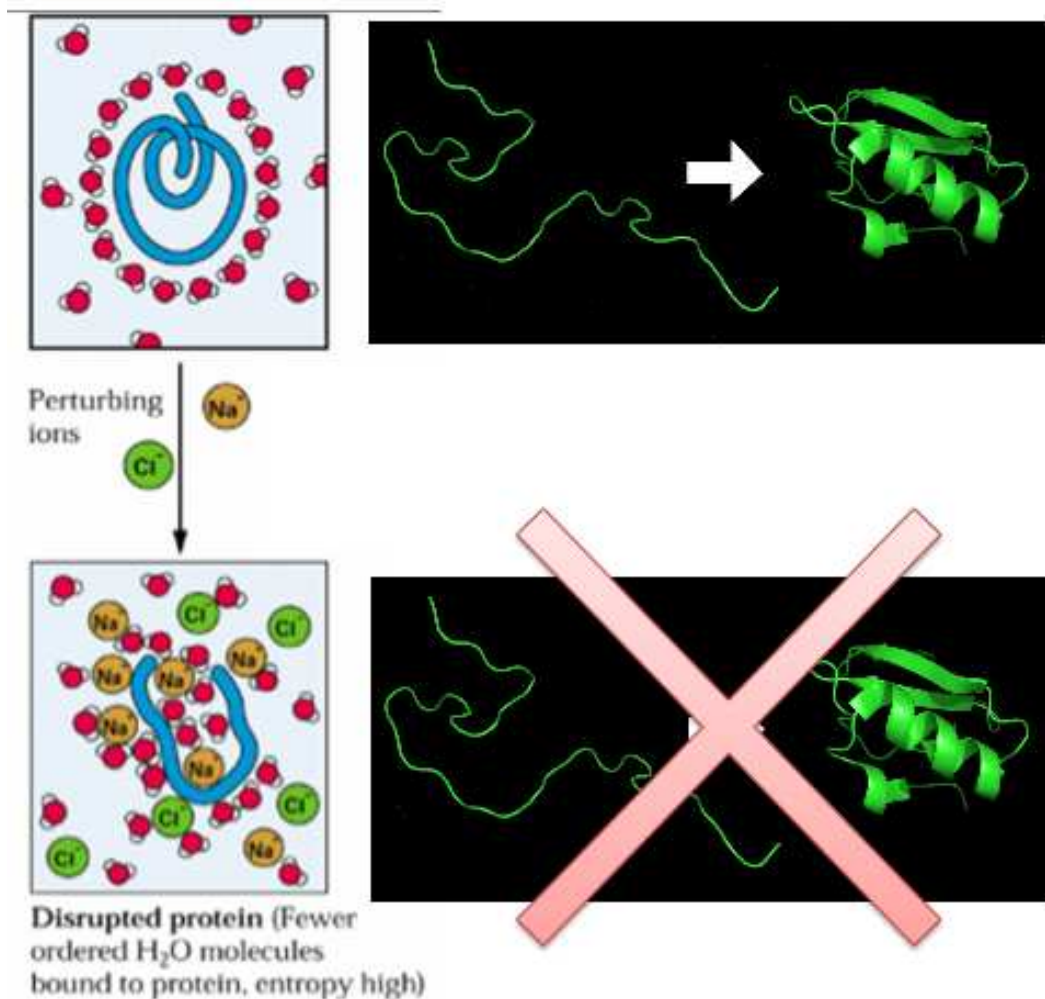
En conséquence, la survie des glycophytes, et l'accomplissement de leur cycle de développement, sont tributaires du maintien de l'activité métabolique des **jeunes feuilles**, sources trophiques pour l'apex, et donc pour la croissance de la plante.

Quelle que soit la stratégie mise en place par les végétaux, la détoxification des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  nécessite de contrôler les flux (influx et efflux) dans la cellule, ou d'isoler les ions dans des

compartiments, ou encore de les chélater, ou enfin un mélange de tous ces mécanismes. L'objectif ultime est le maintien de l'homéostasie ionique du cytoplasme.

### I-3 Modifications cellulaires induites par la contrainte saline

L'homéostasie ionique contribue au maintien d'un taux constant et faible des espèces ioniques dans le cytoplasme des cellules afin de limiter les effets du  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sur la fonctionnalité des enzymes (Figure 3).



**Figure 3:** Représentation schématique d'un excès de sel sur la conformation 3D des protéines.

Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  vont modifier la distribution des molécules d'eau autour des protéines entraînant un changement de conformation de ces dernières et modifiant de façon partielle et/ou totale l'activité des enzymes (Flower *et al.*, 1977). L'existence de protéines chaperones protectrices a été décrit par de nombreux auteurs, comme la famille des HSP90 chez la tomate (Manaa *et al.*, 2011), ou des HSP70 et Hsc70 (heat-shock cognate) chez *A. thaliana* (Pang *et al.*, 2010) et *Physcomitrella patens* (Wang *et al.*, 2008). Si cette dénaturation des protéines ne

pose que peu de problèmes dans le compartiment vacuolaire, elle va conduire pour le cytoplasme et/ou les autres organites de la cellule à des dysfonctionnements importants des enzymes du métabolisme. Par la nature des ions mis en jeu, les protections des enzymes du cytoplasme vont conduire à des ajustements osmotiques dans les cellules.

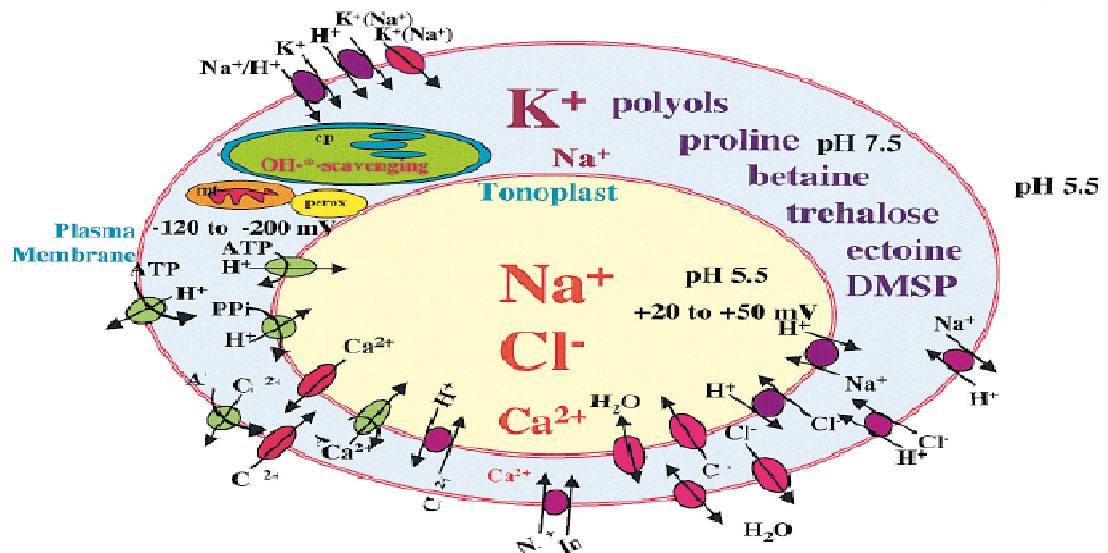
Outre les effets toxiques des ions  $\text{Na}^+$ , son absorption massive peut induire des carences potassiques. Le  $\text{K}^+$  est un ion essentiel, activement transporté dans les cellules. En raison de la similarité chimique (degré de solvatation, et rayon ionique) des cations  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ , les transporteurs du  $\text{K}^+$  comme les NHXs et le NSCCs ne font pas la différence entre les 2 cations et les transportent indifféremment, ce qui entraîne une accumulation de  $\text{Na}^+$  au dépend du  $\text{K}^+$  (Pardo et Quintero, 2002).

Le  $\text{Cl}^-$ , présent en excès dans les milieux hypersalins, est toxique pour les cellules. La toxicité au chlore se traduit par une dégradation de la chlorophylle et l'apparition de chlorose à la périphérie des feuilles. Cette toxicité foliaire est différente de celle du  $\text{Na}^+$  qui, par la réduction des taux de  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  induit une diminution de la photosynthèse *via* la réduction de la conductance stomatique. Cependant, les effets du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  sont additifs (Tavakkoli *et al.*, 2011). De plus, et comme pour  $\text{Na}^+$ , la teneur en  $\text{Cl}^-$  augmente avec l'âge des feuilles chez les glycophytes par comparaison aux halophytes où la concentration de ces 2 ions est la même quelque soit l'âge des feuilles (Teakle et Tyerman, 2010).

### **I-3-1 Les ajustements ioniques à l'échelle de la cellule**

Avant que n'apparaisse la toxicité cellulaire induite par la présence de sel dans le cytoplasme des cellules, les plantes, se développant dans un environnement hypersalin, vont devoir ajuster leur osmolarité intracellulaire afin de limiter les pertes de turgescence due à l'abaissement du potentiel hydrique ( $\Psi_H$ ) de la solution du sol. Ainsi, les végétaux vont accumuler des solutés compatibles : le  $\text{K}^+$  (Yokoi *et al.*, 2002), les monosaccharides comme le fructose et le glucose, les alcools comme le glycérol, et les dérivés d'acides aminés quaternaires comme la proline, et la glycine-bétaïne. Pour contrebalancer les potentiels hydriques bas du cytosol, les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  présents dans la rhizosphère sont accumulés dans la vacuole, limitant ainsi leur toxicité cytoplasmique (Blumwald *et al.*, 2000), et cela tant que la capacité de compartimentation des cellules n'est pas dépassée. Le mouvement du  $\text{Na}^+$  de l'apoplasme à la vacuole est réalisé par des transporteurs situés dans la membrane plasmique et le tonoplaste (Figure 4). Au-delà de l'augmentation de la charge en « osmoticum » de la cellule, certains de ces métabolites auront

un rôle d'osmoprotectants en protégeant l'intégrité des membranes thylakoïdaires et plasmalemmiques (Rhodes et Hanson, 1993). L'accumulation de ces molécules est corrélée à la tolérance à la salinité (Yamada *et al.*, 2003). En complément, des protéines (Kim *et al.*, 2005; Ndimba *et al.*, 2005; Chitteti et Peng, 2007), comme par exemple les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), s'accumulent dans le cytosol protégeant les cellules contre la déshydratation (Ingram et Bartel, 1996).

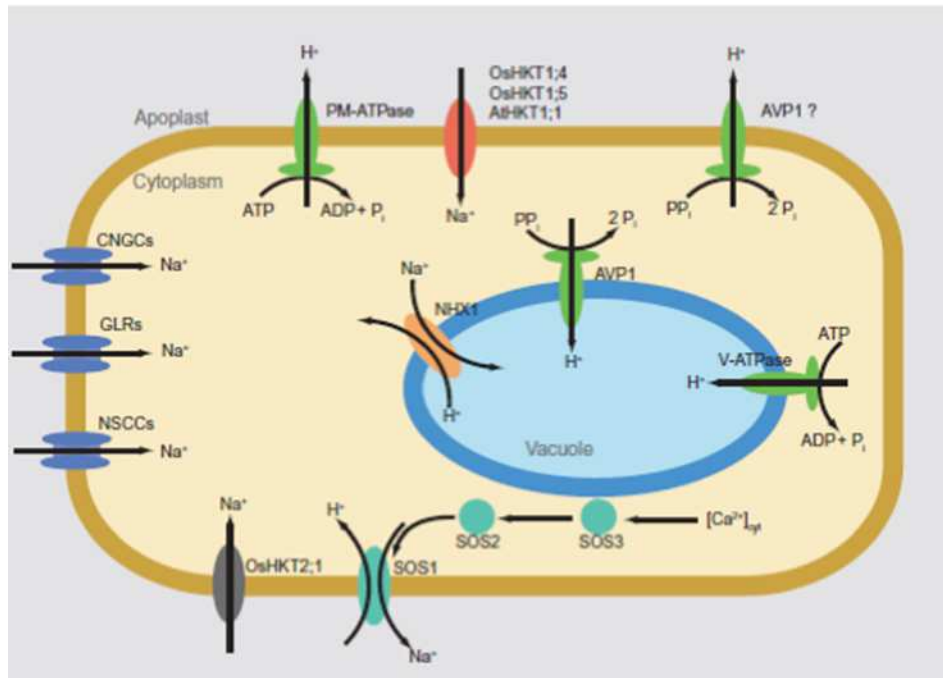


**Figure 4** : Homéostasie cellulaire établie après l'adaptation au sel (NaCl). Présentation des osmolytes et des ions compartimentés dans la vacuole, des transporteurs protéiques responsables de l'homéostasie pour  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , des canaux aqueux, et des potentiels électrochimiques à travers la membrane plasmique et le tonoplast. Chloroplaste (cp), mitochondrion (mt) et peroxisome (perox), organites dans lesquels le ROS-« scavenging » est impliqué (Hasegawa *et al.*, 2000).

A l'équilibre, les plantes acclimatées aux sels ont ainsi complètement redistribué les osmolytes de part et d'autre du plasmalemme et progressivement compartimenté les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . L'homéostasie ionique est alors réalisée, mais ceci au prix d'une consommation énergétique importante, à la fois pour le transport des ions dans les différents compartiments, mais également au travers de la synthèse des nouveaux métabolites et de nouvelles protéines. En effet, la majorité des transporteurs sont énergisés, soit de façon directe, soit de façon indirecte, par des pompes à protons (Figure 4, selon Hasegawa *et al.*, 2000).

L'influx de  $\text{Na}^+$  au travers de la membrane plasmique est en partie sous la dépendance de processus  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants (Figure 5) utilisant des canaux non spécifiques pour le transport des ions au travers de la membrane plasmique comme les NSCCs (Non Selective Cation Channels) (Demidchik et Maathuis, 2007). Certains de ces canaux non spécifiques, comme les CNGCs (Cyclic Nucleotide Gated Channels) (Kaplan *et al.*, 2007), semblent avoir une fonction non pas dans l'influx de  $\text{Na}^+$ , mais dans l'efflux comme AtCNGC2 d'*Arabidopsis*

*thaliana* (Leng *et al.*, 2002). Enfin, un 3<sup>ème</sup> groupe de transporteurs aspécifiques est impliqué dans l'influx sodique au travers de la membrane plasmique (Roy, 2008; Tapken et Hollmann, 2008), les GLRs pour « Glutamate Activated-Channels » (Davenport, 2002).



**Figure 5** : Transporteurs, canaux et pompes impliqués dans l'exclusion du Na<sup>+</sup> des tiges. **Au niveau de la membrane plasmique, l'influx de Na<sup>+</sup>** fait intervenir les : cyclic nucleotid gated channels (CNGCs), glutamate receptors (GLRs), non selective cations channels (NSCCs), HKT transporteurs (AtHKT1 ;1, OsHKT1;5, OsHKT1;4) -**Efflux de la cellule** :Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteurs (SOS1) qui interagissent avec SOS2, qui interagit avec SOS3, qui est activé par le Ca<sup>2+</sup> cytosolique. **Au niveau du tonoplaste**, Na<sup>+</sup> est accumulé dans la vacuole grâce à un antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHX1), le gradient de H<sup>+</sup> est fourni par l'activité des H<sup>+</sup>-ATPase et H<sup>+</sup>- pyrophosphatase (Plett et Moller, 2010).

A côté des canaux non spécifiques sensibles au Ca<sup>2+</sup> (Figure 5), il existe également une autre famille de canaux capables de transporter dans la cellule des ions Na<sup>+</sup>: les HKTs (High-affinity K<sup>+</sup>Transport) (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010). Ces canaux, initialement dévolus au transport du K<sup>+</sup> dans les cellules sont capables de transporter des ions Na<sup>+</sup> (AtHKT1.1) (Rus *et al.*, 2001; Davenport *et al.*, 2007). A la différence des canaux Ca<sup>2+</sup> dépendants, les gènes codant des canaux HKTs sont présents avec un nombre réduit de copies, et ceci particulièrement chez l'arabette des dames (Plett et Moller, 2010) qui ne dispose que d'une copie à la différence du riz qui en a 9 (Platten *et al.*, 2006).

Une fois le sodium internalisé, la cellule va soit le compartimer dans la vacuole soit l'exporter dans le milieu extérieur afin d'en réduire la toxicité cytologique. Le stockage vacuolaire du Na<sup>+</sup> se fait contre un gradient de concentration et nécessite l'utilisation soit d'ATPase à H<sup>+</sup> vacuolaire, soit de PPase à H<sup>+</sup>, couplées à un antiport H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Figure 5, selon

Plett et Moller, 2010). Des transporteurs vacuolaires de type antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  appartenant à la famille NHXs ont ainsi été caractérisés dans de nombreuses espèces végétales, comme *Helianthus annuus* (Ballesteros et al., 2006), *Arabidopsis thaliana* (Apse et al., 1999), *Hordeum vulgare* (Fukuda et al., 2004b), *Atriplex gmelili* (Hamada et al., 2001), *Thellungiella halophila* (Wuet Gao., 2009), *Brassica napus* (Wang et al., 2003), *Beta vulgaris* (Xia et al., 2002), *Gossypium hirsutum* (Wu et al., 2004), *Oryza sativa* (Fukuda et al., 2004a) et *Medicago sativa* (Yang et al., 2005). Récemment, Li et al., (2011) ont mis en évidence que la surexpression du gène *SsNHX1* (NX1 de *Salsola soda*) augmente la tolérance de *Medicago sativa* L., même pour des concentrations en sel supérieures à 400 mM.

La dernière stratégie possible pour les cellules est l'exclusion des ions toxiques de la cellule via un mécanisme d'efflux. Ici encore, le mécanisme d'efflux est dévolu à un antiport  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ . (Blumwald et al., 2000; Pardo et al., 2006). Des protéines de la famille SOS, comme AtSOS1 d'*Arabidopsis thaliana* ont été identifiées comme affectées par le stress salin. Le mutant *sos1*, ayant perdu le système antiport  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ , accumule moins de  $\text{Na}^+$  dans les parties aériennes que les plantes sauvages (Shi et al., 2002). En condition de contraintes salines modérées, le transporteur SOS1 permet d'internaliser les ions  $\text{Na}^+$  à la fois dans les cellules du mésophylle, mais également dans les cellules parenchymateuses de la racine. Les transporteurs de  $\text{Na}^+$  représentent, de ce fait, une classe de molécules importantes pour le contrôle osmotique des plantes soumises à un stress salin (Figure 5, selon Plett et Moller, 2010).

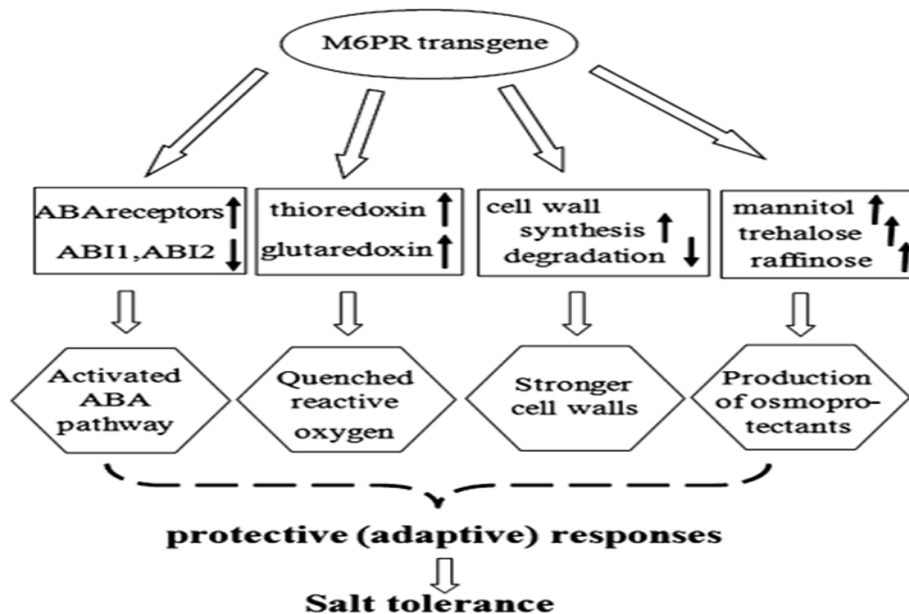
### **I-3-2 Les ajustements osmotiques à l'échelle de la cellule**

Les flux d'ions dans la cellule, leurs compartimentations vont contribuer à modifier l'osmolarité cellulaire. En complément des flux ioniques, les cellules vont synthétiser des molécules organiques de faible masse moléculaire, encore appelées osmolytes, non toxiques et capables d'augmenter la pression osmotique intracellulaire, et donc de maintenir l'homéostasie hydrique de la cellule (Timasheff, 1992; Bourot et al., 2000). Les osmoprotectants les plus importants sont les polyols et leurs dérivés (Tarczynski et al., 1993; Wanek et Richter, 1997), les glucides (Fougère et al., 1991; Kameli et Lösel, 1993), et les zwitterions, comme les acides aminés et la bétaine (Le Rudulier et al., 1984; Csonka et Hanson, 1991).

Les polyols sont distribués en 2 grands groupes, les polyols acycliques, comme le mannitol, et les cycliques, comme le D-pinitol, plus particulièrement rencontré dans la famille des Fabacées (Wanek et Richter, 1997). Chez le céleri, l'accumulation du mannitol est corrélée



avec l'intensification de la contrainte saline. Pour les Fabaceae, Vernon et Bohnert (1992) ont montré une corrélation étroite entre l'intensité du stress hydrique et l'expression de *lamyoinositol 6-O- méthyltransférase*. Chez des plantes transgéniques surexprimant la mannitol-1P déhydrogénaseNAD- dépendante, une accumulation de mannitol est observé corrélativement à une augmentation de la tolérance au stress salin (Tarczynski *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1995; Chaturvedi *et al.*, 1997; Karakas *et al.*, 1997; Sheveleva *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2005). Des plantes recombinantes d'*Arabidopsis*, sur-exprimant un gène de mannose-6-phosphate réductase (M6PR) de céleri deviennent tolérantes à des concentrations en sel de 100 mM de NaCl et ne présentent des altérations fonctionnelles que pour des concentrations salines supérieures à 200 mM de NaCl (Chan *et al.*, 2011). L'analyse du transcriptome de M6PR montre que l'expression de nombreux gènes est affectée (plus de 2200 gènes) dont certains gènes de la voie de biosynthèse de l'ABA, des gènes codant des protéines phosphatases 2C, ainsi que des gènes codant des protéines du métabolisme redox et des protéines de biosynthèse de réorganisation de la paroi (Figure 6, selon Chan *et al.*, 2011).



**Figure 6** : Modèle de réponse au stress salin des plantes recombinantes M6PR d'*Arabidopsis thaliana* (Chan *et al.*, 2011).

A l'instar de ce qui a été décrit pour les polyols, le stress salin induit une augmentation dans les cellules, et plus particulièrement dans la vacuole, de glucides (Minorsky, 2003., Morsy *et al.*, 2007). Chez un cultivar de riz sensible au stress salin, le Salt-sensitive rice Pathumthani1 (PT1), l'accumulation de glucides solubles permet à la fois des réajustements osmotiques et la protection des cellules de la racine (Siringamet *et al.*, 2012). L'augmentation des composés carbonés dans les cellules soumises à la contrainte saline, permet de compenser en partie les dysfonctionnement de la photosynthèse (Vermont *et al.*, 1992). Parmi les glucides importants,

le tréhalose, connu comme disaccharide marqueur de stress (Zeid, 2009; López-Gómez et Lluch, 2012), est affecté lors du stress salin (Nounjan *et al.*, 2012). Les plantes traitées avec du tréhalose montrent une stabilisation de leur membrane plasmique *via* la diminution des liaisons ioniques et par l'augmentation du rapport  $K^+/Na^+$  dans les feuilles de *Z. mays* (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Cependant, des travaux controversés suggèrent que le tréhalose n'est pas un soluté compatible lors de stress salin et pourrait même générer des toxicités lors d'accumulation cytosolique trop importante (Schluepmann *et al.*, 2003; Cortina et Culián-Maciá, 2005).

Les zwitterions Pro et Gly bétaïnes sont les osmolytes les plus diversement accumulés dans des conditions de stress osmotique chez les plantes (Aspinall et Paleg, 1981; Wyn Jones, 1984; Hasegawa *et al.*, 2000). Toutefois, si la Gly bétaïne est produite en grande quantité par plusieurs familles de plantes supérieures, en particulier dans les Chenopodiacees, Amaranthacees et Poacees (Rhodes et Hanson, 1993), certaines plantes à fleurs manquent d'importantes quantités de bétaïne Gly et produisent d'autres bétaïnes, comme la bétaïne Pro, également connue sous le N, N-diméthylproline ou stachydrine. Cette dernière se trouve principalement dans certaines espèces de Plumbaginacees, Capparidacees, Rutacees, Labiées, Apiacées, et Fabacées (Wyn Jones et Storey, 1981; Rhodes et Hanson, 1993; Hanson *et al.*, 1994). Dans la luzerne (*Medicago sativa*), la bétaïne Pro est la bétaïne majeure (Robertson et Marion, 1960), mais d'autres bétaïnes, telles que la bétaïne pipécolate (homostachydrine), trigonelline, la bétaïne hydroxyproline, et Gly bétaïne, ont également été identifiées dans différents génotypes de luzerne (Wood *et al.*, 1991).

En plus de la luzerne, d'autres espèces de *Medicago*, comme *M. truncatula*, *M. littoralis*, *M. rugosa*, et *M. polymorpha*, produisent de la proline bétaïne avec des variations génotypiques significatives (Wood *et al.*, 1991; Naidu *et al.*, 1992). La proline bétaïne, qui est libérée par les graines de luzerne pendant la germination (Phillips et Kopolniky, 1995), est un inducteur des gènes de nodulation (ADI) chez *Sinorhizobium meliloti* (Phillips *et al.*, 1992).

Le *S. meliloti* transloque cette bétaïne *via* un transporteur ayant une forte affinité avec les ions  $Na^+$ . En outre, *S. meliloti* utilise la bétaïne Pro en tant que source de carbone et d'azote, ou en tant qu'osmoprotectant (Gloux et Le Rudulier, 1989; Goldmann *et al.*, 1991; Burnet *et al.*, 2000). Compte tenu de la concurrence entre les bactéries du sol pour les éléments trophiques, il est intéressant de souligner que le catabolisme de proline bétaïne facilite la colonisation des racines par *S. meliloti* (Phillips *et al.*, 1998).

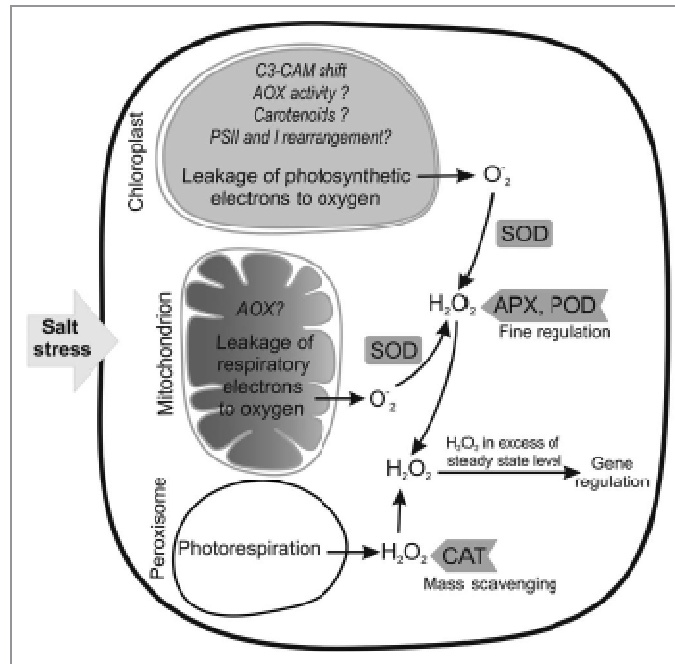
### **I-3-3 La détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

La relation entre la tolérance au stress salin des plantes et leur aptitude à détoxifier les espèces réactives en oxygène (ROS), est l'objet de débat (Gaber, 2010). En effet, certains auteurs suggèrent l'existence d'une corrélation positive entre les contraintes salines et oxydatives (Hasegawa *et al.*, 2000), alors que d'autres démontrent l'inverse (Miller *et al.*, 2007). La genèse de ROS dans une plante soumise aux contraintes salines a pour origine un dysfonctionnement des métabolismes photosynthétique et respiratoire. Ainsi, une réduction de la photosynthèse suite à une fermeture des stomates conduit à une diminution de la teneur en NADP<sup>+</sup>, réduisant les possibilités de piégeage de l'O<sub>2</sub> par les systèmes antioxydants couplés à la photosynthèse (Gosset *et al.*, 1994; Borsani *et al.*, 2001; Hsu et Kao, 2003). La fermeture des stomates induit également une augmentation de la pression partielle en O<sub>2</sub> dans les feuilles, ce qui active la photorespiration au détriment de la photosynthèse chez les C<sub>3</sub> et augmente la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les peroxysomes (Leegood *et al.*, 1995; Wingler *et al.*, 2000; Ghannoum, 2009). De façon concomitante, les activités respiratoires (Hernandez *et al.*, 2001; Lin et Kao, 2001; Mazel *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005), comme celles de plusieurs oxydases, dont la NADPH oxydase membranaire et la diamine oxydase cytotogique (Jeanjean *et al.*, 1993), sont stimulées, induisant une production accrue de ROS. L'accumulation de ROS dans le cytoplasme initie une dégradation des lipides membranaires (LPO, peroxydation des lipides) et des biomolécules (Balakhnina *et al.*, 2009, 2010; Halliwell, 1984). Afin de se prémunir de l'accumulation des ROS dans le cytoplasme, les plantes soumises à une contrainte saline vont mettre en place des mécanismes préventifs capables d'empêcher la formation de ROS et des mécanismes de détoxifications prenant en charge les ROS accumulés dans le cytoplasme:

**-Des mécanismes préventifs.** Lorsque les pigments photosynthétiques ne peuvent plus prendre en charge l'excès de particules lumineuses, les pigments secondaires et des pigments non photosynthétiques vont capter ces photons et de ce fait réduire les effets indésirables de la lumière sur l'hydrolyse des molécules l'H<sub>2</sub>O (Ahmad *et al.*, 2010, Miller *et al.*, 2010). La formation de zéaxanthine par de-époxylation de la violaxanthine, connue encore sous l'appellation de cycle des xanthophylles, représente un mécanisme préventif de « quenching » dissipant les excès d'excitation du PSII et permettant ainsi une protection de l'appareil photosynthétique soumis au stress salin (Demming-Adams et Adams, 1992; Gilmore, 1997; Niyogi, 1999;). D'autres pigments non photosynthétiques sont également impliqués dans ces

mécanismes de protection, comme la lutéine (Casper-Lindley et Björkman, 1998; Niyogi *et al.*, 1998; Pogson *et al.*, 1998; Bungard *et al.*, 1999; Gilmore et Yamamoto, 2001), l'ascorbate et le glutathion (Smirnoff, 2000; Smirnoff et Wheeler, 2000; Szarka *et al.*, 2012) et l' $\alpha$ -tocopherol (Foyer et Noctor, 2005; Miller *et al.*, 2010; Gill et Tuteja, 2010). Les polyamides (PAs) forment également une famille de composés capables de participer à la tolérance des plantes au stress salin (Kuznetsov et Shevyakova 2007; Gill et Tuteja 2010; Hussain *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2012). Un traitement des feuilles de *Cucumis sativus* avec 1 mM de spermidine (Spd) améliore la croissance et augmente la photosynthèse nette ( $P_N$ ), la conductance stomatique ( $g_s$ ), la teneur intracellulaire en  $CO_2$  et l'efficacité du photosystème II ( $\Phi_{PSII}$ ) (Li *et al.*, 2007). D'autres travaux montrent que des modifications des teneurs intracellulaires de PAs, suite à la contrainte saline, induisent une meilleure efficacité des mécanismes photosynthétiques (Zhang *et al.*, 2009). Outre les données quantitatives de variation de toutes ces molécules, leur biosynthèse, tout comme celle des enzymes de la voie de détoxification des ROS, vont ainsi compléter l'arsenal de défense des plantes face au stress salin.

**-La détoxification.** La détoxification enzymatique par les superoxyde dismutases (SODs), les catalases (CATs) et les peroxydases (APXs), la glutathion S-transférase (GTS) et la glutathion peroxydase (GPX) est concomitante à l'accumulation de ROS au cours des contraintes salines (Hernandez *et al.*, 2000, Garrat *et al.*, 2002) (Figure 7, selon Abogadallah, 2010). L' $H_2O_2$  produit au cours de la peroxydation des lipides membranaires, semble jouer 2 rôles distincts dans la cellule: (i) le rôle de molécule toxique devant être prise en charge par les CATs, mais également (ii) le rôle de molécule signal (Rhee *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2010). En effet, un pré-traitement des cellules avec du  $H_2O_2$  confère aux plantes une plus grande tolérance au stress salin (Azevedo-Neto *et al.*, 2005). De nombreuses expériences de sur-expression de l'une des enzymes du stress oxydatif montrent soit une meilleure tolérance des plantes, soit une amélioration de la germination des semences en condition de contrainte saline (Tanaka *et al.*, 1999; Amaya *et al.*, 1999; Roxas *et al.*, 1997; Mittova *et al.*, 2003). Cependant, certains auteurs, comme Miller *et al.*, (2007) suggèrent d'étudier non pas des simples mutants pour cette voie de détoxification, mais plus justement des doubles ou des multiples mutants, afin de mieux comprendre le rôle de chacune des enzymes dans le processus de tolérance.



**Figure 7** : Principaux sites de genèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et principales enzymes de détoxification des ROS dans les cellules de plantes soumises aux contraintes salines. Les mécanismes préventifs sont présentés en *italique* (Abogadallah, 2010).

## I-4 Modifications tissulaires induites par la contrainte saline

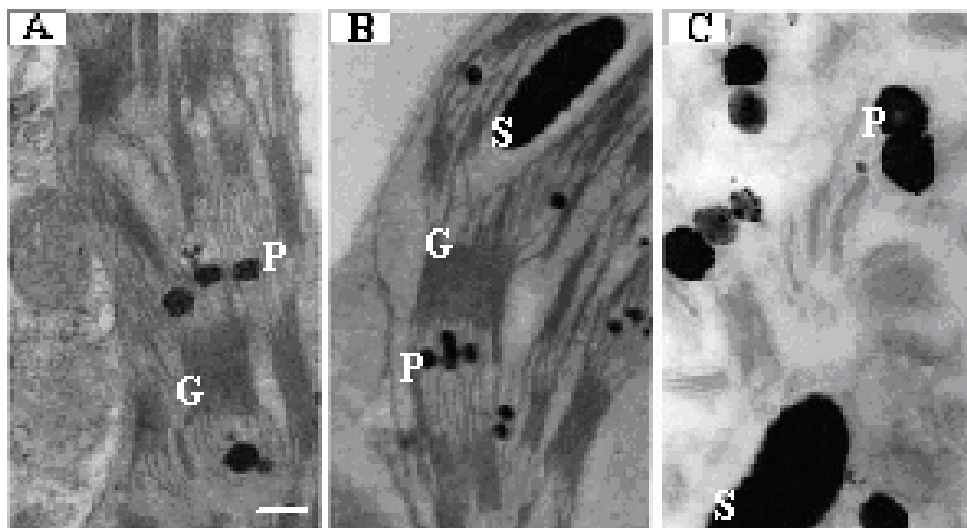
### I-4-1 Production de biomasse et photosynthèse

A l'échelle de la plante entière, des modifications importantes sont mises en évidence. Elles concernent essentiellement la photosynthèse, donc la productivité des plantes (baisse de la production de biomasse, réduction de la durée du cycle biologique, réduction de la taille des feuilles) et des flux de nutriments dans les plantes.

Le stress salin induit pour la très grande majorité des plantes une réduction de la production de biomasse correspondant essentiellement à une baisse des processus non-mésophylliens de la photosynthèse (Pettigrew et Meredith 1994; Sudhir et Murthy 2004). A l'échelle du chloroplaste, Sudhir et Murthy (2004) ont montré que ce sont les processus de carboxylation, et non la photophosphorylation, qui sont les plus affectés par le stress salin. Cependant, la réponse des plantes aux variations de salinité des milieux est fortement dépendante du génotype et /ou de l'importance de la contrainte saline (Hawkins et Lewis 1993). Ainsi, chez *Bruguiera parviflora*, le taux de photosynthèse augmente pour des faibles niveaux de salinité et décroît pour des teneurs élevées, sans modification sur la conductance stomatique (Parida *et al.*, 2004) De nombreux travaux montrent cependant un rôle majeur du stress salin sur la conductance stomatique qui, par sa limitation, va réduire les possibilités de carboxylation de

la RubisCO. Le sel induit ainsi une diminution de l'abondance des 2 sous unités de la RubisCO, mais également des protéines du complexe OEE (Flexas *et al.*, 2006; Aghaei *et al.*, 2008; Sobhanian *et al.*, 2010; Panet *et al.*, 2010; Bandehagh *et al.*, 2011; Chattopadhyay *et al.*, 2011). Les stress prolongés provoquent une diminution de la régénération du RuBP (Lawlor et Cornic 2002), et les ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> en excès induisent une altération de la machinerie photosynthétique (Munns *et al.*, 2006). La teneur en chlorophylle décroît également chez les plantes soumises au stress salin (Maxwell et Johnson 2000; Chutipajit *et al.*, 2011). Ainsi, chez *Oryza sativa* des concentrations de 200 mM de NaCl induisent une diminution de la Chlb et dans une moindre mesure de la Chla (Amirjani, 2011).

A l'échelle de l'organite, la présence de sel induit une modification de la distributions des thylakoïdes avec une accumulation d'amidon et des plastoglobules (Figure 8, selon Boughnami *et al.*, 2005). Pour les stress salins de fortes intensités, la réduction de la photosynthèse serait la conséquence d'un stress secondaire oxydatif non spécifique, particulièrement en conditions de lumière élevée (Flexas *et al.*, 2004).



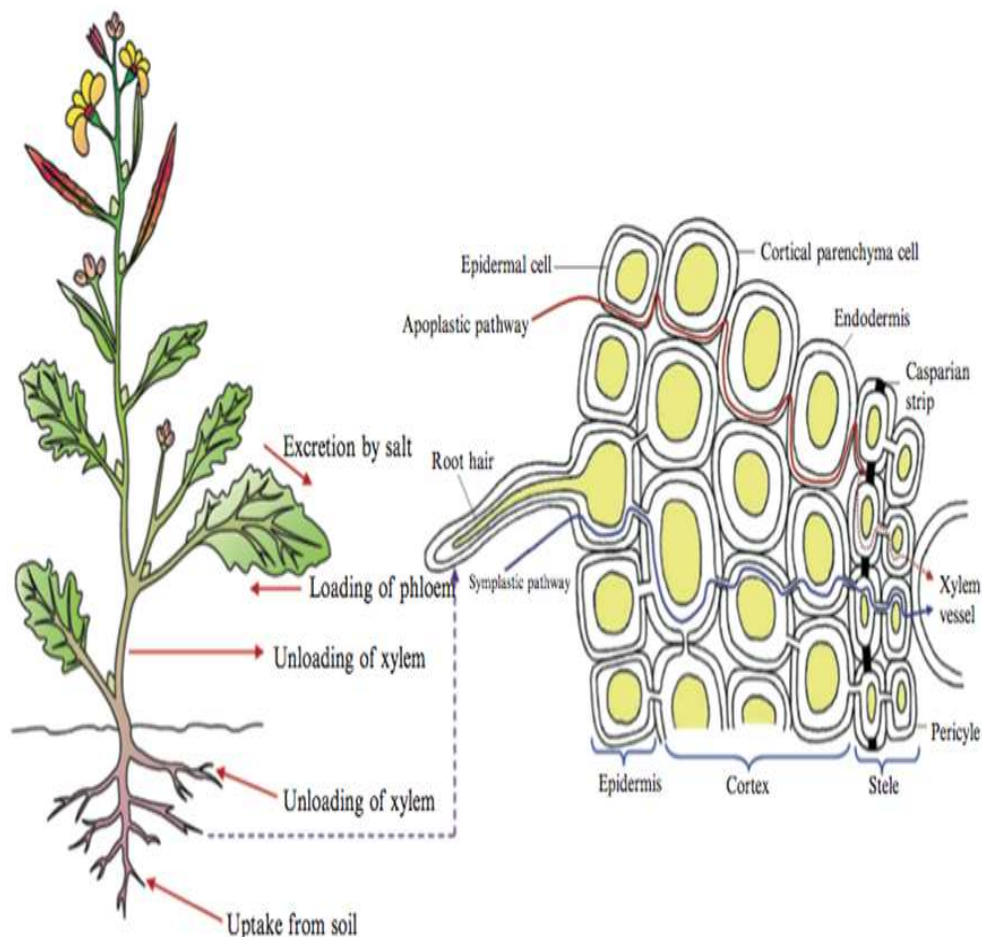
**Figure 8** : Chloroplastes de *Medicago sativa* cv Gabès de feuilles témoins (A), jeunes (B) ou âgées (C) traitées avec 150 mM de NaCl durant 4 semaines. G: grana, P: plastoglobuli, S: amidon. Echelle: 0, 1 µm (Boughnami *et al.*, 2005).

Dans ces conditions, des mécanismes préventifs du stress oxydatif se mettent en place, tels que le cycle des xanthophylles et la photorespiration. Cette dernière représente un coût énergétique pour la plante dont la croissance ainsi diminue. Quelle que soit l'importance de ces réductions, le stress salin génère ainsi une chlorose qui amplifie la réduction de biomasse (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

## I-4-2 Flux trophiques

La seconde raison majeure des pertes de biomasse est imputable aux effets du sel sur les flux trophiques dans la plante. Les effets d'un excès d'ions toxiques sur les flux de matière sont fortement dépendants du stade physiologique de développement des plantes, du génotype, mais également de facteurs environnementaux comme la température, l'humidité et la lumière.

Le transport de ces ions des racines vers les feuilles est sous la dépendance de l'aptitude des cellules de la racine à prélever les ions dans la rhizosphère, du chargement du xylème, du transport à longue distance des racines vers les feuilles et du déchargement dans les cellules du mésophylle des éléments toxiques préalablement absorbés (Munns *et al.*, 2002; Figure 9, selon Hasanuzzaman *et al.*, 2013).



**Figure 9** : Transport horizontal et vertical du sel dans la plante (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

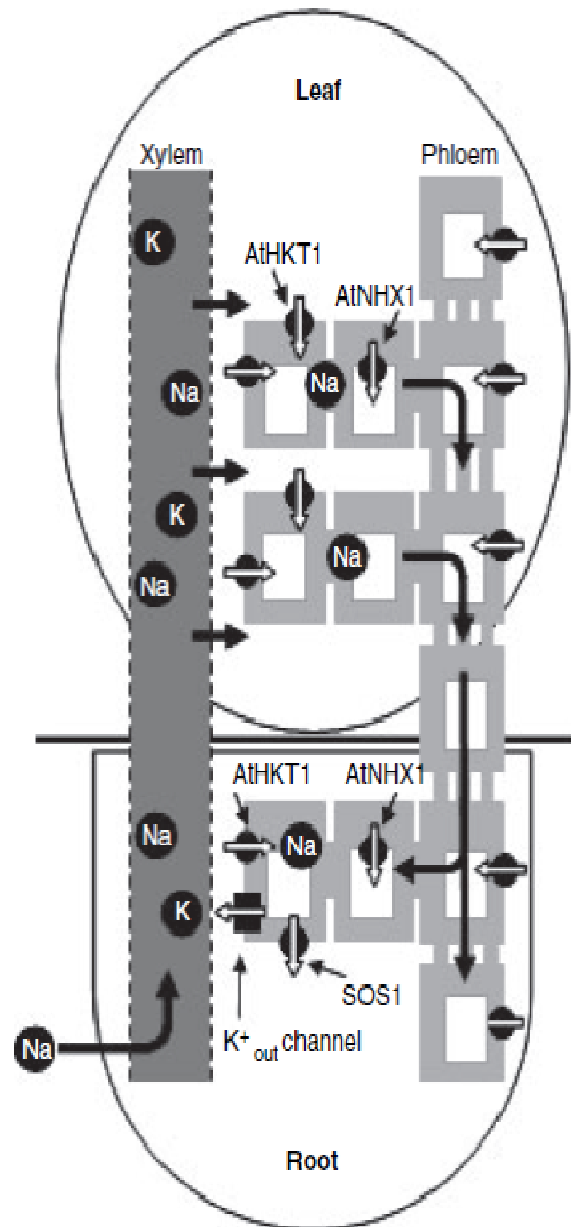
Le transport des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  de la rhizosphère vers le cylindre central est sous le contrôle de flux symplasmique et apoplasmique du mouvement des ions.

Les flux symplasmiques dépendent de variation dynamique du potentiel osmotique des cellules de l'épiderme jusqu'au cortex profond. Les plantes sont capables de contrôler ce flux symplasmique est donc de réduire l'accumulation d'ions toxiques dans la sève du xylème (Garcia-deblas *et al.*, 2003). Une fois dans le xylème, les flux sont dépendants de la variation de potentiel hydrique entre le sol et l'atmosphère. Mais tout au long de cette colonne d'eau, des cellules sont capables de prélever une partie des ions pour les stocker, les immobiliser dans différentes parties de la plante, protégeant ainsi le mésophylle des excès de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ .

Le flux xylémien de  $\text{Na}^+$  arrivant aux feuilles est réduit par la réabsorption par les cellules parenchymateuses du xylème (Figure 10, selon Sunarpi *et al.*, 2005) dans les racines (Davenport *et al.*, 2007), à la base des tiges (Munns, 2007), au niveau des entre-noeuds (Wolf *et al.*, 1991) et, en dernier recours, au niveau du parenchyme foliaire (Sunarpi *et al.*, 2005). Le  $\text{Na}^+$  réabsorbé peut être stocké dans les tiges et les pétioles (Wolf *et al.*, 1991), recyclé vers les racines (Berthomieu *et al.*, 2003), où il pourrait se lier aux grains d'amidon (Kanai *et al.*, 2007) et/ ou transféré au phloème (Winter, 1982). Les transporteurs du potassium HKT sont responsables de la réabsorption de  $\text{Na}^+$  à partir du xylème. Il s'agit de AtHKT1 chez *Arabidopsis* et OsHKT1-5 chez le riz (Ren *et al.*, 2005). D'une manière générale le  $\text{Cl}^-$  est moins étudié que le  $\text{Na}^+$ . L'exclusion de  $\text{Cl}^-$  des tiges est corrélée avec la tolérance au sel (Winter, 1982; Islam *et al.*, 2007). Cet ion est réabsorbé par les cellules parenchymateuses du xylème chez *Lotus tenuis*, tolérant au sel, toutefois le mécanisme n'est pas élucidé (Teakle *et al.*, 2007). En définitive, l'exclusion de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{Na}^+$  se ferait selon des mécanismes différents sans que l'on n'en sache plus actuellement (Tavakkoli *et al.*, 2010).

Les quantités du  $\text{Na}^+$  accumulées au niveau des cellules mésophylliennes sont diminuées également *via* la recirculation dans le phloème (Winter, 1982). Le transporteur AtHKT1 (Figure 10, selon Sunarpi *et al.*, 2005) est impliqué dans le chargement, dans les cellules compagnes des veines mineures foliaires et dans le déchargement dans les racines (Berthomieu *et al.*, 2003).





**Figure 10** : Rôles de AtHKT1 dans la réabsorption du  $\text{Na}^+$  par le xylème et sa recirculation par le phloème dans la protection de la feuille contre le stress sodique. Dans les racines, AtHKT1 fonctionne dans les cellules parenchymateuses xylémiennes lors du déchargement du  $\text{Na}^+$  des vaisseaux de xylème dans les cellules parenchymateuses. Dans les feuilles, AtHKT1 permet le chargement phloémien de  $\text{Na}^+$  des cellules compagnes dans les tubes criblés (Sunarpi *et al.*, 2005).

Le  $\text{Na}^+$  chargé dans le phloème suit la voie des photoassimilats des feuilles, zones sources, vers les puits métaboliques. Les méristèmes représentent chez les végétaux une zone de puits potentiel, pourtant ces derniers sont très peu chargés en sel. Cet état s'explique par les fonctions différenciées des feuilles en fonction de leur position sur la plante dans la redistribution des assimilats chez les glycophytes. Des expériences utilisant des photoassimilats marqués au  $^{14}\text{C}$  ont permis de montrer que les feuilles âgées distribuent ces derniers préférentiellement vers les racines, alors que les feuilles jeunes alimentent les apex

caulinaires. La teneur en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  étant réduite dans les dernières feuilles formées par la plante, et les assimilats produits par ces feuilles jeunes allant préférentiellement vers les bourgeons, on peut expliquer que la charge en ions toxiques est, de ce fait, réduite dans les bourgeons caulinares (Layezl *et al.*, 1981).

Le  $\text{Cl}^-$  est aussi redistribué *via* la sève phloémienne à raison de 10 % des ions chlore du flux xylémien sans qu'aucun flux n'ait pu être montré de ces ions vers les bourgeons (Munns, 2002). Si la recirculation est un caractère de sensibilité négligeable selon Munns (2007), d'autres travaux, réalisés sur le trèfle d'Alexandrie (Winter, 1982), le maïs (Lohaus *et al.*, 2000), la tomate (Perez-Alfocea *et al.*, 2000) et la luzerne (Boughanmi *et al.*, 2003) semblent contredire cette première affirmation.

Le stress salin affecte les feuilles sources qui supportent la croissance des plantes par ses effets osmotique et ionique sur le complexe stomatique ce qui va en même temps porter préjudice à l'assimilation du  $\text{CO}_2$  et, par conséquent, à l'alimentation des tissus puits. Le paragraphe qui suit détaille (i) les mécanismes de chargement et déchargement *via* les cellules associées aux vaisseaux et (ii) l'impact du stress salin sur le fonctionnement de ces cellules.

## **II Les cellules associées aux vaisseaux et le stress salin**

Le chargement des vaisseaux du xylème se produit dans des cellules xylémiennes associées aux vaisseaux (CAVs) et celui des éléments conducteurs du phloème par les cellules compagnes des tubes criblés (CCs/TCs).

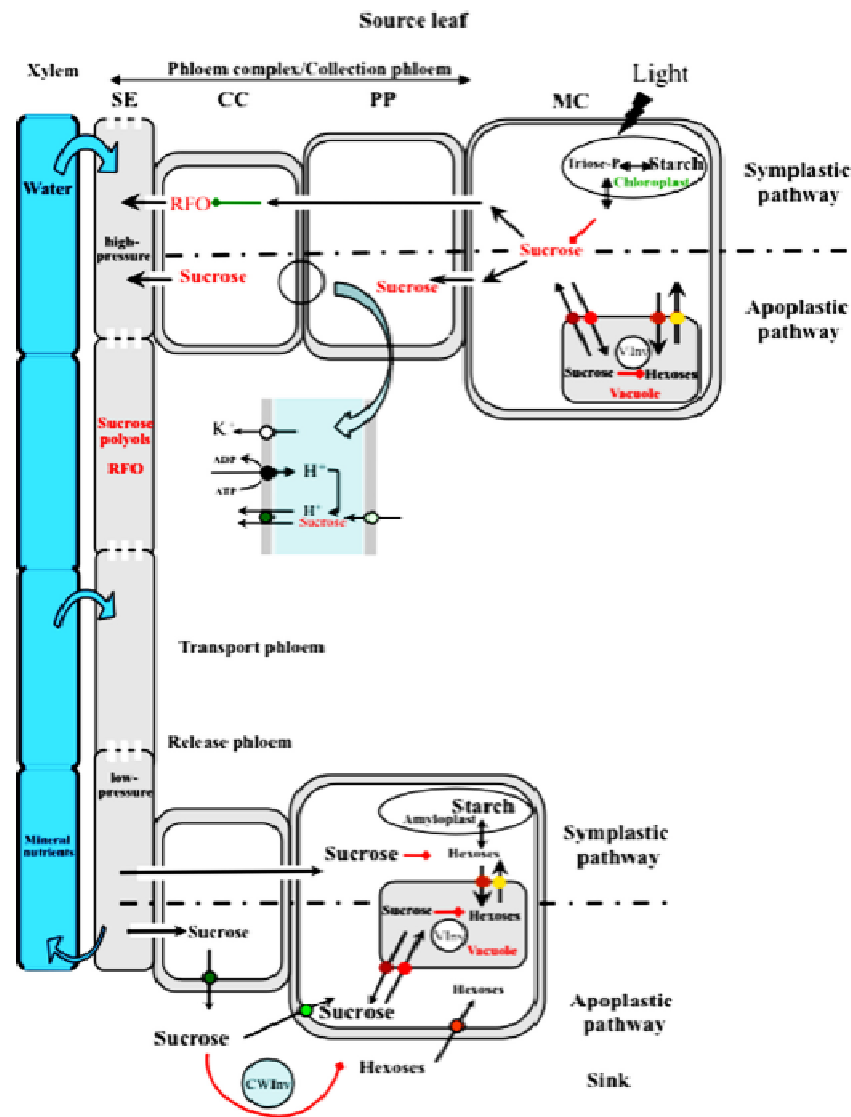
Schématiquement, le xylème est formé de vaisseaux conducteurs, des fibres de soutien et de parenchymes formés de cellules vivantes permettant la mise en réserve, la mobilisation et la translocation des substances nutritives. Le complexe conducteur de sève xylémienne comprend le vaisseau et la cellule associée au vaisseau (CAV) (Czaninski, 1977, Catesson *et al.*, 1982). Le vaisseau du xylème est une cellule morte vidée de son contenu par apoptose (Wodzicki, 1971; Skene, 1972; Courtois-Moreau *et al.*, 2009). La CAV, cellule vivante, contrôle les flux entre les parenchymes de réserve et les vaisseaux. Entre les CAVs et les parenchymes de réserve, des ponctuations portent de nombreux plasmodesmes assurant un flux trophique *via* une voie symplastique. En revanche, les ponctuations entre les CAVs et les vaisseaux sont dépourvues de plasmodesmes si bien que les échanges y sont de nature apoplastique (Czaninski, 1979).

La CAV est située dans une position stratégique entre la voie de transport vertical de la sève xylémienne et la voie de transport radial des nutriments dans ou hors des parenchymes de stockage. Ainsi, les réserves contenues dans les rayons ligneux sont utilisées au début de l'hiver et au printemps sous forme de sucres solubles qui se déversent dans le courant de sève où ils vont alimenter la croissance des jeunes pousses.

Le xylème est donc un puits transitoire (Sauter 1980; Sauter et Van Cleve, 1994). Dès que la force de puits diminue, la mise en réserve des sucres solubles augmente dans la tige. Les assimilats sont dirigés vers les rayons ligneux en continuité du phloème au xylème. Chez les plantes pérennes, un cycle annuel de mise en réserve des glucides existe comprenant 4 phases: 2 d'entre-elles, automne et en fin d'hiver, servent à l'accumulation de l'amidon, suivies de 2 phases de mobilisation, l'une entre novembre et février, pendant la dormance, l'autre au débourrement en mars-avril (Fromard, 1990). Ces variations saisonnières montrent l'importance du xylème dans la protection de la plante face aux variations climatiques hivernales et dans la transition hiver-printemps qui soutient la croissance.

Le phloème a pour principal fonction la conduction de la sève riche en assimilats, des sources de production (les tissus chlorophylliens) aux puits. Le phloème est constitué de cellules parenchymateuses, riches en réserves et contigües aux complexes conducteurs, composés de l'élément criblé associé à sa cellule compagne. Les éléments criblés sont des tubes longs et étroits qui transportent à longue distance la sève phloémienne. Leur différenciation fait intervenir un mécanisme apoptotique partiel avec la dégénérescence de plusieurs constituants cellulaires (le noyau, le cytoplasme, le vacuome, les plastes, l'appareil de Golgi) et la réorganisation du réticulum endoplasmique et des mitochondries qui persistent. Cette mort partielle permet la préservation de diverses activités enzymatiques dans ces cellules, notamment des ATPases, phosphatases acides, peroxydases et cytochrome oxydases (Catesson, 1973). Les cellules compagnes (CCs), issues de la même cellule mère que les éléments criblés qui leur sont associés, ont un cytoplasme dense riche en polysomes. Les mitochondries y sont nombreuses alors que quelques plastes sont présents. Ces cellules, qui ont une activité phosphatasique et peroxydasique (Adams *et al.*, 2013), assurent la collecte des assimilats entre le mésophylle et les tubes criblés et contrôlent le transport latéral «à courte distance» dans les veines mineures.

Dans cette première étape de chargement des assimilats, les échanges s'effectuent par voies symplastique et apoplastique (Figure 11, selon Lemoine *et al.*, 2013). Ainsi, la voie apoplastique, qui fait intervenir des pompes  $H^+$ -ATPasiques, assure l'entrée des assimilats dans la cellule compagne. Puis, de nombreux plasmodesmes branchus reliant cellules compagnes et tubes criblés permettent le chargement des tubes criblés par voie symplastique (Van Bel et Gamalei, 1991). L'avantage de la voie apoplastique est de permettre un chargement contre un gradient de concentration.



**Figure 11** : Transport des glucides par le phloème des sources aux puits par les voies apoplasmique et symplastique (Lemoine *et al.*, 2013).

L'augmentation de la concentration en nutriments dans le tube criblé engendre un appel d'eau à partir de l'apoplasme et ainsi un flux permet d'expulser les nutriments vers les organes puits demandeurs, *via* un transport longitudinal à longue distance. Il s'agit de la deuxième étape de transport. Enfin, le déchargement des nutriments dans les organes puits par transport latéral,

du tube criblé vers les tissus receveurs, constitue la troisième étape du transport. Il s'agit là d'une voie apo-symplasmique. Chez les plantes fourragères, les apex en croissance sont des puits remarquables, tout comme les tiges et les racines pivotantes qui stockent des nutriments dans les parenchymes xylémien et médullaire.

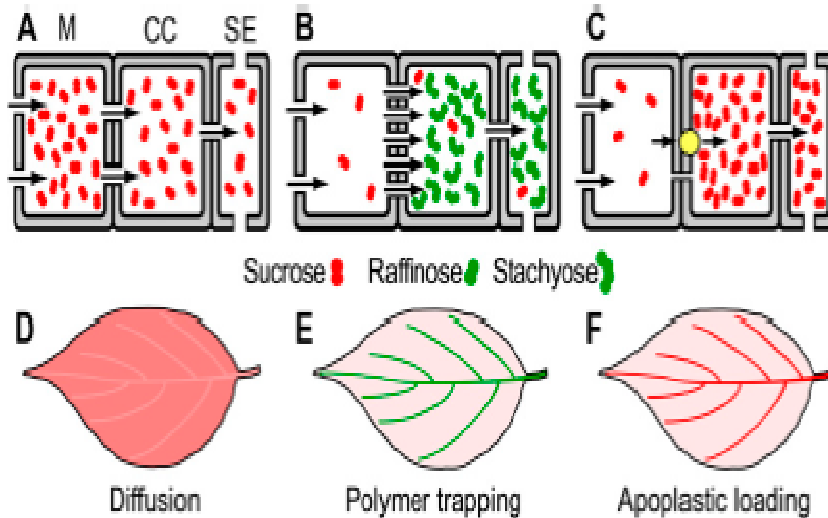
L'intérêt agronomique d'une plante dépend à la fois de ses capacités à utiliser les nutriments du sol dont l'azote et le CO<sub>2</sub> de l'atmosphère mais également de ses aptitudes à exporter et/ou accumuler les produits des synthèses dans les organes de stockage. Les ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> vont détourner et/ou induire des modifications quant au fonctionnement des cellules associées au chargement et déchargement du phloème et du xylème. De l'organe donneur à l'organe receveur, le transport des nutriments peut être décomposé en trois étapes: un transport latéral du compartiment de synthèse, la feuille, aux cellules conductrices phloémiennes des fines nervures, un transport longitudinal dans les tubes criblés du phloème, et un transport latéral du tube criblé au compartiment de stockage. Ces transports impliquent à la fois le franchissement de membranes plasmiques et le transfert d'assimilats et/ou d'ions au travers des parois.

## **II-1 Transport des assimilats du mésophylle vers les CAVs**

Dans la cellule foliaire assimilatrice, le saccharose formé est dirigé vers la vacuole et la paroi pecto-cellulosique (Kaiser et Heber, 1984). Lorsque le saccharose n'est pas stocké, il est transporté jusqu'au phloème par les voies symplastique et apoplastique. Si ces voies ne s'opposent pas, elles peuvent prédominer l'une par rapport à l'autre suivant les espèces végétales (Van Bel, 1993). Les glucides transportés par la voie symplastique transitent *via* les plasmodesmes dont la distribution et la fréquence semblent des paramètres importants pour les plantes utilisant ces voies (Gamalei, 1989, 1991; Zimmerman et Zeigler, 1975; Haritatos *et al.*, 2000). Chez la fève, la betterave et la pomme de terre, c'est la voie apoplastique qui prédomine. Cette dernière fait intervenir un co-transport saccharose/H<sup>+</sup> (Geiger, 1976 ; Bush 1993; Grusak *et al.*, 1996; Komor *et al.*, 1996; Rentsch et Frommer, 1996) pour l'efflux de saccharose. L'utilisation d'acide *p*-chloromercuribenzène sulfonique (PCMBS), réactif dirigé contre les groupements sulfhydryles des protéines, a permis de mettre en évidence que le chargement du saccharose dans les CAVs était couplé à l'activité d'une H<sup>+</sup>-ATPase (Giaquinta, 1979).

## II-2 Le chargement phloémien et sa régulation *via* les cellules compagnes

La concentration en glucides dans le phloème est plus importante que dans les cellules du mésophylle (Crafts, 1961), ainsi un chargement actif du phloème permet de maintenir une concentration faible en photosynthétats dans les cellules du mésophylle (Figure 12, B et E, C et F, selon Turgeon, 2010 ) et une pression suffisamment élevée dans le phloème pour le transport à longue distance des glucides (Lalonde *et al.*, 2004; Schulz, 2005; Sauer, 2007; Braun et Slewinski, 2009; Turgeon et Wolf, 2009). Même si cette stratégie semble la plus intéressante pour ce qui est du rendement de croissance (Turgeon, 2010), les arbres, qui transportent des sucres non-structuraux sur de longues distances, montrent des chargements phloémiens passifs et maintiennent des teneurs élevées en sucres dans les cellules du mésophylle (Figure 12, A et D, selon Turgeon, 2010) (Turgeon et Medville, 1998; Fisher et Cash-Clark, 2000; Voitsekhovskaja *et al.*, 2006; Reidel *et al.*, 2009; Rennie et Turgeon, 2009). Au regard de cet objectif, plusieurs stratégies actives et passives de transport permettent de comprendre le mouvement des assimilats du mésophylle vers les tubes criblés *via* les cellules compagnes (Figure 12, selon Turgeon, 2010).



**Figure 12 :** Différentes stratégies de chargement du phloème : complexe phloémien (cellule compagne (CC)-tube criblé (SE) des veines mineures (A, B, C) et feuille entière (D, E, F). A et D, le saccharose diffuse suivant un mécanisme passif; B et E, le saccharose diffuse *via* les plasmodesmes du mésophylle vers les veines mineures où il est converti en raffinose et stachyose avant d'être transporté dans le phloème; C et F, le saccharose est pompé de l'apoplaste dans les veines mineures par des transporteurs. M, mésophylle (Turgeon, 2010).

L'énergisation des systèmes de transport dans les veines mineures permettant le chargement du phloème est sous le contrôle des H<sup>+</sup>-ATPases (Giaquinta, 1977; Bouché-Pillonnet *et al.*, 1994; Dewitt et Sussman, 1995).

Divers résultats ont montré que le système excréteur de protons était plus représenté dans le phloème des fines nervures que dans les parenchymes les entourant. Ainsi, l'absorption de  $K^+$  est plus importante dans le phloème que dans le mésophylle. De plus, les  $H^+$ -ATPases sont fortement exprimées dans les cellules de transfert des fines nervures et peu dans les tubes criblés. Ce résultat suggère que cette catégorie de pompe joue un rôle majeur dans l'énergisation du chargement phloémien. Par ailleurs, cette pompe présente une distribution fortement polarisée puisqu'elle est plus abondante le long des protubérances pariétales que sur les autres parties de la cellule. Il existe plusieurs transporteurs de saccharose, dont les profils d'expression et les propriétés diffèrent (Sauer et Stolz 1994; Stadler et Sauer, 1996).

La situation est la même pour les transporteurs d'acides aminés (AAP) (Fischer *et al.*, 1995) et pour celle de peptides, dont certains sont exprimés dans les feuilles, ou leurs fonctions restent inconnues à ce jour.

### **II-3 Effet de la salinité des sols sur la production et le transport des photoassimilats**

La survie et la croissance des glycophytes pérennes sur des sols chargés en sels laissent supposer le développement de modifications structurales supportant des mécanismes physiologiques adaptatifs. L'alimentation des puits par le phloème est peu étudiée (Lemoine *et al.*, 2013).

Chez la tomate, le sel a un effet inhibiteur sur la collecte et le transport à longue distance des assimilats, ce qui présente un effet néfaste sur la croissance des puits et en général sur les racines (Suwa *et al.*, 2008). Au contraire chez le maïs, les concentrations de saccharose ne sont pas affectées par le traitement salin, et la concentration en acides aminés est augmentée expliquant en partie l'augmentation du rapport racines/feuilles (Lohaus *et al.*, 2000). Ces variations, couramment décrites chez les glycophytes tolérantes, peuvent aussi être le résultat de la synthèse de polyols à l'instar de ce qui a été décrit chez le plantain (Pommerreining *et al.*, 2007).

#### **II-3-1 Incidence du stress salin sur le contenu de la sève phloémienne**

Le stress salin, comme d'autres stress va, induire des modifications de la composition de la sève phloémienne *via* des altérations et/ou des activations de l'expression et/ou de l'activité des transporteurs de chargement du phloème. Le premier transporteur qui a été étudié, *in planta*, sous condition de stress salin est ProT2, un transporteur de la proline (Rentsch *et al.*, 1996). Ces auteurs démontrent qu'un traitement avec 200 mM de NaCl induit une

augmentation de l'expression de ProT2, et ceci 4 h après le début du traitement. Pour le céleri, Noiraud *et al.*, (2000) mettent en évidence une augmentation de l'expression d'un transporteur de mannitol. Cette activation est associée à un changement d'allocation du carbone, du saccharose vers le mannitol (Everard *et al.*, 1994). De ce fait, pour maintenir un fort taux de mannitol dans les racines, il faut à la fois synthétiser du mannitol à partir du saccharose, transporter le saccharose vers les racines, décharger le mannitol du phloème vers les cellules du parenchyme racinaire et réprimer la mannitol déshydrogénase.

Prata *et al* (1997) montrent que cette dernière enzyme est inhibée par le stress salin et par un excès de saccharose. En condition de stress salin, les transporteurs de saccharose comme AgSUT1 ne sont que faiblement réprimés dans les feuilles (organes sources), alors que leur expression est fortement réduite dans les racines (Noiraud *et al.*, 2000).

Chez *Plantago major*, les taux d'ARNm codant des transporteurs vasculaires de sorbitol (*PmPLT1* et *PmPLT2*) sont fortement augmentés en condition de stress salin, alors que le gène codant le transporteur de saccharose *PmSUC2* n'est pas affecté au cours des phases initiales, voire est dérégulé après 24 h de traitement (Pommerreniget *al.*, 2007). Chez cette plante, le rapport sorbitol/saccharose augmente dans le phloème des plantes stressées par rapport au phloème des témoins.

Ces auteurs suggèrent donc qu'une augmentation de l'expression des gènes *PmPLT1* et *PmPLT2* en conditions de stress entraîne un chargement préférentiel du sorbitol dans le phloème de *P. major* (Pommerreniget *al.*, 2007).

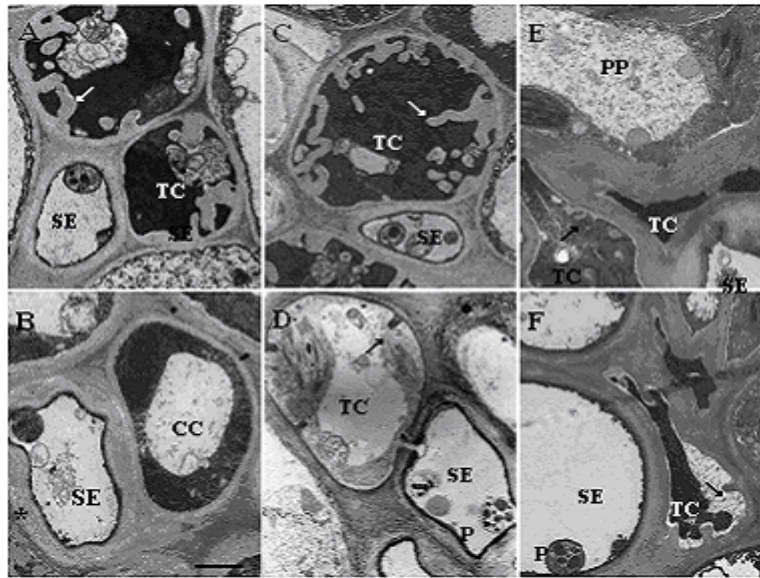
### **II-3-2 Modification du complexe phloémien par le sel**

Ces modifications de la sève phloémienne sont corrélées avec les structures impliquées dans le chargement (veines mineures) et déchargement (nervures principales). De plus, et en conditions de salinité, la physiologie des feuilles de glycophytes est étroitement reliée à son âge physiologique : le stress salin activant la sénescence des feuilles, les jeunes feuilles qui assurent l'alimentation des méristèmes sont relativement protégées de la toxicité ionique. Aussi, avons-nous observé des modifications du complexe phloémien des feuilles de *Medicago sativa* var Gabès en présence de sel (150 mM, 4 semaines) et cela aussi bien dans les veines mineures que dans la nervure principale.

Le sel a induit une stimulation du développement des invaginations pariétales des cellules de transfert (cellules compagnes) aussi bien dans les sites de collection (veines mineures) que



dans le transport à longue distance (nervures principales) (Figure13, selon Boughanmi *et al.*, 2005).



**Figure 13 :** Ultrastructure du complexe phloémien de feuille exportatrice de *Medicago sativacv* Gabès, dans les nervures mineures (A, C et E) et la nervure principale (B, D et F). Plantes témoins (A et B) et traités par NaCl (150 mM, 4 semaines) (C et D: jeunes, E et F: âgées). CC: cellule compagne, P: plaste, PP: parenchyme phloémien, TC: cellule de transfert, SE: élément criblé, flèche: protubérance, étoile: corps nacré. Echelle: 1µm (Boughanmi *et al.*, 2005).

Cette activation du développement des invaginations pariétales témoigne d'un transport accru des photoassimilats, mais est aussi le résultat de la recirculation du Na<sup>+</sup> du mésophylle vers les racines (Boughanmi *et al.*, 2003). En effet, la recirculation des solutés par le phloème se produit toujours de source à puits, celle des solutés inorganiques tels le Na<sup>+</sup> étant étroitement reliée à celle des assimilats (Marshner *et al.*, 1997). Cette modification structurale permet une augmentation des échanges apo-symplastiques latéraux, notamment le stockage (transitoire) d'ions toxiques dans l'apoplaste vasculaire. En effet, dans les plantes qui présentent des cellules compagnes de transfert, la voie suivie par les solutés dans le phloème est apoplasmique (Van Bel, 2003).

#### **II-4 Implication et particularités des cellules de transfert (parenchymateuses du xylème racinaire et des cellules compagnes des veines mineures) dans respectivement, la réabsorption et la recirculation du Na<sup>+</sup> et/ ou du Cl<sup>-</sup>**

La racine représente le point de départ du flux xylémien et en particulier celui de Na<sup>+</sup>. Les veines mineures sont le site de collection des assimilats et aussi le point de départ de la recirculation des ions inorganiques et particulièrement celui du Na<sup>+</sup>. Ces deux sites sont le

siège d'échanges intenses entre l'apoplasme et le symplasme, particulièrement en condition de salinité, et les cellules impliquées à la fonction de réabsorption du  $\text{Na}^+$  à partir du xylème (cellules parenchymateuses), et de sa recirculation par le phloème (cellules compagnes), présentent les caractéristiques de cellules de transfert (nombreuses mitochondries, amplification de la surface de membrane plasmique, qui contourne des invaginations pariétales, enrichies en transporteurs).

Ces cellules de transfert sont représentées dans tous les taxa des algues, et des embryophytes, aux végétaux supérieurs. Elles se différencient à partir de différents types cellulaires (cellules épidermiques, parenchymateuses du xylème et du phloème, cellules compagnes), caractérisent certains stades développementaux (graines, floraison, interface gamétophytes/sporophytes, feuilles exportatrices) et se développent en réponse aux stress biotiques (attaque de nématodes) et abiotiques (variations de lumière, déficiences ioniques, salinité).

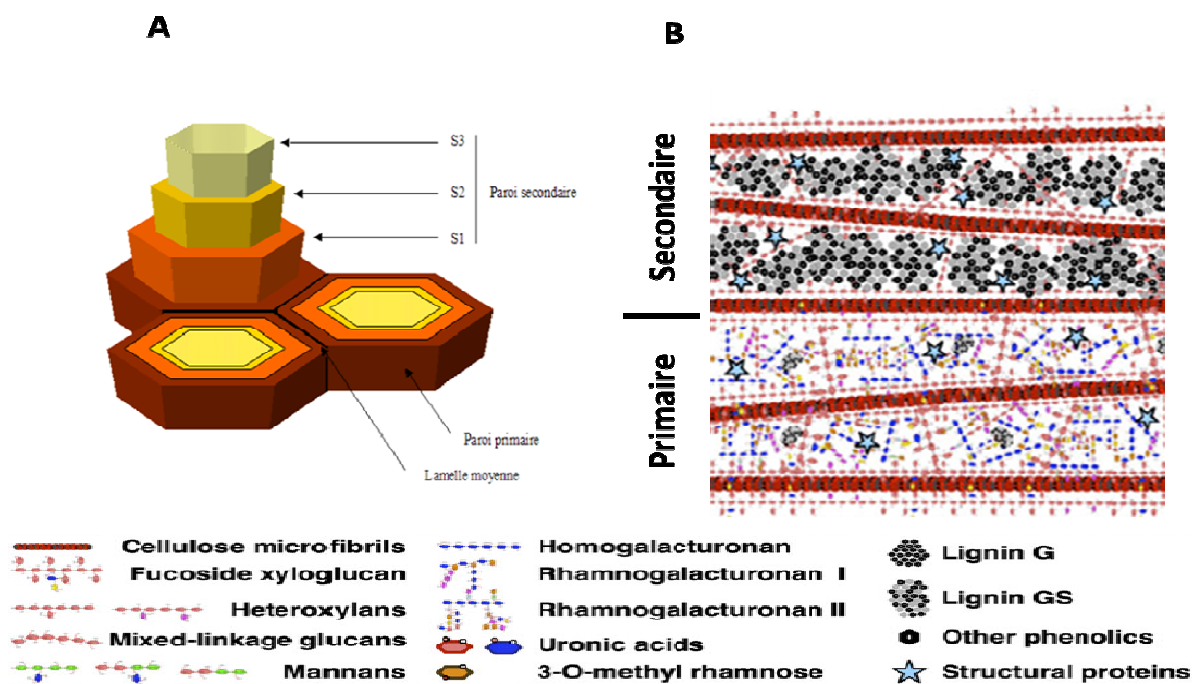
Ces cellules sont impliquées dans la sécrétion de  $\text{NaCl}$  par les glandes à sel dans les halophytes comme *Tamarix aphylla* (Bosabalidis, 2010) et *Limonium perezii* (Fraday *et al.*, 1986). Chez les glycophytes, les cellules du parenchyme xylémien de *Phaseolus coccineus*, excluent  $\text{Na}^+$ , mais pas  $\text{Cl}^-$ , probablement par échange avec  $\text{K}^+$  (Kramer *et al.*, 1977). Une recirculation du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  a été mise en évidence chez *Trifolium alexandrinum* (Winter, 1982) et celle du  $\text{Na}^+$  chez *Medicago sativa* var Gabès (Boughanmi *et al.*, 2003).

En présence de stress salin, le compartiment apoplasmique joue un rôle important, aussi bien dans la croissance des glycophytes que dans le maintien de l'homéostasie ionique. Aussi, nous avons analysé dans le paragraphe qui suit les structures de la paroi primaire impliquées dans la croissance des plantes ainsi que les modifications qualitatives et quantitatives corrélées à la croissance et à la tolérance aux stress hydrique et ionique induits par le sel sur les parois primaires.

### **III La paroi et le stress salin**

La paroi des cellules végétales est une structure composite pluristratifiée composée d'un assemblage de polymères. On distingue de l'extérieur vers la lumière de la cellule, la lamelle moyenne, la paroi primaire et pour certaines cellules végétales la paroi secondaire (Figure 14, selon Sarkar *et al.*, 2009). La lamelle moyenne ou couche intercellulaire est la partie commune entre deux cellules qui assure un rôle de cohésion. Elle a une épaisseur qui varie entre 0,2 à 1  $\mu\text{m}$  et est composée majoritairement de pectines et de glycoprotéines. La paroi

primaire a une épaisseur de 0,03 à 1  $\mu\text{m}$ . Elle est constituée de 90% polysaccharides et 10% de protéines (% de la masse sèche). Suivant les groupes botaniques, elle est composée de 19 à 25% de cellulose, 25 à 50% d'hémicellulose et de 10 à 35% de pectines (Bidlack *et al.*, 1992). Elle est mise en place après la formation de la lamelle moyenne. Les microfibrilles de cellulose n'ont pas une orientation préférentielle ce qui confère à cette assise une architecture fibrillaire relativement lâche favorable à la croissance et l'extension cellulaire. Enfin, la paroi secondaire extrêmement rigide de 1 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est déposée, lorsque les cellules atteignent leur taille définitive. Elle contient une forte proportion de cellulose à laquelle s'ajoute un polymère phénolique: la lignine. Dans son réseau, les microfibrilles sont disposées de façon régulière en hélice par rapport à l'axe de la cellule, formant des strates successives et concentriques (S1, S2, S3) (Figure 14, selon Sarkar *et al.*, 2009). Ce réseau cristallin est très compact d'où la rigidité de cette structure.

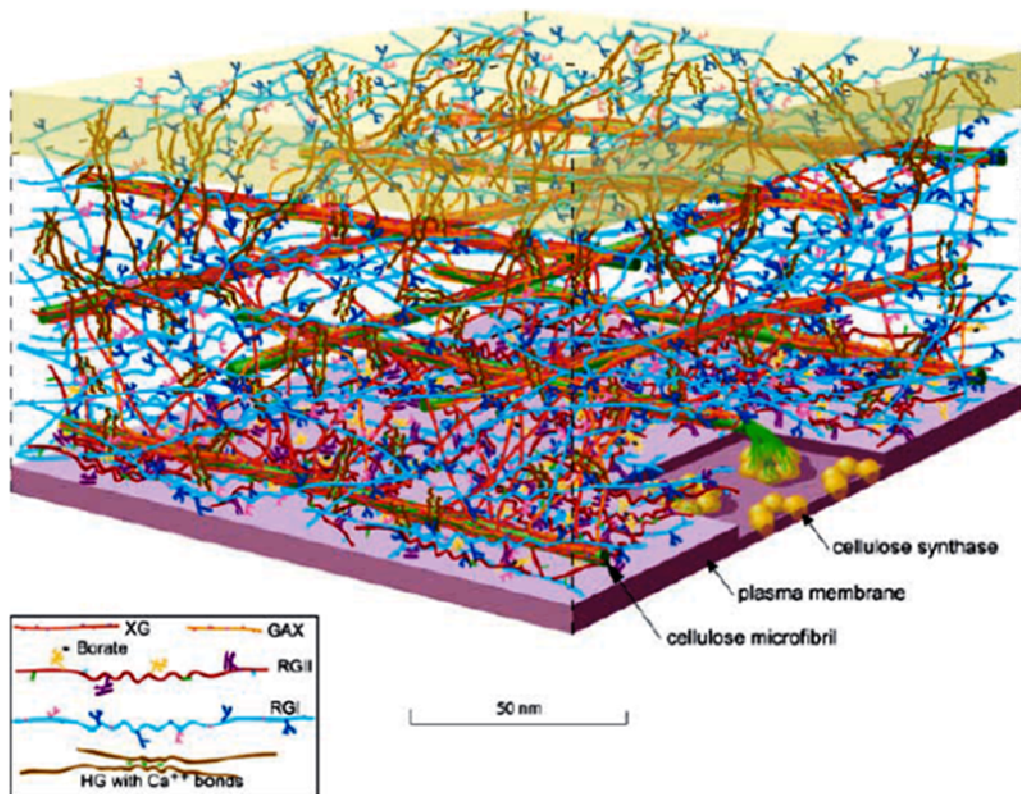


**Figure 14** : **A**, Représentation schématique des niveaux d'organisation de la paroi végétale (www.spectroscience.com). **B**, Présentation simplifiée en 2D de la composition générale de la paroi des angiospermes non grasses qui renferment des teneurs élevées en hémicelluloses (Xyloglucanes fucosylés, Xylanes et quelques mananes) et des protéines de structure. La paroi primaire est très riche en Pectines (HG, RGI et II), alors que la paroi secondaire renferme des grandes quantités de lignines avec des unités G (Guaiacyl) et des unités S (Syringyle) (Sarkar *et al.*, 2009).

### III-1 Organisation moléculaire de la paroi primaire

La paroi primaire constituée de polysaccharides, de protéines, d'ions est un enchevêtrement de molécules établissant de nombreuses liaisons chimiques les unes avec les autres. La

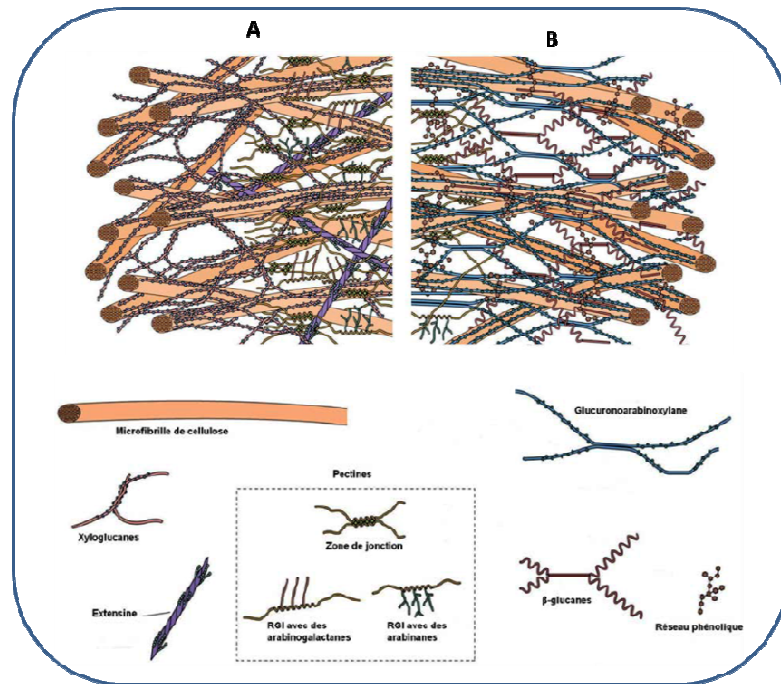
composition chimique des polymères la constituant vont déterminer les niveaux d'interactions des macromolécules et de ce fait les propriétés de cette dernière (Figure 15).



**Figure 15** : Modèle architectural des polysaccharides des cellules foliaires d'*Arabidopsis*. La quantité des différents polymères est présentée en fonction de leur rapport en quantité de cellulose.

Plusieurs modèles ont été établis pour décrire la composition et l'organisation de cette structure cellulaire. En 1990, McCann *et al.*, ont proposé un modèle dans lequel le réseau de xyloglucane et de cellulose est inclus dans une matrice pectique. Ce modèle a été complété par Carpita et Gibeaut (1993) par l'addition d'un troisième acteur constitué des protéines de structure. La paroi primaire est constituée d'une strate de XG-Cellulose qui représente de 50% de la MS des parois, auquel s'ajoute les pectiques pour environ 30% de la MS. Les proportions de ces différentes molécules sont proches au sein d'un taxon, mais peuvent différer d'un taxon à l'autre. C'est le cas des parois primaires des dicotylédones et des monocotylédones Commélinoides (Figure 16, selon Carpita et McCann, 2000). La cohésion des polymères polysaccharidiques et protéiques, conférant aux parois leurs propriétés mécaniques, est le jeu d'interactions hydrogène, forces de Van der Waals et covalentes entre les groupements chimiques portés par toutes ces molécules (Thompson et Fry, 2000). Ainsi, au cours du développement des plantes, des enzymes sont capables de modifier les

décorations glucidiques des polymères et d'induire ainsi des variations des liaisons des molécules entre-elles, permettant le remodelage de la paroi (Lewis *et al.*, 2013).



**Figure 16 :** Représentation schématique des deux modèles de la paroi primaire des plantes à fleurs. **A**, Paroi de type I, composée essentiellement de microfibrilles de cellulose, d'hémicelluloses de type xyloglucanes, de pectines et de glycoprotéines chez les dicotylédones. **B**, Paroi de type II, caractéristique des monocotylédones Commélinoides, constituée de microfibrilles de celluloses, d'hémicelluloses glucuronarabinoxylanes, de  $\beta$ -glucanes et de composés phénoliques, avec une teneur faible en pectines (Schéma modifié à partir de Carpita et McCann, 2000).

Avant de regarder plus précisément les remodelages possibles des polymères pariétaux, que ce soit au cours du développement de la plante ou suite à une contrainte, la nature chimique de chacun des constituants de la paroi sera présentée.

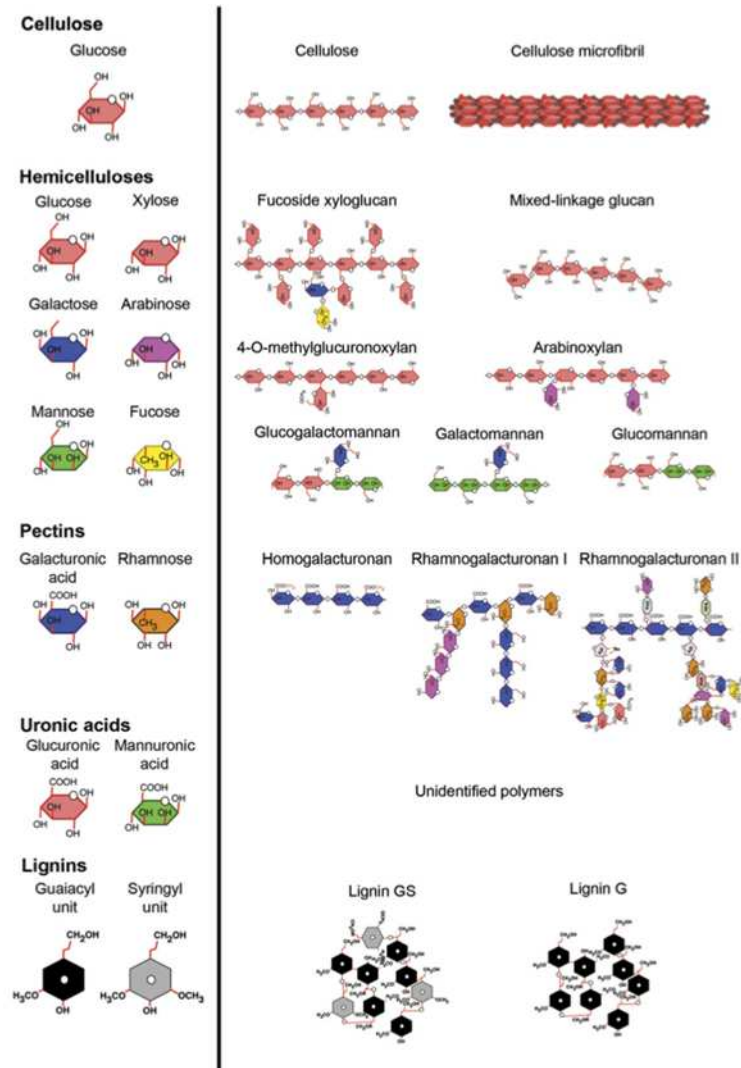
### III-1-1 Les polysaccharides

Selon Carpita et Gibeau (1993), les trois composés polysaccharidiques majeurs présents au niveau de la paroi cellulaire végétale sont la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Ces polysaccharides peuvent se subdiviser en deux grands groupes (Figure 17, selon Sarkar *et al.*, 2009) :

**Les homopolysaccharides** constitués d'un enchaînement d'un seul type de monosaccharides, comme la cellulose (D-Glcp  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)) et les homogalacturonanes (D-GalpA  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)).

**Les hétéropolysaccharides** ou **hétéroglycane**s résultant de la condensation de différents types de monosaccharides. Cette dernière famille de polymère est la plus représentée dans les

parois des plantes comme les xyloglucanes, les rhamnogalacturonanes, les gluco-galactomanannes etc....



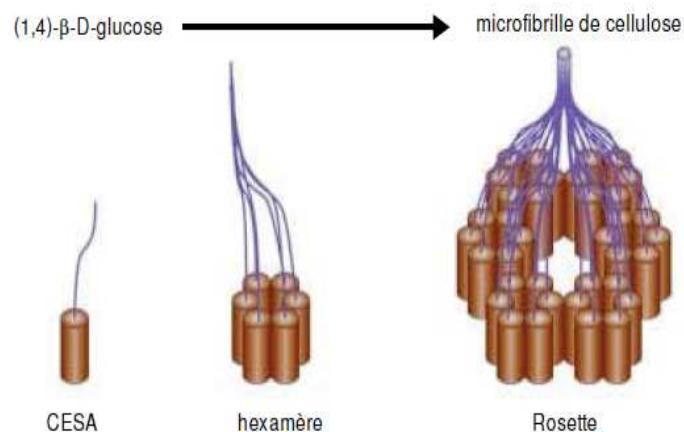
**Figure 17** : Structure chimique des éléments constitutifs prédominant dans la paroi cellulaire primaire. **A**, monomères; **B**, polymères correspondants (Sarkar *et al.*, 2009).

### III-1-1-1 La cellulose

La cellulose représente 15 à 30% de la masse sèche de la paroi primaire. Elle est synthétisée principalement par les végétaux supérieurs (Brown, 1985) et des autres organismes comme certaines bactéries et champignons (Kimura et Itoh, 1995). La molécule de cellulose est un homopolymère linéaire, formée par un enchaînement d'unités disaccharidiques, le cellobiose. Ce motif répétitif est constitué de deux D-glucopyranose liés entre eux par une liaison glycosidique de type  $\beta$ -(1→4) (Figure 17, selon Sarkar *et al.*, 2009). Les liaisons intramoléculaires assurent la stabilité de la chaîne cellulosique et le renforcement de la rigidité de la paroi cellulaire. Les liaisons intermoléculaires se font principalement entre l'hydrogène de l'hydroxyle primaire en C6 et l'oxygène en position O-3. La régularité et le grand nombre

de ces liaisons confèrent à la cellulose un caractère fibrillaire, partiellement cristallin. La hiérarchie de structure et l'organisation supramoléculaire de la cellulose sont schématisées dans la figure 17. La structure fibrillaire très condensée et stable de la cellulose, qui est née suite à ces liaisons et aux interactions de Van der Waals, explique sa résistance mécanique à la traction, sa résistance aux attaques chimiques et enzymatiques, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau.

Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées et organisées au niveau de la membrane plasmique par des complexes protéiques (cellulose synthesizing complex, CSC) composés de six sous-unités hexagonales (CESA) appelés rosettes, à partir des résidus UDP-D-Glc (Giddings *et al.*, 1980 ; Mueller SC et Brown, 1980 ; Cosgrove, 2005). Une unité (CESA) produit une chaîne de glucane. Pour chaque rosette, il y a synthèse de 4 à 6 chaînes de glucanes, puis 24 à 36 chaînes sont rassemblées pour former un microfibrille de cellulose (Doblin *et al.*, 2002) (Figure 18, selon Cosgrove, 2005).



**Figure 18** : Synthèse de cellulose par les celluloses synthases (CESA) (Cosgrove, 2005)

Les microfibrilles de la paroi primaire renferment en moyenne 36 chaînes de cellulose déposées généralement transversalement par rapport à l'axe d'élongation cellulaire (Delmer, 1999). Le dépôt de ces microfibrilles est fait de manière orientée et peut changer au cours de la formation de la paroi secondaire (Brett, 2000; Emons et Mulder, 2000). Le contrôle de la biosynthèse de cellulose est effectué par plusieurs gènes de la famille *CesA* (Somerville, 2006). Certains sont impliqués dans la synthèse de cellulose de la paroi primaire, d'autres de la paroi secondaire.

### III-1-1-2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses forment une famille de polysaccharides pariétaux qui ne sont ni celluloses, ni pectiques, mais sont alcalino solubles et constituées d'un enchaînement de résidus D-glycopyranoses liés en  $\beta$ -(1-4) (Hijazi, 2011). Cependant, certains résidus sont extractibles par l'eau, tels que les arabinanes et les arabinogalactanes.

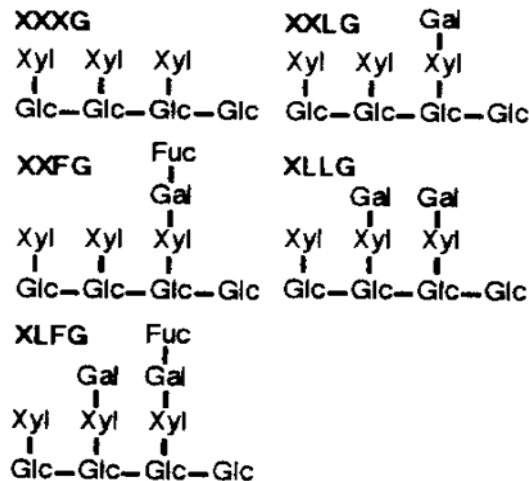
La quantité d'hémicellulose est variable entre la paroi primaire et secondaire, mais également pour un même type de paroi entre des espèces différentes et aussi entre des organes différents dans une même plante (O'Neill et York, 2003). Ces polymères pariétaux diffèrent de la cellulose par la diversité de leur composition monosaccharidique et par la multitude des façons selon lesquelles s'associent les unités glucidiques. L'hydrolyse des hémicelluloses libèrent des pentoses (*Xylp*, *Araf*), des hexoses (*Manp*, *Galp*, *GlcP*), des désoxyhexoses (*Rhap* et *Fucp*) et des acides uroniques (*GlcPA*). La diversité structurale de ces polymères est accompagnée par une variété des liaisons au sein de la paroi végétale avec les autres polymères.

Les hémicelluloses établissent des liaisons non covalentes avec la cellulose (Mc Cann *et al.*, 1990) et des liaisons covalentes avec les pectines (Thompson et Fry, 2000). Chez les dicotylédones, les parois primaires sont essentiellement composées de xyloglucanes (20%), xylanes et de  $\beta$ -glucanes mixtes (Carpita et Gibeau 1993; Doblin *et al.*, 2010; Faik ., 2010; Scheller et Ulvskov, 2010). Contrairement à la paroi primaire, les hémicelluloses de la paroi secondaire sont majoritairement composée d'hétéroxylanes (20%) avec la présence de glucomannanes et galactanes (Selvendran, 1985; Doblin *et al.*, 2010).

**Les xyloglucanes** sont les hémicelluloses prédominantes chez les dicotylédones. Ils sont abondants au niveau de la paroi primaire (PI) des dicotylédones et absents ou très peu présents dans la paroi secondaire (PII) même si des données controversées existent chez le peuplier (Mellerowicz *et al.*, 2008). Les XyGs ont été particulièrement étudiées au regard de leur importance au cours de l'expansion de la PI pendant la croissance cellulaire (Cosgrove, 2005). La structure de base des XyGs est constituée par un squelette composé d'unités D-Glc liées en  $\beta$ -(1-4). Jusqu'à 75% du Glc sont substitués en O6 par des chaînes latérales de mono-, di-, ou trisaccharides (Vincken *et al.*, 1997). Selon le type de substitution, une nomenclature d'écriture des XyGs a été proposée (Fry *et al.*, 1993) : (i)  $\beta$ -D-GlcP non substitué (**G**), (ii)  $\beta$ -D-GlcP- $\alpha$ -(1-6)-D-Xylp (**X**), (iii)  $\beta$ -D-GlcP- $\alpha$ -(1-6)-D-Xylp $\beta$ -(1-2)-D-Galp (**L**) et (iv)  $\beta$ -D-GlcP- $\alpha$ -(1-6)-D-Xylp $\beta$ -(1-2)-D-Galp- $\alpha$ -(1-2)L-Fucp (**F**).



Ainsi, les sous unités oligosaccharidiques des XyGs peuvent s'écrire: XXXG, XXLG, XXFG, XLFG et XLLG (Figure 19, Fry *et al.*, 1993). Les liaisons  $\beta$ -(1-4) confèrent aux XyGs une certaine rigidité et leur permettent d'établir des liaisons avec la cellulose par la formation des ponts hydrogènes (Hayashi *et al.*, 1987).



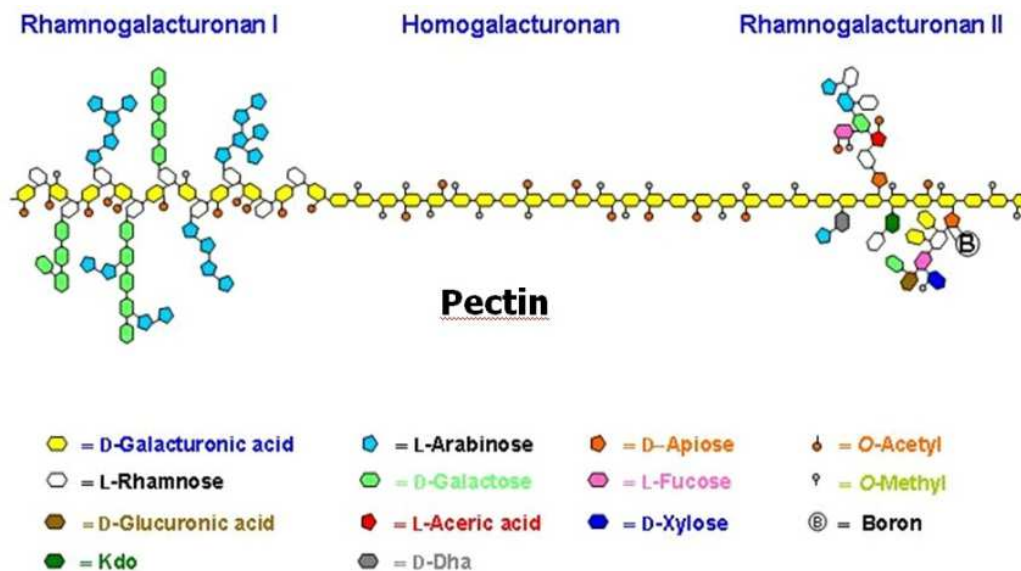
**Figure 19 :** Représentation schématique des différentes sous-unités oligosaccharidiques constitutives des xyloglucanes (XXXG, XXLG, XXFG, XLFG et XLLG) (Fry *et al.*, 1993).

**Les xylanes:** sont des polymères linéaires de résidus  $\beta$ -(1-4)-D-Xylp (Simionescu et Rozmarin, 1972). Ce squelette de base peut être monosubstitué (i) soit par  $\alpha$ -(1-3)-Araf pour former des arabinoxyanes (AXs), (ii) soit par  $\alpha$ -(1-2)-Glc pA et son dérivé O-méthylé en position 4 pour donner des glucuronoxyanes (GXs) des parois secondaires des dicotylédones, (iii) soit par les 2 monosaccharides précédemment décrits et constituer les glucuronoarabinoxyanes GAXs. Les arabinoxyanes et les glucuronoarabinoxyanes sont abondants dans les parois primaires des monocotylédones Commelinoïdes (Ebringerova *et al.*, 2005; Doblin *et al.*, 2010; Faïk, 2010). En outre, certaines unités xyloses portent des groupes acétyle en position 2 et 3. Les GXs et les GAXs ont respectivement un degré de polymérisation de 200 et 50-180 résidus. Les xylanes forment des liaisons avec la lignine *via* les résidus D-Araf qui peuvent être estérifiés avec des acides hydroxycinnamiques tels que les acides férulique ou *p*-coumariques. Ce lien entre la lignine et les polysaccharides confère leur solidité aux parois végétales.

**Les  $\beta$ -(1-4)(1-3) glucanes:** sont des polysaccharides neutres, non ramifiés, constitués de blocs de D-Glcp liés en  $\beta$ -(1-3) pour 30% des liaisons, ce qui les distingue de la cellulose (Lazaridou *et al.*, 2004) et de blocs de-D-Glcp liés en  $\beta$ -(1-4). Ce polymère se retrouve exclusivement dans les parois primaires des monocotylédones appartenant à l'ordre des Poales.

### III-1-1-3 Les pectines

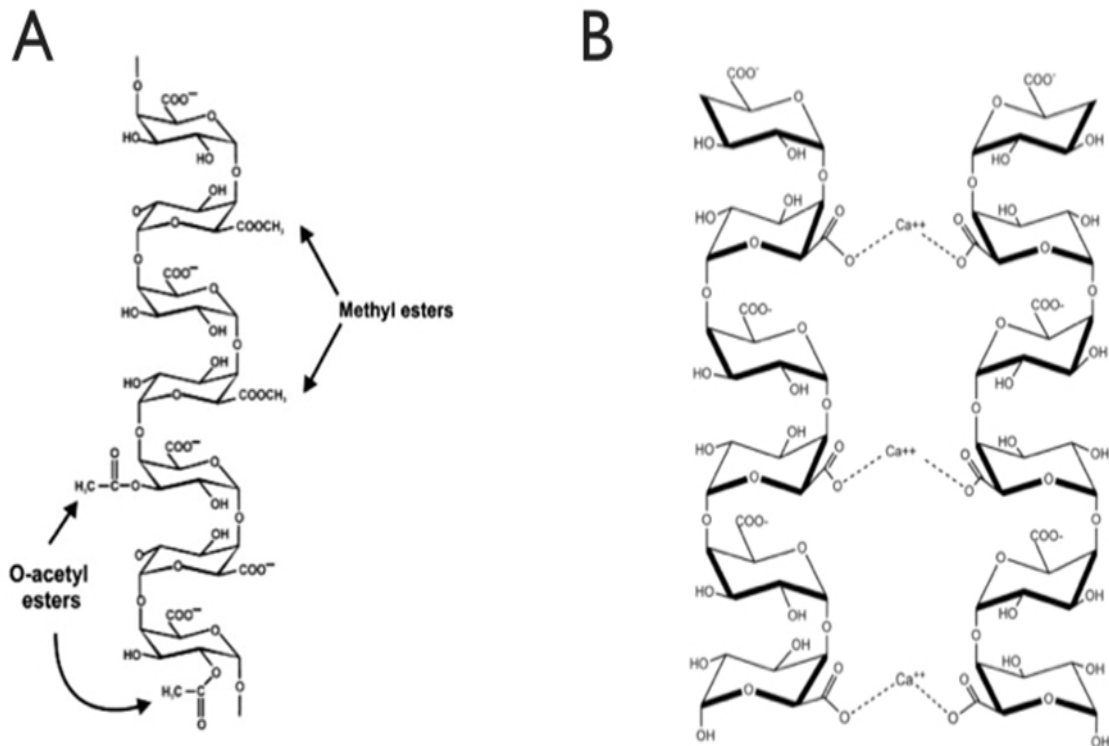
Les pectines appartiennent à la famille des polysaccharides la plus complexe structurellement et fonctionnellement des parois cellulaires de plantes (Mohnen, 2008). Elles constituent 35% de la paroi primaire des dicotylédones et des monocotylédones à l'exception de la famille des Poaceae où elle représente moins de 10% des polysaccharides pariétaux. Chez les ligneux, les pectines sont peu représentées quantitativement, soit un maximum de 5% de la paroi mais jouent un rôle significatif dans le fonctionnement hydrolique des trachéides (O'Neill *et al.*, 1990, Ridley *et al.*, 2001). Ces polysaccharides sont très abondants aux niveaux de la lamelle moyenne et dans les parois primaires des cellules en croissance et en division (Mohnen., 2008). L'hydrolyse totale par un acide des pectines fournit rarement plus de 5 sucres réducteurs: le D-GalpA, le L-Rhap, le D-Galp, le L-Araf, le D-Xylp et quelques sucres rares comme le 2-O-méthyl-D-Xylp ou le 2-O-méthyl-L-Fucp. Le D-GalpA, retrouvé dans toutes les fractions pectiques, est un sucre marqueur de cette famille de polymères (Mohnen., 2008, William *et al.*, 2001). La digestion enzymatique et les analyses biochimiques des pectines ont montré la présence de plusieurs domaines pectiques (Figure 20). Ces différents domaines correspondent aux trois polysaccharides pectiques majoritaires qui sont les homogalacturonanes (HG), rhamnogalacturonanes de type I (RG I) et rhamnogalacturonanes de type II (RG II) (William *et al.*, 2001, Figure 20).



**Figure 20 :** Diagramme schématique simplifié décrivant les trois polysaccharides majeurs des pectines attachés au squelette de GalA.

**L'homogalacturonane (HG)** est le polysaccharide pectique le plus abondant est l'homogalacturonane ou le galacturonane (HG) qui peut représenter jusqu'à 65% des pectines. Les HGs constituent au moins 23% de la paroi primaire des feuilles *d'Arabidopsis*

*thaliana* (Zablackis *et al.*, 1995). Ce sont des homopolymères linéaires de 100-200 résidus D-GalpA reliés par des liaisons osidiques  $\alpha$ -(1-4) (Zhan *et al.*, 1998). Les HGs peuvent être partiellement méthyl-estérifiés en C6, et peuvent être O-acétylés en position O-2 ou O-3 (O'Neill *et al.*, 1990, Figure 21).



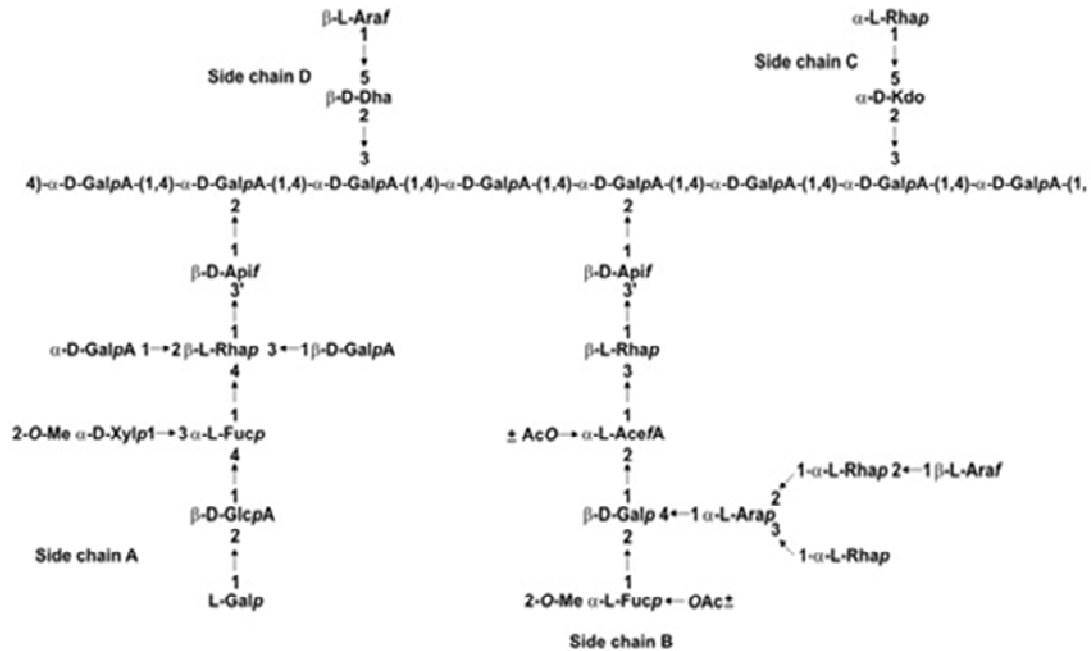
**Figure 21 :** Représentation des chaînes d'homogalacturonanes. A, sites de méthyl-estérification et d'acétylation d'homogalacturonanes. B, Liaison du Ca<sup>2+</sup> entre 2 chaînes de HG suivant le modèle de la « boîte à oeuf ».

Le C-6 non méthylé d'un résidu GalpA des HGs est chargé négativement et peut interagir avec les cations Ca<sup>2+</sup> pour former une liaison avec une seconde molécule HG, pouvant conduire à la formation d'un gel stable connu sous le modèle « egg-box » (Liners *et al.*, 1989, Figure 21). Les HGs peuvent être liés ou non à des RG I et/ou des RG II, mais également aux autres polymères pariétaux comme les xyloglucanes (Popper et Fry, 2005).

**Les rhamnogalacturonanes de type I (RG I)** renferment plus de 100 répétitions d'un disaccharide  $\alpha$ -(1-2)-L-Rhap- $\alpha$ -(1-4)-D-GalpA (Albert sheim *et al.*, 1996, O'Neill *et al.*, 1990; Caffall et Mohnen, 2009, Figure 22). Une fraction variable (20-80%) des résidus L-Rhap sont soit monosubstitués en C4 par  $\beta$ (1-4)-D-Galp, soit par un oligosaccharide linéaire et/ou branché, constitué de  $\alpha$ -L-Araf et  $\beta$ -D-Galp pour former des chaînes latérales

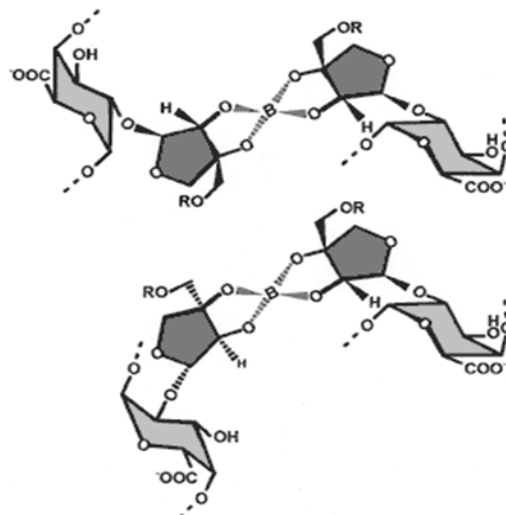


Outre leur complexité, les RG II arborent des monosaccharides rares comme  $\beta$ -(1-2)-D-Apif,  $\alpha$ -(1-3)-L-AcefA,  $\alpha$ -(2-3)-D-Kdop et  $\beta$ -(2-3)-D-Dhap. (Darvill *et al.*, 1978, Figure 23, O'Neill *et al.*, 2004).



**Figure 23 :** Structure de rhamnogalacturonanes de type II où RGII, caractérisée par un squelette de base constitué D-GalpA substitué par 4 chaînes latérales différentes A, B, C, D (O'Neill *et al.*, 2004).

Deux chaînes de RG II peuvent s'associer l'une avec l'autre *via* un atome de bore, permettant alors la formation d'un réseau pectique (Kobayashi *et al.*, 1999; Fleisher *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2001; Dembitsky *et al.*, 2002; Figure 24).



**Figure 24 :** Liaison de coordination entre un atome de bore et 2 résidus de D-Api de 2 chaînes de rhamnogalacturonanes de type II ou RGII (Matoh *et al.*, 1996).

Des altérations de l'intégrité des RGII induisent des dysfonctionnements développementaux, comme le nanisme (O'Neill *et al.*, 2001), l'altération de l'élongation du tube pollinique (Delmas *et al.*, 2003) et des symptômes de lyse cellulaire et de dégradation des organites cellulaires (Ahn *et al.*, 2006).

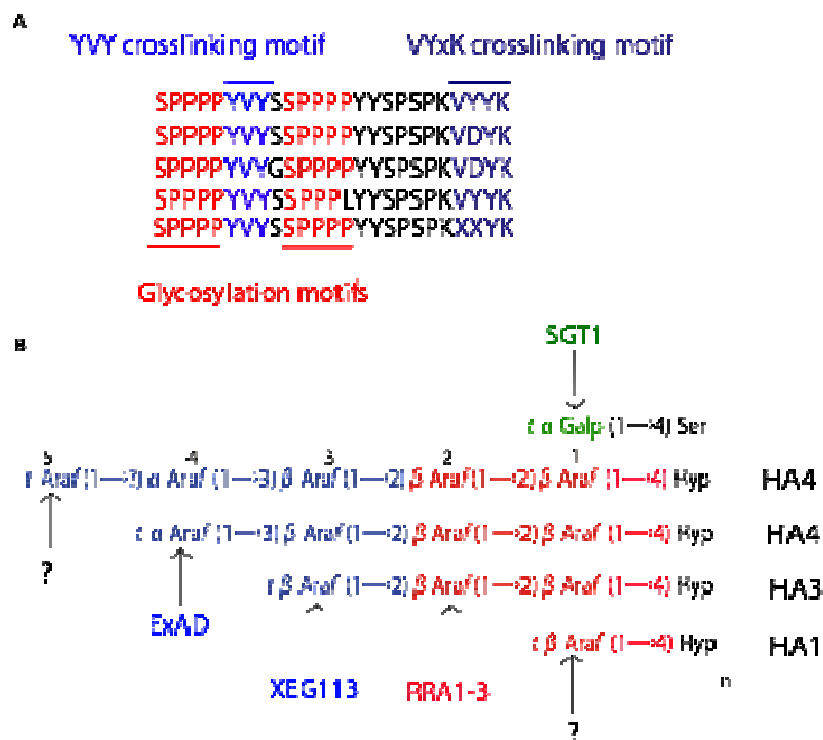
### **III-1-2 Les protéines pariétales**

Les analyses de la composition pariétale en protéines révèlent une grande variété de glycoprotéines impliquées dans la structuration des parois, mais également dans leur remodelage. Dans la paroi végétale, les protéines de structure comprennent plusieurs superfamilles de molécules: les protéines riches en hydroxyproline (HRGPs), qui englobent les extensines et les arabinogalctanes protéines (AGPs), les protéines riches en proline (PRPs), et les protéines riches en glycine (GRPs).

#### **III-1-2-1 Les extensines (HRGP)**

Les extensines (EXTs) forment une famille de glycoprotéines particulièrement sensibles au stress (Cannon *et al.*, 2008). Suite à une contrainte mécanique, en réponse à une blessure ou une agression par un pathogène les EXTs peuvent être sur-exprimées au niveau du phloème (Jamet *et al.*, 2000). Elles forment une famille de *O*-glycoprotéines impliquées dans la croissance des parois des plantes (Lamport et Northcote, 1960; Hall et Cannon, 2002; Held *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2008; Lamport *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2011).

Les EXTs appartiennent à la super-famille des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) avec des modules constitués par 2 motifs Ser-(Hyp)<sub>3-4</sub> encadrant un motif Tyr-Val-Tyr (Fry, 1982; Brady *et al.*, 1998; Held *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2008, Figure 24). Les Hyp de ces protéines sont fortement glycosylées soit par un monosaccharide  $\alpha$ -D-Galp ou de  $\beta$ -L-Araf, soit par des oligosaccharides constitués d'un enchaînement de  $\beta$ - et  $\alpha$ -L-Araf (Figure 25, selon Velasquez *et al.*, 2011).



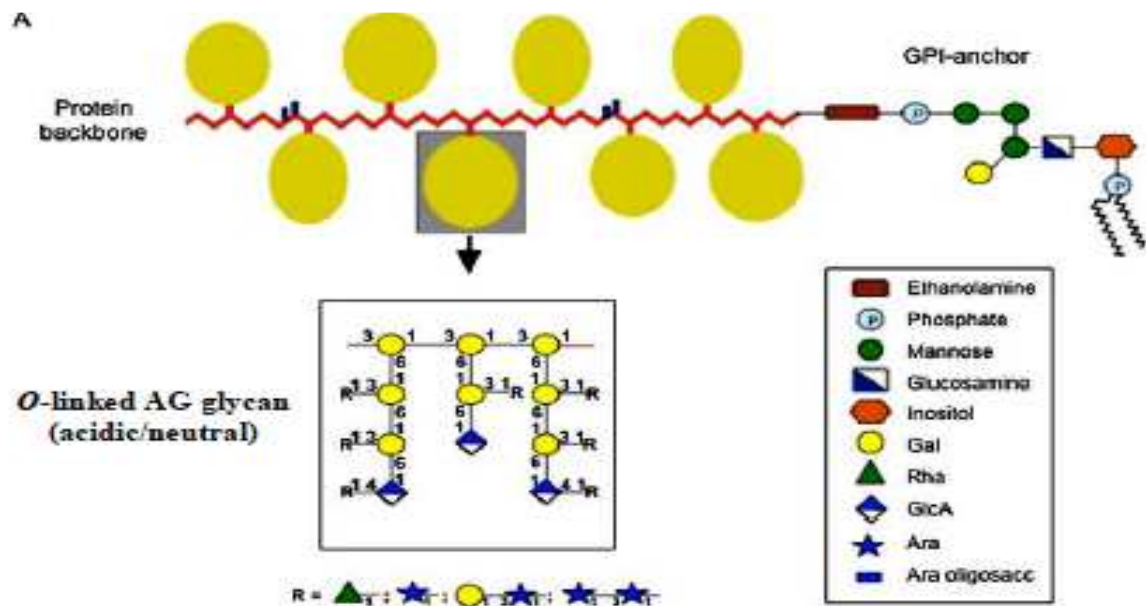
**Figure 25** : **A**, Motif répété prédominant de la plupart des séquences connues d'extensine (EXT) contenant le motif Ser-(Hyp)<sub>4</sub>, qui est O-glycosylé. **B**, Les oligosaccharides présents sur le motif Ser-(Hyp)<sub>4</sub>. Les flèches indiquent les transférases connues impliquées dans la biosynthèse de ces oligosaccharides (Velasquez *et al.*, 2011).

La richesse de ce polymère en Lys est responsable du caractère basique des EXTs, ce qui lui permet des interactions avec les groupements acides des pectines.

### III-1-2-2 les Arabinogalactanes protéines (AGPs)

D'après Seifert et Roberts (2007), les AGPs sont des protéoglycanes végétaux composés d'un squelette protéique sur lequel des polysaccharides sont accrochés par des liaisons O-glycosydiques. La fraction glucidique est constituée principalement d'un enchaînement de D-Galp et de L-Araf formant des arabinogalactanes de type II (AGII) qui peuvent représenter plus de 90% de la masse totale de la molécule (Gaspar *et al.*, 2001). Pour les AGPs si le polymorphisme de la fraction glucidique semble réduit, la variabilité de l'aglycone a permis de classer les AGP en 6 sous-familles, parmi lesquelles on peut citer les 2 plus importantes: les AGPs classiques et les non-classiques (Shultz *et al.*, 2002; Showalter *et al.*, 2010). Les AGPs classiques sont composées d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale et d'une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) à l'extrémité C-terminale hydrophobe (Figure 26, Ellis *et al.*, 2010). Cette dernière confère un ancrage et une mobilité de la molécule au sein de la membrane plasmique (Chatterjee et Mayor, 2001). Le deuxième type d'AGPs diffère du

premier par l'absence de l'ancre et par la présence de motifs peptidiques riches en Cys, Lys ou Asp et Hyp/Pro.



**Figure 26 :** Représentation schématique des AGPs suivant Ellis *et al.*, 2010. A, Structure de la protéine (rouge) avec son ancre GPI et ses domaines de liaisons des arabinogalactanes (AG). B, Détail des glucides et des liaisons osidiques des AG de type II retrouvés dans des AGPs classiques.

Les AGP sont abondants dans le règne végétal et semblent être impliqués dans les divers processus tels que la différenciation, l'adhésion cellulaire, l'embryogenèse et la mort cellulaire programmée (Lee *et al.*, 2005; Molletet *et al.*, 2002; Nguema-Ona *et al.*, 2006; Vicré., *et al* 2004).

### III-1-2-3 Protéines riches en proline (PRPs)

Les protéines riches en proline (PRP) et les protéines riches en proline hybride (HyPRP) forme une sous famille de HRGP à l'instar des EXTs et des AGPs présentant des motif riches en Pro de type KPPV(K), qui peuvent être répétés jusqu'à 40 fois (Cassab, 1998) avec une équi-molarité entre Pro et Hyp (Datta *et al.*,1989). Les Pro/Hyp de ces motifs peuvent être en partie *O*-glycosylés par des arabinanes (Kieliszewski *et al.*, 1995). Les PRPs, groupées en plusieurs classes ont été identifiées dans les semences, les feuilles, les tiges, les racines et au cours des phases précoces de développement des fruits (Rodriguez-Conception *et al.*, 2001). Les HyPRPs sont des *O*-glycoprotéines faiblement glycosylées caractérisées par une abondance de Cys dans le domaine C-terminal (Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000; Josè-Estanyol *et al.*, 2004; Battaglia *et al.*, 2007). Le rôle de ces protéines reste largement inconnu,



même si de récents travaux suggèrent une fonction dans la réponse des plantes aux stress environnementaux (Neto *et al.*, 2013).

#### **III-1-2-4 Protéines riches en glycine (GRPs)**

A la différence des autres protéines de structure des parois végétales, les protéines riches en glycine, où GRPs, ne possèdent pas de domaine riche en Pro et ne sont pas glycosylées (Ringli *et al.*, 2001). Le motif riche en glycine est du type (Gly)<sub>5</sub>X où X est n'importe quel acide aminé avec une fréquence préférentielle pour l'Ala, la Val, l'His, la Ser, la Glu et la Phe. Ces protéines sont insolubles et peuvent être réticulées. Les GRPs ont été identifiées comme sur-exprimées dans les parois des plantes soumises à des contraintes biotiques et abiotiques (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Chez *Phaseolus vulgaris*, la GRP1.8 a été identifiée dans le protoxylème (Keller *et al.*, 1989) et semble capable d'interagir avec des hydrolases pariétales comme la chitinase (Ringli *et al.*, 2001). D'autres GRPs, comme AtGRP-3, interagissent avec des chitinases pariétales, comme WAK1, et participeraient alors au contrôle de l'expansion pariétale au cours de la croissance cellulaire (Anderson *et al.*, 2001). A l'instar de ce qui a été mis en évidence pour le protoxylème, Condit et Keller, (1990) ont mis en évidence une GRP dans les parois du phloème.

#### **III-2 Réponse de la paroi primaire aux contraintes salines**

La paroi est une structure dynamique en continuel remodelage grâce à tout une batterie d'enzymes présentes dans ce compartiment (Feiz *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2013). Lacroissance et/ou l'expansion pariétale des cellules est le résultat de la balance entre l'inextensibilité de la paroi et les forces exercées sur ce compartiment par la pression de turgescence (Peaucelle *et al.*, 2012). Ainsi, toutes modifications d'osmolarité cellulaire, comme par exemple celles qui sont induites par le stress salin, va affecter le potentiel osmotique de la cellule et donc la pression de turgescence exercée par la vacuole sur le compartiment pariétal. Avant de regarder comment le stress salin affecte la croissance de la paroi cellulaire, une description succincte de ce processus est proposée dans le paragraphe suivant.

##### **III-2-1 Croissance de la paroi primaire.**

Nous avons vu que la paroi est un enchevêtrement de polymères liés entre-eux par tout une gamme de liaisons chimiques (liaisons hydrogènes entre les chaînes glycaniques, liaisons

entre des polymères différents: XyGs-cellulose, mais également liaisons médiées par des cations entre 2 polymères, comme le  $\text{Ca}^{2+}$ -HG ou le  $\text{B}^{3+}$ -RGII. Toutes ces liaisons chimiques confèrent des propriétés mécaniques de résistance à l'extension de la paroi primaire. Cependant, la différenciation des cellules végétales est associée à une extension pariétale dont le moteur est la pression de turgescence, et dont les acteurs sont des enzymes et des protéines capables de relâcher temporairement la matrice pariétale pour réorganiser à la fois les polymères et le réseau de liaisons entre les polymères.

Ainsi, certaines protéines sont impliquées dans extension des parois alors que d'autres le sont dans son raidissement lorsque la croissance cesse. Parmi les enzymes impliquées dans l'extensibilité des parois il y a les xyloglucanes endotransglucosylases/hydrolases ou XETs qui coupent et reforment les chaînes de xyloglucanes permettant le glissement des microfibrilles de cellulose au cours de la croissance (Fry *et al.*, 1992). Il y a aussi les  $\alpha$ -expansines qui ne possèdent pas d'activité hydrolytique par elles-mêmes mais affaiblissent, à pH acide, les liaisons non-covalentes entre les polysaccharides pariétaux, et permettent le glissement des polymères des parois sous effet de la turgescence (Cosgrove, 2000). Des hormones, comme les auxines, mais également les brassinostéroïdes, ne vont pas intervenir directement dans ce processus, mais vont mettre en place des conditions favorables à la croissance cellulaire en modifiant l'environnement physico-chimique de la paroi et en déclarant la synthèse des enzymes importantes pour ce mécanisme (Cosgrove, 2000).

A côté des acteurs enzymatiques, le relâchement pariétal est associé à une production de ROS (Ros-Barcelo *et al.*, 2002) ; Ainsi, l'activation de la NAD(P)H oxydase membranaire entraîne la formation de l'anion superoxyde et s'achève par la formation du radical hydroxyle  $\text{OH}^\cdot$ , probablement par la réaction de Fenton (Fry 1988). Ces oxydants vont faciliter l'hydrolyse des XyGs permettant à la paroi de s'étirer. Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est, quant à lui, impliqué à la fois dans le durcissement des parois lorsque la croissance cesse et à la stimulation de l'activité de la cellulose synthase (Ros-Barcelo *et al.*, 2002).

### **III-2-2 La réponse pariétale au stress salin**

Les salinités élevées agissent sur le métabolisme des parois en affectant principalement l'activité des enzymes qui y sont impliquées (Zhong et Läuchli, 1993). Il en résulte une réduction de la croissance des glycophytes, particulièrement celle des parties aériennes. Concernant la croissance des tiges, le sel induit une diminution des transcrits des gènes codant la xyloglucane endotransglucosylase (XET), l' $\alpha$ -expansine (EXPA), et  $\text{H}^+$ -ATPase de la membrane plasmique. Le niveau d'expression de ces gènes est corrélé avec la

réduction de l'extensibilité de la paroi et la réduction de la croissance des tiges entre espèces tolérantes et espèces sensibles au stress salin chez le maïs (Geifus *et al.*, 2011). Chez *Vignasp*, la réduction de la croissance de l'hypocotyle par le sel est due à l'activité des peroxydases (Pujari et Chande, 2002). Concernant les feuilles, la réduction de croissance sous l'effet du stress salin, s'exerce plutôt sur le limbe que sur le pétiole. Ainsi, la réduction des limbes de *Chloris gayana* traités par 200mM NaCl est principalement due à la restriction hydraulique. La croissance est maintenue grâce à une augmentation de l'activité des XET sous l'effet du stress salin (Ortega *et al.*, 2006). En ce qui concerne les racines, leur croissance s'adapte au déficit hydrique par un ajustement osmotique et des modifications pariétales. Ces changements se produisent dans les zones d'élongation, mais sont opposées entre régions apicale et basale. L'élongation est le résultat de l'action des expansines dans la région apicale. Le maintien de la croissance des racines en condition de déficit hydrique est dûe à une stimulation de l'expression des expansines dans la zone apicale (Wu et Cosgrove, 2000) et à une augmentation de l'activité des XETs *via* une modification post transcriptionnelle (Wu et Cosgrove, 2005). La réduction de la croissance racinaire observée en réponse au stress salin ne serait pas due à une réduction de la turgescence mais à une perte de sensibilité aux expansines dans la région basale de la zone d'élongation (Wu *et al.*, 1996). Dans le riz, cette réduction est étroitement corrélée aux niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chi et Kao, 2001).

On estime que 70 % du carbone fixé par les plantes se retrouve dans les parois (Poorter et Villar, 1997) qui représentent une matière première renouvelable sur laquelle se portent les regards suite à l'épuisement du carbone fossile. Par ailleurs, et par le biais des plantes fourragères, cette matière organique assure l'alimentation animale. La salinité va modifier les parois des plantes réduisant leur productivité, et pouvant corrélativement modifier la digestibilité des fourrages. L'ensemble de ces phénomènes peut donc avoir des conséquences sur la nutrition de l'humanité. Parmi les plantes fourragères, *Medicago sativa* tient une place toute particulière, à la fois par sa distribution à l'échelle du globe, mais également par son importance nutritionnelle et sa tolérance au stress salin qui caractérisent les sols du sud Tunisien. Elle est qualifiée de « reine des plantes fourragères ».

## IV *Medicago sativa* et le stress salin

### IV-1 Adaptation fonctionnelle des feuilles des *Fabaceae*

Diverses plantes peuvent orienter la surface supérieure de leurs feuilles pour absorber au mieux la lumière. C'est le cas des Fabaceae dont les feuilles, composées pennées, constituent des modèles adaptés à la régulation de ces variations d'orientation associées à l'optimisation de l'activité photosynthétique. Ces variations nyctémérales, connues depuis l'Antiquité, ont été décrites par Darwin (1880) qui parle de mouvements foliaires de veille et de sommeil. A ces variations spontanées s'ajoutent des variations d'orientation induites par divers stimuli, si bien qu'il existe des mouvements foliaires provoqués, correspondant soit à des tropismes, soit à des nasties (Satter, 1990). Ainsi, la feuille des Fabacées se repositionne dans le champ gravifique si la plante a subi une inclinaison ou un renversement sous l'effet de chocs (tornades, séismes...), c'est le gravitropisme. Si elle est éclairée pendant la phase obscure du nyctémère, elle exécute un mouvement photonastique. Les Fabacées présentant des mouvements foliaires rapides (*Mimosa pudica*, *Hedysarum gyrans*) sont des modèles démonstratifs qui amplifient la vitesse des réponses qui ont également lieu discrètement dans d'autres modèles (*Samanea saman*, *Albizia julibrissin*, *Phaseolus vulgaris*, *Robinia sp.*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Trifolium sp.*, *Medicago sp.*.....).

Les mouvements foliaires et foliolulaires sont réalisés *via* des bourrelets moteurs (organes moteurs, pulvini) situés aux jonctions tige-pétiole, pétiole-rachis, rachis-limbe. Chez les Fabacées plusieurs modèles de feuilles existent avec un nombre variable de folioles et de foliolules. *Medicago sp.* possède trois folioles dont les pulvini contrôlent la posture. Des travaux récents (Zhou *et al.*, 2012) ont permis d'identifier et de caractériser des mutants de *Medicago trunculata* dont les pulvini ne se différencient pas à la base des foliolules. Ces mutants pourvus de « petiolule-like pulvini » (PLP), spécifiquement exprimés (RT-qPCR, microréseaux), ont des mouvements nyctinastiques abolis. De plus, dans *M trunculata*, Chen *et al* (2012) ont obtenu des mutants à pétiolules allongés (*epl1*), également dépourvus de pulvini. Une analyse de la relation phylogénique entre le gène EPL1 et ses homologues, *Apu* chez *Pisum sativum*, *SLP* chez *Lotus japonicus*, *glyma* chez *Glycine max* a été réalisée.

## IV-2 La luzerne, plante pérenne, tolérante à divers stress environnementaux

### IV-2-1 Caractéristiques botaniques, taxonomie et origine du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* appartient à la sous-famille des Faboidées, famille des Fabacées, superfamille des Légumineuses, ordre de Fabales (Papilionacées). Sur la base de la forme des gousses et des graines ce genre comprend 4 sous-genres (Lesins et Lesins, 1979). Il s'agit de *Lupularia*, *Orbicularia*, *Spirocarpos* et *Medicago*. Le sous-genre *Medicago* comprend 4 sections dont *Falcato*, elle-même divisée en 4 sous-sections dont *Falcatae*. Sur la base de la couleur des fleurs et la forme des gousses, cette dernière englobe 5 espèces : *falcata*, *glomerata*, *glutinosa*, *prostata* et *sativa*. Ces 5 espèces sont pérennes, diploides ou tétraploides, ont une corolle jaune, violette, ou jaune et violette. A la base, le genre *Medicago* devait être diploide, mais les espèces tétraploides, initiées ont été des plantes vigoureuses et hétérozygotes, capables de s'adapter et de coloniser de nouveaux habitats, accroissant ainsi l'aire de *Medicago* (Quiros et Bauchan, cités par Guinès, 2002). Le nombre chromosomique de base est  $x=8$ , à l'exception d'espèces annuelles pour lesquelles  $n=7$ . Trois niveaux de ploïdie existent, les diploides avec  $2n = 14$  ou  $16$ , les tétraploides  $2n= 32$  et les hexaploides  $2n=48$  (Quiros et Bauchan, 1988) (Figure 27, Flore d'Europe).

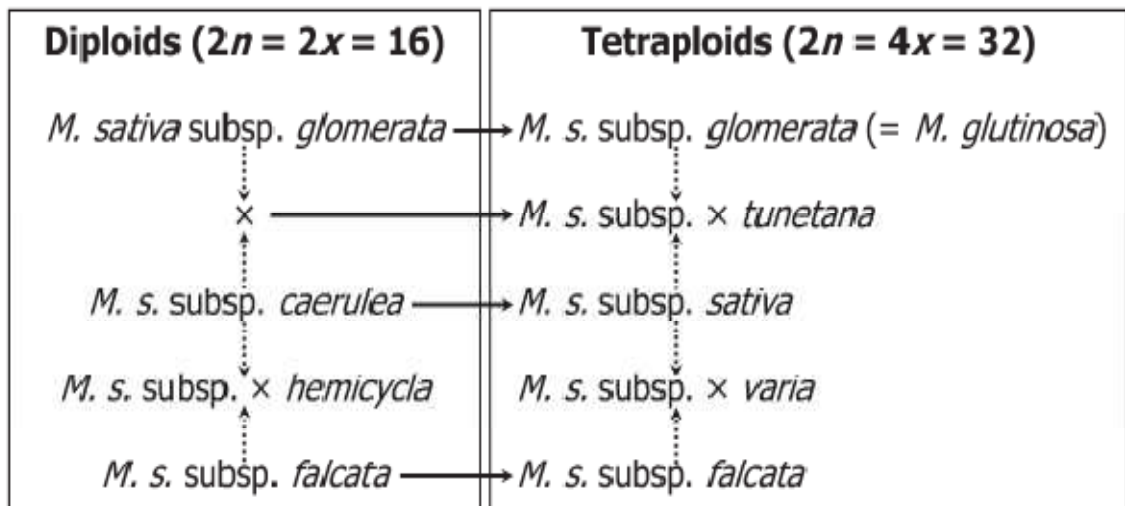


**Figure 27 :** *Medicago sativa* L., grappes de fleurs violettes et graine spiralée, représentation dans la Flore d'Europe.

Concernant *Medicago sativa* L., la forme tétraploïde est dénommée *M. sativa ssp sativa* ( $2n=4x8=32$ ) et la forme diploïde *M. sativa ssp caerulea*. La sous-espèce *sativa* (Figure 27) est caractérisée par un port dressé, une racine pivotante qui peut descendre jusqu'à un mètre dans le sol, des fleurs violettes, et des gousses en forme de spirale (Whyte *et al.*, 1953).

Elle est peu dormante, et présente une bonne résistance au froid. A propos de l'origine du complexe *Medicago sativa*, il est possible que *Medicago glomerata*, présente dans l'ensemble du Caucase, soit l'ancêtre des formes diploïdes du complexe, qui aurait donné deux populations séparées par isolement spatial : *caerulea* au sud et *falcata* au nord (Figure 28). Des hybrides ont été obtenus à partir de ces deux variétés très proches, ce sont le *Medicago media*, créés par les sélectionneurs pour obtenir des fourrages.

En France, les populations locales sont constituées de mélanges de *M sativa* et de *M media*, en proportions variables selon les régions.



**Figure 28** : Relations hypothétiques entre les taxa de *Medicago sativa* (Lesin et Lesin, 1979; Quiros et Bauchan, 1988 ; Small et Jomphe, 1989) modifié par Havananda *et al.*, (2010).

— : autopolyploïdie , ..... : hybridation

De quelle région provient l'espèce luzerne ? D'après Sinskaya (1950) et Michaud *et al.*, 1988 la luzerne aurait deux centres d'origine. Le premier la région transcaucasienne, continentale, qui a produit les luzernes actuelles d'Europe. Le deuxième est l'Asie centrale (Sinskaya, 1950). On la trouve utilisée en fourrage vers 3300 ans avant JC (sans doute la plus vieille référence), et en Turquie des tablettes Hittites la mentionnent 1400-1200 avant JC.

A l'état spontané, elle a été observée dans plusieurs provinces d'Anatolie, au midi du Caucase, donc au Moyen-Orient. On la trouve aussi dans plusieurs régions de Perse, d'Afghanistan, dans le Belouchistan et au Cachemire (régions actuellement localisées en Iran,

en Afghanistan et au Pakistan). Selon une forte probabilité les Grecs auraient transporté cette espèce hors d'Asie Mineure, ou/ et de Médie, région qui s'étendait en Perse septentrionale, là où Alexandre le Grand (356-323 A JC) admira la vigueur du bétail et découvrit ainsi la luzerne qui leur était donnée en fourrage.

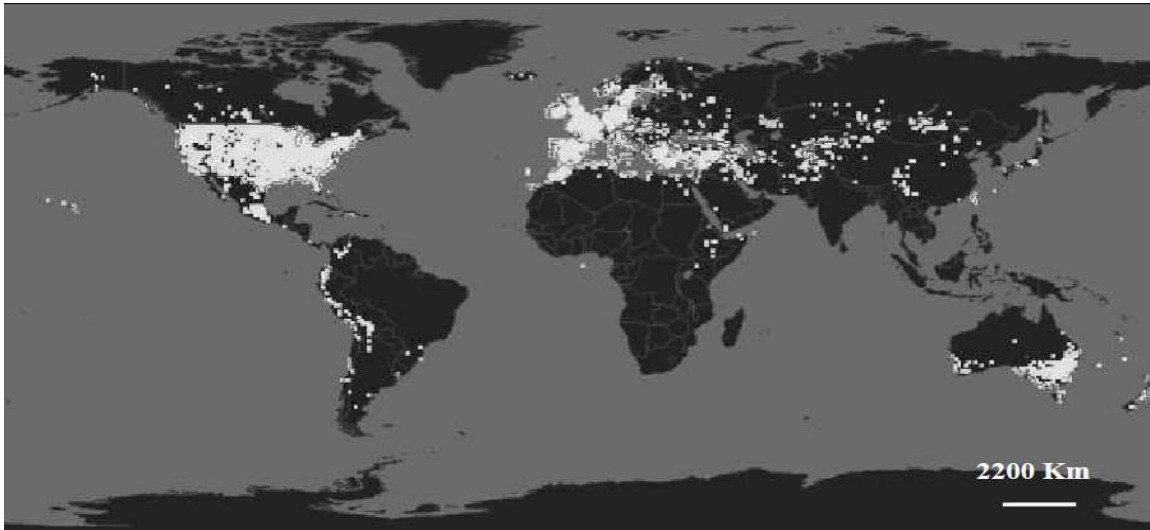
La luzerne cultivée, sans doute, *M sativa ssp sativa* était donc connue des Grecs qui la nommait Medikai (Medikéi), parce qu'elle avait été ramenée de Médie, pendant la guerre contre les Perses, environ 470 ans avant l'ère chrétienne. Puis, les romains étendant leur suprématie sur les Grecs l'ont probablement répandue dans l'Empire Romain et l'ont cultivée, au moins depuis le premier ou le deuxième siècle après JC. Ils l'ont appelé *Medicago*. Ainsi, en traversant l'Europe, Mediké est devenue *Medicago*, qui demeure sa dénomination latine. Cette culture se serait maintenue chez les romains, et compte tenu de l'étendue de leur empire elle a pu être répandue sur une grande partie du pourtour méditerranéen. On peut penser que les Vandales et les Byzantins, vainqueurs de la puissance romaine du IV au VI siècle ap. J.C. ont pu, faire prospérer la culture de la luzerne pour nourrir leurs chevaux avant que les peuples islamiques, qui vont les vaincre, ne favorisent cette culture en Afrique du nord. La piste, indiquant que les Arabes seraient les premiers à avoir cultivé ce fourrage dans la péninsule arabique, après l'avoir transporté dans leur migration vers le Maghreb est la plus retenue. Ces éleveurs de chevaux, remarquant que cette plante augmentait la valeur nutritive du fourrage, l'appelèrent Alfach-facah, qui signifie « père de tous les aliments ». Le nom actuel de Alfalfa en dérive et les peuples Arabes dans leurs migrations à partir du Moyen Orient, à travers l'Egypte (dès 643, avec une conquête véritable à partir de 666) jusqu'au Maghreb ont très probablement pu amener ce fourrage en Afrique du Nord. De plus, les invasions menées par les Maures, en Espagne et dans le sud de la France, au 8ème siècle après JC, ont pu contribuer à y répandre cette plante. Puis son introduction d'Espagne en France daterait de 1550 selon Michaud *et al.*, 1988.

Il faut aussi ajouter que les colonisateurs Portugais et espagnols au 16ème siècle l'ont répandue en Amérique, notamment au Mexique et au Pérou. Puis des missionnaires l'aurait amenée du Mexique au Texas, en Arizona, au Nouveau Mexique et en Californie.

Au final, c'est dans les zones tempérées chaudes que la luzerne se développe dans tous les continents : Amérique, Europe, Asie, Australie et Afrique (Mauries, 1994).

#### IV-2-2 Aires de culture de la luzerne

La luzerne est l'une des plantes fourragères les plus anciennes sur la planète et c'est aussi celle qui est la plus cultivée à travers le monde (Figure 29, selon Prolea, 2002).

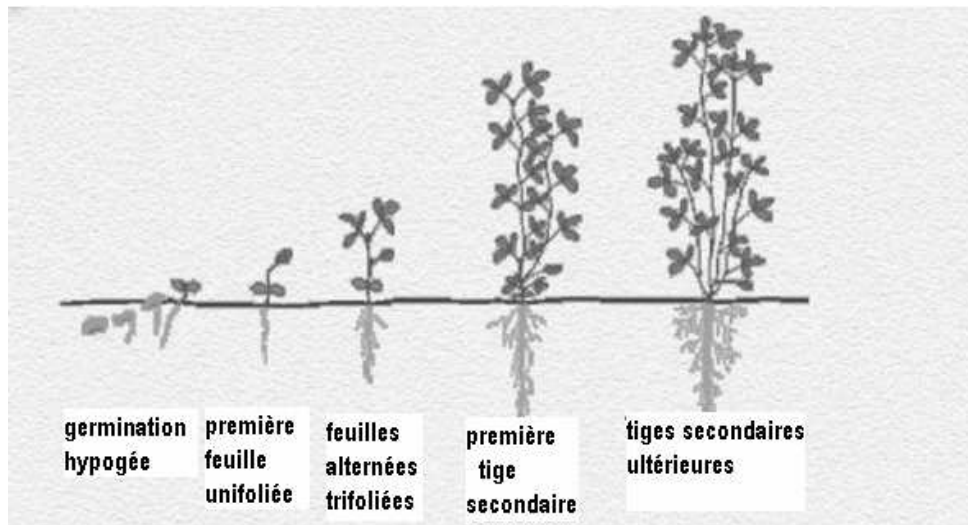


**Figure 29** : Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde (Prolea, 2002)

La luzerne est peu utilisée en pâturage (4%) et en vert (2%) du fait des risques de méthanisation des ruminants. Elle l'est également peu en ensilage (9%). Près de  $\frac{3}{4}$  des luzernières sont utilisées en foin (soit 73%). Mais, les tendances vont vers un nouveau mode d'utilisation où la plante est déshydratée. La luzerne déshydratée, reconnue comme une alternative à l'utilisation des farines animales, et comme source fiable des protéines, constitue une alternative (12%) qui a convaincu les éleveurs de bovins. En effet, les luzernes déshydratées sont riches (à plus de 20%) en protéines de qualité en raison du tannage par la chaleur. Elles constituent donc un apport alimentaire de très haute valeur nutritive pour les ruminants. Sans luzerne les vaches ont des problèmes d'acidose dans le rumen, que ce fourrage atténue. Ainsi, selon les agronomes, sa réimplantation permettrait d'améliorer la qualité du lait, le foin et le maïs s'avérant insuffisants. Le problème quant à l'utilisation de la luzerne, notamment lors des récoltes de printemps concerne essentiellement son séchage qui nécessite de maintenir une température de constante d'au moins 38°C. L'achat de fours pour un séchage forcé, ou seulement une ventilation en période estivale, ou encore le recyclage de la chaleur dégagée par les méthaniseurs dans certaines fermes pour le séchage du fourrage a débuté dans le sud-ouest de la France en 2011. La qualité alimentaire de la luzerne fourragère prend en compte le rapport feuilles/tiges.



Le pied de luzerne, fixé par sa racine principale profonde, entourée d'un réseau racinaire dense, porte une tige principale et de nombreuses tiges secondaires (Figure 30).



**Figure 30** : Développement de la partie aérienne de la luzerne ramifiée en nombreuses tiges et du réseau racinaire autour de la racine pivot profonde.

La digestibilité est le % de matière sèche ingérée qui est retenu lors du transit dans l'appareil digestif. La digestibilité est dépendante de la quantité de tiges dans le fourrage, celle des feuilles reste constante ou évolue très peu dans les luzernes âgées. La valeur azotée représente la teneur en matières azotées digestibles. Les protéines dégradées dans le rumen contribuent à la croissance des microorganismes du rumen, mais peuvent aussi être perdues sous forme d'ammoniaque, entraînant la formation de méthane par des animaux. Les protéines passant directement dans le petit intestin sont dégradées, libérant des acides aminés valorisables par les ruminants. La valeur énergétique de ce fourrage est déterminée par le rapport feuilles/tiges suivant la relation  $f/t=1,7x(MSA)^{-0,6}$  (Lemaire et Allirand, 1993), où MSA est la matière sèche aérienne. La valeur énergétique est exprimée en unités fourragères (UF). Il existe une grande différence de qualité entre feuilles et tiges, si bien que la sélection faite pour améliorer la valeur alimentaire de ce fourrage est orientée vers l'amélioration de la qualité des tiges. Depuis la mise en place du catalogue officiel des variétés de luzernes en 1950, les objectifs de sélection ont évolué. Les premiers critères de sélection des plantes ont été le rendement en matière sèche, la résistance à la verse, aux maladies (notamment fongiques) et aux nématodes. Plus récemment, la bonne production grainière et, depuis quelques années, la valeur

énergétique sont les préoccupations des semenciers, notamment ceux appartenant au Syndicat National des Déshydrateurs de France (conditionnement en granulés).

#### **IV-2-3 Intérêts nutritionnels**

Son utilisation courante dans l'alimentation du bétail lui a valu les noms vernaculaires de : herbe à vaches, herbe à bisons, herbe à lapins. Mais, son utilisation dans l'alimentation humaine vaut la peine d'être mentionnée. En effet, elle est riche en acides aminés, en sels minéraux et en oligo-éléments. Ainsi, au Nicaragua une association déployant son activité sur l'alimentation des populations défavorisées a privilégié l'utilisation de cette plante en complément alimentaire pour lutter contre la malnutrition. Dans les pays « développés » la luzerne présente un intérêt supplémentaire qui est d'être riche en Ribulose Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco). Or cette enzyme, qui permet la fixation du CO<sub>2</sub> et son oxygénation, est riche en acides aminés essentiels et sa composition se rapproche de celle des protéines laitières, d'où son potentiel pour l'alimentation humaine si des techniques innovantes permettent un jour d'extraire facilement cette enzyme.

#### **IV-2-4 Intérêts pharmaceutiques**

Utilisée depuis longtemps en herboristerie pour lutter contre les rhumes, les abcès, les troubles digestifs, elle possède des propriétés reminéralisantes, anti-infectieuses, désintoxicantes. Elle agirait comme élément protecteur contre le diabète et le cholestérol. Certaines de ces propriétés ont été démontrées *in vivo* chez les rongeurs : elle renforce l'immunité (Gawel, 2012), aurait des propriétés hypolipidimiques (Yu, 2010), anxiolytiques ((Bora et Sharma, 2011), antidiabétiques (Gray et Flatt, 1997), antioxydantes (Al-Dosari, 2012), oestrogeniques like (Bora et Sharma, 2011). Certains même voient ainsi la luzerne comme nouvelle usine à médicaments....

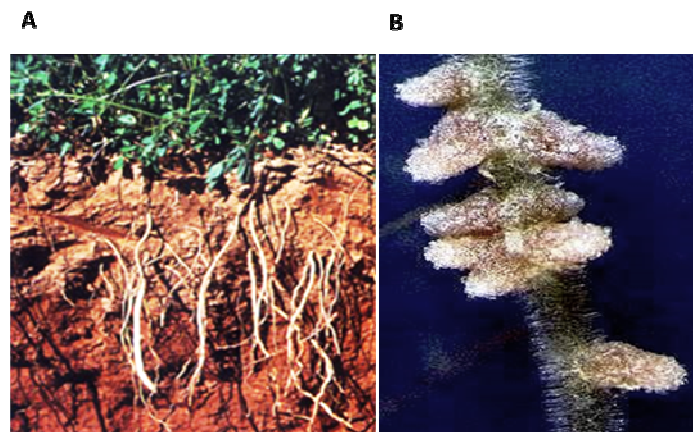
#### **IV-2-5 Intérêts industriel et biotechnologiques**

Concernant l'utilisation de plantes génétiquement modifiées, destinées à la recherche en laboratoire, la luzerne a une place privilégiée puisqu'il s'agit d'un modèle de choix dans l'obtention de molécules précises (domaine de la moléculaire). Industrie : La rubisco peut être favorablement utilisée dans la fabrication de cosmétiques, mais aussi de détergents. *Medicago sativa* est l'une des cultures lignocellulosiques sous études pour la production d'énergie renouvelable tel que le bioéthanol (Godin *et al.*, 2010). Alfalfa présente un potentiel élevé

pour la production de bioéthanol en particulier pour son faible lien avec la fertilisation azotée et surtout sa grande diversité génétique par les enzymes impliquées dans la libération du glucose (Duceppe *et al.*, 2012). De nombreuses légumineuses sont adaptées aux climats chauds et secs (méditerranéens et subtropicaux). Parmi ces plantes *M. sativa* Gabès est une variété-population originaire des oasis tunisiennes (Boughanmi, 1995, Benabderahaim *et al.*, 2011), répandue dans tout le Maghreb.

#### IV-2-6 Intérêt environnemental

La luzerne améliore la qualité des sols car elle absorbe les nitrates, donc protège les nappes aquifères par son système racinaire dense. De plus, par la symbiose bactérienne établie dans les nodules racinaires (Figure 31) la luzerne enrichit les sols en composés azotés permettant une rotation des cultures sans apport d'engrais.



**Figure 31** : A, Système racinaire dense. B, Nodules racinaires (symbiose avec *Rhizobium*).

#### IV-3 Cas de *M. sativa* Gabès, une variété adaptée aux sols secs, arides et salins

Dans les zones semi arides et arides les eaux d'irrigation sont souvent riches en chlorures et/ou sulfates. Les terres irriguées sont donc chargées en sel et peu de plantes fourragères sont adaptées à ces conditions. Pendant la saison chaude estivale en Tunisie, la concentration en sels est encore augmentée si bien que les forces osmotiques externes entraînent la mortalité des plantes non tolérantes. C'est dans ce contexte qu'un dessalement des eaux d'irrigation et un drainage accru des sols ont été tentés. Une autre approche consiste à sélectionner des espèces et des variétés tolérantes au stress salin. C'est ainsi que le degré de tolérance à la salinité de *M. sativa* var Gabès a été analysé. Les travaux ont montré, notamment, sa capacité de germination élevée, en conditions de stress allant jusqu'à 9,5 gL<sup>-1</sup> de NaCl et sa tolérance à

l'eau d'irrigation titrant  $4,2 \text{ gL}^{-1}$ . . Ce cultivar présente, en plus, une production de matière sèche élevée malgré l'intensification de son exploitation (Mezni *et al.*, 1999). Puis, un travail de Mezni *et al.*, (1999) a consisté à comparer *M. sativa* Gabès, **variété non dormante**, à un hybride américain semi-dormant (Hyb 555) et une variété australienne exclusivement dormante (Hunterfield). Par son meilleur taux de survie, sa moindre réduction de production de biomasse aérienne et racinaire avec la salinité croissante, la population Gabès a présenté les meilleures qualités pour les programmes de sélection.

Les besoins alimentaires d'une population mondiale en croissance continue, les pertes progressives de sols agricoles du fait de leur salinisation accélérée par les modifications climatiques rendent impérative l'amélioration des plantes, notamment les plantes fourragères comme la luzerne. Cette action nécessite la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes à la salinité.

### **Argumentaire scientifique**

La tolérance des plantes au stress salin s'exprime de façon différente suivant l'espèce végétale considérée. Ainsi, chez les glycophytes pérennes comme *Medicago sativa*, le NaCl est mal compartimenté, ce qui entraîne des augmentations continues des teneurs en sel dans les tissus (Munns, 2002). Cette situation entraîne le développement d'échanges tropiques importants entre les cellules du mésophylle assimilateur et les sèves xylémienne et phloémienne. Les cellules compagnes/cellules de transfert des veines mineures sont impliquées dans la recirculation du Na<sup>+</sup> (Winter 1982, Boughanmi *et al.*, 2003) qui fait intervenir un transporteur du K<sup>+</sup> (AtHKT1) chez *Arabidopsis* (Berthomieu *et al.*, 2003). Les cellules de transfert qui se transdifférencient à partir de différents types cellulaires sont facilement identifiables par le développement de leur paroi primaire sous forme d'invaginations pariétales en relation avec la physiologie, le stade de développement de la plante et aussi en réponse aux stress biotiques et abiotiques.

Dans le but de comprendre la fonction physiologique de ces modifications pariétales, plusieurs auteurs se sont attachés à identifier (Gunning and Pate, 1969), puis à immunolocaliser les différents composés pariétaux (Vaughn *et al.*, 2007; Boughanmi *et al.*, 2010). Dans cette dernière étude il a été démontré un profond remodelage de la paroi primaire et des invaginations pariétales de plantes soumises à un stress salin. Outre des modifications de la distribution des pectines et plus particulièrement des pectines méthylées, ce travail montre, en accord avec les observations de Vaughn *et al.*, (2007), une redistribution importante de certaines classes d'arabinogalactanes protéiques ainsi qu'une augmentation des xyloglucanes fucosylés. Sur la base de ces données, nous souhaitons comprendre les mécanismes de réponses de cette espèce au stress salin, notamment s'il existe des variations dans la nature des polymères pariétaux sous l'effet du sel et le rôle de ces composés dans la formation des protubérances internes dans les cellules de transfert phloémienne des feuilles.

## **Actions de recherches mises en place**

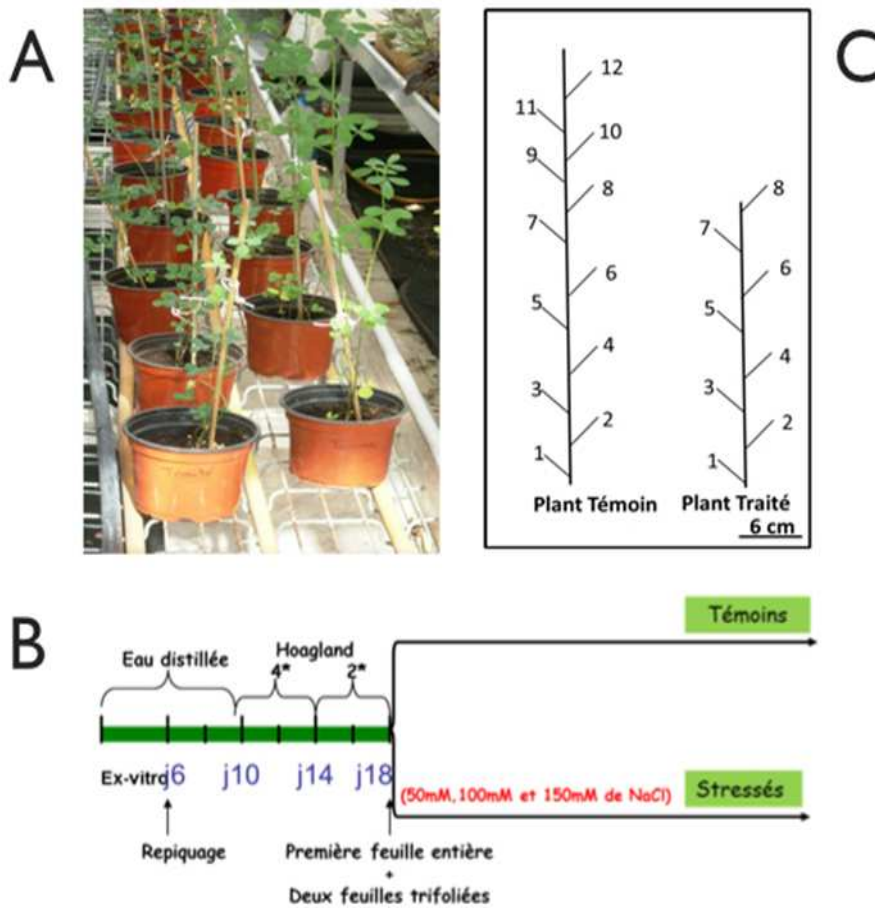
Le travail a été réalisé sur *Medicago sativa* cv Gabès soumis à un stress salin correspondant à un apport de 150 mM de NaCl suivant un protocole déjà décrit par Boughanmi *et al.*, (2010). L'analyse de la réponse de *Medicago sativa* a été abordée ici via une analyse de la réponse au stress salin des feuilles jeunes (2<sup>ème</sup> verticille) et des feuilles âgées (7<sup>ème</sup> verticille) au travers d'une approche biométrique et physiologique (chapitre 1), puis à une analyse biochimique de la paroi (chapitre 2) et une analyse immuno histo chimique (chapitre 3).

**I Matériel végétal**

Cette étude a porté sur une accession naturelle d'une variété Tunisienne de *Medicago sativa*, originaire des oasis Tunisiennes de la région Gabès. C'est l'INRAT de Medenine qui nous l'a procurée.

**I-1 Conditions de culture et de traitement des plantes**

Les cultures ont été réalisées dans des conditions semi-contrôlées à la serre de la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges.

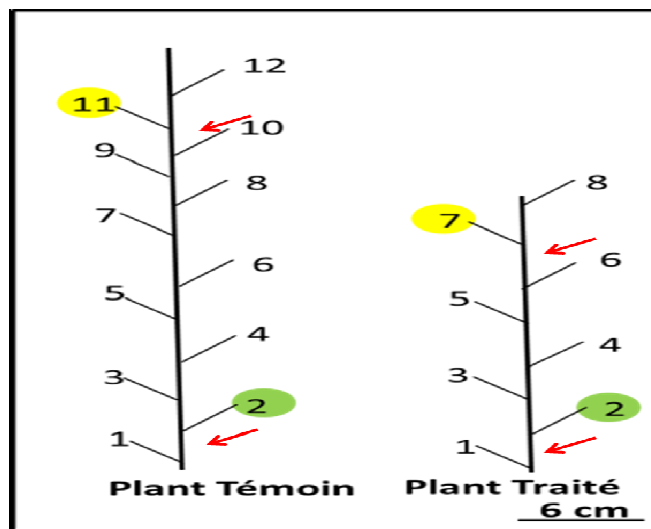


**Figure 32 :** Vue du dispositif expérimental à la serre (A). Schéma du protocole de germination et de culture des plants de *Medicago sativa* var Gabès (B). Représentation comparative de l'âge physiologique des feuilles de plants témoins et traités au moment de l'échantillonnage (C).

Des graines de *Medicago sativa* cv Gabès ont été mises à germer *ex-vitro*, après lavage avec de l'eau savonnée et rinçage à l'eau distillée.

La germination a été faite dans des boîtes de Pétri tapissées de deux couches du papier filtre imbibées d'eau distillée, y compris dans le couvercle. Dès que la radicule a atteint 1 cm, les téguments des graines ainsi que le papier du couvercle ont été enlevés, pour éviter l'étiollement des plantules. La phase de la germination a duré entre 5 à 7 jours à 23°C. Ensuite, les plantules ont été mises en culture individuellement en godet dans du terreau (Figure 32 A). Tous les deux jours, les plantes sont arrosées, au début par de l'eau distillée, puis avec la solution nutritive de Hoagland, diluée quatre fois et, finalement, avec la solution nutritive diluée deux fois, jusqu'à l'apparition de la première feuille entière et de deux feuilles trifoliées. A ce stade de développement, les plantes ont été soumises à un stress salin croissant (50 mM, 100 mM et 150 mM de NaCl), suivant le protocole déjà décrit par Boughanmi *et al.* (2010) (Figure 32 B).

L'échantillonnage et les mesures ont été faits sur des plantes ayant développé, sur la tige principale, 12 étages foliaires pour les plants témoins, et 7 pour les plants traités (Figure 32 C). Par convention, les jeunes feuilles utilisés pour la réalisation de cette étude correspondent aux feuilles des 11 et 7 rangs pour respectivement, les plantes témoins (**JT**) et traitées (**JS**). Toujours par convention, seront appelées feuilles âgées, les feuilles du second rang des plantes témoins (**AT**) et traitées (**AS**) (Figure 33).



**Figure 33** : Schéma représentant le numéro d'ordre basifuge des feuilles de *Medicago sativa* cv Gabès prélevées pour l'échantillonnage: les feuilles jeunes en jaune et les feuilles âgées en vert. Les flèches rouges correspondent aux entrenœuds prélevés pour les études l'anatomo-histologie.



## **I-2 Conditions de culture et de traitement des semences**

Pour chaque traitement, 100 graines par semis ont été lavées et réparties en quatre boîtes de Pétri (25 graines/boîte). Ces graines ont été mises à germer à l'obscurité, à  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en boîtes de Pétri fermées et tapissées avec du papier filtre imbibé d'eau distillée pour le lot témoin et d'eau distillée additionnée de 150 mM de NaCl pour le lot traité. Les graines germées sont dénombrées quotidiennement afin d'analyser la cinétique de germination, l'émergence de la racicule étant l'indice de la germination. Les boîtes de Pétri ont été arrosées tous les deux jours avec 2,5 ml pour maintenir l'imbibition des graines pendant 8 jours.

## **II Analyses morphologiques**

Les mesures ont été faites sur une trentaine de plantes, et sur 3 cultures différentes. Deux types de mesures ont été réalisées: (i) des mesure sur les plantes entières et (ii) des mesures sur les feuilles jeunes et âgées de plantes témoins et traitées.

Les longueurs des tiges et des racines ont été déterminées à l'aide d'une règle graduée en mm. Le diamètre au collet, la longueur et le diamètre des entres nœuds ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Les surfaces foliaires des JT, JS, AT et AS ont été calculées à partir des feuilles fraîches, à l'aide d'un logiciel (OPTIMAS 6). La longueur, le diamètre du pétiole, et la longueur de la nervure principale du foliole impaire ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

## **III Analyses écophysiologicals**

Les analyses physiologiques ont été réalisées sur des feuilles jeunes témoins et stressées (JT et JS) appartenant à des feuilles âgées témoins et stressées (AT, AS). Plusieurs paramètres écophysiologicals ont été mesurées: (i) la photosynthèse, (ii) la teneur en eau et (iii) le potentiel hydrique.

### **III-1 Mesure de la photosynthèse**

Le taux de l'assimilation nette du  $\text{CO}_2$  (A), la conductance stomatique pour le  $\text{CO}_2$  ( $g_s$ ) et le  $\text{CO}_2$  intercellulaire ( $C_i$ ) ont été déterminés à l'aide d'un analyseur portable de la photosynthèse (ADC BioScientific Ltd. Global House Geddings Road Hoddesdon Herts EN11 0NT England). Ces composantes ont été déterminées selon les équations établies par Von

Caemmerer et Farquhar (1981). L'efficacité d'utilisation de l'eau (EUE) au niveau de la feuille a été calculée à partir des données d'assimilation nette du CO<sub>2</sub> et de la transpiration foliaire suivant la formulation suivante (Rivelli *et al.*, 2002):

$$EUE = A(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/E(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

Le rapport A/C<sub>i</sub> qui permet d'expliquer le dysfonctionnement de A par rapport à la régulation stomatique, a été également calculée suivant l'équation suivante:

$g_i' = A(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/C_i (\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ . Ce dernier équivaut à une conductance interne pour le CO<sub>2</sub>, qui tient compte de la diffusion du CO<sub>2</sub> entre les espaces intercellulaires et les sites de carboxylation dans les chloroplastes et de l'activité de la Rubisco (El Aouni, 1980).

### **III-2 Mesures de la teneur en eau et du potentiel hydrique**

La teneur en eau des plantes a été mesurée sur les feuilles jeunes ou âgées, de plantes témoins et stressées. Le limbe foliaire coupé à sa base, est immédiatement pesé pour déterminer le poids frais (PF) puis séché dans une étuve à 70° afin de déterminer le poids séché (PS).

Le potentiel hydrique minimum ( $\Psi_m$ ) des feuilles jeunes et âgées, appartenant à 15 plantes témoins et 15 plantes stressées a été mesurée à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instrument compagny , model 615) à midi, au maximum de l'ensoleillement.

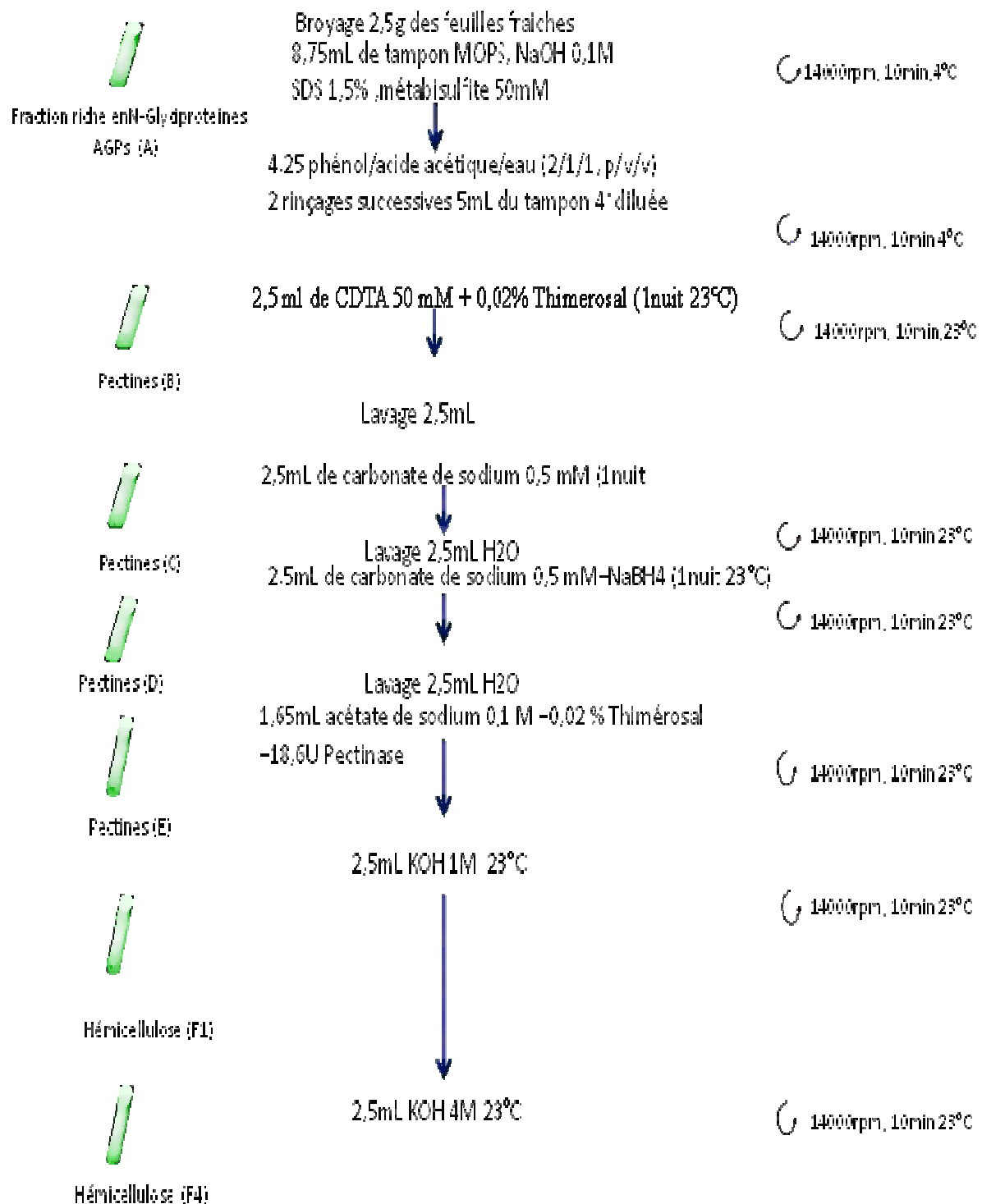
## **IV Analyse biochimique des composés pariétaux**

### **IV-1 Protocole d'extraction séquentielle des polymères**

Le protocole décrit sur la Figure 34 s'inspire des données de la littérature (Vanzin *et al.*, 2002). La première étape consiste à réduire en poudre le matériel végétal frais ou congelé (2,5 g de feuilles correspondant à 300 plantes par traitement) en présence d'azote liquide puis à le broyer dans 8,75 mL de tampon MOPS/NaOH 0,1 M pH 7, contenant 1,5% de SDS et 50 mM de métabisulfite. Le broyat est centrifugé à 21000 g pendant 10 mn à 4°C. Le surnageant (enrichi en N-glycoprotéines et AGPs) est récupéré puis stocké à 4°C (surnageant A). Le culot est mis en suspension dans 4, 25 mL dans un mélange phénol/acide acétique/eau (2/1/1, p/v/v) après deux rinçages successifs avec 5 mL de la solution du tampon précédent dilué quatre fois. Les échantillons sont ensuite placés sous-agitation au bain-marie à 40°C pendant 1 h avant d'être centrifugés (21000 g pendant 10 mn à 4°C). Après centrifugation, les surnageants sont éliminés et remplacés par 2,5 ml de CDTA 50 mM pH 7,5 avec 0,02% de Thimerosal.

Après une incubation d'une nuit à 23°C sous agitation et centrifugation (21000 g pendant 10 mn à 23°C), les surnageants sont récupérés (surnageants B enrichis en Pectines). Les culots sont lavés par 2,5 mL d'eau distillée, éliminée par centrifugation. Ensuite, les culots sont remis en suspension dans 2,5 mL de carbonate de sodium 0,5 mM (préalablement conservé à 4°C), puis placés sous agitation pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation à 21000 g pendant 10 mn à 4°C, les surnageants sont obtenus par centrifugation et neutralisés à l'acide acétique (surnageant C enrichi en Pectines). Après un lavage à l'eau distillée (2,5 mL), les culots sont cette fois remis en suspension dans 2,5 mL de carbonate de sodium 50 mM avec 40,5 mg de NaBH<sub>4</sub>. L'ajout de ces 2 réactifs est réalisé sous flux d'azote. Les échantillons sont alors placés sous agitation à 23°C pendant une nuit. Les surnageants sont obtenus par centrifugation, et neutralisés par addition d'acide acétique (surnageant D). Les culots sont lavés avec 2,5 mL d'eau distillée, puis centrifugés, et les surnageants sont éliminés. La Pectinase d'*Aspergillus niger* (Novozymes -18,6 U) diluée dans 1,65 mL d'acétate de sodium 0,1 M pH 5,2 contenant 0,02% de Thimérosal est ajoutée à chaque échantillon. Ces derniers sont alors placés sous agitation au bain-marie à 35°C pendant une nuit, puis 45 mn à 55°C et 3 mn à 100°C. Les surnageants obtenus par centrifugation, sont neutralisés avec de l'acide chlorhydrique (surnageants E enrichis en Pectines). Les culots sont enfin soumis à une extraction séquentielle des hémicelluloses avec le KOH 1 M, et 4 M pendant une nuit avec la solution d'extraction. Les deux surnageants obtenus par centrifugation à 21000 g pendant 10 mn à 23°C sont neutralisés avec l'acide acétique (F1 : KOH 1M et F4 : KOH 4M).

Les surnageants B, C, D, E, F1 et F4 sont dialysés, deux fois 12 h, contre de l'eau distillée à 4°C (membrane 6-8000 Da), puis stockés à 4°C avant analyse.



**Figure 34 :** Schéma du protocole d'extraction des polymères pariétaux des feuilles de *Medicago sativa* cv Gabès (d'après Vanzin *et al.*, 2002; modifié).

## **IV-2 Dosages colorimétriques**

La quantification des sucres est réalisée par la méthode au phénol sulfurique (Dubois, 1956), pour les oses neutres, et la méthode au méta-hydroxydiphényl (m-HDP) pour les acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973). Le principe de ces deux dosages consiste à hydrolyser les polysaccharides, sous l'action d'acide sulfurique concentré, en oses neutres (pentoses et hexoses) et en acides uroniques. Les monosaccharides libérés sont transformés en dérivés furfuraux, à haute température, qui se condensent avec le phénol (dosage des pentoses) pour donner une coloration brun-jaune, ou bien avec le méta-hydroxydiphényle (m-HDP) (dosage des acides uroniques) formant un complexe rose. Les dosages sont triplés.

### **IV 2-1 Dosage des oses neutres**

La solution à doser (200  $\mu\text{L}$ ) est mise en présence du même volume de phénol-sulfurique à 5% (réactif chromogène). Après homogénéisation des échantillons, 1 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté au mélange réactionnel. Ce mélange est alors porté à 100°C pendant 5min. Les tubes sont ensuite placés à l'obscurité durant 30 min, après refroidissement dans un bain de glace. Les absorbances sont lues à 492 nm (UV 1700 PharmaSpec, Shimadzu). Les quantités d'oses en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de glucose (0, 25, 50 et 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et d'acide glucuronique (0, 50, 100 et 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

### **IV 2-2 Dosage des acides uroniques**

Aux 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon, placés sur un bain de glace à 4°C, sont ajoutés 1,25 mL de tétraborate de sodium à 12,5 mM dans l'acide sulfurique concentré. Après homogénéisation, les tubes sont mis 5 min au bain-marie à 100°C puis sur un lit de glace. Après refroidissement, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de méta-hydroxydiphényl (m-HDP) à 0,15% dans une solution de NaOH à 0,5% sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé avant d'être placé à l'obscurité pendant 30min. Les quantités d'acides uroniques en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon d'acide galacturonique (0, 25, 50 et 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et une gamme étalon de glucose (0, 100, 200 et 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 520 nm (UV 1700 PharmaSpec, Shimadzu).

#### IV 2-3 Détermination des teneurs en oses neutres et en acides uroniques

L'interférence des oses neutres et des acides uroniques, dans les deux dosages précédemment décrits, peut être corrigée par la méthode de calcul établie par Montreuil et Spik (1963), selon la formule suivante :

$$[AU] = (DO_{m-HDP} - (a'/a) \times DO_{Phénol}) / ((ab' - a'b) / a)$$

Et les concentrations en oses neutres par celle-ci :

$$[ON] = (DO_{Phénol} - b \times [AU]) / a$$

Avec,

[AU] : concentration en acides uroniques

[ON] : concentration en oses neutres

a : pente de la droite étalon Glc (dosage Dubois)

b : pente de la droite étalon AGal (dosage Dubois)

a' : pente de la droite étalon Glc (test m-HDP)

b' : pente de la droite étalon AGal (test m-HDP)

DO<sub>phénol</sub> : résultat de la DO du dosage Dubois de l'échantillon à doser (moyenne des triplicatas)

DO<sub>m-HDP</sub> : résultat de la DO au test m-HDP de l'échantillon à doser (moyenne des triplicatas)

#### IV-3 Composition monosaccharidique

Cette analyse est réalisée par chromatographie liquide-gaz (CLG) après transformation des oses en dérivés O-triméthylsilylés. La préparation est effectuée selon le procédé de Kamerling *et al* (1975), modifié par Montreuil *et al* (1986).

A 200 µg de glucides sont ajoutés 20 µg de mésoinositol, servant de témoin interne. Après lyophilisation, l'étape de méthanolyse est réalisée en condition anhydre, dans une boîte à gants saturée en azote. Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides par ajout de 1 mL de méthanol/HCl 3 M (Supelco). La réaction de méthanolyse est stoppée après 24h à 80°C par séchage de l'hydrolysate sous flux d'azote. La délipidation est ensuite réalisée par 3 extractions successives à l'heptane (v/v), après avoir repris l'extrait sec par 1 mL de méthanol. Le mélange est homogénéisé par agitation. La phase supérieure contenant l'heptane est éliminée. La phase méthanolique est ensuite séchée sous flux d'azote. L'étape de dérivation est réalisée à l'aide de 100 µl de pyridine anhydre et 100 µl de Bis-

SilylTriFluoroAcétamide (BSTFA + 1 % TMCS AllTech® GC Reagent), pendant 2h à l'étuve à 27°C. Enfin, le stockage au congélateur, au moins une nuit, est réalisé avant l'injection de 1 µL en CLG.

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont identifiés par CLG, par comparaison avec des témoins à l'aide d'un chromatographe Perichrom équipé d'une colonne apolaire CPSIL-5CB DBI OV 101 et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ; le gaz vecteur est l'azote. La température de l'injecteur est fixée à 260°C. L'élévation de la température du four est programmée de 130 à 210°C à raison de 2°C min<sup>-1</sup>, avec un palier de 5 min à 190°C, puis de 210 à 260°C à raison de 5°C min<sup>-1</sup>. Le chromatographe est piloté par le logiciel Winilab III (Perichrom).

A fin de déterminer la nature des oligosaccharides des xyloglucanes majoritaires, après extraction, les échantillons F1 et F4 sont soumis à trois cycles de rinçage par de l'éthanol à 70% (v/v) avec une incubation pendant 15 minutes à 70° C. A chaque étape, le surnageant est éliminé par centrifugation. Le culot ainsi obtenu est lavé à l'eau et séché avant digestion avec de la cellulase OnozukaR-10(Serva) dans de l'acétate d'ammonium 50mMpH 5. Enfin, la séparation des oligosaccharides est réalisée par chromatographie en phase liquide sur une colonne Hypercarb (0.32x150mm, Thermo-Fisher).

## **V Analyses histologiques**

### **V-1 Préparation des échantillons**

#### **V-1-1 Fixation à l'alcool et coloration au Fasga**

Des échantillons (tiges, feuilles) ont été prélevés dans la serre et fixés dans de l'alcool éthylique à 70%, fixateur qui permet leur conservation pendant plusieurs mois. Dans ces échantillons (racines, tiges, pétioles, pulvini, nervures principales de feuilles) des sections transversales (2 à 4 µm d'épaisseur) ont été obtenues et colorées par le Fasga (Tolivia and Tolivia, 1987). La réaction de Fasga révèle la présence d'éléments lignifiés, colorés en rouge vif, et d'éléments pectocellulosiques, colorés en bleu. Au moins 6 sections, de chaque échantillon, ont été immergées dans des coupelles de verre contenant 2 L de solution Fasga diluée au ¼ dans l'eau distillée. La coloration a été obtenue après une nuit à température de la pièce dans une enceinte fermée pour éviter l'évaporation. Après coloration les coupes ont été lavées dans l'eau distillée et déposées sur des lames de verre dans une goutte de mélange

glycérol/eau distillée (50% v/v). Après ajout de la lamelle les sections ont été observées au microscope Zeiss Axioplan, équipé d'une camera Kappa pour obtenir des images numérisées. La solution mère de « Fasga » contient pour 65 mL: 3 mL de safranine à 1 % (1g de safranine + 1g d'acétate de sodium + 75 mL alcool éthylique à 100% + 25 mL d'eau distillée+ 2 mL d'aldéhyde formique), 11 ml de bleu Alcian 8GX à 0.5 % (500 mg de bleu Alcian + 100 mL d'alcool éthylique à 100%), 30 mL de glycérol à 99%, 1 mL of d'acide acétique pur et 20 mL d'eau distillée.

### **V-1-2 Fixation et Inclusion des feuilles en « London Resin White » (LRW)**

Le limbe foliolaire a été découpé transversalement en rubans de 2mm et fixées dans une solution contenant 0.5% de glutaraldehyde et 2% paraformaldéhyde (PFA) dans du tampon Sörensen à 0.2 M, pH 7.2 permettant d'immobiliser les molécules *in situ* en préservant l'aspect structural des tissus. La fixation est réalisée à l'obscurité pendant 1h à température ambiante. Six lavages de 20 min chacun sont ensuite effectués dans le tampon Sörensen additionné de 7,5% de saccharose pour éliminer le mélange fixateur. Le premier lavage se faisant à température ambiante, puis les suivants sur glace. Ensuite, les échantillons ont subi une postfixation à l'acide osmique  $O_3O_4$  1% (v/v) dans le tampon Sörensen (0,2M, pH 7,2) durant 5min. Trois lavages successifs de 5 min dans ce tampon Sörensen (0,2M, pH 7,2) permettent d'éliminer l'acide osmique en excès. L'étape suivante est la déshydratation des échantillons par des bains successifs de 5 min dans des solutions d'éthanol de concentration croissante (20%, 50%, 70%, 95%, et 2 x 100%). Aussitôt, le dernier bain d'éthanol absolu réalisé, les échantillons sont imprégnés dans la résine LR White Medium (Pelco International, Canada, réf/18181,<http://www.tedpella.com>): 1er et 2ème bains à 1/3 de LR White dans de l'éthanol absolu pendant 2 x 30 min à 4°C ; le 3ème et 4ème bains à 2/3 de LR White dans de l'éthanol absolu et enfin, le 5ème et 6ème bains à 100% de LR White pendant 1h, puis une nuit à 4°C. Finalement, les échantillons sont disposés dans des gélules remplies de résine pure. Ces dernières sont rebouchées, puis placées à l'étuve à 57°C, pendant 24 h afin d'assurer la polymérisation de la résine. Les échantillons ainsi inclus ont été coupés à l'ultramicrotome (OM U3, Reichert, Autriche) pour obtenir des coupes semi-fines (quelques  $\mu$ m) et ultrafines (600 nm).



## **V-2 Observation au microscope photonique**

Les coupes semi-fines sont observées au microscope photonique après coloration au bleu de toluidine (C.I.52040). Il fait parti des colorants Quinones-imides, qui sont des colorants sulfurés, dans lesquels deux noyaux benzéniques sont unis par un anneau fermé constitué d'un atome d'azote, d'un atome soufre et de quatre atomes de carbone. C'est une coloration de base qui donne aux constituants acides différentes nuances de bleu. Ce colorant est utilisé visualiser les structures tissulaires des coupes semi-fines de feuilles de luzerne enrésinées. Son utilisation sur ces coupes permet aussi de vérifier le bon positionnement de l'échantillon sur le microtome, ainsi que la localisation précise de la zone coupée. La solution de bleu de toluidine à 1% est préparée comme suit: 1g de bleu de toluidine + 2g de borate de sodium (Borax) dans 100 ml d'eau distillée. Quelques gouttes de cette solution filtrée sont posées sur les coupes semi fines recueillies sur une lame de verre, alors déposée sur une plaque chauffante à 60°C. Après 30 secondes de coloration à chaud les coupes sont lavées avec de l'eau distillée et séchées. Ainsi, les tissus prennent différentes teintes de bleu, notamment au niveau des parois, suivant leur composition et acidité. Une paroi lignifiée apparaît bleu foncée intense alors qu'une paroi riche en pectine (acide) est plus claire.

## **VI Techniques immunologiques**

Les anticorps primaires utilisés proviennent de Plant Probes, UK. Development et sont listé dans le tableau 1. Tous les grands types de polymères pariétaux ont été ainsi analysés.

### **VI-1 Immuno-histocytologie**

#### **VI-1-1 Préparation des échantillons**

Les coupes ultra-fines sont récupérées sur des grilles en or recouvertes d'une membrane de Parlodion (Pelco International, Canada, ref : 01810G-F) pour les expérimentations d'immuno-marquage.

##### **VI-1-1-1 Immuno-marquage à l'or**

Le marquage immunocytochimique est basé sur la spécificité de la liaison antigène-anticorps. Cette interaction dépend de plusieurs facteurs, tels le pH et la molarité. Les conditions

d'expérimentation ont été décrite par Boughanmi *et al.*, 2010. C'est un marquage indirect des polymères, qui s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à fixer un anticorps monoclonal primaire directement sur l'épitope spécifique du polymère pariétal puis à fixer un second anticorps qui reconnaît le premier. L'anticorps secondaire porte un traceur métallique qui est l'or pour cette étude. Ces billes d'or chargées négativement s'adsorbent sur la partie constante des anticorps. Ces billes métalliques sont opaques aux électrons, donc apparaissent « noires » (opaques aux électrons) en MET. Les incubations sur les différents réactifs ont été effectuées sur des gouttes de 50 µL déposées sur du parafilm, sauf pour les anticorps (gouttes de 15µL) réalisées dans des plaques Terasaki. La saturation des sites de fixation aspécifique est réalisée dans la solution de blocage (PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1%, BSA 2%) pendant 45 min. Trois rinçages de 10 min chacun dans le PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1% sont suivis d'une incubation de 12 h en une chambre humide avec l'anticorps primaire (billes de 10 nm dans le serum anti-rat employé à la dilution de 1/5, ou de 15nm dans l'anti-souris pour CCRCM1). Après un lavage de 10 min par une solution de PBS 1X pH7,4 ,Tween 20,0,1% et trois lavages de 10 min, chacun par une solution de PBS 1X pH7,4 ,Tween 20, 0,5%, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'or (dilution 1/20) durant trois heures en chambre humide (Tableau 1).

Puis, plusieurs lavages (PBS 1X pH 7,4, Tween 20, 0,5% : 3 x 10 min ; eau ultra-pure : 2 x 10 min) sont effectués. Les coupes sont ensuite séchées et contrastées, juste avant l'observation au MET, avec l'acétate d'uranyle saturé dans de l'eau, pendant 7 min, et le citrate de plomb, pendant 3 min, afin d'obtenir une meilleure résolution d'image.

Les anticorps proviennent de "Plant probes, UK" et du "Complex Carbohydrate Research Center, USA" et sont listés dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Caractéristiques des différents anticorps utilisés

	Dénomination	Type de marquage/ Utilisation	Isotype	Type	Source animal	Dilution	Fournisseur	Références
Anticorps primaire	LM5	(1,4)- $\beta$ -D-galactane	IgG	monoclonal	Rat	1/5 <sup>ème</sup>	PlantProbes	Jones et al., 1997
	LM6	(1,5)- $\alpha$ -L-arabinane	IgG	monoclonal	Rat	1/5 <sup>ème</sup>	PlantProbes	Willats et al., 1998
	LM15	Xyloglucane	IgG2c		Rat	1/5 <sup>ème</sup>	PlantProbes	Marcus et al., 2008
	JIM5	Homogalacturonane (peu ou non méthyle-estérifié)	IgG2a	monoclonal	Rat	1/5 <sup>ème</sup>	CarboSource	Knox et al., 1990
	JIM7	Homogalacturonane (méthyle-estérifié)	IgA	monoclonal	Rat	1/5 <sup>ème</sup>	CarboSource	Knox et al., 1990
	JIM8	AGP		monoclonal	Rat	1/5 <sup>ème</sup>	CarboSource	Pennell et al., 1989
	JIM13	Arabinogalactan /AGP	IgM	monoclonal	Rat	1/5 <sup>ème</sup>	CarboSource	Knox et al., 1991
	CCRC-M1	$\alpha$ -L-xyloglucane fucosylé, rhamnogalacturonane	IgG1	monoclonal	Souris	1/5 <sup>ème</sup>	CarboSource	Puhlmann et al., 1994
Anticorps secondaire	EM.GAM15	IgG de souris/ or colloïdal 15 nm			Chèvre	1/20 <sup>ème</sup>	BBInternational	
	Anti-Mouse IgG-PA	IgG de souris/ Phosphatase Alcaline			Chèvre	1/20 <sup>ème</sup>	Sigma	
	EM.GAT10	IgG de rat/ or colloïdal 10 nm			Chèvre	1/20 <sup>ème</sup>	BBInternational	
	Anti-Rat IgG-PA	IgG de rat/ Phosphatase Alcaline			Chèvre	1/20 <sup>ème</sup>	Sigma	

### VI-1-1-2 Observation Microscopie Electronique à Transmission (MET)

L'analyse et l'acquisition des images ont été effectuées à l'aide d'un MET 80 kV (JEM-100CX2, JEOL, France) couplé à une caméra. Les billes d'or sont opaques aux électrons et leur dénombrement a été effectué manuellement et sur des surfaces de 200 nm<sup>2</sup>.

### VI-2 Analyse immunologique par dot blot de fractions pariétales

Les Dot-Blots sont réalisés sur des membranes en nitrocellulose (BioTrace NT, Amersham) préalablement activées. Pour cette activation, les membranes sont placées quelques secondes dans un bain d'éthanol à 20% et après 3 rinçages à l'eau distillée, celles-ci sont équilibrées dans du tampon TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,6). Des quantités variables de

polysaccharides témoins, de fractions polysaccharidiques isolées suivant la procédure préconisée par Vanzin *et al* (2002) ont été déposées sur des membranes de nitrocellulose (BioTrace NT, Amersham) avec un « manifold blotter » (SRC 96 D, Schleicher and Schuell). Après dépôt de 200 µl d'échantillons, les membranes sont placées 6 h dans du TBS contenant 5% de lait. Après cette étape de saturation, les membranes sont incubées une nuit avec un anticorps primaire dilué au 1:100 dans le tampon TBS. Les membranes sont lavées ensuite 3 fois 15 min dans un tampon TBS avant d'être incubées 1 h avec un IgG secondaire anti-rat (Whole molecule alkaline Phosphatase), anti-anticorps primaire dilué au 1:10000 dans du TBS. Après 3 lavages de 15 min dans du TBS, les polysaccharides sont révélés par une solution de NBT/BCIP (1-Step™ NBT/BCIP, Thermo Scientific). La réaction est arrêtée dans un excès d'eau.

Les sucres témoins utilisés sont les suivants : Pectines d'écorce de citron (Sigma-Aldrich), Xyloglucanes de graine de tamarin (Megazyme), Xylanes de hêtre (Sigma-Aldrich), 1,4-D-Mannopentaose (Megazyme).

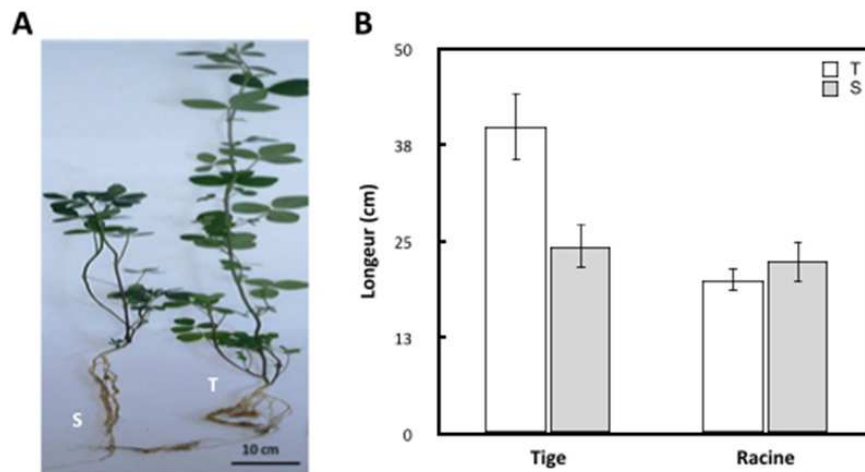
# CHAPITRE 1 EFFETS DU STRESS SALIN SUR LA MORPHOLOGIE ET LA PHYSIOLOGIE DE *M. sativa* cv Gabès

Dans cette étude, nous avons cherché à suivre la réponse de *Medicago sativa* cv Gabès à une contrainte saline, correspondant à un apport progressif de NaCl jusqu'à une valeur finale de 150 mM suivant un protocole décrit par Boughamani *et al.*, (2003). Afin de normaliser au mieux les cultures nous permettant ainsi de travailler sur un matériel biologique le plus homogène possible, des analyses morphologiques et physiologiques ont été réalisées sur les différentes cultures.

## I Effets du stress salin sur le développement de *M. sativa* Gabès cv Gabès

### I-1 Effets du stress sur la croissance

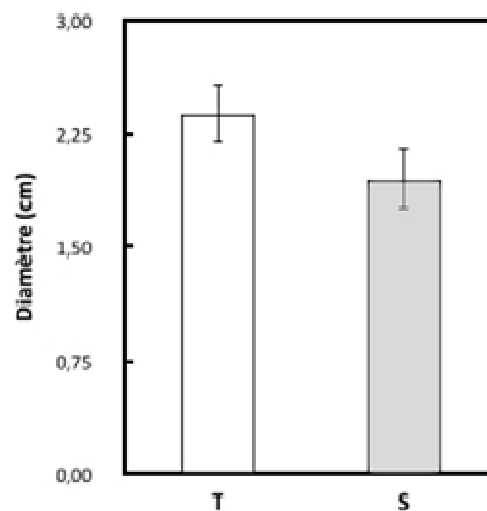
Après 5 semaines de culture, la luzerne traitée avec 150 mM NaCl présente une réduction de croissance de l'appareil aérien (Figure 34 A).



**Figure 34 :** Effets du stress salin sur la croissance en longueur de *M. sativa* cv Gabès. **A**, photographie des plantes après 5 semaines de culture, **B**, Longueur des tiges et des racines des plantes témoin (blanc) et des plantes traitées (gris). T, plantes témoins, S, plantes traitées avec 150 mM de NaCl pendant 5 semaines. Chaque valeur représente la moyenne de 75 mesures individuelles. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 5%.

La réduction de croissance des parties aériennes affecte à la fois la tige principale et les axes secondaires. Concernant l'axe principal, chez les plantes traitées une réduction de 39% de

l'allongement de la tige est observée par rapport aux témoins (Figure 34 **B**). Par contre, le traitement n'a pas d'effet significatif sur la croissance en longueur de la racine (Figure 34 **B**). Le rapport de la longueur des tiges sur celle des racines est diminué de 50% entre les plantes témoins et les plantes traitées avec 150 mM de NaCl. Une évolution de ce rapport a également été décrite pour le coton (Meloni *et al.*, 2001). De plus, le sel exerce un effet dépressif sur la croissance en diamètre (- 18% au niveau collet entre témoin et traité) de *M. sativa* cv Gabès (Figure 35).



**Figure 35** : Effets du stress salin sur la croissance en diamètre au collet de la tige principale de *M. sativa* cv Gabès. **T**, plantes témoins, **S**, plantes traitées avec 150 mM de NaCl pendant 5 semaines. Chaque valeur représente la moyenne de 75 mesures individuelles. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 5%.

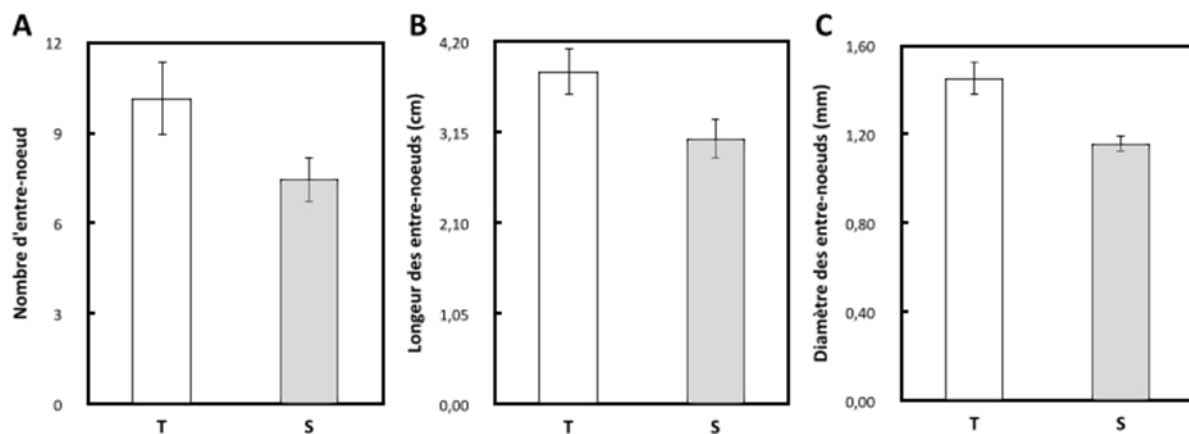
Des résultats similaires montrant un effet du stress salin sur les parties aériennes ont été mis en évidence pour des arbres de mangrove comme *Avicennia marina* (Cherian *et al.*, 1999) et *Bruguiera gymnorhiza* (Takemura *et al.*, 2000), mais également chez des Fabaceae plus proches de la Luzerne, comme *Pisum sativum* (Hernandez *et al.*, 1995). Tous les travaux réalisés sur ces plantes montrent que le stress, s'il induit une réduction de la biomasse aérienne, entraîne simultanément une réduction des parties racinaires. Dans nos expériences, nous n'avons pas mis en évidence d'effets du stress salin sur la croissance des racines. L'acclimatation des plantes, à des doses croissantes en NaCl, peut permettre d'expliquer ce résultat (Etehadnia *et al.*, 2010). En effet, ces auteurs suggèrent qu'un pré-traitement des plants de pomme de terre avec des doses croissantes de NaCl augmente la résistance au sel de celles-ci en modifiant le rapport  $K^+/Na^+$  dans les parties aériennes au dépend des racines. Dans ce modèle, l'acide abscissique (ABA) serait alors la phytohormone de régulation de la croissance différenciée des racines et des tiges des plantes soumises à des contraintes, saline ou autres (Sharpe et LeNoble 2002).

Au cours de cette première phase du travail, nous avons ainsi démontré que les parties aériennes de *Medicago sativacv* Gabès, acclimatée à des doses croissantes en sel, présentaient une réduction importante de la biomasse aérienne. Afin de préciser l'impact du stress salin sur la phénologie de la plante, une étude plus fine de ces dernières a été entreprise.

## I-1-2 Effets du stress sur le développement des entre-noeuds

### I-1-2-1 Données biométriques

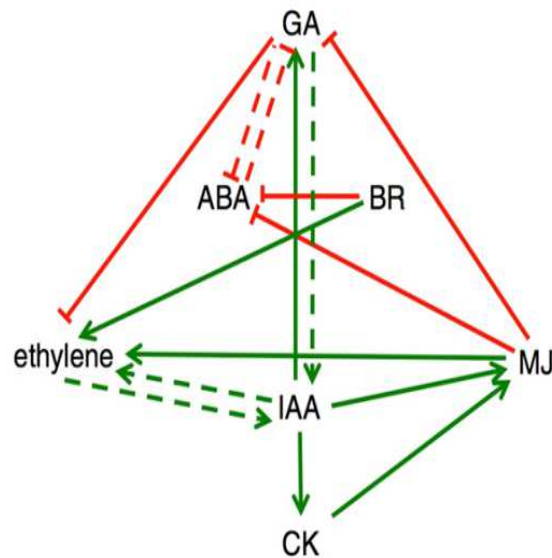
Quelque soit le paramètre des entre-noeuds mesurés (nombre, taille, et diameter) la contrainte saline induit une réduction de leur développement (Figure 36). Une diminution de 26% du nombre, de 20% de la longueur et du diamètre des entre-noeuds entre les plantes témoins et stressées est observée. La réduction du nombre des entre-noeuds, ainsi que la diminution de leurs longueurs permettent d'expliquer en partie la réduction de la croissance globale des parties aériennes de 39% (Figure 36).



**Figure 36** : Effets du stress salin sur le nombre (A), la longueur (B) et le diamètre (C) de la tige principale de *M. sativa* cv Gabès. T, plantes témoins, S, plantes traitées avec 150 mM de NaCl pendant 5 semaines. Chaque valeur représente la moyenne de 75 mesures individuelles. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 5%.

La réduction de la taille des tiges, des entre-noeuds, et de leur diamètre respectif, peut s'expliquer soit par une diminution du nombre et/ou de la taille des cellules soit par une réduction de la biosynthèse de la biomasse produite par l'appareil photosynthétique. En effet, de nombreux auteurs ont montré qu'un stress salin affecte la photosynthèse (Munns et Termatt, 1986; Chaudhuri et Choudhuri, 1997; Soussi *et al.*, 1998; AliDinar *et al.*, 1999; Romeroaranda *et al.*, 2001; Parida et Das, 2005), ce qui induit corrélativement une perte de biomasse. L'inhibition de la croissance des entre-noeuds peut, également, être la conséquence d'un dysfonctionnement hormonal (Ross *et al.*, 2010). Dans ce modèle (Zentella *et al.*, 2007,

modifié Ross *et al.*, 2010), l'acide abscissique (ABA) contrecarre les actions des acides gibbéréliques (GA) bloquant ainsi l'élongation des entre-nœuds (Figure 36 ).



**Figure 37 :** Modèle d'interaction hormonale sur le contrôle de la croissance des entre-nœuds chez le pois élaboré par Zentella *et al.* (2007) et modifié par Ross *et al.* (2010). **GA**, Acide gibbérélique, **ABA**, acide abscissique, **BR**, brassinostéroïdes, **IAA**, auxine, **CK**, cytokinine, **MJ**, méthyl jasmonate.

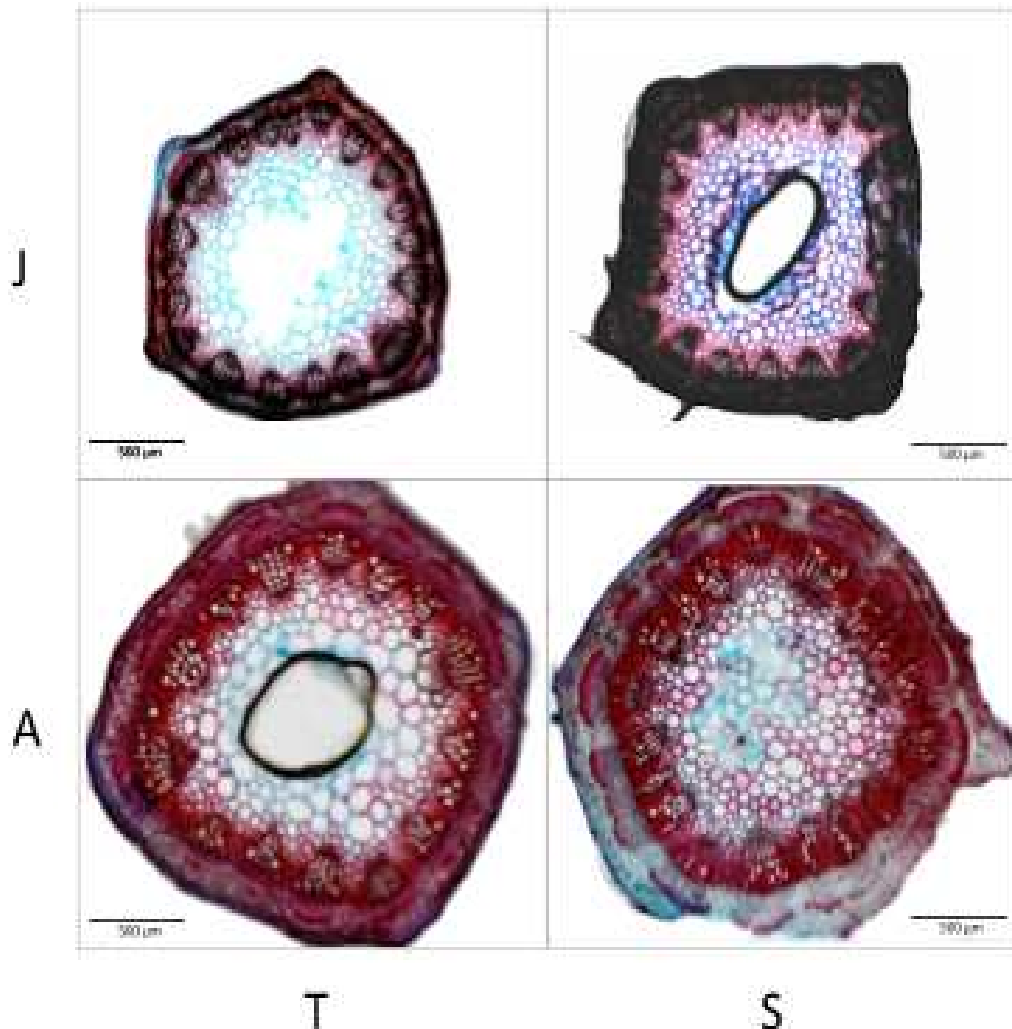
Ainsi, l'ABA dont nous avons vu qu'il était produit par les racines des plantes stressées serait exporté vers les parties aériennes, où il pourrait déréguler le fonctionnement d'autres hormones comme les GA. Ainsi, l'ABA induirait un effet dépressif sur les GAs et une dérégulation du fonctionnement des auxines (IAA). Ces 2 dernières hormones sont connues pour être impliquées dans les divisions cellulaires et l'allongement des cellules, et donc dans la croissance des tissus. Ce dérèglement hormonal va, de ce fait, modifier l'organogenèse et la morphogenèse des entre-nœuds. Ainsi, les effets cumulés des modifications osmotiques induites par le sel et des interactions antagonistes ABA, IAA et GAs peuvent apporter des éléments d'explication de la réduction de croissance en longueur et en diamètre des entre-nœuds. Afin de vérifier cette hypothèse, une observation des tissus constituant les entre-nœuds jeunes et âgés a été réalisée.

### I-1-2-2 Données histologiques

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés exclusivement aux entre-nœuds correspondant aux stades de développement qualifié de jeune, soit les 10<sup>ème</sup> (JT) et 7<sup>ème</sup> (JS)



entre-nœuds des plantes témoins et stressées, et les entre-nœuds âgés correspond au 2<sup>ème</sup> (AT, AS) entre-nœud des plantes témoins et stressées.

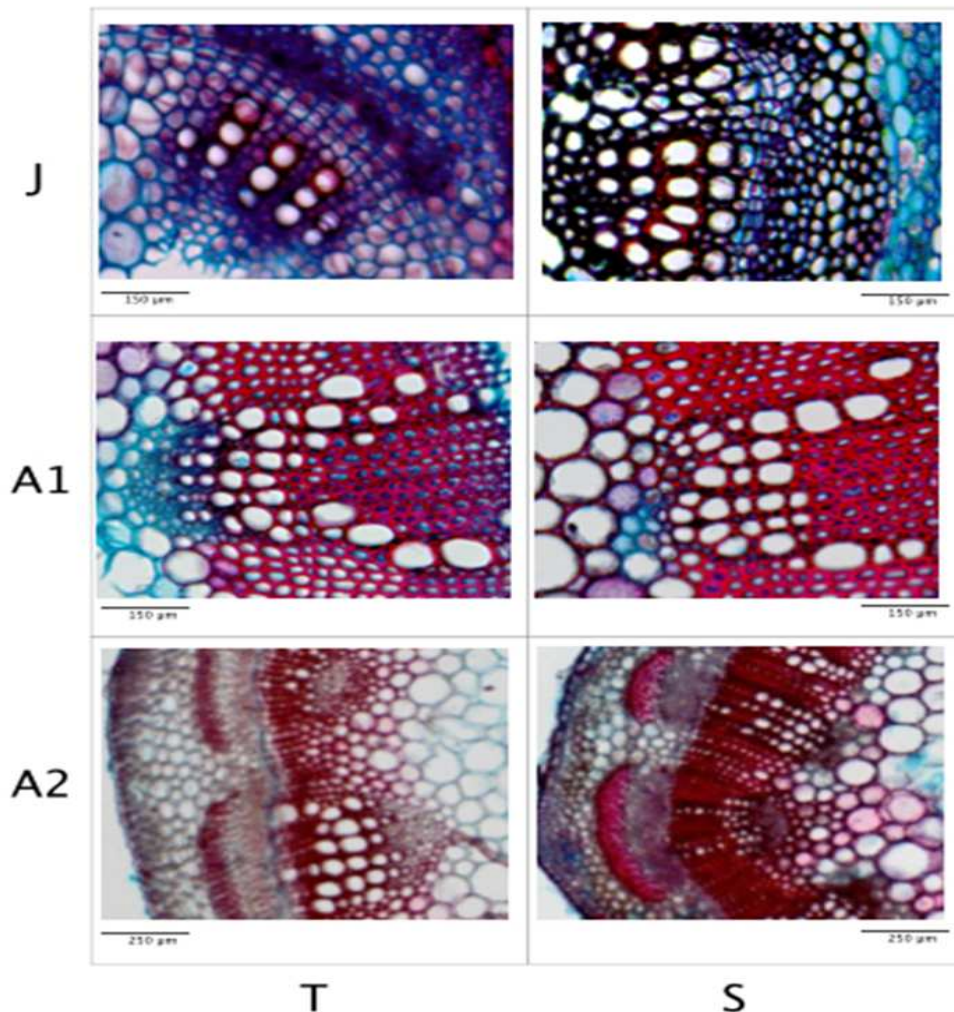


**Figure 38** : Coupe transversale colorée au FASGA d'entre-nœuds jeunes (**J**) et âgés (**A**), des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**).

Les jeunes entre-nœuds (**J**) présentent des sections anguleuses soutenues par des amas de collenchymes, des anneaux vasculaires avec des faisceaux triangulaires, lignifiés (en rouge) dans fibres supralibériennes (phloémien) et xylémiennes. Les entre-nœuds âgés des plantes témoins (**AT**) présentent des faisceaux libéro-ligneux contenant des alignements des vaisseaux de taille décroissante vers le pôle de régression ligneux, alors que dans les plantes traitées (**AS**) les faisceaux libéro-ligneux sont plus larges que hauts avec de gros vaisseaux près du pôle ligneux. Les cellules du parenchyme médullaire sont plus grosses dans les entre-nœuds des plantes témoins (**JT**, **AT**) que dans les entre-nœuds des plantes traitées (**JS**, **AS**). Echelle = 500 µm.

Le diamètre des entre-nœuds des plantes soumises à la contrainte saline, **JS** et **AS**, est moindre que celui mesuré au niveau des plantes témoins, **JT** et **AT**, avec cependant un effet plus marqué pour les parties les plus anciennes de la tige, où la réduction est ~18%. La

réduction en diamètre des entre-nœuds jeune et âgé pourrait s'expliquer en partie par la taille des cellules du parenchyme médullaire (Figure 39).



**Figure 39** : Faisceaux libéro-ligneux colorés au FASGA d'entre-nœuds jeunes (**J**) et âgés (**A1**, **A2**), des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**).

Les faisceaux libéro-ligneux des entre-nœuds jeunes ont une organisation similaire mais moins ordonnée et différent au niveau du cambium qui est continu chez les plantes stressées (**JS**) permettant la production de dérivés xylémiens lignifiés. Dans les entre-nœuds âgés (**A1**) le pachyte est continu et plus développé chez les plantes stressées (**A1S**). Les plantes stressées (**A1S**) ont de nombreuses fibres xylémiennes et des vaisseaux larges, plus nombreux dans la région primaire du xylème. La lignification des fibres supra-libériennes les plus externes (**A2T**) est plus marquée après le stress (**-A2S**) de même que celle de l'extrémité du parenchyme proxylémien et du pourtour de la moelle. Echelle = 150 µm de JT, JS, A1T et A1S, et 250 µm A2T et A2S. Echelle = 150 µm JT, JS, A1T et A1S; 250 µm A2T et A2S.

En effet, les cellules du parenchyme médullaire sont plus grosses dans les entre-nœuds des plantes témoins (Figures **JT**, **AT**) que dans les entre-nœuds des plantes traitées (Figures **JS**, **AS**). Un des effets du stress salin est donc de réduire la taille des cellules sans affecter de façon significative le nombre des cellules du parenchyme médullaire. Le modèle proposé par Zentella *et al.*, 2007 modifié Ross *et al.*, 2010 trouve chez *Medicago sativa* cv Gabès une confirmation. Le dysfonctionnement hormonal induit par l'ABA pourrait être médié dans la

cellule par la voie de signalisation SOSs (Salt Overly Sensitive) (Mahajan *et al.*, 2008), couplée à l'activité de kinases particulières, les MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), connues pour réguler la division cellulaire, le développement de certains organes (Widmann *et al.*, 1999; Chen et Thorner, 2007; Colcombet et Hirt, 2008). Ces modifications sont impliqués dans la tolérance des glycophytes, à la contrainte saline (Zhu *et al.*, 2001).

Au delà de la taille des cellules, la contrainte saline affecte le fonctionnement de l'assise cambiale. En effet, le développement d'assise libéro-ligneuse inter-fasciculaire est précoce, entraînant la formation d'un pachyte continu dans les jeunes entre-noeuds des plantes traitées par le sel (Figure 39 **JS**). La différenciation des cellules cambiales en fibres xylémiennes et en vaisseaux est également fortement modifiée entre les plantes témoins et les plantes traitées par 150 mM de NaCl. Dans les entre-noeuds des plantes stressées, les vaisseaux sont petits, peu nombreux avec des fibres xylémiennes abondantes (Figure 39 **A1T-A1S**). Il en résulte une perte de l'alignement des vaisseaux du bois dans les tiges des plantes traitées (Figure 39 **A1S**). L'ensemble des modifications observées est toujours plus prononcée avec l'âge des tiges (Figure 39 **JS-A1S**). De plus, le sel induit des modifications pariétales quantitatives et qualitatives, telles que l'épaississement des parois des fibres supra-libériennes et la lignification des parenchymes xylémien et médullaire sur 4 à 5 assises bordant les pôles de régression vasculaire (Figure 39 **A1T-A1S**). Outre la différenciation des tissus formant le bois, le cambium va participer à la différenciation du phloème. Ici encore le stress salin induit des modifications avec une lignification importante des fibres supra-libériennes (Figure 39 **A2T-A2S**). De nombreux auteurs ont mis en évidence un effet du stress salin sur l'accumulation de lignine, plus particulièrement dans les racines comme chez la tomate (Gowri *et al.*, 1991; Espartero *et al.*, 1994; Quiroga *et al.*, 2000; Sanchez-Aguayo *et al.*, 2004). Cependant, aucune donnée n'est à ce jour, disponible quant à un effet du stress salin sur la lignification des tiges.

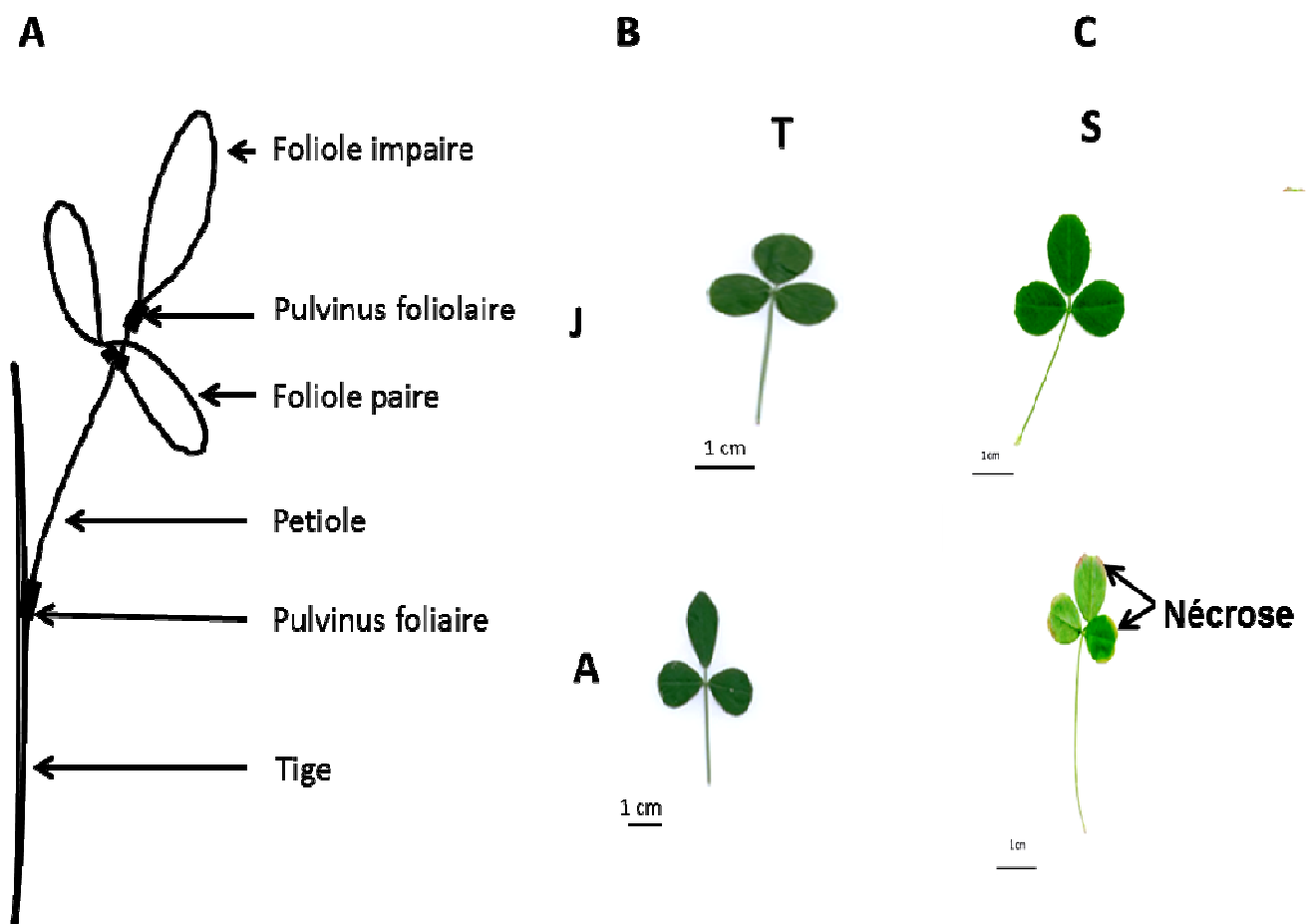
En résumé, l'effet du sel, dans les entre-nœuds, a été observé sur la structure des tissus vasculaires et de la moelle. Le traitement avec 150 mM de NaCl accélère le fonctionnement du cambium dans les entre-nœuds jeunes (installation précoce d'un pachyte continu) et induit une lignification accrue des fibres supra-libériennes, des éléments xylémiens et de la région médullaire adjacente au bois. L'effet, marqué dans la partie caulinaire âgée, par rapport à la jeune, sera-t-il retrouvé dans les feuilles de ces deux étages ? C'est le résultat présenté dans le paragraphe suivant.

## II Effets du stress salin sur l'histo-morphologie foliaire de *M. sativa*cv

### Gabès

#### II-1 Effets du stress sur la morphologie des feuilles jeunes et âgées

La feuille composée trifoliée de *M sativa* comprend un pétiole articulé sur la tige par un *pulvinus* très rudimentaire, deux folioles paires et une foliole impaire terminale elle même articulées sur le pétiole par des *pulvini* foliolaires (Figure 40 A).

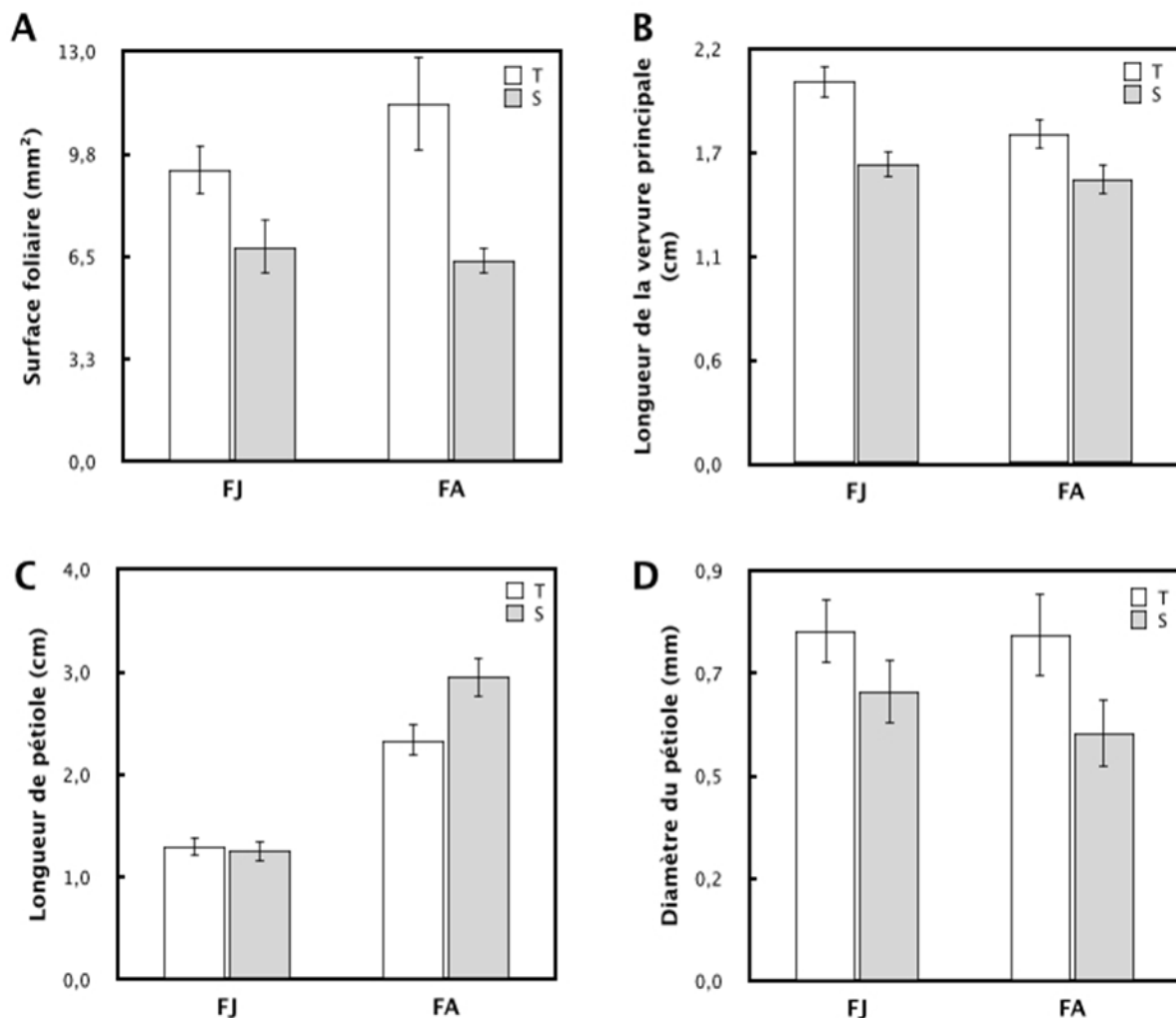


**Figure 40 :** A, Représentation schématique de la feuille composée trifoliée de *M. sativa* ; B, Feuilles jeunes (J) et âgées (A), des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

On notera une différence morphologique importante entre les feuilles jeunes et âgées des plantes témoins (foliole ronde *versus* foliole oblongue) et une différence de taille, de forme et de couleurs entre les folioles des feuilles jeunes et âgées des plantes stressées, avec pour ces dernières l'apparition de nécroses.

En l'absence de stress salin, une évolution dans la forme et la taille du limbe des folioles en fonction de l'âge a été observée chez *M. sativa*. (Figure 40 B, JT-AT). En effet, les folioles des feuilles jeunes (Figure 40 B, JT) présentent une forme oblongue alors qu'elles sont arrondies pour les feuilles âgées (Figure 40 B, AT). Pour les plantes traitées avec 150 mM de NaCl, la morphogenèse foliaire est fortement modifiée quant à la forme, à la couleur (Figure

40 **BJS-AS**) et à la surface des limbes foliaires (Figure 41 **A**), mais également quant à la longueur et au diamètre du pétiole (Figure 41 **C, D**). Outre les modifications de forme des folioles des feuilles, est mise en évidence une différence de coloration des limbes foliaires entre les feuilles jeunes et âgées (Figure 40 **B, JT-AT**). En effet, les limbes des folioles âgées sont plus jaunes soulignant l'existence d'une chlorose induite par NaCl. Plus encore, les folioles des feuilles âgées montrent des nécroses de la région périphérique pouvant se développer vers l'intérieur du limbe (Figure 40**B, AS**).



**Figure 41** : Effets du stress salin sur la surface foliaire (**A**), la longueur de la nervure principale (**B**), la longueur (**C**) et le diamètre (**D**) du pétiole des feuilles jeunes (**FJ**) et âgées (**FA**) de *M. sativa* cv Gabès. **T**, plantes témoins, **S**, plantes traitées avec 150 mM de NaCl pendant 5 semaines. Chaque valeur représente la moyenne de 75 mesures individuelles. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 5%.

Le traitement entraîne une réduction de ~44% de la surface assimilatrice et ceci particulièrement dans les feuilles âgées sans affecter, dans les mêmes proportions, la nervure

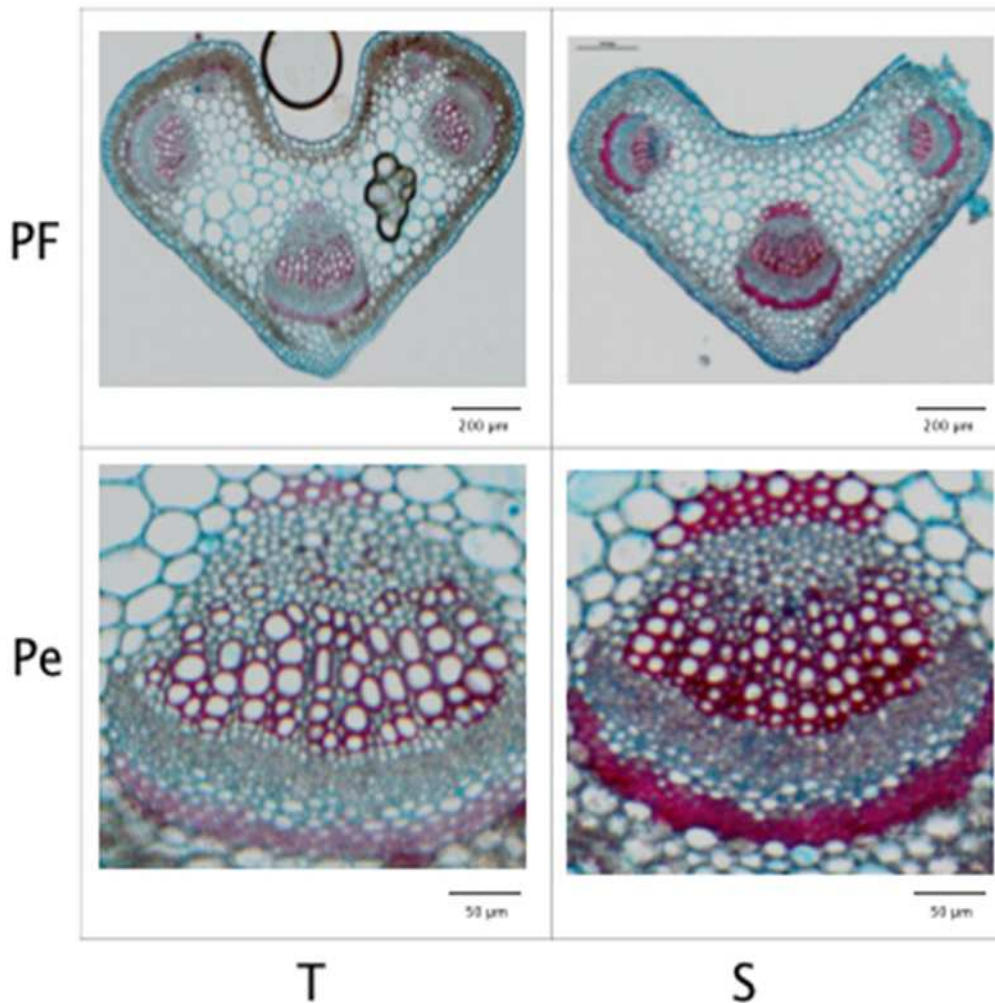
principale de la foliole impaire (-22%). Pour ce qui est de la longueur des pétioles et de leur diamètre, l'effet du sel est moindre et affecte principalement les feuilles âgées avec des réductions de taille respectivement de 27% et 17%. Le développement des feuilles, l'apparition de nécroses et/ou l'accélération de la sénescence, comme les réponses des feuilles jeunes par rapport aux feuilles âgées, ont été décrits par de nombreux auteurs (Vera-Estrella *et al.*, 2005; Yasar *et al.*, 2006; Munns et Tester, 2008; Wang *et al.*, 2012; Kazachkova *et al.*, 2013). Ainsi, chez le riz et *Eutrema*, les jeunes feuilles sont protégées quant à l'accumulation de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  à cause d'une expression réduite de l'antiport  $\text{SOS1 Na}^+/\text{H}^+$  dans ces dernières par rapport aux feuilles âgées (Taji *et al.*, 2004; Vera-Estrella *et al.*, 2005; Kant *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Kazachkova *et al.*, 2013). D'autres mécanismes comme l'immobilisation des ions toxiques dans les racines et/ou leurs stockages dans les tiges peuvent expliquer la protection des feuilles jeunes (Lessani et Marschner, 1978; Apse *et al.*, 1999). En conséquence, seules les feuilles plus âgées vont devoir réajuster leur osmolarité cellulaire ce qui entraînera, pour ces dernières, une réduction de la croissance, une baisse de la photosynthèse (Saied *et al.*, 2005; Keutgen et Keutgen 2003; Giuffrida *et al.*, 2001) voire une altération de la captation de l'énergie lumineuse par des molécules de chlorophylle, d'où la chlorose observée sur les plants de luzerne traités avec 150 mM de NaCl. Tous ces mécanismes conduisent à une augmentation des ROSs dans les feuilles âgées, ce qui induit des nécroses foliaires précoces, à l'instar de ce qui est observée chez *M. sativa* cv Gabès (Figure 40 B, AS).

## II-2 Effets du stress sur l'histologie des feuilles jeunes et âgées

Les réductions de croissance des feuilles vont influencer la photosynthèse des feuilles, que nous aborderons dans le dernier paragraphe de ce chapitre (**chapitre 1**), mais également l'anatomie du système vasculaire, lieu de chargement des éléments toxiques dans les feuilles, et également site de transfert des assimilats des cellules du mésophylle vers la vascularisation phloémienne. Chez la luzerne, la vascularisation de la tige se prolonge dans la feuille (Figure 39 A) en passant successivement par le *pulvinus* foliaire rudimentaire, puis le pétiole, le *pulvinus* foliolaire, la nervure principale des folioles et enfin les veines moyennes et les mineures. Dans cette partie, nous regarderons plus précisément les modifications induites par la contrainte saline dans les feuilles âgées.

## II-2-1 Anatomie des pétioles, des *pulvinet* des nervures principales des folioles âgées

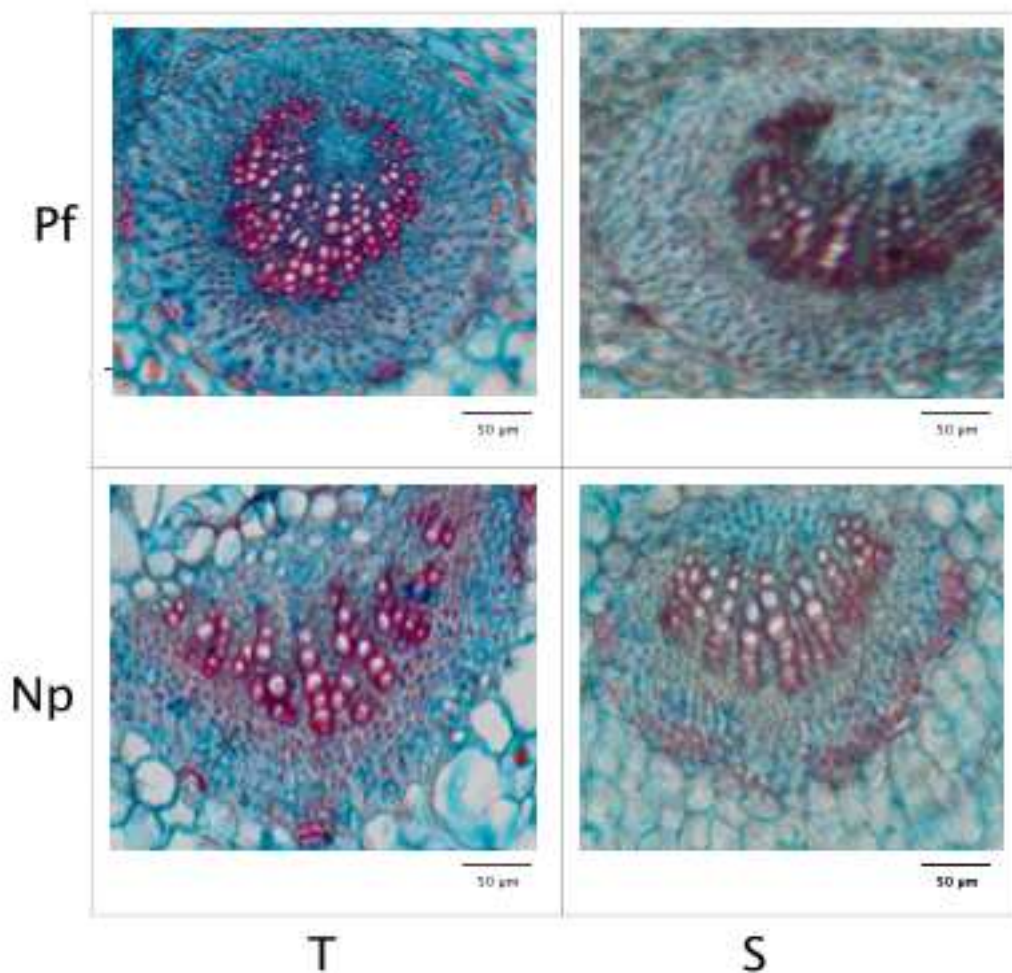
Nous avons montré que l'augmentation observée de la longueur du pétiole dans les feuilles âgées sous l'effet du sel est accompagnée d'une réduction de croissance diamétrale, comparativement aux témoins (Figure 41 **B-D**). Les fibres supra-libériennes qui surmontent les trois faisceaux cribrovasculaires du pétiole présentent des parois plus épaissies et sont plus nombreuses en présence de sel (Figure 42).



**Figure 42** : Coupes transversales de *pulvinus* de la feuille (**PF**) et détail du système vasculaire du pétiole (**Pe**) colorées au FASGA des feuilles âgés, des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**). Le *pulvinus* de la feuille (**PF**) présente avec 2 faisceaux vasculaires latéraux et un dorsal montrant une lignification plus importante des fibres phloémiennes, du xylème et des fibres xylémiennes et à l'extrémité du parenchyme xylémien des plantes stressées (**PeS**), par rapport aux témoins (**PeT**). Noter les différences de taille des cellules du xylème (**PeT-PeS**). Echelle = 200 µm PFT, PFS; 50 µm PeT, PeS.

Dans le *pulvinus* foliolaire, le parenchyme cortical et la vascularisation sont de taille plus importante que celles du pétiole qu'il prolonge, mais les modifications induites par le sel y sont similaires (Figure 43 **Pf**). Aux *pulvini* foliolaires, fait suite la nervure principale, dans

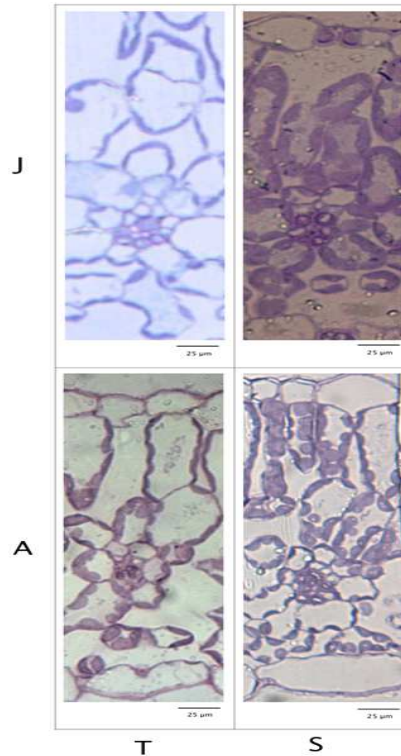
laquelle, et comme décrit dans les organes foliaires précédents, le sel augmente le nombre et l'épaisseur des parois des fibres dans la région supra-libérienne et dans le xylème secondaire. Ce dernier comporte moins de vaisseaux, en disposition parfois anarchique, dont la taille est plus petite et les fibres plus nombreuses que dans les témoins (Figure 43 **Np**).



**Figure 43** : Coupes transversale de *pulvinus* du foliole principale (**Pf**) et nervure principale du foliole impaire (**Np**) colorées au FASGA des feuilles âgés, des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**). Le *pulvinus* foliolaire des témoins (**PfT**) présente un anneau de collenchyme au bord externe du cylindre central, un anneau phloémien à parois épaisses, des vaisseaux xylémiens en alignement vers le parenchyme à parois épaisses. Les plantes traitées (**PfS**) montrent un collenchyme à parois très épaisses, un xylème avec moins de vaisseaux et plus de fibres que dans le témoin. La nervure principale du foliole impaire témoin (**NpT**) montre des collocytes bordant le phloème, un alignement des vaisseaux de taille décroissante du xylème secondaire au primaire. Dans les plantes traitées (**NpS**) la lignification des collocytes les plus externes est importante, le xylème secondaire montre de petits vaisseaux, des fibres près du cambium et de larges vaisseaux près du parenchyme protoxylémien, formé de cellules à paroi large et avec une lumière réduite. Echelle = 50 µm PfT, PfS, NpT, NpS.



Dans les parenchymes palissadique et lacuneux, de structure classique, le traitement salin rend les plastes plus volumineux que dans les témoins, à la fois dans les feuilles jeunes (Figure 44 JS) et âgées (Figure 44 AS).



**Figure 44 :** Coupe transversale de limbe foliaire des feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) colorées au bleu de toluidine, des plantes témoins (**T**) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (**S**). Les parenchymes palissadique (PP) et lacuneux (SP) ont un aspect plus compact chez les plantes traitées (**JS**, **JD**). Dans les fines nervures, le xylème et phloème à parois plus épaisses est plus colorés dans feuilles traitées (**JS**), jeunes (**B**) et âgées (**D**) qu' n A et C; gaine périvasculaire (G). Epiderme inférieur (EI), épiderme supérieur (ES). PFA-Glutaraldehyde, LRW, Sections transversales, semi-fines, bleu de toluidine, Zeiss OrthoPlan.

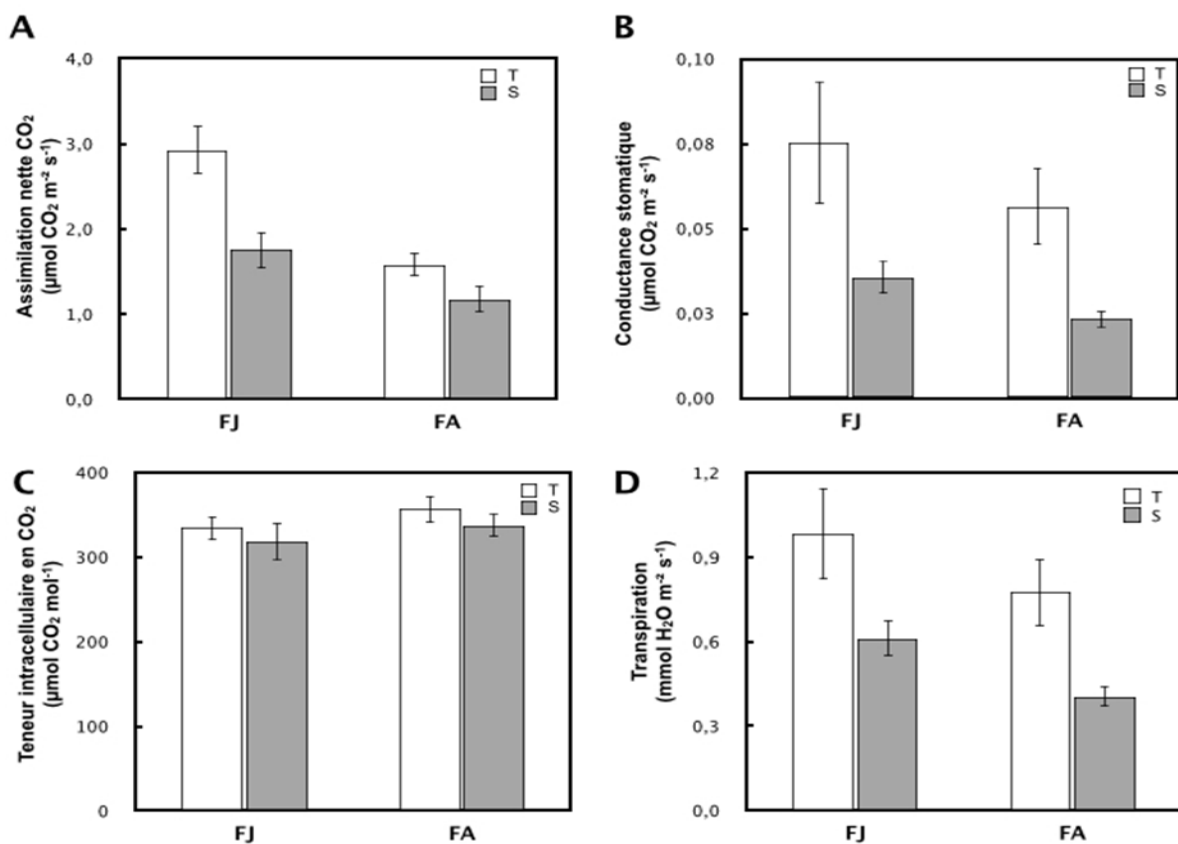
Les fines nervures, de 25 à 50 µm de diamètre, sont entourées par une gaine périvasculaire riche en amyloplastes. Ces nervures ne contiennent que 1 ou 2 vaisseaux de xylème, 2 ou 3 cellules parenchymateuses phloémiennes, 2 ou 3 tubes criblés associés aux cellules compagnes. Les cellules phloémiennes présentent, sous l'effet du sel, une paroi plus intensément colorée par le bleu de toluidine que celle des feuilles de plantes témoins. Cette modification existe dans les feuilles jeunes (Figure 44**JS**) comme dans les âgées (Figure 44 **AS**).

L'appareil plastidial apparaît plus compact dans les parenchymes assimilateurs après traitement par le sel. Les nervures mineures sont également touchées par le traitement qui induit des modifications pariétales, observées plus particulièrement dans le phloème à l'échelle photonique.

### III Effets du stress salin sur la physiologie foliaire de *M. sativacv* Gabès

La feuille représente une interface d'échanges gazeux avec l'atmosphère, principalement *via* l'appareil stomatique avec une sortie de vapeur d'eau par évapotranspiration et pénétration de CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse. L'importance de ces flux gazeux est fonction des résistances rencontrées dans la plante dont la plus importante est celle modulable par les stomates.

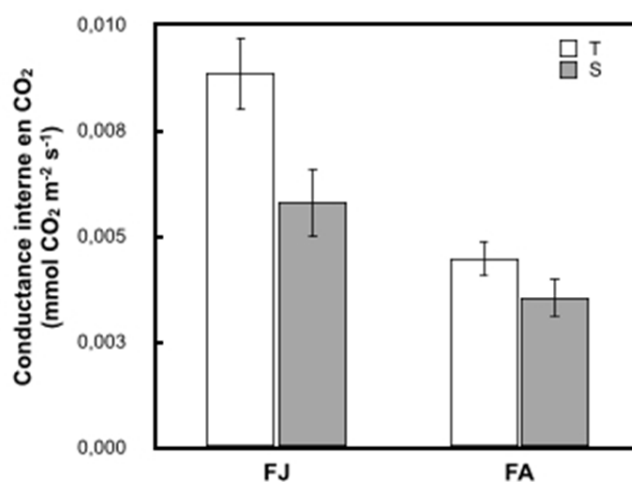
A l'instar de ce qui classiquement décrit dans la littérature (Stepien et Johnson, 2009), l'assimilation nette du CO<sub>2</sub> (A) est réduite, respectivement de 56% et 58% dans les feuilles jeunes et âgées, de luzernes traitées par le sel par comparaison aux luzernes témoins (Figure 45 A).



**Figure 45 :** Effets du stress salin sur l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> (A), la conductance stomatique (B), teneur intracellulaire en CO<sub>2</sub> (C) et la transpiration foliaire (D) des feuilles jeunes (FJ) et âgées (FA) de *M. sativa* cv Gabès. T, plantes témoins, S, plantes traitées avec 150 mM de NaCl pendant 5 semaines. Chaque valeur représente la moyenne de 75 mesures individuelles. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 5%.

Cette réduction de la photosynthèse peut être due soit une modification des échanges gazeux, soit à une modification des processus mésophylliens. Dans notre modèle, les échanges gazeux, respectivement l'influx de CO<sub>2</sub> ( $g_s$ ) et l'efflux d'H<sub>2</sub>O (E), sont réduits de 50% et 34% dans les feuilles jeunes et de 33% et 21% dans les feuilles âgées (Figure 45 B, D). Ici, les

effets sont plus marqués dans les feuilles jeunes que dans les feuilles âgées. Cependant, quelque soit l'âge des feuilles, il y a fermeture des stomates. Ces données ont également été décrites par d'autres auteurs comme une réponse des halophytes et des glycophytes à la contrainte saline (Chaudhuri et Chaudhuri, 1997; Lu *et al.*, 2002; Gulzar *et al.*, 2003; Stepien et Johnson, 2009). En effet, les excès de sel des sols modifient les aptitudes des plantes à prélever de l'eau. De ce fait, l'une des réponses immédiates à la contrainte est la fermeture des stomates *via* la production par les racines d'ABA et son transport jusqu'aux parties aériennes. Cette réduction de l'ouverture des stomates induit elle-même une baisse de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et une réduction de croissance, ce que nous observons. De ce fait, la baisse de la photosynthèse est due plus à une dérégulation des processus non-mésophylliens de la photosynthèse. Cependant, la teneur en CO<sub>2</sub> intracellulaire n'est pas affectée par la contrainte saline pour notre modèle (Figure 45 C). Le maintien d'une teneur constante en CO<sub>2</sub> intracellulaire dans les feuilles suggère que même si les stomates réduisent les influx de CO<sub>2</sub>, son utilisation par la machinerie photosynthétique semble être également modifiée. La limitation à la diffusion du CO<sub>2</sub> dans le mésophylle, d'abord dans le réseau des espaces gazeux intercellulaires puis dans la cellule, permet de déterminer, par le calcul, une valeur de conductance au transfert du CO<sub>2</sub>, encore appelée conductance interne (*g<sub>i</sub>*). Dans nos expériences, la conductance interne est fortement diminuée chez les plantes stressées, avec un effet très marqué pour les jeunes feuilles (Figure 46).



**Figure 46 :** Effet du stress salin sur la conductance interne en CO<sub>2</sub> des feuilles jeunes (FJ) et âgées (FA) de *M. sativa* cv Gabès. T, plantes témoins, S, plantes traitées avec 150 mM de NaCl pendant 5 semaines. Chaque valeur représente la moyenne de 75 mesures individuelles. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 5%. L'épaississement des parois, le dysfonctionnement des enzymes de carboxylation peut entraîner une augmentation de la résistance aux flux de CO<sub>2</sub> et donc une baisse de la photosynthèse.

## IV Discussion, Conclusion

La mesure de divers paramètres morphologiques nous a conduits à montrer que la salinité subie par les plants de *Medicago sativa* cv Gabès a modifié leur potentiel de croissance. Le traitement salin réduit le diamètre et la hauteur des plantes. Des inhibitions similaires ont été décrites précédemment chez plusieurs cultivars de *Medicago sativa*, dont le cv Gabès (Mezni *et al.*, 2012), mais également pour les cv Mareth et Ghanouch. Steppuhn *et al.* 2011, ont révélé également des réductions de la croissance moyenne en hauteur des neuf populations de luzerne selon le degré de salinisation. Dans nos expérimentations, l'addition de 150 mM de NaCl à la solution d'arrosage entraîne une réduction plus importante de la croissance en hauteur par rapport à la croissance en diamètre suggérant que le sel a un effet sur le développement des méristèmes apicaux et intercalaires. Outre la réduction de la croissance des parties aériennes, le sel réduit également le nombre des entre-noeuds à l'instar de ce qui a été décrit chez *Phillyrea* sp (L.). (Gucci *et al.*, 1997) et chez *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl (Barhoumi *et al.*, 2007). Burssen *et al.* (2000) démontrent que le stress salin induit des modifications de la régulation transcriptionnelle des gènes codant des protéines impliquées dans le fonctionnement du cycle cellulaire, comme CDC2a et les cyclines (CycA2 CycB1). Le stress salin induit alors des modifications de l'activité mitotique des cellules méristématiques. Si l'inhibition de la croissance en longueur trouve une explication *via* un dysfonctionnement des méristèmes, la réduction de la croissance en diamètre peut, elle s'expliquer par des modifications de la turgescence des cellules de la tige. Les coupes histologiques des tiges montrent une réduction d'~50% de la taille des cellules des plantes traitées. L'augmentation de l'osmolarité de l'apoplasme pourrait alors réduire les flux hydriques vers la vacuole, diminuant à la fois la pression de turgescence cellulaire et la taille des cellules du parenchyme de la tige. Dans notre modèle, le stress ne semble pas affecter la croissance des parties racinaires comme pour deux variétés de luzerne Tafilalet et Trifecta à 100mM de NaCl (Lachhab *et al.*, 2013). Ce dernier effet n'est pas classiquement décrit chez des plantes soumises à stress salin (Sharp *et al.*, 1998; French et Hsiao, 1994; Couot-Gastelier et Vartanian, 1995; Robertson *et al.*, 1990; Bitonti *et al.*, 1991; Bracale *et al.*, 1997; Sack *et al.*, 1997). Cependant, un tel comportement a été observé chez deux clones de peuplier blanc (MA-195 et MA-104) après trois ans de traitement salin (Abassi, 2009). Le développement de la partie racinaire est considéré par plusieurs auteurs comme un critère de résistance à la salinité et/ou à la sécheresse (Van hees, 1997). La surexpression du gène codant une H<sup>+</sup>-PPase diminue l'effet du stress salin sur la réduction de la longueur des racines chez *Medicago*

*sativa* L. (Bao *et al.*, 2009). Les H<sup>+</sup>-PPases sont des enzymes connues pour être impliquées dans le contrôle des flux ioniques permettant l'absorption et/ou la séquestration vacuolaire des ions comme le Na<sup>+</sup> (Brini *et al.*, 2007). Le stockage vacuolaire du sodium permettrait alors le maintien d'une homéostasie ionique, notamment celle de K<sup>+</sup>, et modulerait ainsi la capacité d'osmorégulation des cellules (Bao *et al.*, 2009). Les racines acclimatées à des fortes concentrations en sel présenteraient alors une croissance différenciée (Etehadnia *et al.*, 2010). Si les adaptations aux milieux salins de l'appareil aérien des halophytes se traduit toujours par des réductions de croissance, une revue récente montre que l'architecture du système racinaire est modifiée sous l'effet de la contrainte (Galvan-Ampudia et Testerink, 2011). S'appuyant sur leur plasticité phénotypique, les plantes adaptent l'architecture du système racinaire et la direction de la croissance des racines *via* une distribution hétérogène de l'auxine dans la racine (Zhao *et al.*, 2010). La plante perçoit alors la présence de fortes concentration en sodium dans le sol et réoriente la croissance des racines (Tuteja, 2007; Kudla *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). A l'échelle des feuilles, la contrainte saline appliquée aux plantes de *M. sativa* cv Gabès entraîne une réduction de la surface foliaire associée, mais, dans une moindre mesure, à un raccourcissement de la nervure principale à la fois dans les feuilles jeunes et âgées. Les effets du traitement salin sur la surface foliaire sont plus marqués dans les feuilles âgées que dans les feuilles jeunes avec des baisses respectives de ~50% et 30%. Ces effets du stress salin sur la surface foliaire peuvent ici s'expliquer par une réduction de la taille des cellules mésophylliennes soumises à des variations extra et intracellulaires de potentiel hydrique, comme le montre la figure 44. Dans le limbe, on observe une réduction de la taille des cellules palissadiques et une diminution des espaces libres au sein du parenchyme lacuneux. Pour ce qui est des tissus plus intensément lignifiés, que sont les nervures, le pulvinus et le pétiole on observe des effets moindres, voire des effets inverses pour ce qui est du pétiole des feuilles âgées. Les modifications morphologiques s'accompagnent de changements histologiques, avec une augmentation de la lignification du système vasculaire et des diminutions de la taille des cellules des pulvinus et du pétiole. L'augmentation de la lignification des tissus végétaux a été décrite chez la tomate où l'activité de la S-Adénosyl-L-méthionine synthase (SAM; ATP:L-méthionine adénosyltransférase, EC 2.5.1.6) est augmentée lors d'un stress salin. Les auteurs suggèrent que la lignification des éléments de vaisseaux permettrait de réduire la perméabilité à l'eau dans l'apoplasme. De ce fait, l'eau ne peut passer dans la lumière du xylème qu'après avoir traversé les cellules du parenchyme xylémien (Sanchez-Aguayo *et al.*, 2004). La chélation du sodium sur la paroi des cellules lignifiées, associée à une augmentation de la sélectivité des membranes vis à vis de

l'absorption des ions, représente une stratégie d'adaptation à la contrainte saline. Outre les modifications morphologiques et anatomiques des feuilles, l'activité assimilatrice et les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère sont également perturbés. Pour ce qui est de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, le stress salin induit une réduction de la fixation du carbone par les plantes traitées, plus marquée dans les feuilles jeunes que dans les feuilles âgées. Les feuilles jeunes ayant une activité assimilatrice 2 fois supérieures aux feuilles âgées, les conséquences du stress salin sont alors fortement amplifiées quant à la fixation globale de carbone par *M. sativacv* Gabès. De ce fait, les réductions de croissance qui ont été décrites précédemment peuvent trouver une partie de leurs explications via une diminution de la production de photosynthétats. Munns *et al.* (1995), expliquent la réduction de la surface foliaire via une réduction d'apport en glucides. Des résultats similaires ont été observés chez plusieurs espèces, dont 3 cv de *Medicago sativa* L. (Mezni *et al.*, 2012). Outre les effets du stress salin sur la photosynthèse, notre étude montre que les échanges gazeux (transpiration et conductance stomatique) entre la plante et l'atmosphère diminuent. La diminution des flux dans les plantes traitées est également amplifiée par une diminution de la surface foliaire, ce qui va bien sûr diminuer l'accumulation de sel dans les tissus, mais ce qui va entraîner également une baisse de la nutrition hydrominérale de la plante. Tous ces mécanismes concourent à une perte de biomasse simplement via des pertes trophiques. La réduction de la **surface foliaire** face à une contrainte saline a été considérée comme un processus d'adaptation à travers une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau (Omami *et al.* 2006). Contrairement à *Medicago sativa* cv Gabès, *Rhizophora mucronata* augmente sa surface foliaire sous l'effet du stress salin, maintenant ainsi une concentration cellulaire aqueuse constante par absorption d'eau en quantité suffisante (Levit, 1980). La réduction en biomasse aérienne est un comportement commun chez les glycophytes (Munns et Termaat, 1986). Cette inhibition de croissance a été révélée chez les glycophytes sensibles et plusieurs glycophytes tolérantes (Taffouo *et al.*, 2004). Pour les glycophytes sensibles la réduction de la croissance est vraisemblablement régulée par des signaux hormonaux développés par les racines (Munns, 2002). Toutes ces modifications morphologiques d'alfalfa var Gabès ont été accompagnées par des modifications aux niveaux du fonctionnement de l'appareil photosynthétique, qui se traduisent par une baisse simultanée de l'assimilation nette (A), de la transpiration (E) et de la conductance stomatique pour le CO<sub>2</sub> (g<sub>s</sub>). Les témoins des feuilles jeunes et des feuilles âgées ne présentent pas les mêmes niveaux d'assimilation nette de CO<sub>2</sub>. Il en est de même pour les feuilles traitées. Pour les feuilles jeunes, et ceci indépendamment du traitement appliqué, les activités photosynthétiques sont meilleures. Cette variation de la photosynthèse en fonction de

l'étage foliaire est liée à l'âge physiologique de la feuille, mais également à son aptitude à intercepter le rayonnement lumineux. Une telle différence d'activité photosynthétique selon l'âge a été identifiée par Jurik (1986). Par contre, la réduction de la photosynthèse n'est pas reliée seulement à l'étage foliaire mais aussi à la réduction de la surface foliaire (Munns *et al.*, 2000). Concernant la conductance stomatique ( $g_s$ ), la plus importante réduction est celle déterminée au niveau des feuilles jeunes, contrairement à la photosynthèse. Une telle réduction de la conductance stomatique a été identifiée chez *Atriplex hortensis* (Sai Kachout *et al.*, 2009). Ces modifications dans les échanges gazeux sont dépendantes de l'espèce et la durée d'application de stress. La réduction des échanges gazeux peut être reliée à une fermeture partielle de l'ostiole, qui limite ainsi les pertes transpiratoires (Ben Nja, 2010). Cette fermeture des stomates pourrait être reliée au stress osmotique et/ou à la déformation des chloroplastes sous stress salin (Kao *et al.*, 2006). Il existe d'autres facteurs qui influent la réduction de l'activité photosynthétiques, tels que la toxicité ionique ou l'altération des processus métaboliques (Turan *et al.*, 2007). Face à cette contrainte saline, les feuilles tendent à réduire leur perte en eau afin de conserver une certaine turgescence cellulaire permettant une bonne tolérance à la salinité. Ce comportement a été également identifié chez *Atriplex halimus* et *Atriplex canescens* (Bissati *et al.*, 2011). La réduction la plus importante de la transpiration est celle des feuilles âgées corrélativement avec la conductance stomatique. La baisse simultanée de  $g_s$  et de E pourrait être un des mécanismes adaptatifs développés par la luzerne cultivée. Contrairement aux travaux qui ont déterminé l'existence d'une corrélation positive entre la réduction de la surface foliaire et la transpiration, cette espèce développe la plus importante réduction en surface foliaire au niveau des feuilles âgées, contrairement à la transpiration. Certains auteurs ont relié la chute de la transpiration à la réduction de la conductance hydrique du système racinaire (Rodriguez *et al.*, 1997). Les variations de l'efficacité d'utilisation de l'eau (EUE) sont très faibles. La réduction de EUE a été identifiée chez le peuplier blanc suite à une baisse de la transpiration (Abassi, 2009). La réduction en EUE des feuilles âgées, accompagnée par une réduction en surface foliaire, sont considérés comme une adaptation au stress salin, comme chez *Amarantha* ssp (Omami *et al.*, 2006). Les précédentes modifications physiologiques ont été accompagnées par une réduction en conductance interne en  $CO_2$ , la plus importante aux niveaux des feuilles jeunes. Aux niveaux des feuilles âgées il existe une corrélation entre la conductance interne et l'assimilation nette de  $CO_2$ . L'absence d'effet du stress salin sur la concentration en  $CO_2$  dans la chambre sous stomatique ( $C_i$ ) pour tous les échantillons, peut être expliquée par la durée de traitement, qui semble insuffisante pour agir sur cette dernière. La combinaison d'une faible assimilation

nette du CO<sub>2</sub>, d'une forte résistance stomatique est l'une des stratégies de la tolérance à la salinité d'après Koyro, (2003). Cette stratégie tend à réduire l'afflux du sel au niveau des feuilles en le maintenant à des niveaux non toxiques pour assurer une meilleure longévité de la plante (Koyro, 2003).



## **CHAPITRE 2 EFFETS DU STRESS SALIN SUR LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES FEUILLES DE *M. sativa* cv Gabès**

Dans cette partie nous avons cherché à suivre les effets du stress salin sur la composition biochimique des parois des feuilles jeunes et âgées de *Medicago sativa* cv Gabès. L'approche proposée ici vise à avoir une image des effets de la contrainte saline sur le pool global des polysaccharides des parois primaires et secondaires de toutes les cellules (xylème, phloème, parenchymes chlorophylliens etc...) constituant les feuilles de luzerne. En effet, plusieurs travaux ont montré que la contrainte saline entraîne une réduction de la croissance des plantes (Pujari et Chande, 2003; Ortega *et al.*, 2006; Geifus *et al.*, 2011). Cette réduction de la croissance affecte la paroi primaire des cellules en réduisant son extensibilité (Beatriz *et al.*, 2001), ce qui suggère un remodelage des polysaccharides pariétaux. En effet, de nombreux auteurs ont mis en évidence un effet du stress salin sur l'activité de plusieurs enzymes et/ou protéines de la paroi, comme la xyloglucane endo-transglycosylase (Janz *et al.*, 2011), la peroxydase dans les racines (Talano *et al.*, 2006; Janz *et al.*, 2011), les expansines (Geifus *et al.*, 2011; Janz *et al.*, 2011) et les AGP (Janz *et al.*, 2011). Dans cette partie nous avons donc cherché à identifier l'effet du sel sur une redistribution des polymères pariétaux des cellules des feuilles jeunes, actives et peu accumulatrices de sel, et des feuilles âgées, moins actives mais surtout plus chargées en sel, de la luzerne. Toutes les données présentées dans cette partie ont été obtenues à partir d'un lot de feuilles collectées sur 25 plantes par traitement. Pour les expériences de biochimie, 6 cultures de luzerne ont été réalisées au cours de la thèse. Si toutes les cultures ont été conduites de façon similaire, les conditions micro-climatiques dans la serre ne nous ont pas permis de reproduire des plantes parfaitement identiques (différences de température, quantité et qualité de la lumière).

### **I. Effet du stress salin sur les oses des feuilles jeunes et âgées de *M. sativa* cv Gabès**

L'analyse biochimique des sucres, et par extension des polysaccharides pariétaux, nécessite la mise en place de méthodes d'extraction séquentielle des différents groupes de polymères. Les fractions obtenues (voir Matériels et Méthodes) notées: **A, B, C, D, E, F1 et F4** ont servi aux dosages des oses totaux (**OT**), des oses neutres (**ON**) et des acides uroniques (**AU**) (Tableau 2).

La teneur en sucres totaux (**OT**) des feuilles jeunes (**J**), obtenue en additionnant les teneurs des différentes fractions est de  $\sim 14 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ . Cette teneur en **OT** est inférieure à celle mesurée pour les feuilles âgées (**A**) qui est  $17,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ . En condition de contrainte saline, les rapports des teneurs en **OT** s'inversent entre les feuilles jeunes et âgées. Ainsi, le rapport J/A passe 0,8 pour les plantes témoins (**T**), à 1,5 pour les plantes stressées par 150 mM de NaCl (**S**). Le stress affecte plus les oses neutres totaux que les acides uroniques totaux se traduisant par une baisse de plus de 30% de la teneur en **ON** totaux dans les feuilles âgées par rapport aux feuilles jeunes. Ces premiers résultats suggèrent que le monosaccharide marqueur des pectines, comme l'acide galacturonique (GalA), est peu affecté par le stress salin à la différence des oses neutres. La contrainte saline, même si elle se traduit par une faible accumulation de sel dans les jeunes feuilles (Boughamani et al., 2003), modifie la répartition **ON** et **AU**. Ces résultats globaux se retrouvent pour la majorité des fractions collectées suivant le protocole décrit par Vanzin *et al.*, (2002) à l'exception des fractions **A** et **C** (Tableau 2). La fraction **A**, très riche en glucide, est une fraction décrite comme constituée d'un mélange très complexe d'oses libres et d'oses issus de l'hydrolyse de polymères comme les AGP, les *N*-glycoprotéines, l'amidon (Vanzin *et al.*, 2002).

Pour ce faire, nous présentons les résultats associés à cette fraction, mais nous ne l'analyserons pas directement. Les fractions **B**, **C**, **D**, **E** sont normalement enrichies en pectine, alors que les fractions **F1** et **F4** sont riches en hémicellulose. La fraction **C** ne présente aucune inversion des rapports T/S pour les **OT** et **ON** entre les feuilles jeunes (**J**) et âgées (**A**) (Tableau 2, **C**). Par contre, la teneur en **AU** diminue de plus de 95% dans les feuilles âgées (Tableau 2, **C-AU**).

Pour la fraction **F4**, normalement enrichie en hémicellulose, on observe une augmentation des **AU** dans les jeunes feuilles (Tableau 1, **F4-AU**).

Globalement les plantes de luzerne soumises à une contrainte saline montrent une modification des taux des sucres qui est différente entre les feuilles jeunes et âgées. Ces modifications concernent tout à la fois les fractions enrichies en pectine et en hémicellulose. De ce fait, une analyse plus précise de la composition moléculaire de ces fractions est nécessaire.

**Tableau 2 :** Teneur en oses totaux (OT), acides uroniques (AU) et en oses neutres (ON) des différentes fractions de polysaccharides (A, B, C, D, E, F1 et F4) extraits des feuilles jeunes (J) et âgées (A) des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S). Pour chaque fraction, des rapports des teneurs en OT, ON et AU ont été calculés: rapport des teneurs en glucides des feuilles jeunes et âgées (J/A) et rapport des teneurs en glucides des plantes témoins et stressées (T/S) pour les feuilles jeunes (J) et âgées (A). Toutes les données présentées dans ce tableau ont été obtenues à partir de 25 feuilles sur une expérience. La manipulation a été répétée 3 fois.

		Osés Totaux (OT) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)			Ac. Uroniques (AU) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)			Osés Neutres (ON) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)		
		J	A	J/A	J	A	J/A	J	A	J/A
A	T	11929,38	11327,86	<b>1,05</b>	3838,39	3366,31	<b>1,14</b>	8090,99	7961,55	<b>1,02</b>
	S	9284,76	9325,95	<b>1,00</b>	2759,66	2786,37	<b>0,99</b>	6525,10	6539,58	<b>1,00</b>
	T/S	<b>1,28</b>	<b>1,21</b>		<b>1,39</b>	<b>1,21</b>		<b>1,24</b>	<b>1,22</b>	
B	T	319,58	328,91	<b>0,97</b>	83,40	59,42	<b>1,40</b>	236,18	269,49	<b>0,88</b>
	S	365,83	309,97	<b>1,18</b>	69,12	113,57	<b>0,61</b>	296,71	196,40	<b>1,51</b>
	T/S	<b>0,87</b>	<b>1,06</b>		<b>1,21</b>	<b>0,52</b>		<b>0,80</b>	<b>1,37</b>	
C	T	127,26	147,18	<b>0,86</b>	16,39	33,87	<b>0,48</b>	110,87	113,30	<b>0,98</b>
	S	182,24	356,08	<b>0,51</b>	26,25	2,54	<b>10,34</b>	156,00	353,54	<b>0,44</b>
	T/S	<b>0,70</b>	<b>0,41</b>		<b>0,62</b>	<b>13,34</b>		<b>0,71</b>	<b>0,32</b>	
D	T	141,84	554,01	<b>0,26</b>	34,86	4,73	<b>7,37</b>	106,99	549,28	<b>0,19</b>
	S	461,97	197,91	<b>2,33</b>	0,76	12,83	<b>0,06</b>	461,22	185,08	<b>2,49</b>
	T/S	<b>0,31</b>	<b>2,80</b>		<b>46,08</b>	<b>0,37</b>		<b>0,23</b>	<b>2,97</b>	
E	T	366,11	494,44	<b>0,74</b>	251,99	273,75	<b>0,92</b>	114,13	220,69	<b>0,52</b>
	S	608,73	416,38	<b>1,46</b>	226,06	206,70	<b>1,09</b>	382,67	209,68	<b>1,82</b>
	T/S	<b>0,60</b>	<b>1,19</b>		<b>1,11</b>	<b>1,32</b>		<b>0,30</b>	<b>1,05</b>	
F1	T	535,50	1194,89	<b>0,45</b>	137,89	289,39	<b>0,48</b>	397,61	905,50	<b>0,44</b>
	S	905,63	1299,22	<b>0,70</b>	124,65	824,82	<b>0,15</b>	780,99	474,40	<b>1,65</b>
	T/S	<b>0,59</b>	<b>0,92</b>		<b>1,11</b>	<b>0,35</b>		<b>0,51</b>	<b>1,91</b>	
F4	T	655,17	3636,93	<b>0,18</b>	61,25	437,75	<b>0,14</b>	593,92	3199,18	<b>0,19</b>
	S	5805,61	1542,85	<b>3,76</b>	920,67	407,89	<b>2,26</b>	4884,94	1134,96	<b>4,30</b>
	T/S	<b>0,11</b>	<b>2,36</b>		<b>0,07</b>	<b>1,07</b>		<b>0,12</b>	<b>2,82</b>	

## **II Effets du stress salin sur la composition polysaccharidique des feuilles jeunes et âgées de *M. sativa* cv Gabès**

La composition polysaccharidique des parois des feuilles jeunes et âgées a été abordée suivant 2 approches différentes: (i) l'analyse des oses par chromatographie en phase gazeuse (CPG) permettant de déterminer le pourcentage molaire des différents monosaccharides constituant les polysaccharides co-extraits dans les différentes fractions obtenues, et (ii) la détermination des polysaccharides pariétaux *via* une technique ELISA grâce à un set d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains épitopes de ces polymères.

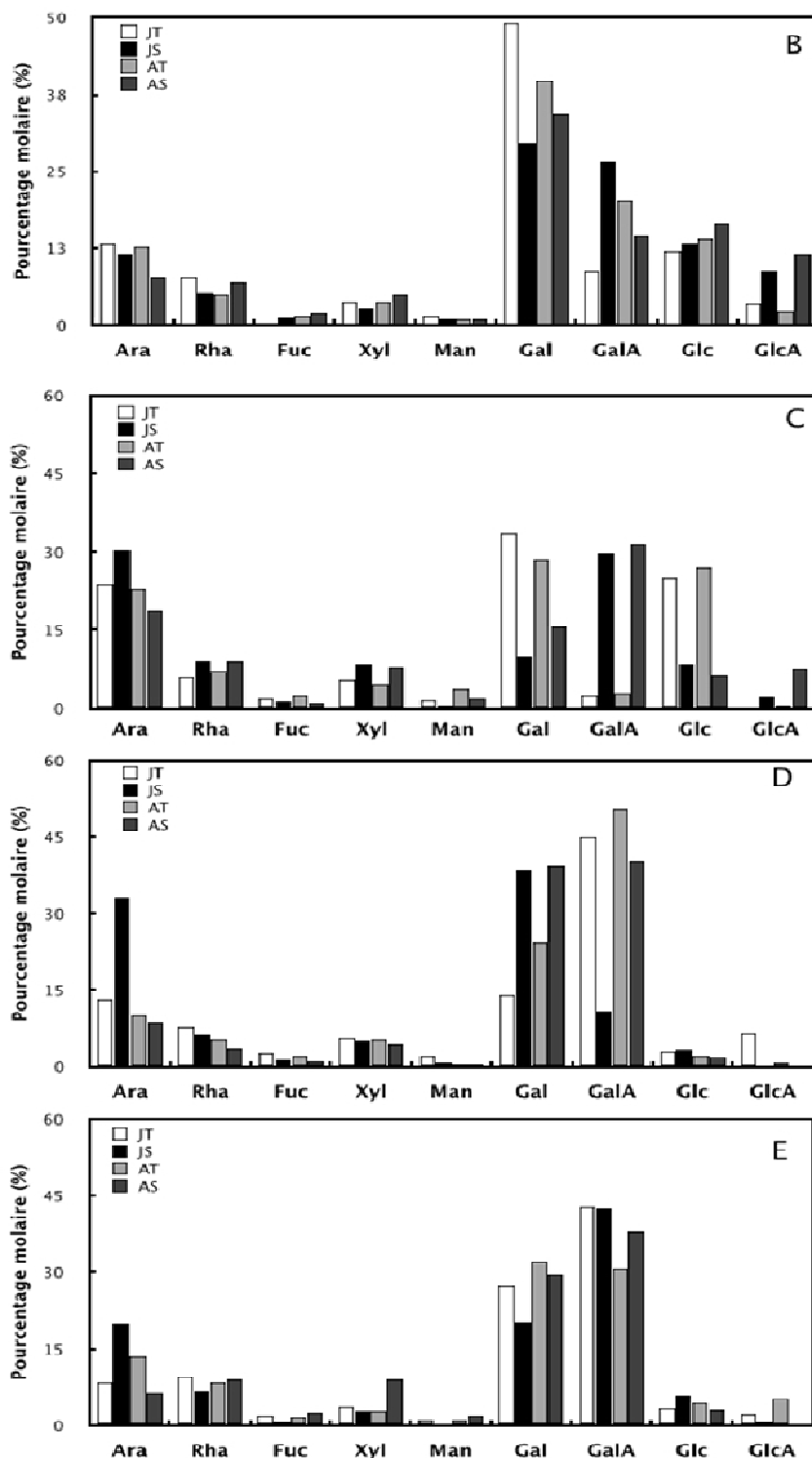
### **II-1 Effets du stress salin sur la composition en monosaccharides des parois des feuilles jeunes et âgées de *M. sativa* cv Gabès.**

Les monosaccharides de chacune des fractions ont été identifiés par CPG et la proportion relative de chacun d'entre eux a été calculée sur la base de l'aire des pics chromatographique obtenue par rapport à un témoin interne: le meso-inositol. Les données montrent que les parois des cellules foliaires de *Medicago sativa* cv Gabès renferment quatre catégories de monosaccharides: les hexoses avec le glucose (Glc), le galactose (Gal) et le mannose (Man), les pentoses avec l'arabinose (Ara) et le xylose (Xyl), un méthyl-pentose, le rhamnose (Rha) et des acides uroniques avec l'acide galacturonique (GalA) et l'acide glucuronique (GlcA).

La fraction A qui correspond à la première fraction collectée suivant le protocole décrit par Vanzin *et al.* (2002) est une fraction qui contient tout à la fois des oses circulants, et des monosaccharides issus de l'hydrolyse de polymères pariétaux. L'importance du pourcentage molaire du Glc dans cette fraction, suggère la présence de grandes quantités d'amidon et/ou de saccharose co-extraites avec les polymères pariétaux de la feuille de luzerne. En effet, le protocole de Vanzin *et al.* (2002) ne prévoit pas d'utiliser d' $\alpha$ -amylase permettant d'éliminer l'amidon, qui se retrouve tout naturellement dans certaines des fractions extraites, dont dans la fraction A. De ce fait, cette fraction est difficilement analysable en termes de composition polysaccharidique. On notera cependant que cette dernière contient d'autres sucres comme l'Ara, le Rha, le Gal et l'GlcA pouvant suggérer la présence de certains polymères comme les AGPs.



Les fractions B, C, D, E contiennent toutes du Gal, GalA, de Glc et de l'Ara. Les pourcentages molaires de Glc, significatif encore dans les fractions B et C décroissent pour devenir négligeables dans les fractions D et E (Figure 49).



**Figure 49** : Pourcentage molaire des monosaccharides séparés et identifiés par CPG à partir des fractions (B), (C), (D) et (E) des feuilles jeunes (J) et âgées (A) des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

L'GalA est retrouvée dans des proportions variables, de 2 à 50%, dans chacune de ces fractions suggérant la présence de pectines. De toutes ces fractions, identifiées par de nombreux auteurs comme étant des fractions enrichies en pectine (Joye, 2000), seule la fraction C ne répond pas pleinement à cette définition. En effet, à l'exception des plantes stressées, les feuilles jeunes et âgées des plantes témoins sont très pauvres en GalA avec des pourcentages molaires inférieurs à 5%. Pour la fraction B, les pectines extraites en présence de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont classiquement qualifiées de pectines insolubles (Jarvis *et al.* 1981). Pourtant ici, il semble que le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ne permette pas d'extraire ces molécules dans les feuilles témoins jeunes et âgées. Cette grande variabilité des pourcentages molaires est en accord avec les taux très faibles d'AU mesurés dans cette fraction (Tableau 2 C-AU). Le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> permet de rompre les liaisons covalentes mettant ainsi en solution une fraction pectique insoluble (Selvendran *et al.*, 1985 ; Selvendran et O'Neill, 1987). Chez la luzerne, cette fraction semble difficilement accessible avec ce type d'extractant suggérant que d'autres processus peuvent bloquer son action. Dans les 2 autres fractions définies comme riches en pectine, la présence de 20 mM de NaBH<sub>4</sub> permet de réduire la dégradation des pectines par β-élimination (Fischer *et al.*, 1994). Ces fractions ont des taux d'GalA supérieurs à 20% avec un contenu en oses neutres principalement constitué d'Ara, de Gal et dans une moindre mesure de Rha, indiquant la présence possible de nombreuses zones riches en rhamnogalacturonane branché par des chaînes latérales constituées d'oses neutres: « hairy regions ».

Après avoir identifié et quantifié, de façon relative, les différents monosaccharides présents dans chacune des fractions B, C, D et E, nous avons cherché à reconstruire les polymères suivant la méthode de Muschitz (2009). Cette méthode de calcul est basée sur la proportion relative des monosaccharides constituant les pectines.

Elle permet ainsi à partir d'un mélange complexe de monosaccharides de reconstituer le polymère putatif constitué de différents monomères analysés par CLG.

### **Pectines**

Homogalacturonanes (HG)

**HG** = GalA-Rha

Rhamnogalacturonane (RG)

Chaîne principale (CP)

Chaînes latérales (CL)

**CP** = 2 Rha

**CL** = Gal + Ara

**RG** = CP + CL

**HG + RG** = GalA + Rha + Gal + Ara

Pectines

### **Hemicelluloses**

Xyloglucanes

**XG** = ½ Xyl + Glc

Autres hémicelluloses

½ Xyl + GlcA + Man

Hémicelluloses

Glc + Xyl + GlcA + Man

Sur la base de ces équations, les fractions B, C, D, et E sont constituées de polymères présentés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Pourcentage des polymères pectiques et hémicellulosique calculés suivant Muschitz (2009) des fractions (B), (C), (D) et (E) extrait à partir des feuilles jeunes (J) et âgées (A) des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

<b>B</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>52,08</b>	<b>49,81</b>	<b>C</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>22,18</b>	<b>38,95</b>
		HG	1,11	21,4			HG	0	20,71
		RG	50,97	28,41			RG	22,18	18,24
		<b>Hemicellulose</b>	<b>20,98</b>	<b>25,69</b>			<b>Hemicellulose</b>	<b>19,59</b>	<b>36,06</b>
<b>A</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>52,08</b>	<b>36,91</b>	<b>A</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>19,83</b>	<b>40,65</b>
		HG	15,17	6			HG	0	22,53
		RG	37,08	30,91			RG	19,83	18,12
		<b>Hemicellulose</b>	<b>20,95</b>	<b>34,12</b>			<b>Hemicellulose</b>	<b>23,82</b>	<b>17,52</b>
<b>D</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>59,47</b>	<b>22,21</b>	<b>E</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>71,08</b>	<b>49,65</b>
		HG	37,19	4,58			HG	33,24	35,75
		RG	16,28	17,63			RG	37,84	13,94
		<b>Hemicellulose</b>	<b>17,52</b>	<b>9,22</b>			<b>Hemicellulose</b>	<b>10,12</b>	<b>9,51</b>
<b>A</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>69,92</b>	<b>74,69</b>	<b>A</b>	<b>J</b>	<b>Pectin</b>	<b>58,14</b>	<b>38,42</b>
		HG	45,17	36,63			HG	22,18	7,51
		RG	24,75	37,86			RG	35,96	30,91
		<b>Hemicellulose</b>	<b>8,47</b>	<b>5,87</b>			<b>Hemicellulose</b>	<b>13,46</b>	<b>14,46</b>
		<b>T</b>	<b>S</b>				<b>T</b>	<b>S</b>	

Cette reconstitution moléculaire nous permet de confirmer que les différentes fractions B, C, D, E sont constituées d'un mélange de molécules où les pectines sont majoritaires. Mais l'extraction séquentielle co-extraite avec les pectines des hémicelluloses. A l'exception de la fraction C, toutes les fractions contiennent des homogalactorananes (HG) et des rhamnogalacturonanes (RG). Par contre des différences importantes peuvent être mises en évidence entre les fractions pectiques analysées, et entre les feuilles jeunes et âgées. Les HG sont peu représentés dans les fractions B et C et montrent de plus des différences importantes pour les feuilles jeunes entre les plantes témoins et les plantes traitées par 150 mM NaCl (Tableau 2 B, C). Les proportions d'HG augmentent avec la contrainte saline. Pour ces mêmes fractions, les effets sont inversés pour les RG par rapport aux HG. Pour les feuilles âgées, les taux de HG et de RG de la fraction B diminuent avec le traitement alors qu'ils augmentent pour les HG et sont invariants pour les RG.



Pour les fractions C et D les taux globaux d'HG et de RG sont bien supérieurs et invariants avec l'âge et le traitement. La présence de Gal et d'Ara suggèrent la présence de ramification d'arabinane, de galactane et/ou d'arabinogalactane sans que l'on puisse trancher entre ces 3 polymères. Les RG sont probablement des RG de type I. Mais d'autres investigations doivent être conduites afin de vérifier ces données qui restent spéculatives.

### **II-1-2 Composition en monosaccharides des fractions F1 et F4**

L'utilisation d'une base forte, comme la potasse à 1M (F1) et 4M (F4) permet d'extraire des polymères hémicellulosiques. La figure 2 montre que les fractions F1 et F4 sont particulièrement riches en Xyl, en Gal et Ara sans pour autant présenter des taux de Glc important. Dans ces 2 dernières fractions on trouve également de l'GalA. La présence de GalA suggère que l'enzyme utilisée dans la fraction E n'a pas dégradé toutes les pectines. A l'exception des feuilles âgées des plantes témoins où Xyl et Ara sont plus abondants, dans les autres échantillons, nous n'observons pas de différences significatives en fonction de l'âge et/ou du traitement (Figure 50). Les faibles teneurs en Glc suggèrent qu'il existe d'autres hémicelluloses que les xyloglucanes dans les parois des cellules des feuilles. En effet, les xyloglucanes, connus pour être l'hémicellulose principale des parois primaires des dicotylédones, sont identifiables par la présence de Glc, Xyl dans des proportions 2/1 auquel on associe d'autres sucres comme le Gal et le Fuc. En prenant seulement les deux sucres Glc et Xyl on remarque que sous l'effet de la salinité la réponse au sel a été généralement dépressive sur ces deux sucres pour les feuilles jeunes et âgées, sauf dans la fraction F1 et pour les feuilles âgées (Figure 50). Afin d'identifier les polymères présents dans chacune de ces fractions, nous avons appliqué la méthode de calcul proposée par Muschitz (2009) aux fractions F1 et F4 (Tableau 4). Dans ces fractions, la salinité a induit des réponses variables chez les plantes.



(1993). Cette expérience confirme la présence de xyloglucanes comme l'une des hémicelluloses chez la luzerne. Les trois oligosaccharides majoritaires retrouvés indépendamment de l'âge, et du traitement des plantes sont XXG, XLLG et XXLG. Si la majorité des xyloglucanes sont fucosylés (Figure 51), il est difficile de mettre en évidence des effets du sel et/ou de l'âge des feuilles sur la distribution des oligosaccharides de xyloglucanes. Le sel, et dans une moindre mesure l'âge, semblent augmenter la proportion de oligosaccharides fucosylés suggérant une tendance à l'augmentation de la rigidification des parois. En effet, le Fuc, principalement retrouvé dans les xyloglucanes chez l'arabette des dames (Zabackis *et al.* 1995), modifie les propriétés d'expansion de la paroi (Levy *et al.*, 1991; Carpita and Gibeaut, 1993; Reiter *et al.*, 1993) et l'accessibilité aux xyloglucanes des xyloglucanes endo-transglycosidases (Rose *et al.*, 1996). Le tableau 4 confirme que les fractions F1 et F4, outre de pas être pures, contiennent probablement d'autres hémicelluloses que les xyloglucanes, dont peut être des arabinoxylyanes. Ici encore ces données méritent d'être confirmées. Si aucune publication ne mentionne la présence d'arabinoxylyane et/ou d'arabinane chez *M. sativa*, Xiong *et al.* (2007) ont purifié et cloné une  $\beta$ -D-xylosidase d'alfalfa capable d'hydrolyser des arabinoxylyanes de blé et des arabinanes de betterave sucrière. De plus, Chen *et al.* (2006) ont mis évidence une voie particulière de liaison de l'acide férulique aux parois cellulaires de *M. sativa*. Sachant que l'acide férulique a été décrit comme lié aux résidus arabinoses, l'existence d'arabinanes et/ou d'arabinoxylyanes chez la luzerne peut représenter une hypothèse plausible. Cependant, là encore, l'imprécision des données ne nous permet pas de conclure. D'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer cette première hypothèse.

**Tableau 4 :** Pourcentage des polymères pectiques et hémicellulosiques calculés suivant Muschitz (2009) des fractions (F1) et (F4) extraits à partir des feuilles jeunes (J) et âgées (A) des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S). Pour chaque fraction, des rapports des teneurs sont représentés

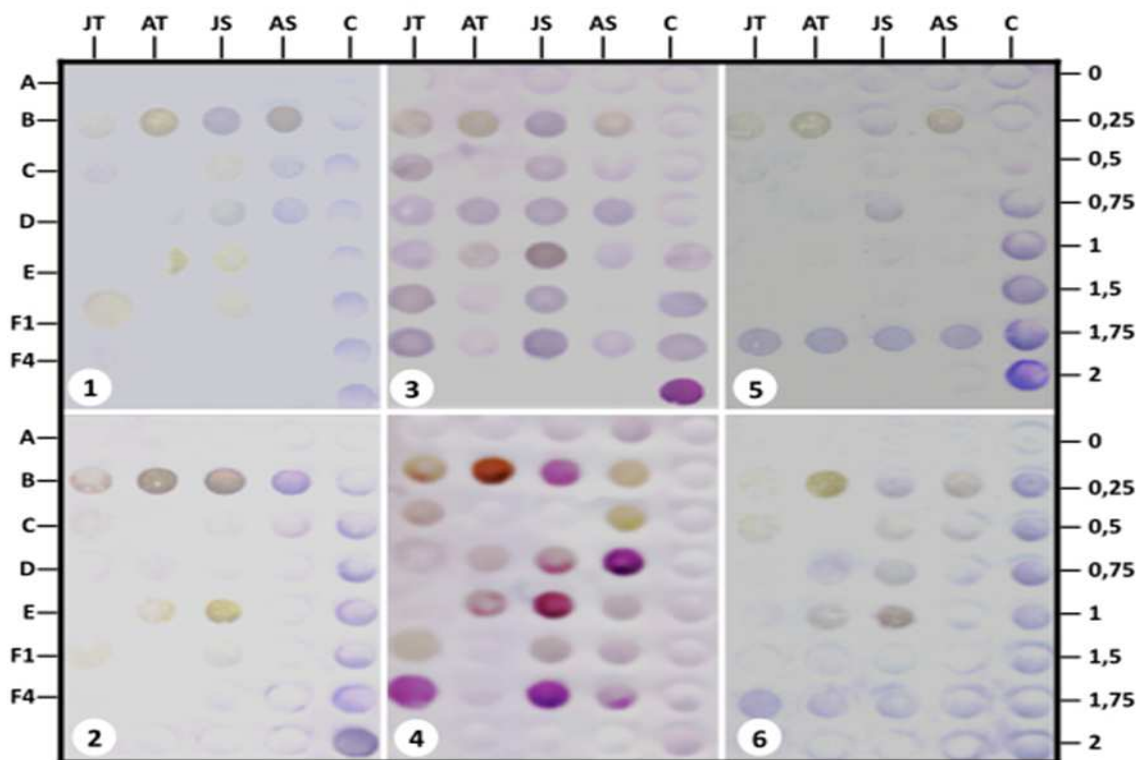
Fraction	État	Témoin (T)		Traité (S)		
		Pourcentage	Rapport	Pourcentage	Rapport	
F1	J	Pectin	48,99	45,52		
		Hemicellulose	50,12	39,55		
		XG	32,18	23,16		
		Other Hemicellulose	17,94	16,4		
F4	J	Pectin	62,96	74,53		
		Hemicellulose	34,58	23,27		
		XG	20,76	13,9		
		Other Hemicellulose	13,82	9,37		
F1	A	Pectin	62,81	72,93		
		Hemicellulose	49,56	25,26		
		XG	23,36	14,14		
		Other Hemicellulose	26,2	11,12		
F4	A	Pectin	65,17	70,8		
		Hemicellulose	33,36	26,34		
		XG	20,33	15,3		
		Other Hemicellulose	13,03	26,34		

Si l'on considère la fraction F4, potentiellement la plus riche et la plus pure en hémicellulose, nos résultats suggèrent une situation très différente entre les feuilles jeunes et les feuilles âgées. En effet, la contrainte saline induit une augmentation de ~50% des autres hémicelluloses dont, putativement, des arabinoxylanes et/les arabinanes alors que les proportions sont inversées dans les jeunes feuilles. Ces résultats pourraient s'interpréter quant à une réponse des feuilles âgées à la contrainte saline par une augmentation de la lignification des parois primaires *via* l'acide férulique, réduisant un peu plus la digestibilité de ces plantes chez les ruminants.

## **II-2 Effets du stress salin sur la distribution de certains épitopes polysaccharidiques dans les parois des feuilles jeunes et âgées de *M. sativa* cv Gabès.**

Afin de préciser les résultats obtenus précédemment, nous avons cherché à identifier certains épitopes de polysaccharides *via* l'utilisation d'un set d'anticorps monoclonaux commerciaux. Plusieurs anticorps ont ainsi été utilisés: JIM5 et JIM7 capables de reconnaître respectivement des chaînes d'HG peu ou pas méthylestérifiées et méthylestérifiées (figure 52, 1 et 2), LM5 et LM6 pour respectivement des  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes (figure 5, 3 et 4) et LM15 et CCRCM1 du fait de la capacité à reconnaître respectivement les chaînes des xyloglucanes non fucosylées et fucosylées (Figure 52, 5 et 6). Le choix de ces différents anticorps pour cette étude est lié avec les résultats présentés dans le chapitre 3: effet du stress salin sur la distribution des polysaccharides dans les veines mineures des feuilles jeunes et âgées de *M. sativa* cv Gabès. Les différents anticorps utilisés dans le cadre de cette étude montrent des profils d'expression différenciés en fonction des fractions A, B, C, D, E, F1, F4 (Figure 52). A l'exception des anticorps dirigés contre les  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes (Figure 52, 3 et 4) qui se retrouvent dans toutes fractions isolées (A, B, C, D, E, F1, F4), les polysaccharides pectiques (Figure 52, 1 et 2) et hémicellulosiques (Figure 52, 5 et 6) ne sont identifiables respectivement que dans les fractions B à E et B, D, E et surtout F4. Les HGs peu ou pas méthylestérifiées se retrouvent essentiellement dans les feuilles âgées et le stress semble avoir un effet stimulant sur l'accumulation de ces polymères (Figure 52, B1). Des marquages similaires peuvent être mis en évidence pour les HGs méthylestérifiées (Figure 52 B2) avec ici un niveau d'expression plus important que pour les HGs peu ou pas méthylestérifiées. A l'exception de la fraction B, peu d'HG reconnus par JIM5 et JIM7 peuvent être mis en évidence dans les autres fractions isolées. Ceci suggère que les autres fractions

« pectiques » ne contiennent pas ou très peu HG mais probablement des Rhamnogalacturonanes au regard de la composition molaire de ces fractions (Figure 52, 2).



**Figure 52 :** Dot blot réalisé à partir des fractions polysaccharidiques (A, B, C, D, E, F1 et F4) collectées suivant le protocole de Vanzin *et al.* (2002) des feuilles jeunes (J) et âgées (A) des plantes témoins (T) et des plantes traitées par 150 mM NaCl (S).

1, anticorps JIM5 dirigé contre des HGs peu ou pas méthylestérifiés; 2, JIM7 dirigé contre des HGs méthylestérifiés; 3, anticorps LM5 dirigé contre des  $\beta(1,4)$ -D-galactanes; 4, anticorps LM6 dirigé contre des  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes; 5, anticorps LM15 dirigé contre des XGs non fucosylés; 6, anticorps CCRCM1 dirigé contre des XGs fucosylés.

Si seules quelques fractions contenaient des HGs, il semble que la distribution des  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes soit bien plus complexe. Toutes les fractions semblent contenir ces polymères mais avec des intensités variables, à l'exception de la fraction A (Figure 52, 3 et 4). Les 2 polysaccharides identifiés par les anticorps LM5 et LM6 sont susceptibles de reconnaître des  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes et/ou des arabinogalactanes de type I. De ce fait, la fraction A enrichie en AGP, donc en arabinogalactanes de type II, n'est pas identifiée par l'anticorps LM5 mais peut l'être par anticorps LM6. Dans nos expériences on observe un net marquage des feuilles jeunes et âgées des plantes témoins avec l'anticorps LM6, suggérant la présence de d'AGP connu pour arborer des arabinogalactanes de type II (Clarke *et al.*, 1979; Fincher *et al.*, 1983). A la différence des arabinogalactanes de type II, les type I ne sont décrits que chez les rhamnogalacturonanes (Clarke *et al.*, 1979; Fry, 1988; Hinz *et al.*, 2005). En confrontant les

résultats des pourcentages molaires déterminés dans les fractions B, C, D, E, F1 et F4 (Figure 49 et 50) avec les résultats obtenus grâce aux anticorps LM5 et LM6 (Figure 5-3 et 5-4), on peut raisonnablement émettre l'hypothèse d'une abondance dans les feuilles jeunes (FJ) et âgées (FA) de rhamnogalacturonanes ramifiés, avec soit avec des chaînes latérales de  $\beta(1,4)$ -D-galactanes, d' $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes, d'arabinogalactanes de type I, soit d'un mélange complexe de ces 3 polymères. Le traitement de la fraction E avec des pectinases commerciales d'*Aspergillus niger* (Pectinex smash XXL, Novozymes), n'a pas permis d'éliminer toutes les pectines que l'on retrouve dans les fractions F1 et F4 (Figure 50 et 52). Le mix pectinex smash XXL a été identifié comme ayant une activité polygalacturonase majoritaire, et des activités xylanases et endoglucanases (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2008). Les polygalacturonases (EC 3.2.1.15) sont des enzymes de dépolymérisation des pectines qui catalysent l'hydrolyse de la liaison  $\alpha(1,4)$  glycosidique entre 2 unités d'acide galacturonique non estérifié (Fogarty et Ward, 1974). Lorsque les RG sont fortement branchés, d'autres enzymes que les polygalacturonases permettent de libérer les sucres constitutifs comme les RG-hydrolases (Schols *et al.*, 1990), les RG-acétylestérases (Searle-Van Leeuwen *et al.*, 1992), les RG-rhamnohydrolases (Mutter *et al.*, 1996), les RG-lyases (Azadi *et al.*, 1995; Mutter *et al.*, 1994) et les xylogalacturonane-exogalacturonases (Beldman *et al.*, 1996). La faible efficacité du mix pectinex smash XXL sur les pectines des feuilles jeunes et âgées de *M. sativa* cv Gabès pourrait alors s'expliquer par la présence, dans nos extraits, d'une forte proportion de RG I fortement ramifiés. En effet, les pourcentages molaires de GalA, de Rha ainsi que le très fort immunomarquage des fractions F1 et F4 avec les anticorps LM5 et LM6 plaident en faveur de la présence RG I fortement ramifiés. Lorsque l'on analyse la distribution des épitopes reconnus par LM5 et LM6 en fonction de l'âge et/ou du traitement on constate globalement que les tissus jeunes sont plus riches en RG I que les tissus âgés. Par contre le sel n'a pas ou très peu d'effets sur les RGI dans les feuilles jeunes alors qu'il entraîne une augmentation importante de la distribution des chaînes latérales dans les tissus stressés, à l'exception de la fraction B. On notera que le marquage est plus important pour les  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes que pour les  $\beta(1,4)$ -D-galactanes.

Le dernier polymère analysé ici est représenté par les xyloglucanes qui se retrouvent majoritairement dans la fraction F4, et dans une moindre mesure dans la fraction B (Figure 52 B5 et F4/5-5). Aucune intensité différenciée de marquage n'a pu être mise en évidence que ce soit en fonction de l'âge et/ou du traitement des feuilles avec 150 mM de NaCl. Ces résultats confirment les données obtenues en spectrométrie de masse (Figure 51). Lorsque l'on analyse

la présence de xyloglucanes fucosylés *via* l'utilisation de l'anticorps CCRCM1, on observe des profils bien plus complexes (Figure 52 5-6) avec des marquages pour d'autres fractions que la fraction F4. Là encore, les travaux conduisant à la caractérisation de cet anticorps ont permis de mettre en évidence la possibilité d'hybridation croisée avec des RG I (Puhlmann *et al.*, 1994; Freshour *et al.*, 1996; 2003; Pattathil *et al.*, 2010). Cependant, quelque soit la cible de l'anticorps, aucune corrélation entre le niveau de fucosylation des RG I et des XyG n'a pu être mis en évidence.

### III Discussion, Conclusion

Sous l'effet du stress salin la paroi cellulaire de *Medicago sativa* cv Gabès est le théâtre de plusieurs modifications quantitatives et qualitatives de ses polymères. Cette capacité de modification de la composition biochimique de l'ensemble des parois foliaires peut être à l'origine de la tolérance de cette espèce à un certain seuil de salinité, en l'absence de compartimentation. Nos résultats concernent la totalité des parois du limbe, englobant donc l'appareil vasculaire et les cellules assimilatrices du mésophylle. Rappelons que dans notre protocole, au moment de l'extraction et du fractionnement de la paroi cellulaire, la cellulose, précipitée au cours de l'extraction, et formant alors le culot, a été éliminée. Ainsi, les polymères pariétaux analysés dans les différentes fractions ont été les hémicelluloses et les pectines. De plus, notre analyse ne concerne pas la fraction A, enrichie en AGPs et en N-glycoprotéines, car cette dernière contient des quantités non négligeables d'amidon, et n'a pas été purifiée. Pour les autres fractions, B, C, D, E, F1 et F4, les dosages colorimétriques montrent une hétérogénéité des réponses des deux étages foliaires vis-à-vis du traitement de 150 mM sel. Prenant l'exemple des **oses totaux** des augmentations significatives de toutes les fractions pectiques, et de la première fraction hémicellulosique (F1) ont été notées dans les feuilles jeunes des plantes stressées, comparativement aux plantes témoins. Or, au début de l'application du stress salin nous avons observé que la croissance des plantes était stimulée et que l'activité des feuilles jeunes restait significativement supérieure à celle des feuilles âgées. Ces données peuvent donc être reliées avec l'augmentation des teneurs des oses totaux des feuilles jeunes. Concernant les feuilles âgées, plus longtemps exposées au sel que les jeunes, la réponse a été variable, entre augmentation et réduction des oses totaux.

Les données du dosage colorimétrique montrent aussi que les teneurs en **acides uroniques** sont plus faibles que celles des oses neutres. Sous cette contrainte saline, la quantité des acides uroniques augmentent pour quelques échantillons, comme dans les fractions C et F4 des

feuilles jeunes et **B, D, F1** et des feuilles âgées. Une telle augmentation a été détectée, lors stress salin dans la tige chez des génotypes (3906) de maïs (Sensible) et (SR) (Résistant) (Uddin *et al.*, 2012 ; Leubner, 2011) et lors de stress hydrique chez la vigne (Sweet *et al.*, 1990). Ces observations peuvent être liées à la réduction et la dégradation ou à l'augmentation de la synthèse des « polyuronides » (Zhong et Lauchli, 1993). A partir de ces données globales relatives aux teneurs en sucres pariétaux l'étude de la tolérance (c'est connu) de *M. sativa* cv Gabès (tolérance, évitement, sensibilité) à enlever au stress salin a été poursuivie par la détermination plus fine des variations des **pourcentages molaires en monosaccharides**.

L'analyse des fractions pariétales en CLG permet de retrouver les constituants classiquement connus dans les parois primaires des Dicotylédones. Cette analyse monomérique de la paroi des feuilles de *M. sativa* cv Gabès montre que les sucres neutres (Ara, Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc) sont généralement bien représentés dans les fractions pectiques et hémicellulosiques des échantillons. Ces données se conforment partiellement aux données du dosage colorimétrique qui, comparativement, ne ramène que des résultats approximatifs. Les monomères les mieux représentés sont le Gal, Gal A et l'Ara pour les fractions pectiques et le Xyl pour les fractions hémicellulosiques. Les oses Gal et Ara sont souvent trouvés en association dans la paroi cellulaire, formant des homopolymères pectiques d'Arabinane et de Galactane, ou bien des hétéropolymères d'Arabinogalactane de type I (AGI) et II (AGII) (Buchanan *et al.*, 2000). Ces deux AG représentent respectivement des ramifications de RGI (Vincken *et al.*, 2003) et une fraction de la partie glucidique des AGPs (Ridley *et al.*, 2001), qui sont extraits dans la fraction **A**. Dans *M. sativa* Gabès, le calcul des pourcentages molaires d'homogalacturonanes (**HG**) dans les fractions enrichies en **pectines (B, C, D, E)** montre que ces polymères sont moins abondants que les RG dans la majorité des échantillons. Ces pourcentages molaires des HG augmentent sous l'effet de stress salin dans les feuilles jeunes et âgées des fractions **C** et **E**, alors que dans les deux autres fractions pectiques (**B** et **D**) la teneur de ce polymère est variable. Concernant les **RG**, il s'agit de RGI, mieux représentés dans la paroi primaire des dicotylédones que les RGII (Ermel *et al.*, 2000). Le stress salin exerce un effet dépressif sur les teneurs de ces RGI, sauf pour la fraction **D** des feuilles jeunes et âgées et la fraction **E** des feuilles âgées de *M. sativa* cv Gabès. La diminution des RGI est souvent accompagnée par une réduction des chaînes latérales d'arabinogalactanes (AGI et AGII), comme décrit dans la tomate (Wydra et Beri, 2006 ; Muschitz, 2009). Une hétérogénéité marquée des pourcentages molaires en pectines est obtenue sous l'effet du stress salin, selon l'étage foliaire et les fractions analysées, enrichies en ce polymère, ou en hémicelluloses. Remarquons que cette étude quantitative relative aux teneurs en pectines



dans les parois foliaires des plants témoins ou traités, ne donne pas une idée claire sur la réponse de l'espèce *Medicago* vis-à-vis du stress salin.

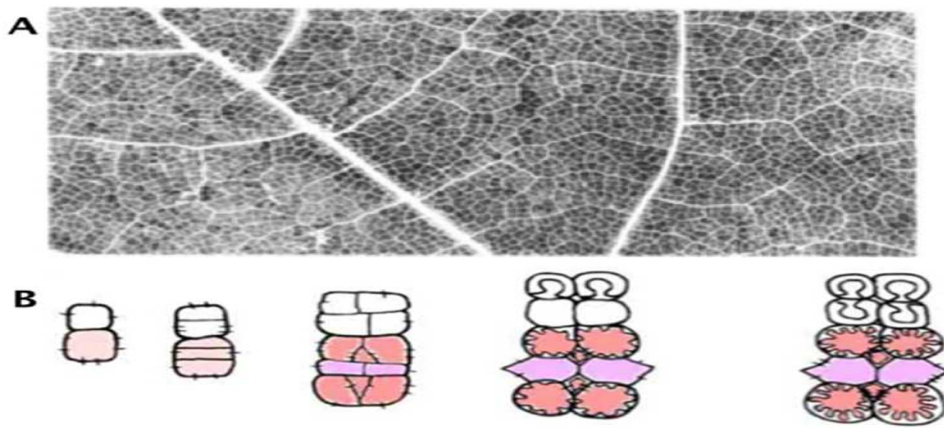
Les pectines sont limitées à la paroi cellulaire primaire « extensible », ce qui suggère leur rôle dans l'expansion cellulaire (Knox et Evert 2006). Dans notre analyse une **augmentation des pourcentages molaires** de ces polymères peut-être traduite comme une réponse adaptative à la teneur de sel à 150 mM, vu que leur augmentation dans la paroi primaire entraîne une augmentation de l'extensibilité de la paroi, donc une meilleure réponse au stress salin. Les réductions révélées en pourcentages molaires des pectines dans les fractions B, D, E des feuilles jeunes, sous stress salin ont été également détectées dans la littérature aux niveaux des coléoptiles d'orge en phase d'élongation (Gibeaut *et al.*, 2005). Généralement en conditions de stress salin une augmentation simultanée en pectines et en acides uroniques se produit. C'est le cas dans les racines de coton et les feuilles de maïs (Zhang et Lauchli, 1993 ; Uddin 2012). La dé-estérification des acides uroniques peut provoquer une réduction de la croissance, en formant un gel de pectines (Cosgrove, 2005 ; Al Ghazi *et al.*, 2009). Pitann *et al* (2009) et Uddin (2012) ont déterminé une corrélation positive entre les degrés de la méthylation des acides uroniques et la croissance. Donc, l'adaptation au stress abiotique, spécifiquement au stress salin, n'est pas liée seulement à la quantité des pectines, mais aussi au degré de méthyl-estérification et à l'interaction entre les différents polymères pariétaux. C'est pour cette raison que l'étude de degré de méthyl-estérification des polymères pectiques serait souhaitable dans *M sativa* cv Gabès. La présence de glucose dans les fractions pectiques peut résulter de la présence de faibles quantités de cellulose qui n'ont pas sédimenté au cours du protocole d'extraction des pectines, mais également de la présence d'une fraction des XyGs, polymère fréquemment rencontré dans la paroi primaire des Dicotylédones. Ces données peuvent expliquer la présence des **hémicelluloses** dans les fractions enrichies en pectines, ou bien la formation des chaînes de xylanes acides, lorsque le xylose est substitué au Gal A (cas des parois secondaires). **Dans les témoins, les pourcentages molaires des hémicelluloses, dans les fractions supposées enrichies en pectines (B, C, D, E), restent inférieurs à ceux des fractions riches en hémicelluloses (F1 et F4), également riches en pectines.** Ce résultat s'explique car les fortes liaisons qui existent entre pectines, hémicelluloses et cellulose rendent l'obtention d'hémicelluloses pures particulièrement difficile (Konno *et al.*, 2005). Sous stress salin, la variation de ces pourcentages est hétérogène dans les fractions riches en pectines, mais réduite dans les fractions **F1 et F4**. Dans ces dernières, les hémicelluloses, et particulièrement les xyloglucanes, sont moins représentés sous l'effet de 150mM de NaCl.

Selon le modèle de la paroi cellulaire végétale, les xyloglucanes se lient à la cellulose formant un réseau XyGs-cellulose qui représente la structure porteuse de la paroi primaire (Keegstra *et al.*, 1973; Obel *et al.*, 2007; O'Neill and York, 2003) . Ils correspondraient à des structures de séparation des microfibrilles de cellulose pour éviter leur agrégation (Thompson, 2005), et ainsi permettraient de maintenir la porosité et la perméabilité de la paroi cellulaire primaire.

## CHAPITRE 3 EFFETS DU STRESS SALIN SUR LA DISTRIBUTION DES POLYSACCHARIDES DANS LES PAROIS DES VEINES MINEURES DE

*M. sativa cv Gabès*

Après avoir successivement analysé les effets du stress salin sur les modifications anatomiques, physiologiques et biochimiques des feuilles jeunes et âgées, nous avons observé la distribution des polymères pariétaux dans le système vasculaire de ces feuilles, et plus particulièrement dans les veines mineures.

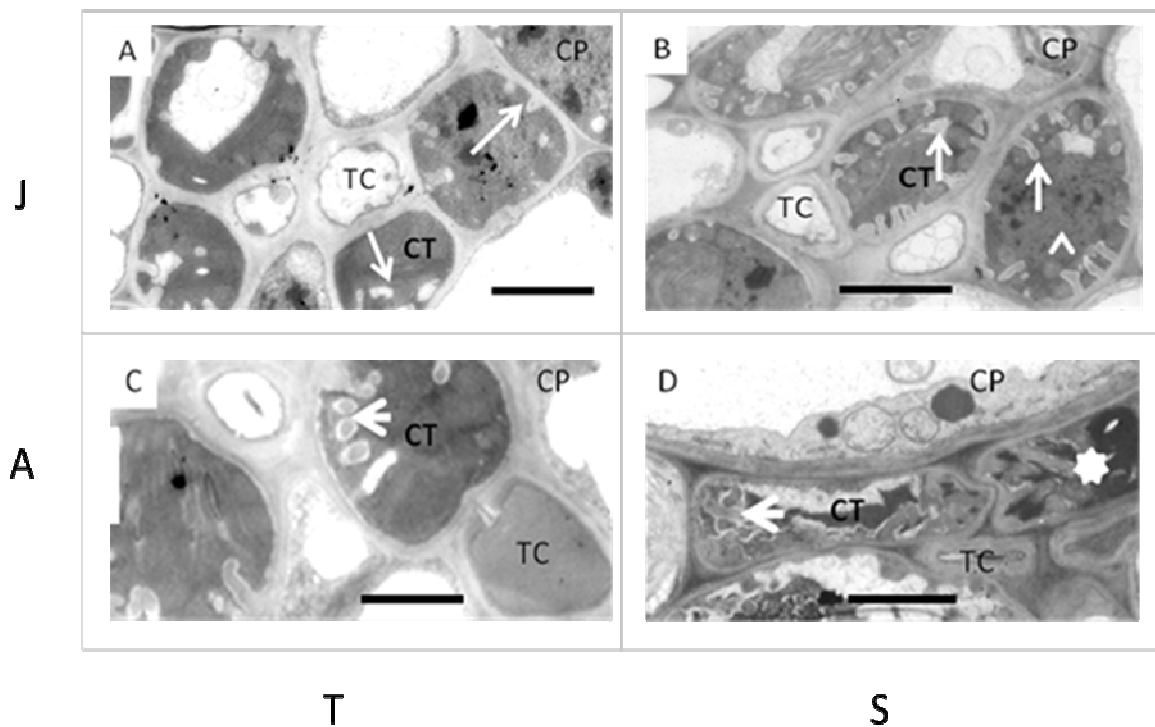


**Figure 53 :** **A**, Présentation du réseau vasculaire du limbe foliaire des dicotylédones, **B**, Structure schématique transversale des veines mineures de type 2 de plantes herbacées mettant en évidence le plan de division cellulaire au cours du développement suivant le modèle décrit par Gamalei (1990).

Dans les feuilles, le réseau vasculaire se compose de nervures, principale (majeure) et secondaires, d'ordre 1, 2, 3 ..., d'où émergent un très grand nombre de veines mineures où s'achève le flux xylémien et débute le flux phloémien. Les veines mineures se caractérisent, entre autres, par la présence de cellules compagnes (CCs) qui vont établir, ou non, des liaisons symplastiques avec les cellules du mésophylle. Gamalei et Yu (1989) a proposé, sur la base d'une étude faite sur 700 espèces différentes appartenant à 140 familles de plantes, un classement des veines mineures en 2 grands types en fonction de la densité des plasmodesmes interconnectant les CCs et les cellules du mésophylle: (i) le type 1, où les CCs sont riches en plasmodesme, et (ii) le type 2, correspondant aux veines mineures sans plasmodesmes (Figure 53). Quelque soit le type de veines mineures, ces dernières assurent, soit *via* les plasmodesmes et/ou par le truchement de transporteurs plasmalemiques, des flux de nutriments (flux d'assimilats mais aussi flux d'ions toxiques). Les veines mineures sont, de ce fait, en première ligne pour permettre, ou non, des échanges avec les cellules du mésophylle.

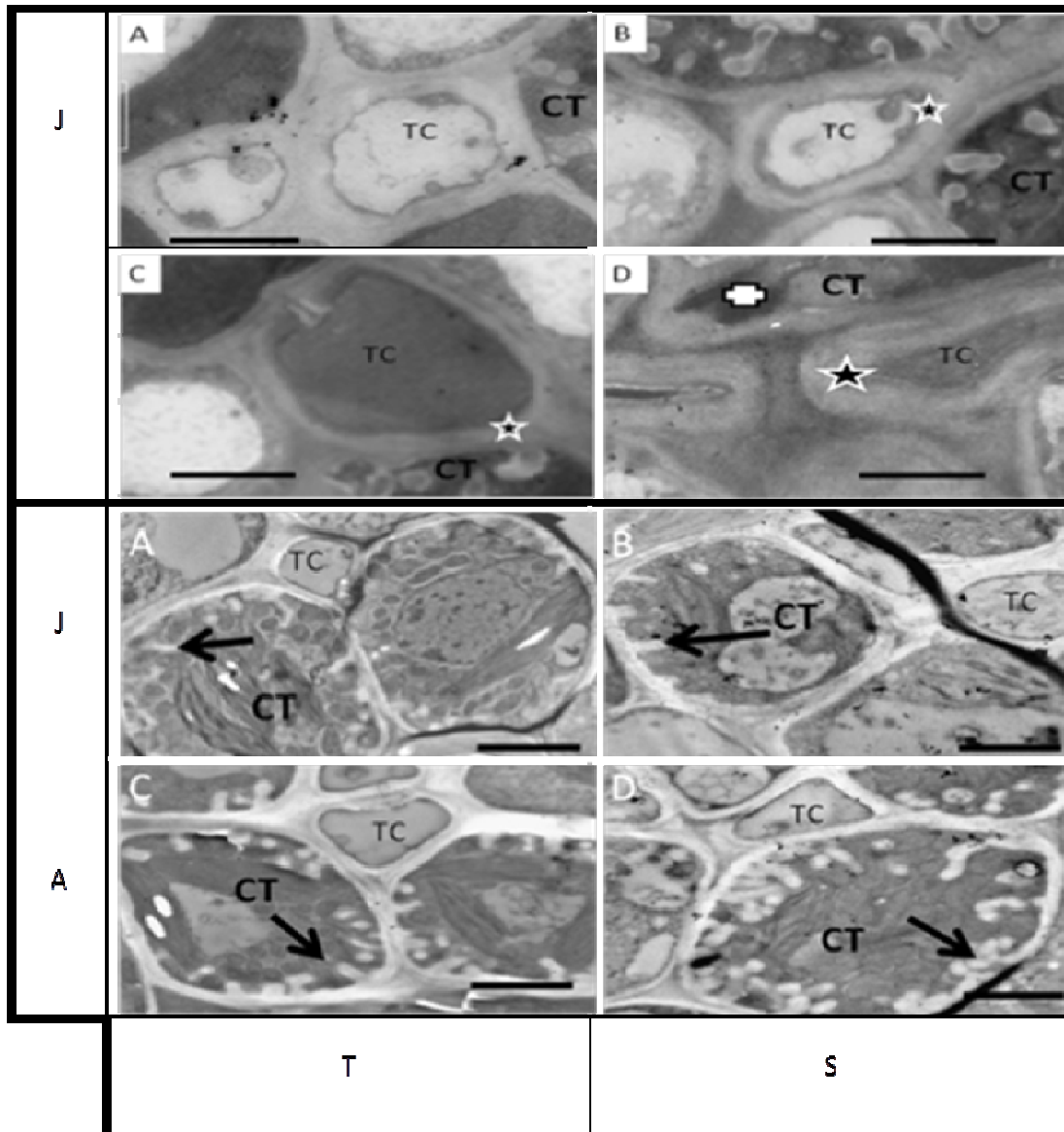
## I Effets du stress salin sur l'ultrastructure des veines mineures de *M. sativa* cv Gabès

Avant d'étudier et d'analyser la composition biochimique des parois des veines mineures des feuilles jeunes et âgées, une étude ultrastructurale de ces veines a été réalisée après fixation des échantillons au glutaraldéhyde et inclusion en résines Epoxy (Figure 54 et 55). Les nervures mineures des jeunes feuilles témoins contiennent 1 ou 2 éléments de xylème, deux ou trois tubes criblés de 2 à 4 µm de diamètre, des cellules compagnes de 4 à 8 µm de large et 2 ou 3 cellules parenchymateuses. Ces dernières possèdent un cytoplasme dense autour du noyau volumineux, quelques profils vacuolaires et des protubérances pariétales internes développées sur la région opposée au tube criblé correspondant (Type A). D'une manière générale, le stress salin augmente le nombre et la taille des protubérances pariétales des cellules de transfert phloémiques des veines mineures des feuilles de *M. sativa* par comparaison aux témoins (Figure 55).



**Figure 54 :** Ultrastructure du phloème dans les nervures mineures de *M. sativa* var Gabès des feuilles jeunes (**A, B**) et âgées (**C, D**) de plantes témoins (**A, C**) et de plantes traitées par 150 mM de NaCl (**B, D**). Les protubérances pariétales internes (flèche) des cellules de transfert (CT) augmentent sous l'effet de NaCl (**B**). Dans les feuilles âgées, ces protubérances sont présentes dans les témoins (**C**), et dans les traités (**D**) où le complexe phloémien est altéré (astérisque) par le sel (**D**). CP, cellule parenchymateuse, TC, tube criblé. Glutaraldéhyde, Epon-Araldite, Sections ultra fines, Uranyl-plomb. Echelle 4µm.

Dans les jeunes feuilles, le sel augmente le nombre et la taille des protubérances pariétales des cellules de transfert, et la paroi des tubes criblés développe une couche nacrée distincte (Figure 55 B, D, C à mettre dans l'ordre vérifier sur planche). Dans les nervures mineures des feuilles âgées des plantes, la surface pariétale des invaginations pariétales dans les cellules compagnes est plus importante que dans les feuilles jeunes (Figure 55).



**Figure 55 :** Détail du complexe phloémien des nervures mineures de *M. sativa* var Gabès, dans les feuilles jeunes (A, B) et âgées (C, D) de plantes témoins (A, C) et de plantes traitées par 150 mM de NaCl (B, D). Le traitement salin induit la présence d'un corps nacré (étoile) dans le tube criblé dans la feuille jeune (B), qui est épaissi par NaCl dans la feuille âgée (comparaison entre C et D) ; CP, cellule parenchymateuse, TC, tube criblé. Glutaraldéhyde, inclusion résine Epoxy. Echelle 2µm.

Complexe phloémien des nervures mineures de *M. sativa* var Gabès des feuilles jeunes (A, B) et âgées (C, D) de plantes témoins (A, C) et de plantes traitées par 150 mM de NaCl (B, D). Les protubérances pariétales (flèches) sont bien définies, le contenu cytoplasmique plus diffus après fixation PFA/ Glutaraldéhyde, inclusion LRW. Echelle 4µm.

Les fixations des échantillons dans un mélange de paraformaldéhyde/glutaraldéhyde, et l'inclusion en résines acryliques, notamment en LRW (Figure 55), ne permettent pas une préservation de l'ultrastructure aussi bonne que le traitement décrit précédemment (Figure 54) mais, en revanche, établissent des conditions favorables aux immunodétections.

Ce sont donc ces échantillons qui ont été utilisés pour les expériences d'immunomarquage en microscopie électronique à transmission (MET), avec les anticorps dirigés contre divers polymères pariétaux.

## **II Effet de NaCl sur la distribution des polysaccharides pariétaux dans les cellules de transfert des nervures mineures**

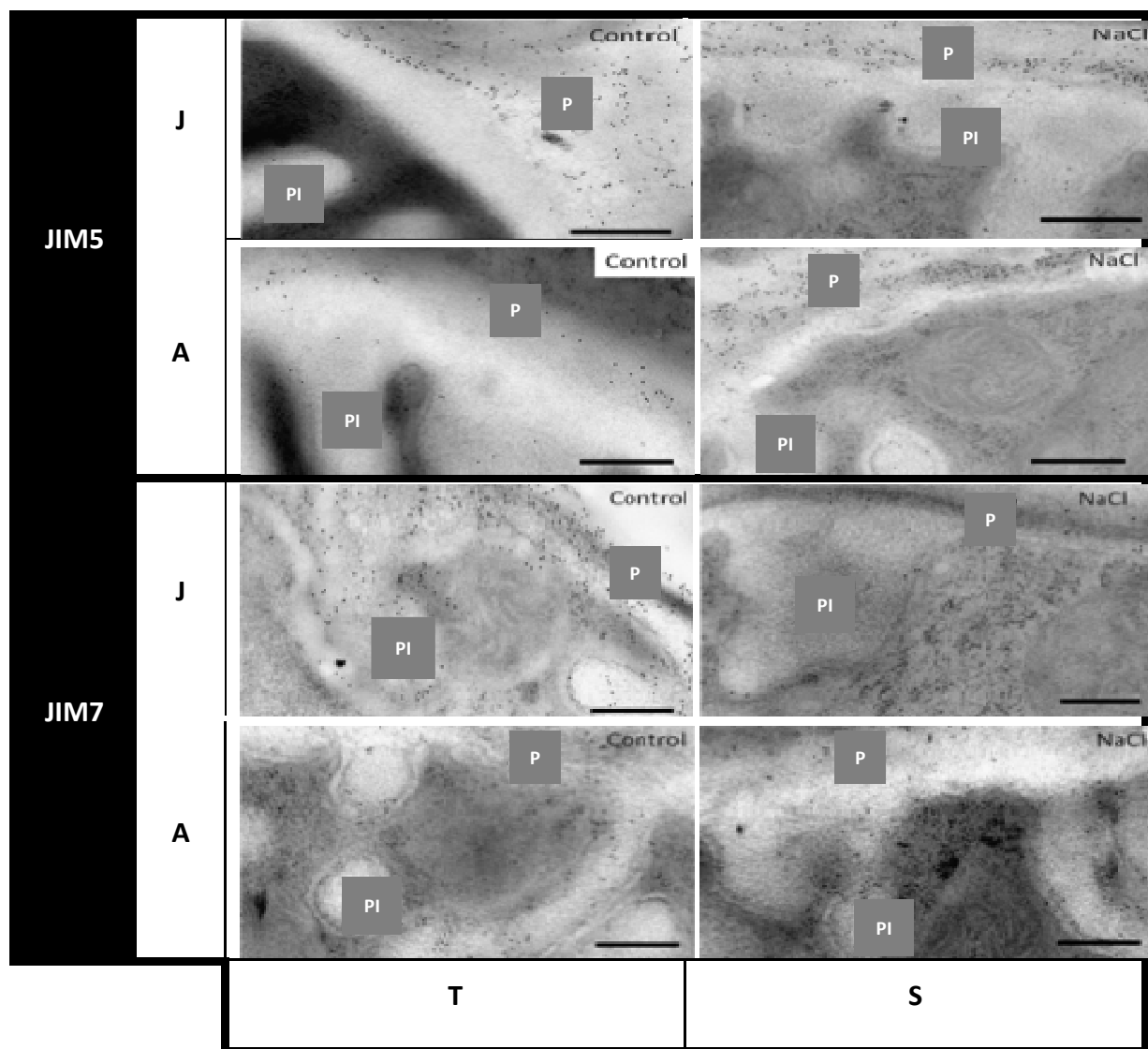
La distribution comparative des polymères pariétaux entre feuilles jeunes et âgées, témoins ou traitées par NaCl à 150 mM, a été étudiée après un immunomarquage réalisé selon les conditions données dans le matériel et méthodes. Plusieurs anticorps ont ainsi été utilisés: JIM5 et JIM7 capables de reconnaître respectivement des chaînes d'HG peu ou pas méthylestérifiées et méthylestérifiées (Figure 56), LM5 et LM6 pour respectivement les  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes (Figure 57), et LM15 et CCRCM1 pour leur capacité à reconnaître respectivement les chaînes des xyloglucanes non fucosylées et fucosylées (Figure 58). Le choix de ces différents anticorps pour cette étude est à lier avec les résultats présentés dans le chapitre 2 : « Effets du stress salin sur la distribution des polysaccharides dans les parois des veines mineures *M. sativa* cv Gabès ». Nous avons, de plus, utilisé 2 anticorps, dirigés contre les AGP (JIM13 et JIM8) (Figure 59). En effet, des travaux précédents (Boughanmi *et al.*, 2010) avaient montré l'importance des AGPs dans les cellules de transfert en réponse au stress salin. Les données numériques du comptage sont présentées dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Dénombrement des marquages immunologiques obtenus sur la paroi des cellules de transfert phloémiennes. Coupes des nervures mineures de feuilles jeunes (J) et de feuilles âgées (A) de *M. sativa* cv Gabès témoins (T) et traitées par 150 mM de NaCl (S). JIM5, anticorps anti HGs peu ou pas méthylestherifiés, JIM7, anticorps anti HGs méthylestherifiés, LM5, anticorps anti  $\beta$  (1,4)-galactanes, LM6, anticorps anti  $\alpha$  (1,5)-arabinanes, LM15, anticorps anti XyG, CCRCM1, anticorps anti XyG fucosylés, JIM13, anticorps anti  $\alpha$ (1,5)-arabinanes, JIM8, anticorps anti XyG.

		Paroi primaire			Protubérances pariétales		
		J	A	J/A	J	A	J/A
JIM5	T	13,84 ± 1,9	1,96 ± 0,2	7,06	6,19 ± 0,9	2,7 ± 0,4	2,29
	S	25,32 ± 3,1	11,42 ± 1,4	2,21	4,5 ± 1,15	2,94 ± 0,48	1,53
	T/S	48%	83%		-27%	8%	
JIM7	T	5,4 ± 0,5	1,96 ± 0,19	2,75	4,06 ± 0,78	2,14 ± 0,23	1,89
	S	2,67 ± 0,60	2,59 ± 0,29	1,03	3,09 ± 1,14	2,82 ± 0,25	1,09
	T/S	-51%	24%		-24%	24%	
LM5	T	1,34 ± 0,27	2,71 ± 0,37	0,49	1,36 ± 0,20	1,36 ± 0,20	1
	S	4,8 ± 0,94	6,61 ± 0,60	0,72	1,73 ± 0,51	13,87 ± 0,2	0,12
	T/S	72%	59%		21%	90%	
LM6	T	2,80 ± 0,66	2,66 ± 0,29	1,05	2,20 ± 0,39	4,44 ± 0,26	0,49
	S	5,30 ± 0,50	5,75 ± 0,97	0,92	12,60 ± 1,1	16,90 ± 1,6	0,74
	T/S	47%	54%		89%	73%	
LM15	T	1,63 ± 0,50	3,24 ± 0,47	0,5	1,74 ± 0,22	5,35 ± 0,35	0,32
	S	5,80 ± 0,47	5,67 ± 1,16	1,02	12,28 ± 1,4	11,8 ± 1,43	1,04
	T/S	72%	43%		86%	57%	
CCRCM1	T	1,70 ± 0,32	1,77 ± 0,46	0,96	1,67 ± 0,40	2,44 ± 0,34	0,68
	S	3,05 ± 0,40	2,95 ± 0,33	1,03	2,16 ± 0,24	6,60 ± 0,90	0,32
	T/S	44%	40%		23%	63%	
JIM13	T	3,05 ± 0,40	3,27 ± 0,41	0,93	3,43 ± 0,38	3,05 ± 0,32	1,12
	S	1,87 ± 0,32	2,79 ± 0,27	0,67	1,83 ± 0,38	2,73 ± 0,21	0,67
	T/S	-39%	-15%		-47%	-10%	
JIM8	T	11,02 ± 0,7	3,30 ± 0,57	3,33	24,38 ± 1,1	3,64 ± 0,76	6,69
	S	7,59 ± 0,62	5,98 ± 0,79	1,26	14,64 ± 1	10,19 ± 0,7	1,43
	T/S	-31%	45%		-40%	64%	

## II-1 Distribution des pectines

Quelque soit le degré de méthylesterification, des homogalacturonanes sont toujours retrouvés dans la paroi primaire et dans les protubérances pariétales des cellules de transfert des feuilles de *M. Sativa* cv Gabès (Figure 56).



**Figure 56** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps JIM5 et JIM7. Nervures mineures de feuilles jeunes (J) et âgées (A) de *M. sativa* cv Gabès témoins (Control) et traitées (NaCl) à par 150 mM. P, paroi primaire; PI, protubérance. Echelle 0,5 µm.

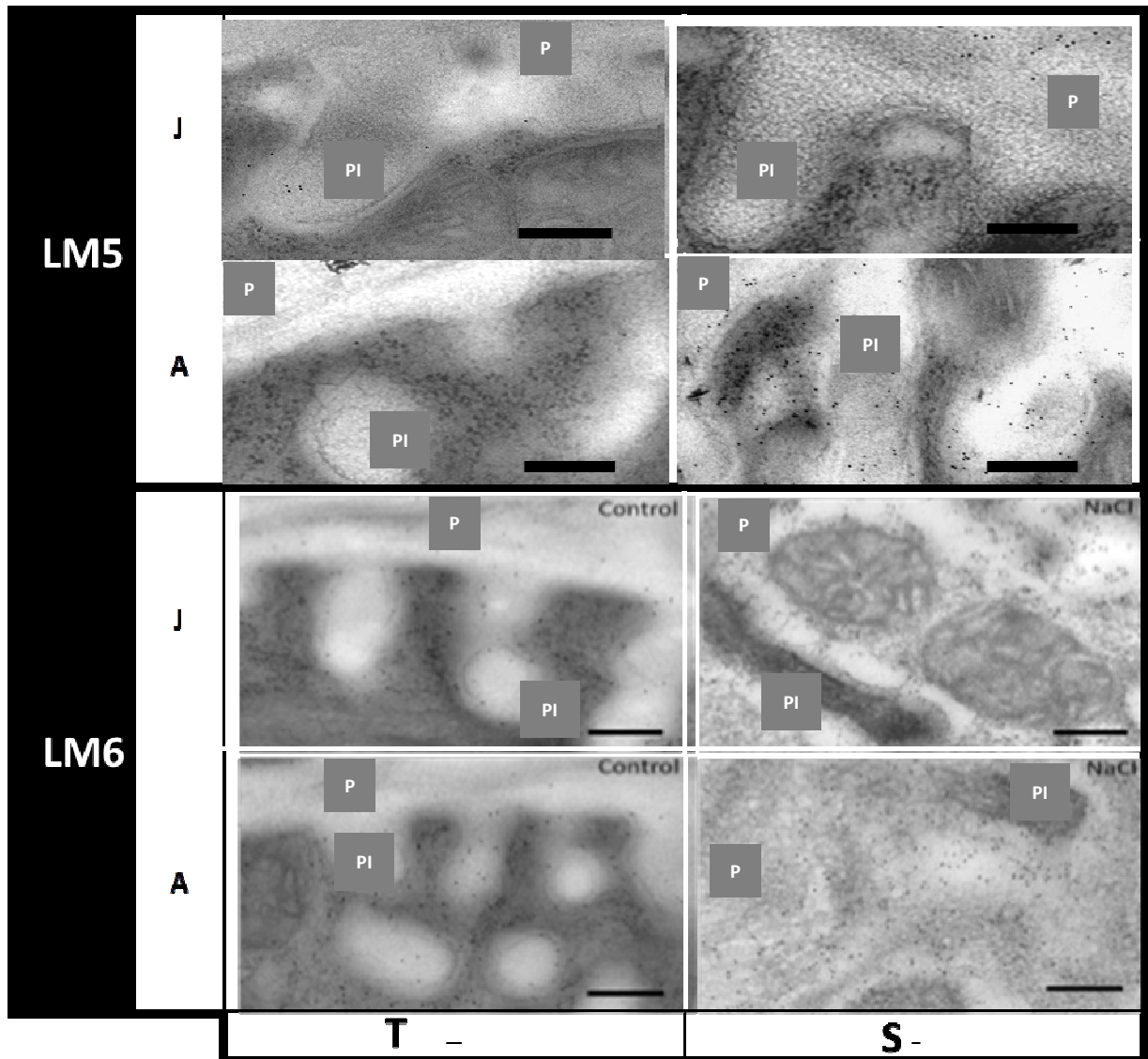


Cependant, des différences d'intensité dans l'immunomarquage ont été observées à la fois entre la paroi primaire et les protubérances et en fonction de l'âge de la feuille (Tableau 5).

Le nombre d'épitopes reconnus par JIM5 et JIM7 est globalement plus important dans les parois primaires par rapport aux protubérances et dans les feuilles jeunes par rapport aux feuilles âgées. De façon similaire, le stress salin réduit de 25 à 50% le nombre d'épitopes dans les feuilles jeunes et augmentent de 8 à 80% dans les feuilles âgées dans les parois (paroi primaire et protubérances pariétales) des cellules de transfert des plantes stressées par rapport aux plantes témoins. Si la méthylestérification réduit la plasticité pariétale en augmentant le nombre de liaisons intermoléculaires entre les polymères pariétaux le stress salin semble alors avoir ici un effet particulièrement marqué sur les parois des cellules de transfert des feuilles âgées, dont la teneur en sel a été décrite comme étant plus importante que dans les feuilles jeunes (Boughanmi *et al.*, 2003). A l'instar de ce qui a été décrit pour d'autres tissus, l'accumulation de sel dans les feuilles induit une rigidification des tissus due à des dépôts de lignine. Ici, le système vasculaire et les cellules impliquées dans le chargement phloémien sont affectés. Par opposition, les feuilles jeunes semblent mieux protégées de cette évolution qui compromet à la fois la croissance cellulaire et la plasticité pariétale.

A l'instar des HGs, des anticorps dirigés contre des  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et les  $\alpha(1,5)$ -L-arabinanes (LM5 et LM6) nous ont permis d'identifier ces polymères dans les parois primaires et dans les protubérances pariétales (Figure 57). La distribution de ces épitopes augmente avec l'âge et la contrainte saline, à la fois dans les parois primaires et dans les protubérances pariétales (Tableau 5). Ici encore, les effets du traitement salin sont plus importants dans les parois (+50% dans la paroi primaire et +70% dans les protubérances pariétales) des feuilles âgées par rapport aux feuilles jeunes (Tableau 5). Nous avons vu dans le chapitre précédent que les  $\beta(1-4)$ -D-galactanes et les  $\alpha(1-5)$ -L-arabinanes peuvent former des homopolymères ou encore des hétéro polymères, comme les arabinogalactanes de type I (AGI), mais sont susceptibles également de définir les ramifications des rhamnogalacturonanes de type I. Dans ce dernier cas, des chaînes latérales constituées essentiellement de sucres neutres de  $\beta(1-4)$ -D-galactanes et/ou  $\alpha(1-5)$ -L-arabinanes sont généralement fixés sur la position O-4 et parfois O-3 des unités de Rha des RGI. Si l'on prend comme hypothèse que les chaînes de  $\beta(1-4)$ -D-galactanes et/ou  $\alpha(1-5)$ -L-arabinanes sont fixées sur des RGI, alors le stress salin pourrait avoir un effet stimulateur sur le degré de branchement des RGI (« hairy region ») dans la paroi primaire et dans les protubérances des cellules de transfert.

Les galactanes et, dans une moindre mesure les arabinanes, ont souvent été identifiés comme régulés au cours du développement des plantes (Jones *et al.* , 1997; Willats *et al.* , 1998; Bush et McCann, 1999; Ermel *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2001).



**Figure 57** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps LIM5 et LIM6, anti galactanes et arabinanes. Nervures mineures des feuilles jeunes (J) et âgées (A) de *M. sativa* cv Gabès témoins (Control) et traitées (NaCl) à 150 mM. P, paroi primaire; PI, protubérance. Echelle 0,5µm.

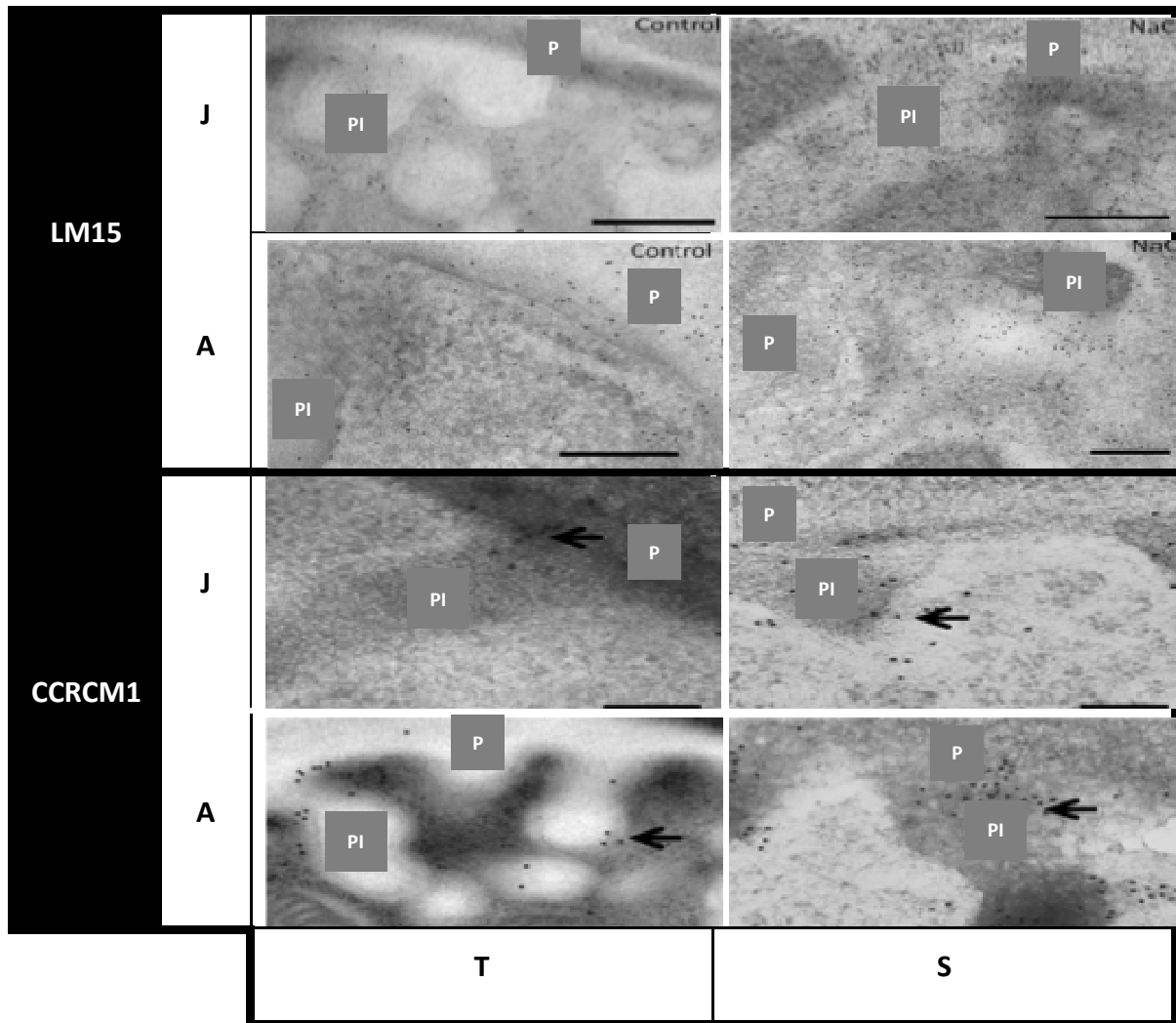
La transition entre division et élongation cellulaire se traduit par une augmentation des galactanes et une diminution des arabinanes dans les parois primaires des cellules de carotte (Willats *et al.*, 1998). L'implication des arabinanes et/ou des galactanes dans la cohésion de la paroi et/ou sa plasticité a également été mise en évidence lors de stress hydrique par Harholt *et al.* (2010), ou plus récemment lors de contraintes minérales chez la vigne (Fernandez *et al.*, 2013). Pour ces auteurs, les arabinanes et/ou galactanes seraient plus

fortement liés à la cellulose et aux hémicelluloses. D'autres résultats montrent la présence de liaisons covalentes entre les chaînes latérales des RGI et les microfibrilles de cellulose (Zykwinska *et al.*, 2007) et entre les xyloglucanes (XyG) et les pectines, dont les rhamnogalacturonanes (Popper *et al.*, 2005; Marcus *et al.*, 2008). De ce fait, l'augmentation des liaisons intermoléculaires entre les polymères pectiques et cellulosiques conduit à une rigidification des cellules, pouvant limiter les flux ioniques, dont les influx sodiques, en condition de stress salin. Peu d'informations, capables d'étayer cette hypothèse, sont disponibles à ce jour. Humphrey *et al.*, (2007) suggèrent, qu'un choc osmotique pourrait induire une déformation de la paroi cellulaire permettant de libérer du  $Ca^{2+}$ . Ces influx de  $Ca^{2+}$  vont alors stimuler le fonctionnement des  $H^+$ -ATPases membranaires (Hasegawa *et al.*, 2000), ce qui va modifier les flux de nutriments.

## II-2 Distribution des hémicelluloses

Des xyloglucanes (XyG) ont été identifiés, tant dans la paroi primaire que dans les protubérances des plantes témoins et des plantes traitées (Figure 6). Cependant, leur évolution diffère légèrement en fonction de l'âge, à la fois chez les plantes témoins et les plantes traitées (Tableau 5). Pour les témoins, les XyG augmentent avec l'âge, alors qu'ils restent invariants chez les plantes stressées, et ceci à la fois dans la paroi primaire et dans les protubérances pariétales (Figure 58, Tableau 5). Par contre, quelque soit l'âge des feuilles, la distribution des XyG fucosylés et non fucosylés augmentent en moyenne de + de 40% dans les parois primaires et les protubérances des nervures mineures. Le stress salin semble donc modifier quantitativement et qualitativement l'hémicellulose majoritaire dans les angiospermes dicotylédones. Là encore, une augmentation des polymères pourrait avoir comme conséquence une augmentation des liaisons intermoléculaires entre hémicelluloses et pectines, pouvant alors contribuer à une réduction de la plasticité pariétale. Cette rigidification des parois modifierait en conséquence les échanges trophiques entre les cellules compagnes et le système vasculaire conduisant. Dans les témoins, les Xyloglucanes, reconnus par LM15, sont plus abondants dans les feuilles inférieures que supérieures dans la paroi primaire (rapport= 0,50), et plus nettement dans les protubérances pariétales (rapport H/B= 0,32), Sous l'effet du sel, ils sont plus augmentés dans les feuilles hautes (71,90% paroi primaire et 85,83% dans leurs protubérances) que feuilles basses (43,00% paroi primaire et 56,66% protubérances) (Figure 58). Les Xyloglucanes fucosylés, reconnus par CCRC-M1 dans les témoins, sont également distribués dans la paroi primaire des deux sortes de feuilles, mais sont plus abondants dans les protubérances pariétales des feuilles basses (rapport J/A= 0,68), Le sel

produit une augmentation générale de la distribution de ces sites dans les parois et les protubérances de toutes les feuilles (Figure 58).

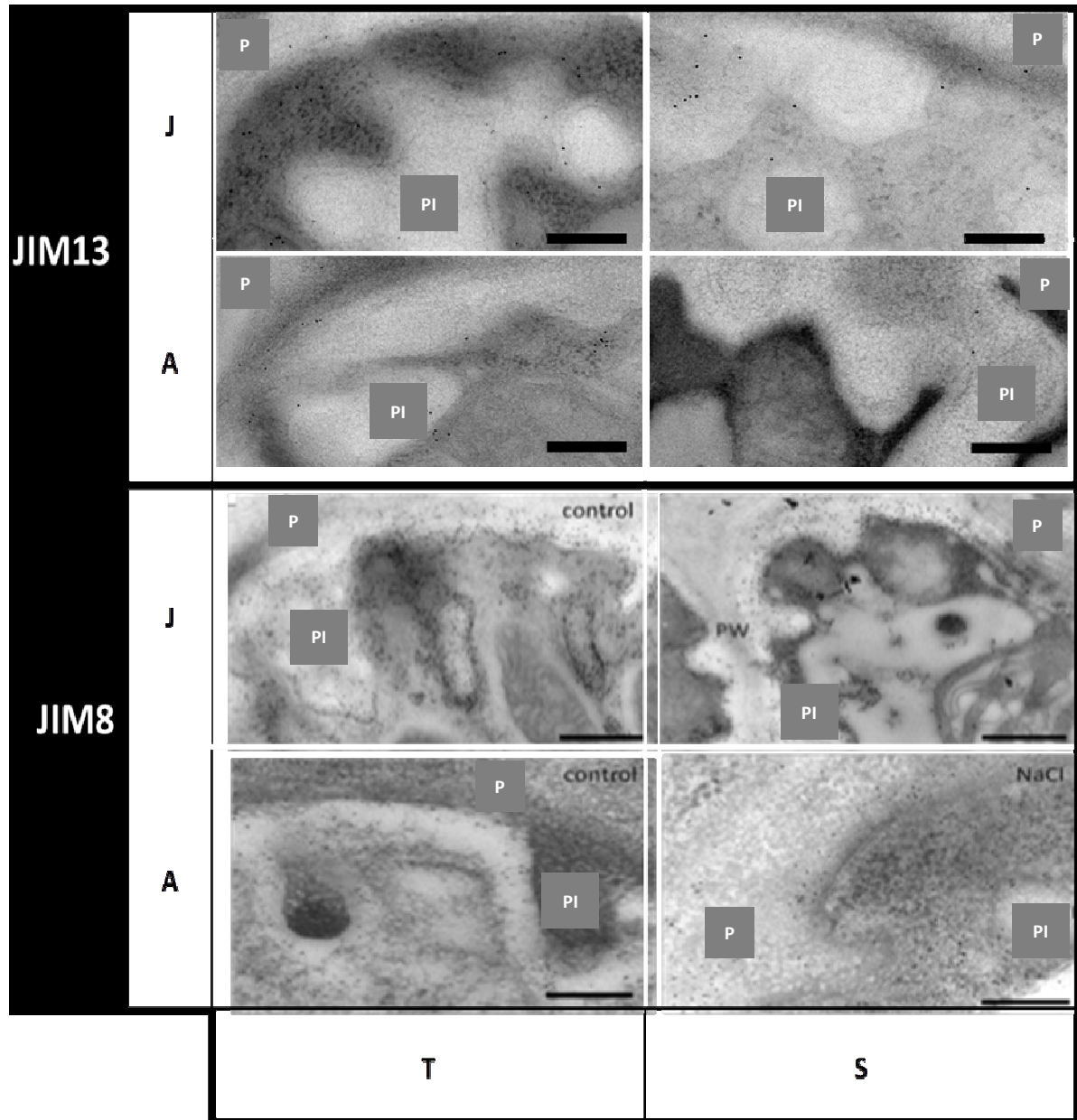


**Figure 58:** Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps LM15 et CCRCM1, anti XyG et XyG fucosylés. Nervures mineures des feuilles jeunes (J) et âgées (A), de *M. sativa* cv Gabès témoins (T) et traitées (S) par NaCl à 150 mM. P, paroi primaire; PI, protubérance. Echelle 0,5  $\mu$ m.

### III Effet de NaCl sur la distribution des AGPs dans les cellules de transfert des nervures mineures

Dans les échantillons témoins, les épitopes d'arabinogalactanesprotéines (AGPs), reconnus par JIM13 sont distribués, dans des valeurs de même ordre, à la fois dans la paroi primaire (rapport J/A=0,93) et dans les protubérances pariétales (rapport J/A=1,12) des feuilles hautes et basses. Le sel diminue le nombre de sites reconnus dans la paroi et les protubérances des deux sortes de feuilles, mais plus fortement sur celles du haut (autour de 40,00%), alors que pour les basses il s'agit de 10,00% (Tableau 5). Dans les témoins, les épitopes d'AGPs

reconnus par JIM8 sont nettement plus abondants dans la paroi primaire et surtout dans les protubérances des feuilles jeunes (rapport J/A=3,33 pour la paroi primaire et 6,69 pour les protubérances), Le sel diminue la quantité de sites dans les feuilles hautes (-31,12% dans la paroi et -39,95% dans les protubérances) mais, en revanche, l'augmente dans les feuilles basses (+44,51 % dans la paroi et +64,28 dans les protubérances) (Figure 59).



**Figure 59** : Microphotographie de la paroi des cellules de transfert phloémiennes après marquage par les anticorps JIM13 et JIM8, anti-AGPs. Nervures mineures des feuilles jeunes (J) et âgées (A), de *M. sativa* cv Gabès témoins (T) et traitées (S) par NaCl à 150 mM. P, paroi primaire; PI, protubérance. Echelle 0,5 µm

## IV Discussion, Conclusion

Afin de détailler l'effet de la salinité sur la paroi primaire de *M. sativa* cv Gabès une approche immunologique *in situ*, à l'échelle ultrastructurale a été utilisée en utilisant une série d'anticorps qui ciblent des épitopes de polymères formant des AGPs, des pectines ou des hémicelluloses. L'étude a été réalisée dans les fines nervures foliaires, et plus précisément dans le complexe tube criblé/cellule compagne, dont les parois ont montré des épaisissements sous l'effet du sel, notamment dans les corps nacrés et surtout dans les protubérances pariétales internes des cellules compagnes (Boughanmi *et al.*, 2010). L'augmentation d'épaisseur des corps nacrés est généralement associée à des stress, notamment hydrique, chez les Rosacées et les Fabacées. Cette structure pourrait avoir un rôle de protection contre la salinité. La présence d'invaginations pariétales dans les cellules compagnes, plus nombreuses et plus développées dans les feuilles de *M. sativa* cv Gabès soumises au stress salin, est généralement associée à l'augmentation de la surface d'échange apo/symplastique des nutriments, qui seront ensuite chargés dans le tube criblé contre un gradient de concentration.

Dans la paroi des cellules compagnes, et plus particulièrement dans les invaginations pariétales internes, les marquages immunologiques font ressortir une grande similitude dans la variation de répartition des épitopes spécifiques aux anticorps JIM5 (marqueurs de HGs non méthyl-estérifiées) et JIM7 (marqueurs de HGs méthyl-estérifiées). Sous l'effet d'un stress salin, la réponse des deux étages foliaires a été hétérogène: des augmentations de marquages par JIM5 et JIM7 dans les feuilles âgées (paroi primaire et protubérances) et des réductions dans les feuilles jeunes (protubérances pour JIM5, protubérances et paroi primaire pour JIM7). Les teneurs en HGs méthyl-estérifiées augmentent donc dans les feuilles âgées. Le degré de méthyl estérification est considéré comme un indicateur de réponse positive *vis à vis* du stress salin (Al Ghazi *et al.*, 2009). Les feuilles âgées de *M. sativa* cv Gabès auraient développé un processus d'adaptation à cette contrainte (150 mM). Ainsi, une augmentation du nombre de pectines non estérifiées (reconnues par JIM5) dans les plantes traitées par le sel est possible puisque la stimulation des pectines méthylestérases par NaCl entraîne leur dé-méthylation (Micheli, 2001). L'ensemble de ces résultats suggère que les pectines non estérifiées pourrait avoir, une fonction de séquestration du Na<sup>+</sup> et/ou de rigidification des parois induisant de modification des flux trophiques entre les cellules.

Les marquages par l'anticorps LM5, reconnaissance du tétrasaccharide linéaire  $\beta(1-4)$ -D-galactane et LM6, reconnaissance du  $\alpha(1-5)$ -L-arabinane, sont plus intenses dans la paroi primaire et les protubérances des feuilles âgées que des feuilles jeunes. Sous la contrainte saline, la paroi primaire et les protubérances pariétales sont plus marquées par ces deux derniers anticorps, ce qui suggère une augmentation des teneurs en RGIs. Cependant, LM5 augmente plus fortement dans les protubérances pariétales des feuilles du âgées, alors que LM6 augmente plus fortement sur les protubérances des feuilles jeunes. Ainsi, ces deux anticorps, connus pour être impliqués dans le maintien de la flexibilité de la paroi cellulaire, notamment sous stress hydrique (Moore *et al.*, 2008), et d'une manière générale sous l'effet de stress abiotiques (Shiga et Lajolo 2006 ; Gomez *et al.*, 2009), auraient un effet spécifique sur les protubérances pariétales des feuilles jeunes ou âgées. L'augmentation de ces RGIs dans la paroi primaire et les protubérances pariétales provoquerait une diminution de la flexibilité de ces compartiments contribuant à l'adaptation à la teneur en sel. De plus, LM6 reconnaît les arabinanes qui sont des régulateurs spaciaux de la proximité des chaînes de RGIs, Cette réponse pourrait résulter d'une impossibilité de formation de ponts de  $Ca^{2+}$  entre les RGIs. Ainsi, après traitement de l'épiderme foliaire par l'arabinase une modification du processus d'ouverture et de fermeture des stomates se produit (Jones *et al.*, 2003), probablement par le fait que l'altération des arabinanes induit une rigidification pariétale.

Les observations réalisées après marquage par LM15 et CCRCM1 confirment la présence des XyGs fucosylés (CCRCM1) et les XyGs de type XXXG (LM15) dans la paroi primaire et les protubérances. Le sel induit une augmentation des ces deux types de XyGs mais en comparant la densité de marquage dans les plantes traitées on remarque qu'il y'a plus de XyGs de type XXXG que de XyGs fucosylés. De plus, sous stress salin le LM15 augmente en plus forte proportion dans les feuilles jeunes, et plus particulièrement dans les protubérances pariétales. Le CCRC-M1 augmente également dans les protubérances des feuilles âgées. Ortega *et al.*, (2006) ont montré que la teneur en xyloglucane endotransglycosylase est deux fois plus importante dans les feuilles des plantes de l'herbe de Rhodes (*Chloris gayana*) traitées par le sel que dans les feuilles des plantes témoins. L'augmentation des XyGs, sous traitement salin, peut être due à l'augmentation de la transcription du gène XTH (Xyloglucane endotransglucosyle/hydrolase) et/ou à sa traduction. En effet, l'activité de la XET, qui catalyse la coupure et le réarrangement des chaînes des xyloglucanes (Fry *et al.*, 1992), permet le glissement de ces chaînes polysaccharidiques de la paroi au cours de la croissance cellulaire. Ces données suggèrent que, comme dans le cas d'un stress hydrique intense, une

augmentation de l'activité enzymatique de la XET, associée à un étirement de la paroi, peut maintenir la croissance en cas de stress salin.

Les cellules de transfert phloémiennes de *M. sativa* cv Gabès ont une paroi primaire de composition classique qui nécessite des AGPs orientant les dépôts pariétaux. En effet, des AGPs marquent les sites de formation de nouvelles protubérances pariétales internes et assurer leur extension, comme dans les cellules épidermiques des cotylédons de *Vicia faba* (Vaughn *et al.*, 2007). Les AGPs peuvent aussi agir sur l'extensibilité pariétale (Lamport *et al.*, 2006) et l'assemblage du réseau cellulose-xyloglucanes. La colocalisation de l'AGP-like (JIM13) et de l'AGP (JIM8) sur la membrane plasmique pourrait impliquer que ces protéoglycane possèdent des liens lipidiques, peut être une ancre glycosylphosphatidylinositol. Cette observation est en accord avec le fait que l'épitope réactif de JIM8 est associé avec des arabinogalactanes protéines très lipophiles (Showalter, 2001). Mais, comme la distribution des monomères AGP-like (JIM13, faiblement reconnu dans ce travail) et AGPs diffère par unité de surface, nous pouvons penser que les AGP-like sont rejetés par clivage de l'ancre glycosylphosphatidylinositol. Ainsi, les épitopes de JIM13 migreraient de la membrane plasmique vers la paroi, la lamelle moyenne et les espaces intercellulaires des cellules de transfert. Après stress salin le JIM8 diminue dans les feuilles jeunes et augmente dans les feuilles âgées, à la fois dans les parois primaires et les protubérances pariétales. L'augmentation de cette famille d'AGPS dans les feuilles âgées serait un indicateur de la tolérance des plantes à la salinité (Lamport *et al.*, 2006). Cela a aussi été observé chez des tabacs transgéniques (Yamada *et al.*, 2010).

La comparaison de ces résultats avec ceux de Boughanmi *et al.*, 2010 doit tenir compte du fait que la culture des luzernes a été réalisée i) en hydroponique (sur sol) ii) en conditions semi contrôlées en serre en Tunisie (en France) iii) l'étude a été réalisée sur des feuilles mûre d'âge moyen (feuilles jeunes et âgées) (cf. matériel et méthodes). La comparaison des résultats obtenus dans les deux analyses montre que ces paramètres ont une incidence sur la composition pariétale des cellules de transfert phloémiennes. Il existe, en effet, des différences dans la distribution de plusieurs polymères dans ces cellules appartenant aux feuilles prélevées sous les deux types de conditions.

Ainsi, le marquage par JIM7 a été plus faible que celui obtenu dans le travail précédent. Sous l'effet du sel le marquage par JIM7 a été augmenté dans les feuilles âgées, mais réduit chez les feuilles jeunes, déclarant probablement un début de tolérance à cette contrainte abiotique.



Avec LM5 et LM6 l'effet du sel a été différent de celui observé dans l'analyse de Boughanmi (marquage diminué) puisqu'il a au contraire augmenté dans notre travail.

Cependant, de nombreuses similitudes ont été observées dans les deux analyses. Ainsi, l'anticorps JIM5 marque toujours plus la paroi primaire que les protubérances pariétales internes. Sous l'effet de NaCl, la distribution de ces sites reconnus par JIM5 est augmentée, comme dans les travaux de Boughanmi, où elle atteignait jusqu'à 80% dans la paroi primaire. De plus, nous précisons que sa plus forte distribution a lieu dans les feuilles basses. Dans les deux analyses la reconnaissance par JIM7 a été diminuée : de 15% dans les travaux de Boughanmi et de 50 et 20% respectivement dans les feuilles hautes et basses de notre travail. Dans les deux observations les protubérances sont plus marquées que la paroi par LM15 et dans le cas de CCRC-M1 le marquage augmente sous l'effet du sel (40% sur la paroi). Nous confirmons sa plus forte augmentation dans les protubérances des feuilles basses. Dans les deux observations le marquage avec JIM13 diminue et celui avec JIM8 augmente, et nous remarquons qu'il augmente en fait dans la feuille basse, mais diminue dans la feuille haute.



## ***DISCUSSION GENERALE***

La salinité affecte la croissance et le développement des glycophytes, dont la survie et l'accomplissement du cycle de développement sont assurés, chez les espèces **tolérantes**, telles *M.sativa* cv Gabès, par un ensemble de processus qui permettent de contrecarrer les stress osmotique, ionique et oxydatif induits par le sel. La salinité agit sur le bilan hydrique de la plante, sur sa morphologie son anatomie, ses échanges gazeux, sa nutrition minérale et son métabolisme général, notamment sur la synthèse des protéines et des lipides (Parida et Das, 2005).

Les traitements salins de forte intensité (150 mM) et de longues durées (4 semaines à 150mM) affectent la croissance (réduction de longueur et de biomasse) de *M. sativa* cv Gabès, glycophyte vivace. Toutefois les racines sont moins affectées que les parties aériennes, ce qui est une caractéristique des plantes osmotiquement stressées. Ce développement plus important des racines par rapport aux tiges, en conditions de salinité, pourrait résulter d'une synthèse accrue d'acides aminés (Lohaus *et al.*, 2000) et d'agents osmotiques (Pommerrening et al., 2007), mais aussi provenir d'une modification par le sel de l'allocation des assimilats à partir des feuilles sources. En effet, l'expression de l'invertase extracellulaire, enzyme clé du transport apoplasmique du saccharose à longue distance est augmentée en situation de stress salin (Roltsch *et al.*, 2003) pour soutenir la croissance des organes puits, mais aussi génère des signaux pour les réactions de défense. *M. sativa*, variété vivace endémique des oasis tunisiens, est connue pour développer une importante racine pivotante lui permettant d'assurer le départ de nouvelles tiges, mais aussi la régulation de son homéostasie hydrique indispensable en conditions de salinité.

La réduction de la croissance des parties aériennes de *M. sativa*, observée sous l'action de NaCl est le résultat d'une diminution du nombre et de la longueur des **entre-noeuds**. Cette diminution est accompagnée par des modifications structurales, particulièrement une altération du bois (moins de vaisseaux, en disposition anarchique et plus de fibres), et du phloème (notamment plus de fibres périlibériennes équipées de larges parois). Ces modifications anatomiques observées dans la tige concernent aussi la feuille (pulvinus foliolulaire, pétiole et nervure principale des folioles) et les racines. Le sel induit donc chez

*M. sativa* des modifications du système vasculaire, particulièrement au niveau du bois, qui devient plus riche en fibres, mais moins en vaisseaux.

Ce phénomène va restreindre l'alimentation en eau et en éléments minéraux indispensables, comme le  $K^+$ , affectant ainsi le fonctionnement de la plupart des enzymes cytosoliques (Pandolfi *et al.*, 2012). A titre d'exemple, la présence de  $Na^+$  dans le milieu de culture limite l'alimentation de la plante en cations indispensables à la croissance tels que  $K^+$ , P et  $Ca^{2+}$  (Munns et Termaat, 1986 ; Zid et Grignon, 1991). Or, le  $Ca^{2+}$  assure un rôle important dans la stabilité des structures pariétales (Dupont *et al.* 1990). Il en est de même pour l'accumulation excessive de l'ion chlore, qui agit non seulement en tant qu'ion toxique mais aussi en diminuant l'absorption et le transport des anions organiques et minéraux essentiels, comme  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  et  $P_i$  (Soltani, 1988 ; Soltani *et al.* 1990 ; Botella *et al.* 1997 ; Davenport *et al.* 1997). Ce déséquilibre dans la nutrition minérale est souvent dû à l'antagonisme entre les ions sodium et potassium (Lachaal, 1992 ; Boughanmi Ghanem, 1986).

Cet état va être potentialisé par la diminution de la transpiration, comme conséquence de la réduction de la surface foliaire et de l'augmentation de la résistance stomatique. L'acclimatation de *M sativa* au stress salin de longue durée suppose la mise en place de mécanismes permettant au niveau **racinaire** une absorption d'eau efficiente, mais aussi de  $K^+$ . L'ensemble de ces modifications morpho anatomiques permettent un port érigé plus solide que celui des plantes non traitées et une résistance accrue aux stress environnementaux (vents, sécheresse...).

Les **feuilles** matures représentent le composant majeur de la performance des plantes en particulier par leur rôle d'organes sources supportant la croissance des organes puits (Pantin *et al.*, 2011). Or, la première réponse à la salinité des glycophytes est la réduction de la surface du limbe. Toutefois, la salinité a des effets différents chez les feuilles matures **jeunes ou âgées** (Munns et Tester, 2008), qui y répondent par différents mécanismes (Wang *et al.*, 2012). Nous avons observé, sous l'effet de NaCl, une réduction de la surface du limbe des feuilles matures de *M. sativa* plus importante pour les feuilles âgées que pour les jeunes. De plus, le sel ne modifie pas la morphologie du pétiole chez les plus jeunes, alors que chez les plantes âgées, la longueur du pétiole est augmentée, et son diamètre diminué, ce qui permettrait à ces feuilles âgées de pouvoir bénéficier d'un meilleur apport de lumière et de  $CO_2$ . D'une manière générale, et comme chez la plupart des glycophytes, c'est le limbe qui est la partie foliaire la plus affectée par le traitement salin comme conséquence à la fois d'une réduction du nombre mais aussi de la taille des cellules (Skirycz et Inzé 2010).

La réduction de croissance est aussi due aux modifications structurales induites par le NaCl dans le mésophylle. Les altérations des chloroplastes du parenchyme palissadique sont comparables à celles induites par le stress oxydatif (Hernandez *et al.*, 1995). De plus, l'accumulation d'amidon due à la dénaturation d'enzymes de sa dégradation (Salama *et al.*, 1994), exercerait un contrôle de retour sur la photosynthèse (Viera da Silva, 1968). Ces deux effets du sel correspondent aux indices de sénescence foliaire précoce (Smart, 1994), processus oxydatif régulé génétiquement (Del Rio *et al.*, 1998). Certaines modifications provoquées par le sel seraient à l'origine des stimuli qui induisent la tolérance de la plante au NaCl. Selon nos résultats cette réponse va varier avec l'âge de la feuille, elle semble plus efficace au niveau de la jeune feuille. Elle pourrait faire intervenir des processus de défense par mobilisation d'enzymes antioxydantes, à l'exemple du citronnier où l'ascorbate peroxydase joue un rôle clef dans la tolérance aux fortes salinités (Gueta-Dahan *et al.*, 1997).

Le limbe représente la principale interface d'échange de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) entre la plante et l'atmosphère. Dans les feuilles matures il est aussi le **site de synthèse des photoassimilats** dont la production est diminuée par le sel chez les glycophytes. Ceci est en partie la conséquence de l'augmentation de la résistance stomatique au  $\text{CO}_2$  et de la conductance interne au  $\text{CO}_2$  (Loreto *et al.*, 2003), qui induit une réduction de la photosynthèse (Flexas *et al.*, 2004). Pour les traitements de long terme, le sel induit des modifications anatomiques dans les feuilles. L'épaississement des feuilles en réponse à la salinité peut être attribué soit à l'augmentation du nombre de couches cellulaires dans le mésophylle, soit à une augmentation de leur taille, ou aux deux phénomènes à la fois. Les coupes semi fines des feuilles de *M. sativa* cv Gabès soumises au stress salin montrent une augmentation du nombre des cellules du mésophylle, d'où un épaississement de la feuille avec une réduction des espaces intercellulaires. Or, Delphine *et al.*, (1998) ont suggéré que la baisse de l'assimilation nette chez les plantes sous stress salin est associée à une réduction des espaces intercellulaires dans le mésophylle, qui pourrait provoquer la restriction du flux de carbone à travers les chloroplastes. Rappelons que la réduction de taille des cellules du mésophylle est une réponse typique face au stress hydrique, qui pourrait aussi être induite par le stress salin (Cutler., *et al* 1977).

On peut citer un épaississement des parois et la présence de cellules plus petites entraînant la réduction à long terme de la conductance du mésophylle au  $\text{CO}_2$  (Niinemets *et al.*, 2009). **Chez *M. sativa* cette réduction de croissance est plus importante dans les feuilles âgées**

**que dans les feuilles jeunes.** Il faut ajouter que la diminution de la conductance du mésophylle au CO<sub>2</sub> dans les feuilles de *M. sativa* a pour conséquence une diminution i/ du CO<sub>2</sub> dans les chloroplastes, ii/ de la régénération du RUBP (Lawlor et Cornic., 2002) et iii/ de l'activité de la RUBISCO (Flexas et al., 2006). Cette dernière est aussi sollicitée par la photorespiration qui est intensifiée par Na<sup>+</sup>, particulièrement dans les feuilles âgées comme résultat de la stimulation de la glycine deshydrogénase (Wang et al., 2012), dont l'expression est en revanche diminuée dans les feuilles jeunes (Ivlev et al., 2013). La fixation par la RUBISCO de l'O<sub>2</sub> sur le RUBP diminue sa disponibilité pour les réactions de carboxylation et contribue ainsi à la réduction de croissance des plantes en C3 comme *M. sativa*. L'ensemble de ces réponses morpho-anatomiques et physiologiques permettent de maintenir l'équilibre physiologique chez cette plante tolérante à la salinité des sols.

Lorsque la durée et/ou l'intensité du stress salin augmentent une acclimatation se développe, par des effets ioniques afin de s'adapter au stress salin. L'efficacité de ces mécanismes dépend de la tolérance de la plante.

L'un des aspects de cette tolérance est la capacité de maintenir, en présence de sel, **un statut hydrique** interne adéquat. Ceci est réalisé chez *M. sativa*, grâce à un ajustement osmotique par des facteurs ioniques, dont le Na<sup>+</sup> (Boughanmi, 1995), et des solutés compatibles tels les sucres (Lessani, 1969), la proline (Irigoyen et al., 1992) ou encore la prolinebétaine (Wyn Jones et Storey, 1981). Ces derniers auraient principalement une localisation cytoplasmique et agiraient comme balance osmotique pour les pressions vacuolaires basses dues aux ions (Weimberg et al., 1984). Le NaCl augmente la résistance stomatique chez *M. sativa* ce qui permet une réduction des pertes d'eau par la transpiration, particulièrement dans les feuilles âgées. L'hydratation des feuilles est maintenue par un ajustement osmotique, mais aussi par les ions Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et K<sup>+</sup> dont la teneur diminue de façon plus marquée chez les feuilles âgées (Boughanmi, non publié), entraînant une chlorose sur la périphérie des folioles. Il semblerait que les feuilles jeunes, moins chargées en sel, comporteraient plus de solutés compatibles que les feuilles âgées (Nakamura et al., 1996).

L'impact de la salinité sur la morpho-histologie foliaire a été accompagné par des modifications de la composition biochimique de la totalité des parois du limbe foliaire, avec une différence entre les deux étages foliaires en question. Sous l'effet du sel, les teneurs en pectines dans les fractions pariétale ont été très hétérogènes (augmentation/ réduction) entre feuilles jeunes et feuilles âgées ce qui rend l'interprétation de la réponse de ces deux étages

un peu difficile. Une augmentation des teneurs en pectines peut être considérée comme une réponse adaptative vis-à-vis du stress salin, vue le rôle de ce polymères dans l'expansion cellulaire (Knox, Evert 2006). Prenant l'exemple des feuilles jeunes, leurs assimilation nette de CO<sub>2</sub> est toujours plus importante que celle des feuilles âgées, cela peut être expliqué par leurs capacité à maintenir une meilleur expansion cellulaire à travers une augmentation des pectines du limbe foliaire, sous traitement salin. Sous traitement salin et dans les fractions hémi cellulosiques des feuilles jeunes et âgées, on a déterminé une réduction de ce polymère notamment les xyloglucanes. Ces réductions des teneurs en hémicellulose augmentent l'agrégation des micro- fibrilles de cellulose, qui peuvent être l'une des causes principales de la réduction de la surface assimilatrice de CO<sub>2</sub>.

Pour mieux comprendre la réponse foliaire de *Medicago sativa* var Gabès au stress salin, une étude morpho-immunologique a été effectué aux niveaux des veines mineurs plus particulièrement la paroi des cellules de transfert. **Le stress salin modifie les cellules de transfert phloémiennes de *M. sativa* cv Gabès.** Dans des feuilles sources, la **collecte des assimilats** se produit au niveau des **veines mineures**, dont la configuration est corrélée à la voie de transport. Chez *M. sativa* la présence de cellules de transfert dans le complexe phloémien correspond à un transport apoplasmique des assimilats. Chez ces « apoplasmic loaders » le saccharose est activement chargé dans les tubes criblés par un symport H<sup>+</sup>/saccharose, énergie dépendant (Schmitt *et al.*, 2008), à contre courant du gradient de concentration (Turgeon, 2010). Les veines mineures des cellules de transfert représentent des unités de contrôle des flux dans les vaisseaux de xylème et les tubes criblés. Le Na<sup>+</sup> serait recyclé vers les feuilles âgées (Winter, 1982). Toutefois, et pour cette recirculation du Na<sup>+</sup> ait une signification dans la tolérance à la salinité, il est actuellement admis que les jeunes feuilles sources, peu chargées en sel, alimentent les méristèmes racinaires, alors que les feuilles âgées, chargées en sel, alimentent les racines (Layezl *et al.*, 1981). Cette alimentation des méristèmes racinaires par les feuilles jeunes peut expliquer partiellement le maintien de croissance des racines sous stress salin chez alfalfa Gabés. Les tissus jeunes ainsi protégés des effets nocifs de l'ion Na<sup>+</sup> toxique, mais bien alimentés en K<sup>+</sup> qui migrerait vers les jeunes feuilles et les méristèmes (Jeschke, 1984), permettraient un bilan de croissance positif indispensable à la survie en milieu salé.

Le développement des invaginations pariétales dans les veines mineures se produit lorsque la feuille passe de l'état de puits à celui de **source** et le stress salin n'a pas d'effet sur

l'importance des invaginations dans les **jeunes feuilles**. Au contraire, dans les **feuilles âgées** on observe une stimulation importante des protubérances pariétales internes des cellules de transfert en réponse au sel, plutôt reliée à la **recirculation du Na<sup>+</sup>**, comme en témoigne la teneur élevée en Na<sup>+</sup> dans le complexe phloémien, par comparaison aux tissus environnants (Boughanmi *et al.*, 2003). Cette recirculation du Na<sup>+</sup> suit la même voie que les assimilats (Marshner *et al.*, 1997) et le développement des protubérances pariétales internes plaide en faveur du rôle du compartiment pariétal dans le stockage des ions toxiques et de leur recirculation dans la tolérance à la salinité dans *M. sativa* (Boughanmi *et al.*, 2003).

Donc sous stress salin on a déterminé un développement volumique de l'apoplasme pectocellulosique qui est associé à une augmentation de la surface d'échange avec le symplasme. Cette réponse a été aussi observée chez *Zoostera capensis* lorsque la salinité du milieu extérieur augmente (Lyer et Barnabas, 1993). Ainsi, la stimulation de formation des invaginations pariétales internes, dans *M. sativa* serait bien une réaction de défense face au stress salin, dans le type cellulaire de transfert dont le vacuome, compartiment de stockage reconnu pour les ions toxiques, est peu développé.

Les marquages immunologiques de la paroi des cellules de transfert des veines mineurs ont montré que sous un stress salin il y'a une augmentation des pectines dans les feuilles âgées contrairement aux feuilles jeunes. Il y'a une conformité partielle de ces résultats aux résultats biochimiques qui concerne la totalité du limbe foliaire. Comparé au feuille jeunes les feuilles âgées ont développé une meilleur réponse au stress salin par l'augmentation notamment les HGs méthylestérifiés et les RGI, aux niveaux de la paroi primaire et protubérances. L'augmentation de la méthyl-estérification et des RG est un indicateur positif vis-à-vis du stress salin (Ghazi *et al.*, 2009, Fry *et al.*, 1992). Ces modification sont à l'origine de la réduction de la flexibilité de la paroi et à la régulation de l'ouverture stomatique, ce qui explique la réponse physiologique foliaire de notre espèce. Les données biochimiques qui concernent les extractions KOH, montre qu'il y'a une réduction des teneurs des xyloglucanes dans la totalité du limbe foliaire, sous traitement salin. A l'inverse, aux niveaux des cellules de transfert, la salinité à induit une augmentation des Xyloglucanes dans la paroi primaire et également aux niveaux des protubérances. Ces augmentations en Xyloglucanes peuvent maintenir la croissance en cas d'un stress salin. Pareil pour les AGPs, on a déterminé une augmentation de ce polymère avec une différence entre feuilles jeunes et âgées (plus d'AGPs dans les feuilles âgées). Ce qui confirme une adaptation à la salinité (Lamport *et al.*, 2006) donc une meilleur acclimatation à cette dose de sel surtout aux niveaux des feuilles âgées.





## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail réalisé sur *M Sativa* Gabès concerne l'étude du rôle de l'apoplaste dans l'adaptation au stress salin. Trois approches complémentaires ont été développées pour comprendre les rôles des parois, et plus particulièrement l'importance de la fucosylation des polysaccharides pariétaux sur l'adaptation à la salinité (NaCl à 150 mM): morphoanatomie, biochimie, immunodétection *in situ*.

L'effet morphoanatomique de NaCl a été comparé sur l'unité entre-nœud/feuille d'un étage jeune et d'un étage âgé. Dans les entre-nœuds, le nombre d'éléments lignifiés et leur surface est augmentée et l'épaisseur pariétale accrue dans les fibres libériennes et xylémiennes, les vaisseaux du bois et les cellules médullaires. Dans les **feuilles** l'épaisseur des parois est augmentée dans les colloctes des pulvini et le complexe phloémien des fines nervures foliaires.

La teneur globale en sucres totaux et oses neutres est plus élevée dans les **feuilles témoins** âgées que jeunes, l'inverse est induit par **NaCl**. Celle des acides uroniques, également plus forte dans les âgées, excepté en fractions B, D, devient sous **NaCl** plus élevée en B, D, F1 dans ces feuilles, alors qu'il s'agit de C, E, F4 dans les feuilles jeunes. Dans les **feuilles témoinsjeunes** les monosaccharides les mieux représentés sont les rhamnose (B, F4), fucose (A, F4), Xylose (A, C), mannose et acide glucuronique (B, D), galactose (B, C), acide galactique (E), et glucose (F1). Dans les **âgées** les teneurs élevées n'apparaissent pas dans les mêmes fractions : arabinose (E, F4), fucose (B, C, F4), mannose ©, acide glucuronique (A, C, E), galactose (D) et acide galactique (B). Sous **NaCl**, une prédominance arabinose/glucose existe dans toutes les fractions de feuilles **jeunes**, excepté F1 riche en xylose/glucose, avec une bonne représentation des acide galactique (B), fucose (C) et acide glucuronique (E), qui varie dans les fractions issues de feuilles **âgées** avec l'acide galactique (D), fucose (E, F1), acide glucuronique et mannose (C) et xylose (A, B, E). Le contenu polysaccharidique des fractions extraites aux stades foliaires jeunes ou âgés, témoins ou stressés, a été identifié par Dot Blots, en utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes, de ces polysaccharides.

Dans les **feuilles jeunestémoins** la distribution des polymères pariétaux est identique dans la paroi primaire et les protubérances pariétales internes des cellules de transfert phloémiennes des fines nervures, à l'exception de JIM5, plus abondant dans la paroi. JIM8, polymère le mieux représenté dans la paroi et les protubérances, est un bon candidat pour leur édification. **NaCl** entraîne, une diminution de JIM8, mais, en revanche, une augmentation des XG et RG,

(reconnus par CCRCM1, LM15 et LM5, LM6). Ces polymères peuvent donc être retenus comme acteurs intervenant dans l'augmentation de quantité et de taille des protubérances internes sous l'effet du sel. Dans les **feuilles âgées témoins** la paroi primaire contient moins de JIM5 et JIM8, mais plus de LM5 et LM15, que celle des jeunes. Les protubérances sont plus abondantes, moins riches en JIM8, mais mieux équipées en XG et RG. **NaCl** entraîne, comme dans les feuilles jeunes, une augmentation des polymères, notamment CCRCM et JIM8, qui peuvent donc intervenir dans la consolidation du réseau de protubérances digitées développées dans les nervures mineures de ces feuilles traitées par NaCl.

Au final, les dosages de teneur globale en sucres totaux, oses neutres et acides uroniques des feuilles de luzerne ont permis une comparaison entre feuilles jeunes ou âgées, puis ont conduit à analyser l'effet du stress salin sur la variation de leur teneur dans les différentes fractions étudiées. Les dosages colorimétriques ont permis de déterminer les quantités à injecter lors des analyses en CPG, pour l'étude de la distribution des monomères polysaccharidiques et de l'impact du sel sur leur expression. L'immunologie a permis d'identifier les monosaccharides exprimés dans les différentes fractions saccharidiques et de les localiser dans les cellules de transfert des nervures foliaires mineures.

Pour répondre aux enjeux généraux ayant guidé ce travail de thèse, de nombreux points restent à étudier. Parmi ces points, l'étude de l'influence du stress salin sur la composition biochimique de la paroi primaire doit être élargie à l'analyse de la teneur en cellulose, constituant majeur de ce compartiment. Concernant les protubérances pariétales internes des cellules de transfert phloémiennes il est nécessaire d'analyser leur composition biochimique dans les nervures principales de plantes traitées par le sel, en recherchant si des AGPs sont impliquées dans la mise en place et l'édification de ces structures de ce type de nervures impliquées dans le transport des nutriments. De plus, afin de mieux connaître la structure des polysaccharides *in situ* un moyen rapide et fiable est d'utiliser la technique de microdissection puis l'OLIMP (Oligosaccharide mass profiling) /MALDI-TOF/MS. Avec cette technique il serait aussi possible de suivre les variations de la composition biochimique du tissu conducteur des racines et de la tige. Enfin, avec cette même technique (OLIMP *In situ*) la détermination du rôle de la fucosylation dans la réponse au stress salin chez des *Medicago sativa* génétiquement transformés pourrait être abordée.



## Résumé

Les modifications physiologiques et structurales provoquées par NaCl, à 150 mM, dans la tige et la feuille de *M. sativa* var. Gabès ont conduit à l'analyse biochimique de fractions pariétales extraites aux étages foliaires jeunes ou âgés, témoins ou stressés. La teneur en sucres totaux et oses neutres est moins élevée dans les **feuilles témoins** jeunes qu'âgées, l'inverse est induit par **NaCl**. Les monosaccharides les mieux exprimés sont le galactose, l'acide galactique, le glucose et l'arabinose dans les fractions pectiques, et le xylose dans les fractions hémicellulosiques. Ce contenu monosaccharidique diffère selon l'âge de la feuille et le traitement par NaCl. Dans les témoins, la principale différence est la teneur plus élevée en d'acides glucuronique et galactique dans les feuilles âgées que jeunes. Sous NaCl, le contenu en arabinose et glucose est augmenté dans les jeunes feuilles, alors que celui du galactose, des acides galactique et glucuronique et du rhamnose le sont dans les feuilles âgées, avec celui du fucose dans les fractions hémicellulosiques. L'immuno-identification des monosaccharides par dot Blots a précisé leur variation d'expression dans les fractions pariétales et, *in situ*, leur distribution dans les fines nervures. Dans les feuilles jeunes **témoins** les protubérances pariétales internes sont plus abondantes dans les feuilles âgées que jeunes et contiennent moins de JIM8 mais plus de XyGs et de RG. Sous **NaCl**, dans les feuilles jeunes et âgées l'augmentation de CCRCM1 et JIM8, argumente leur rôle d'agents consolidateurs du réseau de protubérances.

### Abstract

Physiological and structural modifications in leaf of *M. sativa* var. Gabès were compared in control and NaCl-treated plants. Biochemical analyses in wall fractions isolated from young and old leaves were associated with immuno detection of wall polymers in minor veins. The whole carbohydrate content is lower in young than in old control leaves. The reverse is induced by NaCl. The more expressed monosaccharides are galactose, galactic acid, glucose and arabinose in the pectin fractions, and xylose in the hemicellulose fractions. This content was modified according to leaf age and salin treatment. In controls, the main difference was more glucuronic and galactic acids in old than in young leaves. Under NaCl, a higher content in arabinose and glucose occurred in young leaves, whereas more galactose, galactic acid, glucuronic acid and rhamnose in the old leaves, with a fucose increasing in the hemicellulose fractions. The immuno-identification of monosaccharides by dot-blot has shown their variations in the wall fractions and their immunodetection *in situ* detailed their distribution in phloem transfer cells of minor veins. In controls, wall ingrowths are more abundant in the old than in the young leaves, and contain less JIM8, but more XyGs and RG. Under NaCl in old and young leaves, the augmentation of CCRCM1 and JIM8 argue for the possible role of these polymers in wall ingrowth network reinforcement.



## Références

A

**Abassi-Mestiri M.- 2009** Tolérance de divers clones de peuplier à la salinité: Aspects morphologiques, écophysiologies, métaboliques, anatomiques et ultra – structuraux. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Spécialité : Sciences de la Production Végétale. Institut national agronomique de Tunisie. 237p.

**Abogadallah GM.- 2010** Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal. Behav.* 5: 369-374p.

**Adams WW., Cohu CM., Muller O., Demmig-Adams B.- 2013** Foliar phloem infrastructure in support of photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 4: 194p.

**Aghaei K., Ehsanpour AA., Komatsu S.- 2008** Proteome analysis of potato under salt stress. *J. Prot. Res.* 7: 4858–4868p.

**Ahmad MSA., Ashraf M., Ali Q.- 2010** Soil salinity as a selection pressure is a key determinant for the evolution of salt tolerance in blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.). *Flora* 205: 37-45p.

**Ahn JW., Verma R., Kim M., Lee JY., Kim YK., Bang JW., Reiter WD., Pai HS.-2006** Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J. Biol. Chem.* 281: 13708-13718p.

**Albersheim P., Darvill AG., O'Neill MA., Schols HA., Voragen AGJ.- 1996** An hypothesis; the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In : Pectins and pectinases, 47–55p. Viser J., Voragen AGJ., eds. Amsterdam: Elsevier Science BV.

**Al-Dosari MS. – 2012** *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats. *Am. J. Chin. Med.* 40, 4: 779-93p.

**Al-Ghazi Y., Bourot S., Arioli T., Dennis ES., Llewellyn DJ.- 2009** Transcript profiling during fiber development identifies pathways in secondary metabolism and cell wall structure that may contribute to cotton fiber quality. *Plant. Cell. Physiol.* 50: 1364–1381p.

**Ali-Dinar HM., Ebert G., Ludders P.-1999** Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply. *Garten Bauwissenschaft.* 64: 54-59p.

**Amaya I., Botella MA., de la Calle M., Medina MI., Heredia A., Bressan R A., Hasegawa PM., Quesada M A., Valpuesta V.- 1999** Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* 457: 80–84p.

**Amirjani MR.- 2011** Effect of Salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *Intern. J.Bot.* 7: 73-81p.

**Anderson CM., Wagner TA., Perret M., He Z., He D., Kohorn BD. -2001** WAKs: Cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant. Mol. Biol.* 47: 197-206p.

**Antipolis S.- 2003** Les menaces sur les sols dans les pays méditerranéens. Plan Bleu, 2-912081-13-0.

**Apse MP., Aharon GS., Snedden WA., Blumwald E.- 1999** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256–1258p.

**Ashraf M., O'Leary JW.- 1996-** Effect of drought stress on growth, water relations and gas exchange of two lines of sunflower differing in degree of salt tolerance. *J. Plant Sci.* 157 6: 729-732p.

**Aspinall D., Paleg LG.- 1981** Proline accumulation: Physiological aspects. In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants, 205- 240p. Paleg LG., Aspinall D. eds. Australia/ Academic Press.

**Azadi P., O'Neill MA., Bergmann C., Darvill G., Albersheim P.- 1995** The backbone of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonanI is cleaved by an endohydrolase and an endolyase. *Glycobiology.* 5: 783–789p.

**Azevedo Neto AD., Prisco JT., Eness-Filho J., Medeiros JVR., Gomes-Filho E.-2005** Hydrogen peroxide pre-treatment induces stress acclimation in maize plants. *J. Plant Physiol.* 162: 1114-22p.

## **B**

**Bacic A, Churms SC, Stephen AM, Cohen PB, Fincher GB.- 1987** Fine structure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*. *Carbohydr. Res.* 162: 85-93p.

**Balakhnina TI., Gavrilov AB., Wodarczyk TM., Borkowska A., Nosalewicz M., Fomina IR.- 2009** Dihydroquercetin protects barley seeds against mould and increases seedling adaptive potential under soil flooding. *Plant Growth Reg.* 57: 127-135p.

**Balakhnina TI., Bennicelli RP., Stêpniewska Z., Stêpniewski W., Fomina IR.- 2010** Oxidative damage and antioxidant defense system in leaves of *Vicia faba* major L. cv. *Bartom* during soil flooding and subsequent drainage. *Plant Soil* 327: 293-301p.

**Ballesteros E., Blumwald E., Donaire JP., Belver A.- 2006** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol. Plant.* 99: 328–334p.

**Bandehagh A., Salekdeh GH., Toorchi M., Mohammadi A., Komatsu S.- 2011** Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics* 11: 1965–1975p.

**Bao AK., Wang SM., Wu GQ., Xi JJ., Zhang JL., Wang CM.- 2009** Overexpression of the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant. Sci.* 176. 232-240p.



- Barhoumi Z., Djebali W., Smaoui A., Chabi W., Abdelly C.- 2007-** Concentration of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis* (willd) parl. *J. Plant Physiol.* 167: 842-850p.
- Barnes DK., Sheaffer CC.- 1995** Alfalfa. In : Forages: An Introduction to Grassland Agriculture, 205-216p. Barnes R.F., Miller DA., Nelson CJ., eds. 5th ed. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Battaglia V., Rossi CA., Colombatto S., Grillo MA., Toninello A.- 2007** Different behavior of agmatine in liver mitochondria: inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species? *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 1147–1153p.
- Beatriz G., Piestun N., Bernstein N.- 2001** Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity. *Plant Physiol.* 125: 1419-1428p.
- Beldman G., Van den Broek LAM., Schols HA., Searle-Van Leeuwen MJF., Van Laere KMJ., Voragen AGJ.- 1996** An exogalacturonase from *Aspergillus aculeatus* able to degrade xylogalacturonan. *Biotechnol. Lett.*18: 707–712p.
- Benabderrahim MA., Haddah M., Hamza H., Ferchichi A.- 2011** Germination and emergence variability of alfalfa (*Medicago sativa* L.) landraces collected in Southern Tunisia oases. *Spanish J. Agri. Res.* 9: 135–143p.
- Ben Nja R.- 2010**Effet de NaCl sur la croissance et sur la micromorphologie foliaire de trois clones de peuplier blanc (*Populus alba* L.).Master sciences de l'environnement.Faculté des Sciences de Bizerte. 45p.
- Berthomieu P., Conejero G., Nublait A., Brackenbury WJ., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F.-2003** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBOJ.* 22: 2004–2014p.
- Bidlack J., Malone M., Benson R.- 1992** Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Oklahoma Acad. Sci.*72: 51-56p.
- Bissati S., Djerroudi O., Mehani M., Belkhodja M.-2011**Effet du stress salin sur deux parametres hydriques (turgescence et transpiration) de jeunes plants d'*atriplex halimus* et *atriplex canescens*. *Rev. Bioressource.*1 :31-38p.
- Bitonti MB., Ferraro F., Floris C., Innocenti AM.- 1991** Response of meristematic cells to osmotic stress in *Triticum durum*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 187:453–457p.
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G.-1973** New method for quantitative determination of uronic acids. *Ann. Biochem.* 54(2): 484-489p.
- Blumwald E., Aharon GS., Apse MP.- 2000** Sodium transport in plant cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1465: 140–151p.
- Boncompagni E., Dupont L., Mignot T., Østera's M., Lambert A., Poggi MC., Le Rudulier D.- 2000** Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP binding cassette

histidine transporter also involved in betaine and proline uptake. *J. Bacteriol.* 182: 3717-3725p.

**Bora KS., Sharma A.- 2011** Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biol.* 49: 211-220p.

**Borsani O., Valpuesta V., Botella MA.- 2001** Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126: 1024-1030p.

**Bosabalidis AM.- 2010** Ultrastructure, development and histochemistry of the polysaccharide-containing subcuticular compartments in *Origanum dictamnus* L. peltate glandular hairs. *Flavour and Fragrance J.* 25: 202–205p.

**Boscari A., Mandon K., Dupont L., Poggi MC., Le Rudulier D.- 2002** BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184: 2654–2663p.

**Bot A., Nachtergaele F., Youg A.-2000** Land resource potential and constraints at regional and country levels. World Soil Resources Report N 90. Rome: FAO of UN.

**Botella MA., Vartinez V., Pardinez J., Cedra A.- 1997** Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *J. Plant Physiol.* 90: 1408-1416p.

**Bouchabke O., Tardieu F., Simonneau T.-2006** Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand in well-watered but not in water saturated soil. *Plant Cell Env.* 29. 1138-1148p.

**Bouché-Pillon S., Fleurat-Lessard P., Serrano R., Bonnemain JL.-1994** Asymmetric distribution of the plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase in embryos of *Vicia jaba* L. with special reference to transfer cells. *Planta* 193:392-397p.

**Boughanmi N.- 1995.** Nutrition minérale et hydrique de deux espèces de luzerne: *Medicago sativa* var Gabès (vivace) et *Medicago scutellata* (annuelle) en présence de NaCl. Thèse de spec. FST. Tunis. 108p.

**Boughanmi N., Michonneau P., Verduz MC., Piton F., Ferjani E., Bizid E.- 2003** Structural changes induced by NaCl in companion and transfer cells of *Medicago sativa* blades. *Protoplasma* 220: 179–187p.

**Boughanmi N., Michonneau P., Daghfons D., Fleurat-Lessard P.- 2005** Adaptation of *Medicago sativa* cv. Gabès to long-term. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 262-268p.

**Boughanmi N., Thibault F., Decou R., Fleurat-Lessard P., Béré E., Costa G.- 2010** NaCl effect on the distribution of wall ingrowth polymers and arabinogalactan proteins in type A transfer cells of *Medicago sativa* Gabès leaves. *Prot.* 242: 69–80p.

**Bourot S., Sirre O., Trautwette, A., Touze T., Wu LF., Blanco C., Bernard T.- 2000** Glycine betaine assisted protein folding in a lysA mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275: 1050–1056p.

**Bracale M., Levi M., Savini C., Dicorato W., Galli MG.- 1997** Water deficit in pea root tips: effects on the cell cycle and on the production of dehydrin-like proteins. *Ann. Bot.* 9:593–600p.

**Brady J., Sadler I, Fry S.- 1998** Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: its role in cross-link formation. *Phytochemistry* 47: 349–353p.

**Brett C- 2000** Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. Intern. Rev. Cytol., Jeon KW, ed. 199: 161-199p. Acad. Press, New York.

**Brini F., Hanin M., Mezghani I., Berkowitz GA., Masmoudi K.-2007** Overexpression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *TNHX1* and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase *TVPI* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Exp. Bot.* 58: 301–308p.

**Brisson LF., Tenhaken R., Lamb C.- 1994** Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703–1712p.

**Brown RM. Jr.-1985** Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. *J. Cell Sci. Suppl.* 2: 13–32p.

**Braun DM., Slewinski TL.- 2009** Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant. Physiol.* 149: 71–81p.

**Buchanan B., Gruissem W., Jones R.- 2000** Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Amer. Soc. Plant Physiologists, Rockville, Maryland

**Bungard RA., Ruban AV., Hibberd JM., Press MC., Horton P., Scholes JD.- 1999** Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyllcycle in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1135–1139p.

**Burnet M., Goldmann A., Message B., Drong R., El Amrani A., Loreau O., Slightom J., Tepfer D.- 2000** The stachydrine catabolism region in *Sinorhizobium meliloti* encodes a multi-enzyme complex similar to the xenobiotic degrading systems in other bacteria. *Gene* 244: 151–161p.

**BursSENS S., Himanen K., van de Cotte B., Beeckman T., Van Montagu M., Inze, D., Verbruggen N.- 2000** Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 632–640p.

**Bush D- 1993** Inhibitors of the proton-sucrose symport. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 355–360p.

**Bush MS., McCann MC.- 1999** Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol. Plant.* 107: 201–213p.

## C

**Caffall KH., Mohnen D.-2009** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344: 1879–1900p.

**Cannon MC., Terneus K., Hall Q., Tan L., Wang Y., Wegenhart BL., Chen L., Lamport DTA., Chen Y., Kieliszewski MJ.- 2008** Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2226–2231p.

**Casper-Lindley C., Björkman O.- 1998** Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll cycle pigments. *Photosynth. Res.* 56: 277–289p.

**Carpita NC., Gibeaut DM.- 1993** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1–30p.

**Carpita N., McCann M.-2000** The cell wall. In : Biochemistry and molecular biology of plants. 52-108p. Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL., eds. Rockville: Amer. Soc. Plant Physiologists.

**Cassab GI.-1998** Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 281–309p.

**Catesson AM.- 1973** Observations cytochimiques sur les tubes criblés de quelques angiospermes. *J. Microscopie* 16:95-104p.

**Catesson AM., Moreau M., Duval JC.- 1982** Réponse des cellules contigües aux vaisseaux selon la nature de l'agression. *IAWA Bull.* 3: 11-14p.

**Chaibi W.- 1995** Etude physiologique ultrastructurale et cytoenzymatique de l'effet de chlorure de sodium chez *Medicago sativa* L. (cultivar Gabès). Thèse Doctorat, Faculté des Sciences, Tunis.

**Chattopadhyay A., Subba P., Pandey A., Bhushan D., Kumar R., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N.- 2011** Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. *Phytochemistry* 72: 1293–1307p.

**Chatterjee S., Mayor S.- 2001** The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1967–1987 p.

**Chaturvedi V., Bartiss A., Wong B.- 1997** Expression of bacterial mtlD in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 179:157–162p.

**Chaudhuri K., Choudhuri MA.- 1997** Effect of short-term NaCl stress on water relations and gas exchange of two jute species. *Biol. Plant.* 40: 373-380p.

**Chen F., Srinivasa Reddy MS., Temple S., Jackson L., Shadle G., Dixon RA.- 2006** Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant J.* 48: 113-124p.

**Chen RE., Thorner J.- 2007** Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773: 1311-1340p.

**Chen L., Wang T., Zhao M., Zhang W.-2012** Ethylene-responsive miRNAs in roots of *Medicago truncatula* identified by high-throughput sequencing at whole genome level. *Plant Sci.* 184: 14– 19p.

**Cherian S., Reddy MP., Pandya JB.- 1999** Studies on salt tolerance in *Avicennia marina* (Forstk.) Vierh.: effect of NaCl salinity on growth, ion accumulation and enzyme activity. *Indian J.Plant. Physiol.* 4: 266–270p.

**Chi LC., Kao CH.- 2001** Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant. Sci.*160: 323-329p.

**Chitteti B., Peng Z.- 2007** Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *J. Prot. Res.*6: 1718–1727p.

**Chutipaijit S., Cha-um S., Sompornpailin K.- 2011** High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. *spp. indica*. *Aust. J. Crop Sci.* 5: 1191–1198p.

**Clarke AE., Anderson RL., Stone BA.- 1979** Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*18: 521–540p.

**Colcombet J., Hirt H.-2008** Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J.* 413: 217–26p.

**Condit CM., Keller B.- 1990** The glycine-rich cell wall proteins of higher plants. In: Organization and Assembly of Plant and Animal Extracellular Matrix, 119-135p. Adair WS., Mecham RB. eds. San Diego: Academic Press.

**Corratgé-Faillie C., Jabnoue M., Zimmermann S., Véry A-A., Fizames C., Sentenac H.-2010** Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol. Life Sci.* 6:2511–2532p.

**Cornillon P., Palloix A.- 1997** Influence of sodium chloride on the growth and mineral nutrition of Pepper cultivars. *J. Plant. Nutr.* 20: 1085-1094p.

**Cortina C., Culiáñez-Macià FA.-2005** Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.* 169: 75-82p.

**Cosgrove DJ.-1997** Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 171–201p.

**Cosgrove DJ.-2000** New genes and new biological roles for expansins. *Cur. Opin. Plant Biol.* 3: 73-78p.

**Cosgrove DJ.- 2005** Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 850–861p.

**Couot-Gastelier J., Vartanian, N.- 1995** Drought-induced short roots in *Arabidopsis thaliana*: structural characteristics. *Bot. Acta.* 108: 407-413p.

**Courtois-Moreau CL., Pesquet E., Sjodin A., Muniz L., Bollhoner B., Kaneda M., Samuels L., Jansson S., Tuominen H.- 2009** A unique program for cell death in xylem fibers of *Populus* stem. *Plant J.* 58: 260-274p.

**Crafts AS.- 1961a** Improvement of growth regulator formulation. *Plant growth regulation.* Ames, Iowa State Univ. Press.

**Crafts AS.- 1961 b** Absorption and migration of synthetic auxins and homologous compounds. In: *Encyclopedia of plant physiology V14. Growth and growth substances.* Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

**Csonka, LN., Hanson AD.-1991** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.*45: 569–606p.

**Cutler JM., Rains DW., Loomis RS. 1977** - Importance of cell size in the water relations of plants. *Physiol. Plant.* 40. 255-260 p.

**Czaninski Y.- 1977** Vessel-associated cells. *IAWA Bull.* 3: 51-55p.

**Czaninski Y.-1979** Cytochimie ultrastructurale des parois du xyleme secondaire. *Biol. Cell.*35: 97-102p.

## D

**Darvill AG., McNeil M, Albersheim P.-1978** Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* 62: 418–422p.

**Darwin C.-1880** The power of movement in plants. London: John Murray Publishers.

**Datta K., Schmidt A., Marcus A.-1989** Characterization of two soybean repetitive proline-rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes. *Plant Cell* 1: 945–952p.

**Davenport R., Reid J., Smith FA.- 1997** Sodium-calcium interaction in two wheat species differing in salinity tolerance. *Plant Physiol.* 99: 323-327p.

**Davenport R.- 2002** Glutamate receptors in plants. *Ann. Bot.* 90: 549–557p.

**Davenport R., James RA., Zakrisson-Plogander A., Tester M., Munns R.- 2005** Control of sodium transport in Durum wheat. *Plant Physiol.* 137: 807–818p.

**Davenport RJ., Muñoz-Mayor A., Jha D., Essah PA., Rus A., Tester M.- 2007** The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30: 497–507p.

**Deepak S., Shailasree S., Kini RK., Hause B., Shetty SH., Mithöfer A.-2007** Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Planta* 226: 323–333p.

**Delmas F., Petit J., Joubès J., Séveno M., Paccalet T., Hernould M., Lerouge P., Mouras M., Chevalier C.- 2003** The gene expression and enzyme activity of plant 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-8-phosphate synthase are preferentially associated with cell division in a cell cycle-dependent manner. *Plant Physiol.* 133: 348-360p.

**Delmer DP.- 1999** Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 245–276p.

**Del Río LA., Corpas FJ., Sandalio LM., Palma JM., Gómez M., Barroso JB.- 2002** Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* 53:1255–1272p.

**Delphine S., Alvino A., Acchini M., Loreto F.- 1998** Consequence of salt stress on conductance to CO<sub>2</sub> diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 395- 402p.

**Dembitsky VM., Smoum R., Al-Quntar A., Ali HA., Pergament I., Srebnik M.-2002** Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Sci.* 163: 931–942p.

**Demidchik V., Maathuis FJM.- 2007** Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol.* 175: 387-405p.

**Demming-Adams B., Adams WW.- 1992** Photoprotection and other responses of plants to light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 7: 1-116p.

**DeWitt N.D., Sussman MR.- 1995** Immunological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7: 2053–2067p.

**Doblin MS., Kurek I., Jacob-Wilk D., Delmer DP.- 2002** Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43: 1407-1420 p.

**Doblin MS., Pettolino F., Bacic A.- 2010** Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Funct. Plant Biol.* 37: 357–381p.

**Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F.- 1956** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Chem.* 28: 350-356p.

**Duceppe MO., Bertrand A., Pattathil S., Miller J., Castonguay Y., Hahn MG., Michaud R., Dubé MP.-2012** Assessment of genetic variability of cell wall degradability for the selection of Alfalfa with improved saccharification efficiency. *BioEnergy Res.* 5(4): 904-914p.

**Dupont FM., Bush DS., Windle JJ., Russell LJ. - 1990** Calcium and proton transport in membrane vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* 94: 179-188p.

## E

**Ebringerová A., Heinze T.- 2000** Xylan and xylan derivatives: biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Communications.* 21: 542-556p.

**Ebringerova´ A., Hroma´dkova´ Z., Heinze T.- 2005** Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.* 186: 1–67p.

**El Aouni M.H., 1980** – Processus déterminant la production du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.): Photosynthèse, croissance et répartition des assimilés. Thèse de Doctorat D'Etat, Université de Paris VII.

**Ellis M., Egelund J., Schultz C., Bacic A.- 2010** Arabinogalactan-proteins (AGPs): key regulators at the cell surface? *Plant Physiol.* 153: 403–419p.

**Emons AMC., Mulder BM.-2000** How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends Plant Sci.* 5: 35-40p.

**Ermel FF., Follet-Gueye ML., Cibert C., Vian B., Morvan C., Catesson AM., Goldberg R.- 2000** Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives. *Planta* 210:732-740p.

**Espartero J., Pintor-Toro JA., Pardo JM.- 1994** Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol. Biol.* 25 : 217–227p.

**Etehadnia M., Schoenau J., Waterer D., Karen T.- 2010** The effect of CaCl<sub>2</sub> and NaCl salt acclimation in stress tolerance and its potential role in ABA and scion/rootstock-mediated salt stress potential. *Plant Stress* 1: 72-81p.

**Everard JD., Gucci R., Kann SC., Flore JA., Loescher WH.- 1994** Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apiumgraveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.* 106:281–292p.

## F

**Faik A.- 2010** Xylan biosynthesis: news from the grass. *Plant Physiol.* 153: 396-40p.

**FAO et IPTRID- 2006** Conférence électronique sur la salinisation: extension de la salinisation et stratégies de prévention et réhabilitation. <http://www.ciseau.org>.

**FAO- 2008** Terrestrial Database ([www.fao.org/agl/agl.1/terrastat](http://www.fao.org/agl/agl.1/terrastat)).

**Faraday CD., Quinton PM., Thomson WW.- 1986** Ion fluxes across the transfusion zone of secreting *Limonium* salt glands determined from secretion rates, transfusion zone areas and plasmodesmatal frequencies. *J. Exp. Bot.* 37: 482–494p.

**Feiz L., Irshad M., Pont-Lezica RF., Canut H., Jamet E- 2006** Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Methods* 2: 10p.

**Fiehn O.- 2002** Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48 : 155–171p.

**Fincher GB., Stone BA., Clarke AE.- 1983** Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 47–70p.



**Fischer M., Arrigoni E., Amado R.- 1994** Changes in the pectic substances of apple during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions. *Carbohydr.Polymers* **25** : 167-175p.

**Fischer WN., Kwart M., Hummel S., Frommer WB.- 1995** Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J. Biol.Chem.* **270** : 16315–16320p.

**Fisher DB., Cash-Clark CE.- 2000** Sieve tube unloading and post-phloem transport of fluorescent tracers and proteins injected into sieve tubes via severed aphid stylets. *Plant Physiol.* **123**:125–137p.

**Fleischer A., Titel C., Ehwald R.- 1998** The boron requirement and cell wall properties of growing- and stationary-phase suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiol.* **117**: 1401–1410p.

**Fleischer A., O'Neill MA., Ehwald R.- 1999** The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.* **121**: 829–838p.

**Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey TD.- 2004** Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol.* **6**: 269–279p.

**Flexas J., Ribas-Carbo M., Hanson DT., Bota J., Otto B., Cifre J., McDowell N., Medrano H., Kaldenhoff R. - 2006** Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> *in vivo*. *Plant J.* **48**: 427–439p.

**Flowers TJ., Troke PF., Yeo AR.- 1977** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**: 89-121p.

**Fogarty WM., Ward OP.- 1974** Pectinases and pectic polysaccharides. *Prog. Ind. Microbiol.* **13** : 59–119p.

**Fougere F., Rudulier DL, Streeter JG.- 1991** Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **96**: 1228-1236p.

**Foyer CH., Noctor G.- 2005** Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* **28**: 1056–1071p.

**Faraday C D . , Quinton PM., Thomson WW.- 1986** Ion fluxes across the transfusion zone of secreting *Limonium* salt glands determined from secretion rates, transfusion /one area,s and pla,s mode.s matal frequencies. *J. Exp. Bol.* **177**: 482-194p.

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

**Freshour G., Bonin CP., Reiter WD., Albersheim P., Darvill A.G., Hahn MG.- 2003** Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the mur1 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131 : 1602–1612p.

**Fromard L.- 1990** Etude du transport des glucides entre les cellules associées aux vaisseaux (CAV) et les vaisseaux chez *Acer platanoides* et *Robinia pseudoacacia*. Incidence des facteurs saisonniers et climatiques. Thèse Doctorat Université, Poitiers, France.

**Fry SC.- 1982** Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell glycoprotein. *Biochem. J.* **204**: 449-455p.

**Fry IV., Huflejt M., Erber WWA., Peschek GA., Packer L.- 1986** The role of respiration during adaptation of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus* 6311 to salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 686–691p.

**Fry SC.- 1988** Wall polymers: chemical characterisation. The growing plant cell wall. 103-185p. Harlow: Longman Scientific & Technical.

**Fry SC., Smith RC., Renwick KF., Martin DJ., Hodge SK, Matthews KJ.- 1992** Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282: 821–828p.

**Fry SC., York WS., Albersheim P., Darvill A., Hayashi T., Joseleau, JP., Kato Y., Lorences EP., Maclachlan GA., McNeil M., Mort AJ., Reid JSG., Seitz HU., Selvendran RR., Voragen AGJ., White AR.- 1993** An unambiguous nomenclature for xyloglucan derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.* 89: 1–3p.

**Fukuda A., Chiba K., Maeda M., Nakamura A., Maeshima M., Tanaka Y.- 2004a** Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, H<sup>+</sup>-ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley. *J. Exp. Bot.* 55: 585–594p.

**Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H., Tanaka Y.- 2004b** Function intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 146–159p.

## G

**Gaber MA.- 2010** Antioxidative Defense under Salt Stress. *Plant Signal Behav.* **5**: 369- 374p.

**Galvan-Ampudia CS, Testerink C.- 2011** Salt stress signals shape the plant root. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**:296–302p.

**Gamalei YV.- 1989** Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees* 3: 96–110p.

**Gamalei YV.- 1991** Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* 5:50–64p.

**Garratt LC., Janagoudar BS., Lowe KC., Anthony P., Power JB., Davey MR.- 2002** Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 502-511p.

**Garciadeblás B., Senn ME., Banuelos MA., Rodríguez-Navarro A.- 2003** Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* 34: 1–14p.

**Gaspar Y., Johnson KL., McKenna JA., Bacic A., Schultz CJ.- 2001** The complex structure of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.* 47: 161–176p.

**Gamalei YV.-1990** Leaf phloem. Nauka, Leningrad (en Russe).

**Gamalei., Yu V.-1989** Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* 3 : 96–110p.

**Gao M., Kieliszewski MJ., Lamport, DTA, Showalter AM.- 1999-** Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *Plant J.* 18: 43–55p.

**Gawel E.-2012** Chemical compositions of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11: 303–309p.

**Geiger DR.-1976** Effect of translocation and assimilate demand on photosynthesis. *Can. J. Bot.* 54: 2337-2345

**Geilfus CM., Zörb C., Neuhaus C., Hansen T., Lüthen H., Mühling KH.- 2011** Differential transcript expression of wall-loosening candidates in leaves of maize cultivars differing in salt resistance. *J. Plant Growth Regul.* 30: 387–395p.

**Ghanem ME., Albacete A., Martínez-Andújar C., Acosta M., Romero-Aranda R., Dodd IC., Lutts S., Pérez-Alfocea F.- 2008** Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Exp. Bot.* 59: 3039-3050p.

**Ghannoum O.- 2009** C4 photosynthesis and water stress. *Ann. Bot.* 103: 635–644p.

**Giaquinta RT.- 1977** Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. *Nature* (London) 267: 369–370p.

**Giaquinta RT.- 1979** Phloem loading of sucrose. Involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiol.* 63: 744–748p.

**Gibeaut DM., Pauly M., Bacic A., Fincher GB.- 2005** Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles. *Planta* 221 : 729-738p.

**Giddings TH., Brower DL., Staehelin LA.-1980** Visualization of particle complexes in the plasma-membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. *J. Cell Biol.* 84 : 327 – 339p.

**Gill SS., Tuteja N.- 2010** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909–930p.

**Gilmore AM.- 1997** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* 99: 197-209p.

- Gilmore AM., Yamamoto HY.- 2001** Time-resolution of the antheraxanthin and pH-dependent chlorophyll *a* fluorescence components with photosystem II energy dissipation in *Mantoniella squamata*. *Photochem. Photobiol.* 74: 291–302p.
- Girousse C., Bournoville R, Bonnemain JL.- 1996** Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.* 111: 109-113p.
- Giuffrida F., Leonardi C., Noto G.- 2001** Response of soilless grown strawberry to different salinity levels in the nutrient solution. *Acta. Hort.* 559: 675-680p.
- Gloux K., Le Rudulier D.- 1989** Transport and catabolism of proline betaine in salt-stressed *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* 151: 143–148p.
- Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P., Del-carte J.- 2010** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14,549–560p.
- Goldmann A., Boivin C., Fleury V., Message B., Lecoœur L., Maille M., Tepfer D.- 1991** Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 571–578p.
- Gomez LD., Steele-King CG., Jones L., Foster JM., Vuttipongchaikij S., McQueen-Mason SJ.- 2009** Arabinan metabolism during seed development and germination in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 2: 966–976.
- Gossett DR., Millholland EP., Lucas MC.- 1994** Antioxidant response to salt stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34: 706–714p.
- Gowri G., Bugos R., Campbell WH., Maxwell C., Dixon R.- 1991.** *Plant Physiol.* 97 : 7-14p.
- Gray A M., Flatt P R.-1997** Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). *Br. J. Nutr.* 78:325-334p.
- Grignon C., Sentenac H.-1991** pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 103-128p.
- Grusak MA., Beebe DU., Turgeon R.- 1996** Phloem loading. In: Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships, 220–227p, Zamski E., Schaffer AA., eds. New York: Marcel Dekker.
- Gucci R., Aronn G., Lombardini L., Tattini M.- 1997** Salinity tolerance in *Phillyrea* species. *New Phytol.* 135: 227-234 p.

**Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas BA., Ben-Hayyim G.-1997** Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta* 203: 460–469p.

**Gouia H., Ghorbal M.H.,- 1986** Effets du chlorure de sodium sur la réduction du nitrate chez l'orge (*Hordeum vulgare* L. var. Martin). Colloque sur les végétaux en milieu aride. 301-309p.

**Guines F.- 2002** Bases génétiques des variations pour la structure histologique des tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.). Thèse Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes.

**Gulzar S., Khan MA., Ungar IA.- 2003** Effects of Salinity on growth, ionic content and plant-water relations of *Aeluropus lagopoides*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34: 1657–1668p.

**Gunning BES., Pate JS.-1969** "Transfer Cells" plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes - their occurrence, structure, and development. *Protoplasma* 68: 107–133p.

## H

**Hall Q., Cannon MC.- 2002** The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1161–1172p.

**Halliwell B.- 1984** Chloroplast Metabolism. The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells - Oxford Science Publication.

**Hamada A., Shono M., Xia T., Ohta M., Hayashi Y., Tanaka A., Hayakawa T.- 2001** Isolation and characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol. Biol.* 46: 35–42p.

**Hamdy A.- 1999** Saline irrigation and management for **substainabel** use. *Advanced short Course on saline Irrigation Proc.* Agadir: 152-227p.

**Hanson AD., Rathinasabapathi B., Rivoal J., Burnet M., Dillon MO., Gage DA.- 1994** Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:306–310p.

**Harholt J., Suttangkakul A., Vibe Scheller H.-2010** Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* 153: 384–395p.

**Haritatos E., Medville R., Turgeon R.- 2000** Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105–111p.

**Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M.- 2013** Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In : Ecophysiology and responses of plants under salt stress, 25–87p. Ahmad P., Azooz MM., Prasad MNV. eds. Springer, New York.

- Hasegawa, PM., Bressan RA., Zhu JK., Bohnert HJ.- 2000** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* 51: 463–499p.
- Havananda T., Brummer EC., Maureira-Butler IJ., Doyle JJ.-2010** Relationships among diploid members of the *Medicago sativa* (Fabaceae) species complex based on chloroplast and mitochondrial DNA sequences. *Systematic Bot.* 35: 140 – 150p.
- Hayashi T., Marsden MPF., Delmer DP.-1987** Pea xyloglucan and cellulose V: xyloglucan–cellulose interactions *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol.* 83: 384–389p.
- Hawkins HJ., Lewis OAM.- 1993** Combination effect of NaCl salinity, nitrogen form and calcium concentration on the growth, ionic content and gaseous exchange properties of *Triticum aestivum* L.cv. Gamtoos. *New Phytol.* 124: 161-170p.
- Held MA., Tan L., Kamyab A., Hare M., Shpak E., Kieliszewski MJ- 2004** Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosinerich extensin analogs cross-linked *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 279, 55474-55482p.
- Hernandez JA., Olmos E., Corpas FJ., Sevilla F., Del Rio LA.- 1995** Salt-induced oxidativestress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.*105:151–167p.
- Hernandez JA., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F.- 2000** Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853–862p.
- Hernandez JA., Talavera JM., Martí'nez-Go'mez P., Dicenta F., Sevilla F.- 2001** Response of antioxidant enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiol. Plant.* 111:313–321p.
- Hernández M., Fernandez-Garcia N., Diaz-Vivancos P., Olmos E.- 2010** A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in Brassica oleracea roots. *J. Exp. Bot.* 61:521–535p.
- Hijazi M.- 2011** Caractérisation structurale et fonctionnelle d'AGP31, une glycoprotéine atypique de la paroi chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse Doctorat, Université de Toulouse.
- Hinz SWA., Verhoef R., Schols HA., Vincken J-P., Voragen AGJ.- 2005** Type I arabinogalactan contains [beta]-d-Galp-(1→3)-[beta]-d-Galp structural elements. *Carbohydr. Res.* 340(13): 2135- 2143p.
- Horie T., Hauser F., Schroeder JI.- 2009** HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Sci.* 14:660–668p.
- Hsu SY., Kao CH.- 2003** Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 39: 83–90p.
- Hu X., Jiang M., Zhang A.,Lu J.- 2005** Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* 223:57–68p.

**Humphrey TV., Bonetta DT., Goring DR.- 2007** Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytol.* 176: 7–21p.

**Hussain SS., Ali M., Ahmad M., Siddique KHM.- 2011** Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol. Adv.* 29: 300–311p.

## I

**Ingram J., Bartels D.- 1996** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47: 377–403p.

**Irigoyen JJ., Emerich DW., Sanchez- Diaz M.- 1992** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84: 55–60p.

**Islam S., Malik AI., Islam AKMR., Colmer TD.-2007** Salt tolerance in a *Hordeum marinum*–*Triticum aestivum* amphiploid, and its parents. *J. Exp. Bot.* 58: 1219–1229p.

**Iyer V., Barnabas AD.- 1993** Effects of varying salinity on leaves of *Zostera capensis* Setchell. I. Ultrastructural changes. *Aquat. Bot.* 46 : 141–153p.

**IvlevAA., PichouzkinVI., TarakanovIG.-2013** Soil Salinity Effect on Carbon Isotope Composition of Plant Biomass. *Adv. Stu.in Biol.* 5 :223 – 234p.

## J

**Jamet E., Guzzardi P., Salva I.- 2000** What do transgenic plants tell us about the regulation and function of cell-wall structural proteins like extensins? *Russ. J. Plant Physiol.* 47: 318–326p.

**Janz D., Behnke K., Schnitzler J-P., Kanawati B., Schmitt-Kopplin P., Polle A.- 2010** Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaption of stress tolerance mechanisms. *BMC Plant. Biol.* 10:150p.

**Janz D., Lautner S., Wildhagen H., Behnke K., Schnitzler JP., Rennenberg H., Fromm J. and A. Polle.- 2011.** Salt stress induces the formation of a novel type of ‘pressure wood’ in two *Populus* species. *New Phytol.* 194:129–41p.

**Jarvis MC., Hall MA., Threlfall DR., Friend J.- 1981** The polysaccharide structure of potato cell walls: Chemical fractionation. *Planta* 152: 93–100p.

**Jeanjean R., Matthijs HCP., Onana B., Havax M., Joset F.- 1993** Exposure of cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 34: 1073–1079p.

**JESCHKE WD.- 1984** K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. In R. C. Staples and G. H. Toenniessen [eds.], *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*, chap.3. John Wiley & Sons, New York, NY.

**Joao C., Fernandes, Garcia–Angulo P., Goulao LF., Acebes JL., Amancio S.- 2013** Mineral stress affects the cell wall composition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) callus. *Plant Sci.* 205-206: 111-120p.

**Jones L., Seymour GB., Knox JP.- 1997** Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1,4)-galactan. *Plant Physiol.* 113:1405–1412p.

**Jones L., Milne JL., Ashford D., McQueen-Mason SJ.- 2003** Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11783–11788p.

**Jose-Estanyol M., Puigdomenech P.- 2000** Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Phys. Bioch.* 38: 97-108p.

**Jose-Estanyol M., Gomis-Ruth X., Puigdomenech P. -2004** The eight cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Phys. Bioch.* 42: 355-365p.

**Joye DD., Luzio GA.- 2000** Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydr. Polymers* 43(4): 337-342p.

**Jurik TW.- 1986.** Temporal and spatial patterns of specific leaf weight in successional northern hardwood tree species. *Amer. J. Bot.* **73**: 1083–1092p.

## K

**Kaiser G., Heber U.- 1984** Sucrose transport into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* 161: 562–568p.

**Kameli A., Losel DM.- 1993** Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. *New Phytol.* 125: 609-614p.

**Kamerling JP., Gerwig GJ., Vliegthart JFG., Clamp JR.- 1975** Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.* 151 : 491-495p.

**Kanai M., Higuchi K., Hagihara T.- 2007** Common reed produces starch granules at the shoot base in response to salt stress. *New Phytol.* 176: 572–580p.

**Kant S., Kant P., Raveh E., Barak S.- 2006** Evidence that differential gene expression between the halophyte *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na<sup>+</sup> uptake in *T. halophila*. *Plant Cell Environ.* DOI:10.1111/j.1365- 3040.

**Kao WY ., Tsaic TT ., Tsaic HC ., Shih CN.- 2006** Response of three *Glycine* species to salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 60: 344-351p.

**Kaplan B., Sherman T., Fromm H.- 2007** Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett.* 581: 2237-2246p.



**Karakas B., Ozias-Akins P., Stushnoff C., Suefferheld M., Rieger M.- 1997** Salinity and drought tolerance in mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.*20:609–616p.

**Kazachkova Y., Batushansky A., Cisneros A., Tel-Zur N., Fait A., Barak S.- 2013** Growth platform-dependent and independent phenotypic and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and its halophytic relative *Eutrema salsugineum*, to salt stress. *Plant Physiol.*162:1583-1598p.

**Keegstra K., Talmadge KW., Bauer WD., Albersheim P.- 1973** The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.* 51: 188–196p.

**Keegstra K.- 2010** Plant Cell Walls. *Plant Physiol.*154: 483-486p.

**Keller B., Templeton MD., Lamb CJ.- 1989** Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86 5: 1529–1533p.

**Keutgen AJ., Keutgen N.- 2003** Influence of NaCl salinity stress on fruit quality in strawberry. *Acta Hort.* 609: 155-157p.

**Kieliszewski MJ., O'Neill M., Leykam J., Orlando R.- 1995** Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline-O-arabinylation. *J. Biol. Chem.*270:2541–2549p.

**Kim YO., Kim JS., Kang H.- 2005** Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 42: 890–900p.

**Kimura S., Itoh T.- 1995** Evidence for the role of the glomerulocyte in cellulose synthesis in the tunicate *Metandrocarpa uedai*. *Protoplasma* 186: 24-33p.

**Kobayashi M., Nakagawa H., Asaka T., Matoh T.- 1999** Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca<sup>2+</sup> retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol.* 119: 199 – 204p.

**Komalavilas P., Mort AJ.-1989** The acetylation at 0-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich region of pectins. *Carbohydr. Res.* 189: 261-272p.

**Komor E., Zingsheim O., Sprugel H.-1996** Cycles of sugar transport and sucrose metabolism in sugarcane tissue: quantitative determination. In : Sugarcane research towards efficient and sustainable production, 92–94p. Wilson JR., Hogarth DM, Campbell JA., Garside AL. eds. CSIRO Division of Tropical Crops and Pastures, Brisbane.

**Konno H., Nakato T., Nakashima S., Katoh K.- 2005***Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *J. Exp. Bot.* 56:1923–1931p.

**Kosová K., Prášil IT., Vítámvás P.- 2013** Protein Contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6757-6789p.

**Koyro H-W.- 2003** Study of potential cash crop halophytes by a quick check system: determination of the threshold of salinity tolerance and the ecophysiological demands. In: Lieth H., Mochtchenko M. eds. 5–17p. Cash crop halophytes: recent studies. Tasks for vegetation science 38. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

**Kramer D., Lauchli A., Yeo AR.- 1977** Transfer cells in roots of *Phaseolus coccineus* - Ultrastructure and possible function in exclusion of sodium from the shoot. *Ann. Bot.* 41: 1031–40p.

**Kudla J., Batistic O., Hashimoto K.- 2010** Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22: 541–563p.

**Kuznetsov VIV., Shevyakova NI.- 2007** Polyamines and Stress Tolerance of Plants. *Plant Stress* 1: 50–71p.

## L

**Lachaal M.- 1992** Exploration de la variabilité de la tolérance au sel chez la lentille (*Lens culinaris* L.). Thèse de doct. Spéc.FST. Tunis, 149p.

**Lachhab I., Louahlia S., Laamarti M., Hammani K.- 2013** Effet d'un stress salin sur la germination et l'activité enzymatique chez deux génotypes de *Medicago sativa* Int. Journal of Innovation and Applied Studies. 3 : 511-516 p

**Lalonde S., Wipf D., Frommer W.- 2004** Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 341–372p.

**Lampert DTA., Northcote DH.- 1960** Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. *Nature* 188: 665–666p.

**Lampert DT., Kieliszewski MJ., Showalter AM.- 2006** Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytol.* 169: 479–492p.

**Lampert DT., Kieliszewski MJ., Chen Y., Cannon MC.- 2011** Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol.* 156: 11–19p.

**Lawlor DW., Cornic G.- 2002** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25: 275-294p.

**Lazaridou A., Biliaderis CG., Micha-Screttas M., Steele BR.-2004** A comparative study on structure–function relations of mixed-linkage (1→3), (1→4) linear  $\beta$ -D-glucans. *Food Hydrocolloids* 18: 837-855p.

**Lee KJD., Sakata Y., Mau SL., Pettolino F., Bacic A., Quatrano RS., Knight CD., Knox JP.- 2005** Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17: 3051–3065p.

- Leegood RC., Lea PJ., Adcock MD., Häusler RE.- 1995** The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.* 46 :1397–1414p.
- Lemaire G. Allirand JM.- 1993** Relation entre croissance et qualité de la luzerne: interaction génotype - mode d'exploitation. *Fourrages* 134: 183-198p.
- Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain JL., Laloi M., Thévenot PC., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M.- 2013** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Plant Sci.* 4: 272: 1-21p.
- Leng Q., Mercier RW., Hua BG, Fromm H., Berkowitz GA.- 2002** Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* 128:400–410p.
- Le Rudulier D., Strom AR., Dandekar AM., Smity LT., Valentine RC.- 1984** Molecular biology of osmoregulation. *Science* 224: 1064–1068p.
- Lesins KA., Lesins I.- 1979** Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Lessani H., Marschner H.- 1978.** Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Austral. J. Plant Physiol.* 5:27–37p.
- Lessani H.- 1969** Recherche sur le comportement physiologique de la luzerne en présence de NaCl . Etude de quelques aspects de la nutrition minérale et du métabolisme respiratoire. Thèse Doctorat Sciences, Paris.152 p.
- Leubner R.- 2011** Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellwände von Blättern der Maisgenotypen Pioneer 3906 und SR 03 unter Salzstress. Master Thesis, Institute of Plant Nutrition, Justus Liebig University, Giessen.
- Levitt J.- 1980.** Responses of Plants to Environmental Stresses, vol. II. Acad. Press, New York.
- Levy S., York WS., Stuike-Prill R., Meyer B., Staehelin LA.- 1991** Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan: the role of the fucosylated side chain in surface-specific side chain folding. *Plant J.* 1:195-215p.
- Lewis DR., Olex AL., Lundy SR., Turkett WH., Fetrow JS., Muday GK.-2013** A kinetic analysis of the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulate lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Preview* 1-18p.
- Li JM, Jin H.- 2007 Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends.Plant. Sci.* 12:37–41p.
- Li W., Wang D., Jin T., Chang Q., Yin D., Xu S., Liu B., Liu L.- 2011** The vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene SsNHX1 from the halophyte *Salsola soda* confers salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 29: 278–290p.
- Lin CC., Kao CH.- 2001** Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant Soil* 237: 165–171p.

**Liners F., Letesson JJ., Didembourg C., Van Cutsem P.- 1989** Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* 91: 1419–1424p.

**Lohaus G., Hussmann M., Pennewiss K., Schneider H., Zhu JJ., Sattelmacher B.- 2000** Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by a salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* 51: 1721-1732p.

**Loreto F., Centritto M., Chartzoulakis K.- 2003** Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant Cell Environ.* 26: 595-601p.

**López-Gómez M., Lluch C.- 2012** Trehalose and abiotic stress tolerance. In : Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability, Ahmad P., Prasad MNV. eds. Springer, New York. 253–265p.

**Lu C., Qiu N., Lu Q., Wang B., Luang T.- 2002** Does salt stress lead to increased susceptibility of photosystem II to photoinhibition and changes in photosynthetic pigment composition in halophyte *Suaeda salsa* grown outdoors? *Plant Sci.* 163: 1063–1068p.

**Iyer V., Barnabas AD., 1993** Effects of varying salinity on leaves of *Zostera capensis* Setchell. 1. Ultrastructural changes. *Aquat. Bot* 46:141–153p.

## M

**Maathuis Frans JM., Prins Hidde BA.- 1990** Patch clamp studies on root cell vacuoles of a salt-tolerant and a salt-sensitive *Plantago* species.1 Regulation of channel activity by salt stress. *Plant Physiol.* 92: 23-28p.

**Mahajan S ., Pandey GK. , Tuteja N.- 2008** Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem. Biophys.* 471 : 146 – 158p.

**Manaa A. Ahmed HB., Valot B., Bouchet JP., Aschi-Smiti S., Causse M., Faurobet M.- 2011** Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *J. Exp. Bot.* 62: 2797–2813p.

**Marcus SE., Verhertbruggen Y., Herve C., Ordaz-Ortiz JJ., Farkas V., Pedersen HL.- 2008** Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* 8: 60p.

**Marschner H., Kirby EA., Engels C.- 1997** Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. *Bot. Acta* 110: 265–273p.

**Matilde JE.,Puigdomènech P.- 2000** Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 89-108p.

**Matoh T., Kawaguchi S., Kobayashi M.- 1996** Ubiquity of a boraterhamnagalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 636-640p.

**Mauriès M.- 1994**La luzerne aujourd'hui : Vaches laitières, vaches allaitantes, chèvres, brebis, chevaux. Ed. France agricole, Paris.

**Maxwell K., Johnson GN.- 2000-** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 345: 659-668p.

**Mazel A., Leshem Y., Tiwari BS., Levine A.- 2004** Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol.* 134: 118–128p.

**Mc Cann MC., Wells B., Roberts K.- 1990** Direct visualisation of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* 96: 323-334p.

**Mellerowicz EJ., Immerzeel P., Hayashi T.- 2008** Xyloglucan: the molecular muscle of trees. *Ann. Bot.* 102: 659–665p.

**Meloni DA., M.A. Oliva HA., Ruiz., Martinez CA.- 2001.** Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *J. Plant Nutr.* 24:599–612p.

**Mezni M., Bizid E., Harnza M.-1999** Effets de la salinité des eaux d'irrigation sur la survie et la croissance de trois variétés de luzernes pérennes. *Fourrages*158: 169-178p.

**Mezni M., Haffani S., Albouchi A.- 2012** Morphological and physiological studies in three alfalfa varieties (*Medicago sativa* L.) under salt stress. *J. Agric. Veter. Sci.*1: 29-37p.

**Michaud R., Lehman WF., Rumbaugh MD.-1988** World distribution and historical development. In : Alfalfa and alfalfa improvement 25-92p. Hanson AA., Barnes DK., Hill RR., eds. Madison, USA.

**Micheli, F.- 2001** Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6 :414–419p.

**Miller G., Suzuki N., Rizhsky L., Hegie A., Koussevitzky S., Mittler R.- 2007** Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiol.* 144:1777–1785p.

**Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R.- 2010** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33: 453–467p.

**Minorsky PV.- 2003** The hot and the classic. *Plant Physiol.*131: 1159–1160p.

**Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M.- 2003** Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environ.* 26: 845-856p.

**Mohnen D.-2008** Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 266–277p.

**Mollet JC., Kim S., Jauh GY., Lord EM.-2002** Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma* 219: 89–98p.

**Montreuil J., Speak G.- 1963** Microdosage des glucides, Fasc. 1 : Methodes colorimétriques de dosages des glucidestotaux. Laboratoire de chimie biologique, *Fac. Sci. Ed.*, Lille, 148 p.

**Moore JP., Farrant JM., Driouich A.- 2008** A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signal Behav.* 3: 102–104p.

**Morsy MR., Jouve L., Hausman JF., Hoffmann L., Stewart JM.- 2007** Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *J. Plant Physiol.* 164:157–167p.

**Mueller SC., Brown RM.- 1980** Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J. Cell Biol.* 84: 315 – 326 p.

**Munns R.- 2002** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239–250p.

**Munns R.- 2007** Utilizing genetic resources to enhance productivity of salt-prone land. CAB Rev.: *Perspectives in Agric. Veterinary Sci. Nutr. Nat. Res.* 2. No. 009.

**Munns R., Termaat A.- 1986** Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160 p.

**Munns R., Schatman DP., Condon AG.- 1995** The significance of a two- phase growth response to salinity in wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 561-569 p.

**Munns R., Guo J., Passioura JB., Cramer GR.- 2000** Leaf water status controls daytime but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 27p.

**Munns R., James RA., Läuchli A.- 2006** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57: 1025–1043p.

**Munns R., Tester M.- 2008** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651–681 p.

**Muschitz A.- 2009** Réponses physiologiques des végétaux supérieurs aux stress métalliques. Caractérisation du rôle des parois cellulaires dans les stratégies défensives des cellules de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) face aux éléments traces métalliques. Thèse Doctorat Université d'Artois, 190p.

**Mutter M., Colquhoun IJ., Schols HA., Beldman G., Voragen AGJ.-1996** Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan  $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1,4)- $\alpha$ -d-galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiol.* 110:73–77p.

## N

**Naidu BP., Paleg LG., Jones GP.- 1992** Nitrogenous compatible solutes in drought-stressed *Medicago* spp. *Phytochemistry* 31: 1195-1197p.

**Nakamurat., Ishitani M., Harinasut P., Nomura M., TakabeT., Takabet.- 1996** Distribution of glycinebetaine in old and young leaf blades of salt-stressed barley plants. *Plant Cell Physiology*. 37:873-877p.

**Neumann P.- 1997.** Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant Cell Environ.* 20: 1193-1198p.

**Ndimba BK., Chivasa S., Simon WJ., Slabas AR.- 2005** Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5: 4185 – 4196p.

**Nguema-Ona E., Andeme-Onzighi C., Aboughe-Angone S., Bardor M., Ishii T., Lerouge P., Driouich A.- 2006** The *reb1-1* mutation of *Arabidopsis*: effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 140: 1406–1417p.

**Niyogi KK.- 1999** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333–359p.

**Niyogi KK., Grossmn AR., Bjo"rkman O.- 1998** *Arabidopsis* mutants define a central role of the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121–1134p.

**Noble CL., Rogers ME.- 1992** Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant Physiol.* 146: 99–107p.

**Noiraud N., Delrot S., Lemoine R.- 2000** The sucrose transporter of celery: identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122: 1447–1455p.

**Nounjan NP., Nghia T., Theerakulpisut P.- 2012** Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *Journal of Plant Physiology*, 169: 596-604.

**O**

**Obel N., Neumetzler L., Pauly M.- 2007** Hemicelluloses and cell expansion. In: *The Expanding Cell*, VerbelenJP, Vissenberg K., eds Berlin: Springer-Verlag 57–88p.

**Oh SJ., Kim YS., KwonC-W., Park HK., Jeong JS., Kim J-K.- 2009** Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiol.* 150: 1368–1379p.

**Omami EN., Hammes PS, Robbertse PJ.- 2006** Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranthe (*Amaranthus spp.*) genotypes. *New Zealand J. Crop Horticult. Sci.* 34: 11–22p.

**O'Neil MA., Albertsheim P., Darwill A.- 1990** The pectic polysaccharides of primary cell walls. In : *Methods in plant biochemistry* Vol. 2, 425–44p. Dey PM. ed. Acad. Press London.

**O'Neill MA., Eberhard S., Albersheim P., Darvill AG.- 2001** Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*294:846–849p.

**O'Neill MA., York WS.-2003**The composition and structure of primary cell walls. In JKC Rose, ed, *The. Plant. Cell. Wall*. Blackwell Publishers, Oxford. 1–54p.

**O'Neill MA., Ishii T., Albersheim P., Darvill AG.- 2004** Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. PlantBiol.* 55: 109–139p.

**Ortega L., Fry SC., Taleisnik E.-2006** Why are *Chloris gayana* leaves shorter in salt-affected plants? Analyses in the elongation zone. *J. Exp. Bot.* 57: 3945–3952p.

## P

**Pabst M., Fischl RM., Brecker L., Morelle W., Fauland A., Köfeler H., Altmann F., Léonard, R.- 2013**Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species. *Plant J.*76:61–72p.

**Pandolfi C., Mancuso S.,Shabala S.- 2012**Physiology of acclimation to salinity stress in pea (*Pisum sativum*).*Env. Exp.Bot.* 84 : 44–51p.

**Pang Q., Chen S., Dai S., Chen Y., Wang Y., Yan X.- 2010** Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *J. Proteom. Res.* 9, 5: 2584–2599p.

**Pantin F., Simonneau T., Rolland G., Dauzat M., Muller B.- 2011** Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiol.* 156: 803–815p.

**Pardo JM., Quintero FJ.- 2002** Plants and sodium ions : Keeping compary with the enemy. *Genome Biol.* 3: 1017.1-1017.4p.

**Papadopoulos I.- 1986-** Effect of high sulfate irrigation waters on soil salinity and yields. *Agron. J.* 78: 429-432 p.

**Pardo JM., Cubero B., Leidi EO., Quintero FJ.- 2006**Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 1181–1199p.

**Parida AK., Das AB., Mohanty P.- 2004** Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*, differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *J. Plant Physiol.* 161: 531–42p.

**Parida AK., Das AB.- 2005** Salt tolerance and salinity effects on plants. *.Ecotoxicol. Environ. Safety.* 60, 3: 324-349 p.

**Peaucelle A., Braybrook SA., Höfte H.-2012** Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Front. Plant Sci.* 3: 121p.

**Pérez-Alfocea F., Balibrea ME., Alarcón JJ., Bolarín MC.- 2000** Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *J. Plant Physiol.* 156: 367–374p.



- Pettigrew W., Meredith JW.- 1994** Leaf gas exchange parameters vary among cotton genotypes. *Crop Sci.* 34: 700-705p.
- Phillips DA., Joseph CM., Maxwell CA.- 1992** Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 99:1526-1531p.
- Phillips DA, Kapulnik Y.-1995** Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* 3:58-64p.
- Phillips DA., Sande ES., Vriezen JA., De Bruijn FJ., Le Rudulier D., Joseph CM.- 1998** A new genetic locus in *Sinorhizobium meliloti* is involved in stachydrine utilisation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3954–3960p.
- Pitann B., Schubert S., Mühling KH.- 2009** Decline in leaf growth under salt stress is due to an inhibition of H<sup>+</sup>-pumping activity and increase in apoplastic pH of maize leaves. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 535-543p.
- Platten JD., Cotsaftis O., Berthomieu P., Bohnert H., Davenport RJ., Fairbairn DJ., Horie T., Leigh RA., Lin HX., Luan S.- 2006** Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* 11: 372–374p.
- Plett DC., Moller IS.- 2010** Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant Cell Environ.* 33: 612-626p.
- Prolea D.- 2002** Espèces et utilisations, des ressources en protéines à redécouvrir : les plantes fourragères prairiales-la luzerne. Institut du Végétal et de l'Élevage, GNIS, Paris, 4-7p.
- Pogson BJ., Niyogi KK., Bjorkman O., DellaPenna D.- 1998** Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13324–13329p.
- Pommerrenig B., Papini-Terzi FS., Sauer N.- 2007** Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiol.* 144: 1029–1038p.
- Poorter H., Villar R.-1997** The fate of acquired carbon in plants: chemical composition and construction costs. In : *Plant Resource Allocation*, 39–72p. Bazzaz FA., Grace J. eds. San Diego, CA: Academic Press.
- Popper ZA., Fry S.- 2005** Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann. Bot.* 96:91-99p.
- Prata RTN., Williamson JD., Conkling MA., Pharr DM.- 1997** Sugar repression of mannitol dehydrogenase activity in celery cells. *Plant Physiol.* 114:307–314p.
- Puhlmann J., Bucheli E., Swain MJ., Dunning N., Albersheim P., Darvill A.G., Hahn, MG.- 1994** Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. 1. Characterization of a monoclonal-antibody to a terminal alpha-(1-2)-linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiol.* 104: 699–710p.

**Pujari DS., Chanda SV.- 2002-** Effect of salinity stress on growth, peroxidase and IAA oxidase activities in *Vigna* seedlings. *Acta Physiol. Plant* 24: 435-439p.

**Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Ammann S., Oksman-Caldentey KM., Buchert J.- 2008** Enzyme-assisted processing increases antimicrobial and antioxidant activity of bilberry. *J. Agri. Food Chem.* 56: 681-688p

## Q

**Quintero FJ., Blatt MR., Pardo JM.- 2000** Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett.* 471: 224-228p.

**Quiroga M., Guerrero C., Botella MA., Barcelo A., Amaya I., Medina MI., Alonso FJ., deForchetti SM., Tigier H., Valpuesta V.- 2000.** Atomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122: 1119-1127p.

**Quiros CF., Bauchan GR.-1988** The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In : Alfalfa and alfalfa improvement, 93-124p. Hanson AA., Barnes DK., Hill RR. Jr., eds. ASA-CSSA-SSSA WI.

## R

**Rhee JE., Jeong HG., Lee JH., Choi SH.- 2006** AphB influences acid tolerance of *Vibrio vulnificus* by activating expression of the positive regulator CadC. *J. Bacteriol.* 188: 6490–6497p.

**Reidel EJ., Rennie EA., Amiard V., Cheng L., Turgeon R.-2009** Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol.* 149: 1601–1608p.

**Reiter WD., Chapple CCS., Somerville C.- 1993** Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science.* 261: 1032-1035p.

**Ren ZH., Gao JP., Li LG., Cai XL., Huang W., Chao DY., Zhu MZ., Wang ZY., Luan S., Lin HX.- 2005** A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genetics* 37:1141–1146p.

**Rengasamy P.- 2010** Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Aust. J. Soil Res.* 37: 613-620 p.

**Rennie EA., Turgeon R.- 2009** A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 14162–14167p.

**Rentsch D., Frommer WB.- 1996** Molecular approaches towards an understanding of loading and unloading of assimilates in higher plants. *J. Exp. Bot.* 47: 1199–1204p.

**Rentsch D., Hirner B., Schmelzer E., Frommer WB.- 1996** Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease targeting mutant. *Plant Cell* 8:1437–1446p.

- Rhodes, D., Hanson AD.- 1993** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384p.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D.- 2001** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967p.
- Ringli C., Keller B., Ryser U.- 2001** Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 1430-1441p.
- Rivelli AR., Lovelli S., Perniola M.- 2002** Effects of salinity on gas exchange, water relations and growth of sunflower (*Helianthus annuus*). *Fonct. Plant.Biol.* 29: 1405-1415p.
- Robertson AV., Marion L.- 1960** The biogenesis of alkaloids XXV. The role of hygric acid in the biogenesis of stachydrine. *Can. J. Chem.* 38: 396-398p.
- Robertson JM., Yeung EC., Reid DM., Hubick KT.- 1990** Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. 2. Mitotic activity. *J. Exp. Bot.* 41:339-350p.
- Rodríguez HG., Roberts JKM., Jordan WR., Drew MC.- 1997** Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol.* 113:881-893p.
- Rodríguez-Concepción M., Ahumada I., Diez-Juez E., Sauret-Güeto S., Lois LM., Gallego F., Carretero-Paulet L., Campos N., Boronat A.- 2001** 1-Deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J.* 27: 213-222p.
- Rodríguez-Carvajal MA., Hervé du Penhoat C., Mazeau K., Doco T., Pérez S.- 2003** The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modelling and NMR investigation. *Carbohydr. Res.*338: 651-671p.
- Rodríguez-Navarro A., Rubio F.- 2006** High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 1149-1160p.
- Romeroaranda R., Soria T., Cuartero J.- 2001.** Tomato plant water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.* 160: 265-272p.
- Ros Barcelo' A., Pomar F., Ferrer MA., Martí'nez P., Ballesta M.C., Pedren'ño MA.- 2002**In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol. Plant.* 114: 33-40p.
- Rose JKC., Brummell DA., Bennett AB.-1996** Two divergent xyloglucan endotransglycosylases exhibit mutually exclusive patterns of expression in *Nasturtium*. *Plant Physiol.*110: 493-499p.
- Rose JKC., Braam J., Fry SC., Nishitani K.- 2002** The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.*43:1421-1435p.

**Roxas VP., Smith RK., Allen Jr. ER., Allen. RD.- 1997** Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15: 988–991p.

**Roy SJ.- 2008** Investigating glutamate receptor-like gene coexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31: 861–871p.

**Rus A., Yokai S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B, Matsumoto TK., Koiwa H., Zhu JK., Bressan RA., Hasegawa PM.- 2001** AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14150–14155p.

**Rus A., Lee BH., Munoz-Mayor A., Sharkhuu A., Miura K., Zhu JK., Bressan RA., Hasegawa PM.- 2004** AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136:2500–2511p.

## S

**Sachetto-Martins G., Franco L., de Oliveira D.- 2000** Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Bioch. Biophys. Acta* 1492: 1–14p.

**Sacks MM., Silk WK., Burman P.- 1997** Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant Physiol.* 114:519–527p.

**Sai Kachout S., Ben Mansoura A., Leclerc JC., Mechergui R., Rejeb MN., Ouerghi Z.- 2009** Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *Atriplex rosea*. *J. Food Agri. Environ.* 7(3&4): 938-945p.

**Saied AS., Keutgen AJ., Noga G.- 2005** The influence of NaCl salinity on growth, yield and fruit quality of strawberry cvs. 'Elsanta' and 'Korona'. *Scientia Horticulturae* 103: 289-303p.

**Salama S., Trivedi S., Busheva M., Arafa AA., Garab G., Erdei L.- 1994** Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 144: 241-247p.

**Sánchez-Aguayo I., Rodríguez-Galán JM., García R., Torreblanca J., Pardo JM.- 2004** Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* 220: 278-285p.

**Satter RL.- 1990** Leaf movement: an overview of the field. In: Satter RL., Gorton HL., Vogelmann TC., eds. The pulvinus: motor organ for leaf movement. *Amer. Soc. Plant Physiol.* 1–9p.

**Sauer N.- 2007** Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581: 2309–2317p.

**Sauer N., Stolz J.- 1994** SUC1 and SUC2" two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* 6 : 67-77p.

**Sauter JJ.- 1980** Seasonal variation of sucrose content in the xylem sap of *Salix*. *Z. Pflanzenphysiol.* 98: 377–391p.

**Sauter JJ., Van Cleve B.- 1994** Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees* 8: 297–304p.

**Sarkar P., Bosneaga E., Auer M.-2009** Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *J. Exp. Bot.* 60: 3615–3635p.

**Scheller HV., Ulvskov P.- 2010** Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 263–289p.

**Schluemann H., Pellny T., van Dijken A., Smeekens S., Paul M.- 2003** Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6849–6854p.

**Schols HA., Geraeds CCJM., Searle-Van Leeuwen MJF., Kormelink FJM., Voragen AGJ.- 1990** Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydr. Res.* 206: 105–115p.

**Schultz CJ., Johnson KL., Currie G., Bacic A.- 2000** The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1751–1768p.

**Schulz A.- 2005** Role of plasmodesmata in solute loading and unloading. In : Plasmodesmata, *Annu. Plant Reviews*, 18: 135-16p. Oparka KJ. ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

**Searle-Van Leeuwen MJF., Van den Broek LAM., Schols HA., Beldman G., Voragen AGJ.- 1992** Rhamnogalacturonan acetyltransferase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 347–349p.

**Seifert GJ., Roberts K.-2007** The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 137-161p.

**Selvendran RR.- 1985** Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J. Cell. Sci. S.* 2: 51-58p.

**Selvendran RR., Stevens BJH., O’Neill MA.-1985** Developments in the isolation of cell walls from edible plants, 39-78 p. In: *Biochem. Plant Cell Walls*, Brett CT., Hillman JR. eds. Cambridge Univ. Press, U.K.

**Selvendran RR., O’Neil MA.- 1987** Isolation and analysis of cell walls from plant material, p. 25–153. In: *Methods of biochemical analysis*, vol 32, Glick D. ed. Wiley Interscience, New York.

**Sharp J.M., Jr.-1988** Diagenetic processes in northwest Gulf of Mexico sediments, in *Diagenesis, II*, edited by G. V. Chilingarian and K. H. Wolf, chap. 1 43–113 pp. *Elsevier*. New York.

**Sharp RE., LeNoble ME.- 2002** ABA ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53:33–37p.

- Sheveleva EV., Marquez S., Chmawa W., Zegeer A., Jensen RG., Bohnert HJ.- 1998** Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco: high amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiol.* 117:831–839p.
- Shi., HZ., Lee BH., Wu SJ., Zhu JK.- 2002** Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotech.* 21: 81–85p.
- Shiga TM., Lajolo FM.- 2006** Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) - Composition and structure. *Carbohydr. Polymers* 6 : 1-12p.
- Shomer I., Novacky AJ., Pike SM., Yermiyahu U., Kinraide TB.-2003** Electric potentials of plant cell walls in response to the ionic environment. *Plant Physiol.* 133: 411–422p.
- Showalter AM., Keppler B., Lichtenberg J., Gu D., Welch LR.- 2010** A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol.* 153: 485–513p.
- Showalter AM.-1993** Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9–23p.
- Showalter AM.- 2001** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 : 1399–1417p.
- Shu S., Guo SR., Sun J., Yan LY.- 2012** Effect of salt stress on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Cucumis sativus* and its protection by exogenous putrescine. *Physiol. Plant.* 146: 285-296.
- Sibole JV., Cabot C., Poschenrieder C., Barcelo J.- 2003** Efficient leaf partitioning, an overriding condition for abscisic acid controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes. *J. Exp. Bot.* 54: 2111–2119p.
- Skene DS.- 1972** The kinetics of tracheid development in *Tsuga canadensis* Carr. and its relation to tree vigour. *Ann. Bot.* 36: 179–187p.
- Skirycz A., Inzé D.- 2010** More from less: Plant growth under limited water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 197–203p.
- Small E., Jomphe M.- 1989** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Can. J. Bot.* 67: 3260-3294p.
- Smart CM.- 1994** Gene Expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126 : 419-448p.
- Smirnoff N.- 2000** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 229–235p.
- Smirnoff N., Wheeler GL.- 2000** Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 267–290p.
- Sinskaya EN.- 1950** Flora of cultivated plants of the U.S.S.R. XIII Perennial leguminous plants. Part I Transl.1961. Jerusalem: Israel Program of Scientific Translations.

- Siringam K., Juntawong N., Chan-um S., Boribookaset T., Kirdmanee C.- 2012** Salt tolerance enhancement in *indica* rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using exogenous sucrose supplementation. *Plant Proteomics J.* 5:52–59p.
- Small E., Jomphe M.-1989** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Can. J. Bot.* 67: 3260-3294p.
- Sobhanian H., Motamed N., Rastgar Jazii F., Nakamura T., Komatsu S.- 2010** Salt stress induced differential proteome and metabolome response in the shoots of *Aeluropus lagopoides* (poaceae), a halophyte c4 plant. *J. Prot. Res.* 9: 2882-2897p.
- Soltani A.- 1988** – Analyse des effets de NaCl et de la source d'azote sur la nutrition minérale de l'orge. Thèse Doctorat d'Etat. FST. Tunis, 322p.
- Soltani A., Hajji M., Grignon C.- 1990.** – Recherche de facteurs limitant la nutrition minérale de l'orge en milieu salé. *Agro.10:* 857-866p.
- Somerville C.- 2006** Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22: 53–78p.
- Soussi M., Ocana A., Lluch C.- 1998** Effect of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337p.
- Stadler R., Sauer N.-1996** The *Arabidopsis thaliana* AfSUC.2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* 109: 299-306p.
- Stepien P., Johnson NG.- 2009-** Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: Role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiol.* 149: 1154-1165p.
- Steppuhn H., Acharya S. N., Iwaasa A. D., Gruber M., Miller D. R.- 2012** Inherent responses to root-zone salinity in nine alfalfa populations. *Can. J. Plant Sci.* 92: 235-248p.
- Sudhir P., Murthy SDS.- 2004** Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42: 481–486p.
- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, Horie R, Chan W-Y, Leung H-Y, Hattori K.- 2005** Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44: 928–938p.
- Suwa R., Fujimaki S., Suzui N.-, 2008** Use of positron-emitting tracer imaging system for measuring the effect of salinity on temporal and spatial distribution of <sup>11</sup>C tracer and coupling between source and sink organs. *Plant . Science.* 175 : 210–216p.
- Sweet WJ., Morrison JC., Labavitch JM., Matthews MA.- 1990** *Plant Cell Physiol.* 31: 407-414p.
- Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G.- 2012** The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *Inter. J. Mol. Sci.* 13: 4458–4483p.

## T

**Taffouo VD., Kenne M., Fokam Tasse R., Fotsop WO., Fonkou T., Vondo Z., Amougou A.- 2004.** Salt stress variation response in five leguminous plants. *Agron. Afr.* 16: 33-44p.

**Taji T., Seki M., Satou M., Sakurai T., Kobayashi M., Ishiyama K., Narusaka Y., Narusaka M., Zhu JK., Shinozaki K.- 2004** Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol.* 135: 1697–1709p.

**Takemura T., Hanagata N., Sugihara K., Baba S., Karube I., Dubinsky Z.-2000** Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Aquat. Bot.* 68 : 15–28p.

**Talano MA., Agostini E., Medina MI., Reinoso H., Tordable MD., Tigier HA., de Forchetti SM.- 2006** Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: the relationship with the release of a basic peroxidase. *J. Plant Physiol.* 163: 740–749p.

**Tanaka Y., Hibino T., Hayashi Y., Tanaka A., Kishitani S., Takabe T., Yokota S., Takabe T.- 1999** Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *PlantSci.* 148: 131–138p.

**Tarczynski MC., Jensen FG., Bohnert HJ.- 1993** Stress protection in transgenic tobacco producing a putative osmoprotectant, mannitol. *Science* 259: 506-510p.

**Tapken D., Hollmann M.- 2008** *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *J. Mol. Biol.* 383: 36–48p.

**Tavakkoli E., Rengasamy P., Mcdonald GK.- 2010** The response of barley to salinity stress differs between hydroponics and soil systems. *Functional Plant Biology.* 37 :621–633p.

**Teakle N., Flowers T., Real D., Colmer T.- 2007** *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by 'excluding' Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> from the xylem. *J. Exp. Bot.* 58: 2169–2180p.

**Teakle NL., Tyerman SD.- 2010-** Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 33: 566–589p.

**Tester M., Davenport R.- 2003** Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503–527p.

**Teuber LR., Brick MA.- 1988** Morphology and anatomy. Pp. 125-162. In: Alfalfa and alfalfa improvement, Hanson AA., Barnes DK., Hill RR. Jr, eds. ASA-CSSA-SSSA, Madison WI.



**Thomas JC, Sepahi M, Arendall B, Bohnert HJ.- 1995** Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsisthaliana*. *Plant Cell Environ.*18:801–806p.

**Thompson JE., Fry SC.-2000** Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211: 275–286p.

**Thompson DS.- 2005** How do cell walls regulate plant growth? *J. Exp. Bot.* 56: 2275–2285p.

**Timasheff SN.- 1992** A physiochemical basis for selection of osmolytes by nature. In: Water and Life, Somero GN., Osmond CB., Bolis CL., eds. Springer-Verlag, Berlin, 70–84p.

**Tolivia J., Tolivia D.- 1987** Differential technique to stain nerve cells and fibers in methacrylate sections. *Ana.t Rec.*217:318–320p.

**Tsai YC., Hong CY., Liu LF., Kao CH.- 2005** Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Plant Physiol.* 162: 291–299p.

**Tully RE., Hanson AD.- 1979** Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* 64: 460-466p.

**Turan MA., Turkmen N., Taban N.- 2007** Effect of NaCl on stomatal resistance and proline, chlorophyll, Na, Cl and K concentration of lentil plants. *J. Agron.* 6: 378-381p.

**Turgeon, R., Medville, R.- 1998** The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*95:12055–12060p.

**Turgeon R., Wolf S.- 2009** Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 207–221p.

**Turgeon R.- 2010** The puzzle of phloem pressure. *Plant Physiol.* 154: 578–581p.

**Tuteja N.-2007** Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* 428 : 419-438p.

## U

**Uddin N- 2012** Effect of salinity in the first phase of salt stress on leaf cell-wall components of maize with special reference to cell-wall extensibility. Doct. Faculty Agricult. Sci. Nutr. Sci. Environ. Management, Justus Liebig Univ. Giessen, Germany.

**Uddin MK., Juraimi AS., Ismail MR., Hossain MA., Othman R., Rahim AA.- 2012** Physiological and growth responses of six turfgrass species relative to salinity tolerance. *The Sci. World J.* : 905468.

**Unesco water Portal (2007)-** <http://www.unesco.org/water>

## V

**Van Bel AJE., Gamalei YV.- 1991** Multiprogrammed phloem loading. In: Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation, , Bonnemain, J.-L., Delrot, S., Lucas, W.J., Dainty, J., eds. Quest Editions.128–139p. Nantes France.

**Van Bel AJE.- 1993** Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:253–281.

**Van Bel AJE.- 2003** The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ.* 26: 125–149p.

**Van Hees AFM.-1997** Growth and morphology of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings in relation to shading and drought. *Ann .Sci. For.* 54: 9-18p.

**Vanzin GF., Madson M., Carpita NC., Raikhel NV., Keegstra K., Reiter WD.- 2002**The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 3340–334599p.

**Vaughn KC., Talbot MJ., Offler CE., McCurdy DW.- 2007** Wall ingrowths in epidermal transfer cells of *Vicia faba* cotyledons are modified primary walls marked by localized accumulations of arabinogalactan proteins. *Plant Cell Physiol.* 48: 159–168p.

**Velasquez SM., Ricardi MM., Gloazzo Dorosz J., Fernandez PV., Nadra AD., Pol-Fachin L., Egelund J., Gille S., Ciancia M., Verli H., Pauly M., Bacic A., Erik Olsen C., Ulvskov P., Larsen Petersen B., Somerville C., Iusem ND., Estevez JM.- 2011** O-glycosylated cell wall extensins are essential in root hair growth. *Science* 33: 1401–1403p.

**Vera-Estrella R., Barkla BJ., García-Ramírez L., Pantoja O.- 2005** Salt Stress in *Thellungiella halophila* activates Na<sup>+</sup> transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 139: 1507-1517p.

**Vernon DM., Bohnert HJ.- 1992** Increased expression of a *myo*-inositol methyltransferase in *Mesembryanthemum crystallinum* is part of stress response distinct from Crassulacean acid metabolism induction. *Plant Physiol.* 99: 1695–1698p.

**Vicente G., Martinez M., Aracil J.- 2004** Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.* 92: 297-305p.

**Vincken JP., York WS, Beldman G., Voragen AGJ.- 1997** Two general branching patterns of xyloglucan, XXXYG and XXYGG. *Plant Physiol.* 114: 9–13.

**Vincken JP., Schols HA., Oomen RJ., McCann MC., Ulvskov P., Voragen AGJ., Visser RGF.- 2003** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132:1781-1789p.

**Vicre M., Lerouxel O., Farrant J., Lerouge P., Driouich A.- 2004** Composition and desiccation-induced alterations in the cell wall of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiol. Plant.* 120: 229–239p.

**Voitsekhovskaja OV., Koroleva OA., Batashev DR., Tomos AD., Gamalei YV., Heldt H-W., Lohaus G.- 2006** Phloem loading models of two Scrophulariaceae species with either

extensive or moderate symplastic continuity between mesophyll and phloem. *Plant Physiol.* 140:383–395p.

**Von Caemmerer S., Farquhar GD.- 1981** Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153: 376-387p.

## W

**Wanek W., Richter A.- 1997** Biosynthesis and accumulation of D-ononitol in *Vigna umbellata* in response to drought stress. *Physiol. Plant.* 101: 416–424p.

**Wang J., Zuo K., Wu W., Song J., Sun X., Lin J., Li X., Tang K.- 2003** Molecular cloning and characterization of a new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Brassica napus*. *DNA Seq.* 14:351p.

**Wang X., Yang P., Gao Q., Liu X., Kuang T., Shen S., He Y.-2008** Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta* 228: 167–177p.

**Wang Y., Zeng X., Iyer NJ., Bryant DW., Mockler TC., Mahalingam R.- 2012** Exploring the switchgrass transcriptome using second-generation sequencing technology. *PLoS ONE* 7:e34225.10.1371/journal.pone.0034225

**Weinberg RW., Lerner HR., Poljakoff-Mayber A.- 1984** Changes in growth and water-soluble solute concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium salts. *Physiol. Plant.* 62 :472-480p.

**Whyte RO., Leissner N., Trumble HC.-1953** Legumes in Agriculture. FAO, Rome.

**Widmann C., Gibson S., Jarpe MB., Johnson GL.- 1999** Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79: 143–180p.

**Williams, M.A.K., Buffet GMC., Foster TJ., Norton IT.- 2001** Simulation of endo-PG digest patterns and implications for the determination of pectin fine structure. *Carbohydr. Res.* 334: 243–250p.

**Willats WGT., Marcus SE., Knox JP.- 1998** Generation of a monoclonal antibody specific to (135)-a-l-arabinan. *Carbohydr. Res.* 308:149–152p.

**Willats WGT., McCartney L., Mackie W., Knox JP.- 2001** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47: 9–27p.

**Wingler A., Fritzius T., Wiemken A., Boller T., Aeschbacher RA.- 2000** Trehalose induced the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124:105–114p.

**Winicov I.- 1998** New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Ann. Bot.* 82: 703–710p.

**Winter E.- 1982** Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. III: effects of salt on ultrastructure of phloem and xylem transfer cells in petioles and leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 239–250p.

**Wolf O., R Munns ML., Tonnet, Jeschke WD.- 1991** The role of the stem in the partitioning of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salt-treated barley. *J. Exp. Bot.* 42: 697-704p.

**Wodzicki TJ.- 1971** Mechanism of xylem differentiation in *Pinus silvestris* L. *J. Exp. Bot.* 22 : 670–687p.

**Wood KV., Stringham KJ., Smith DL., Volenec JJ., Hendershot KL., Jackson KA., Rich PJ., Yang WJ., Rhodes A.- 1991** Betaines of alfalfa. *Plant Physiol.* 96: 829-897p.

**Wu Y., Sharp RE., Durachko DM., Cosgrove DJ.- 1996** Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* 111: 765–772p.

**Wu Y., Cosgrove DJ.-2000** Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J. Exp. Bot.* 51: 1543-1553p.

**Wu CA., Yang GD., Meng QW., Zheng CC.- 2004** The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol.* 45: 600–607p.

**Wu C., Gao X.- 2009** Molecular cloning and functional analysis of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene ThNHX1 from a halophytic plant *Thellungiella halophila*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27(1): 1-12p.

**Wydra K., Beri H.-2006** Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *R. solanacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68:41-50p.

**Wyn Jones RG., Gorham J., McDonnell E.-1984** Organic and inorganic solute contents as selection criteria for salt tolerance in the Triticeae. In : Salinity tolerance in plants: strategies of crop improvement, 189–203p. Staples RC., Toenniessen GH., eds. Wiley, New York.

**Wyn Jones., RG., Storey R.- 1981** Betain. In : The physiology and biochemistry of drought resistance in plants, 172-204p. Paleg LG., Aspinall D. eds. Academic Press, Sydney, Toronto, San Francisco.

## X

**Xia T., Apse MP., Aharon GS., Blumwald E.- 2002** Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiol. Plant.* 116: 206–212p.

**Xiong Y., Fei S-z., Arora R., Brummer EC., Barker RE., Jung G., Warnke SE.- 2007** Identification of quantitative trait loci controlling winter hardiness in an annual × perennial ryegrass interspecific hybrid population. *Mol. Breed.* 19 : 125–136p.

## Y

**Yamada T., Takatsu Y., Manabe T., Kasumi M., Marubashi W.- 2003** Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of *Gladiolus*. *Plant Sci.* 164: 213–221p.

**Yamada T., Watanabe S., Arai M., Harada K., Kitamura K. -2010.** Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in Soybean. *Plant Biotechnol.* 27: 217-220p.

**Yamaguchi T., Blumwald E.- 2005** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 10, 12: 615–620p.

**Yana K., Albert B., Aroldo C., Noemi TZ., Aaron F., Simon B.- 2013** Growth platform-dependent and -independent phenotypic and metabolic responses of *Arabidopsis* and its halophytic relative *Eutrema salsgineum* to salt stress. *Plant Physiol.* 162: 1583–1598p.

**Yang Q., Wu M., Wang P., Kang J., Zhou X.- 2005** Cloning and expression analysis of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from alfalfa. *DNA Seq* 16: 352–357p.

**Yariv J., Rapport MM., Graf.-1962** The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem. J.* 85: 383–388p.

**Yariv J., Lis H., Katchalski E.- 1967** Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem. J.* 105: 1c–2c.

**Yasar F., Uzal O., Tufenkci S., Yildiz K.- 2006** Ion accumulation in different organs of green bean genotypes grown under salt stress. *Plant Soil Environ.* 52: 476-480p.

**Yin Y-G., Kobayashi Y., Sanuki A., Kondo S., Fukuda N., Ezura H., Sugaya S., Matsukura C.- 2010** Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. ‘Micro-Tom’) fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *J. Exp. Bot.* 61: 563–574p.

**Yokoi S., Quintero FJ., Cubero B., Ruiz MT., Bressan RA., Hasegawa PM., Pardo JM.- 2002** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529–539p.

**Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W.- 2010** Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 188.762–773p.

## Z

**Zablacki, E., Huang J., Müller B., Darvill AG., Albersheim P.- 1995** Characterization of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.* 107: 1129–1138p.

**Zeid IM.- 2009** Trehalose as osmoprotectant for maize under salinity-induced stress. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5: 613-622p.

**Zentella R., Zhang ZL., Park M., Thomas SG., Endo A., Murase K., Fleet CM., Jikumaru Y., Nambara E., Kamiya Y., Sun, TP.- 2007** Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellins signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3037–3057p.

**Zhang HX, Blumwald E.- 2001** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19: 765–768p.

**Zhang L., Tian LH., Zhao JF., Song Y., Zhang CJ., Guo Y.- 2009** Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiol.* 149: 916–928p.

**Zhan D., Janssen P., Mort AJ.- 1998** Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of *Citrus pectin*. *Carbohydr. Res.* 308: 373–80p.

**Zhong H. Lauchli A.- 1993** Spatial and temporal aspects of growth in the primary root of cotton seedlings: Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub>. *J. Exp. Bot.* 44: 763–771p.

**Zhu JK., Liu J., Xiong L.- 1998** Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*: evidence of a critical role for potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181–1192p.

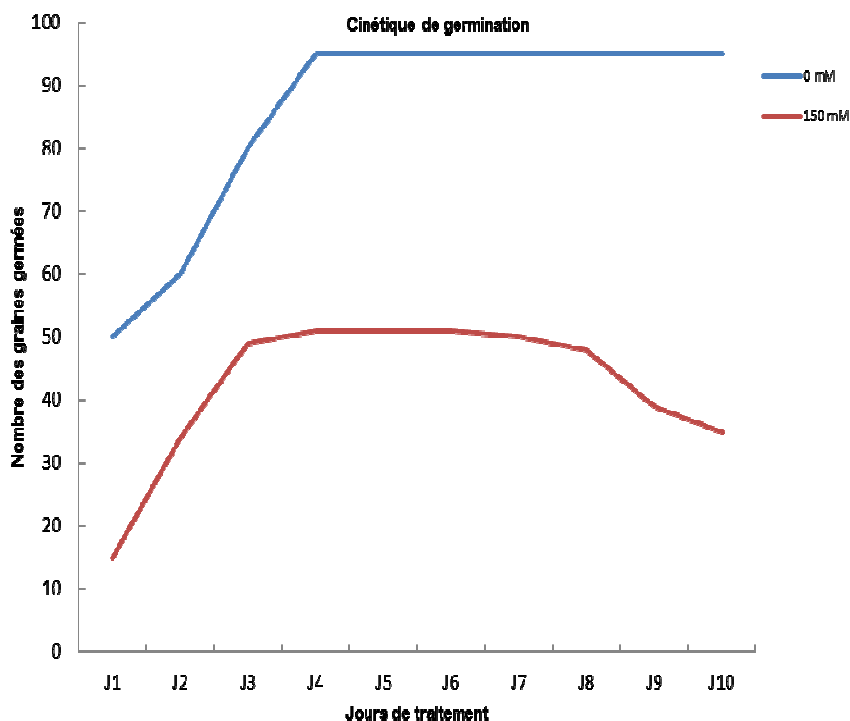
**Zhu GY., Kinet JM., Lutts S.- 2001** Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behaviour during vegetative growth. *Euphytica.* 121: 251–263p.

**Zid E., Grignon C.- 1991** Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes au stress. Cas des stress salins et hydriques. In: L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. 91–108 p. AUPELF-UREF. *John Libbey* ed. Eurotext. Paris..

**Zimmermann M H., Ziegler H.- 1975** List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In : Encyclopedia of Plant Physiology, Transport in Plants 1, Phloem Transport, Vol. 1. 480–503p. Zimmermann MH, Milburn JA., eds. Berlin: Springer.

**Zykwinska A., Thibault J-F., Ralet M-C.- 2007.** Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *J. Exp. Bot.* 58: 1795–1802p.





**Annexe 1 :** Effet du stress salin sur la cinétique de la germination de *Medicago sativa* cv Gabès.

**Annexe2 :** Effets du stress salin sur la teneur en eau des feuilles jeunes (**FJ**) et âgées (**FA**) de *M. sativa* cv Gabès.

	MF des feuilles (Mg)	MS des feuilles (Mg)	Teneur en eau
JT	43,61	9,28	3,68
JS	32,39	5,43	7,89
AT	32,35	5,57	4,77
AS	36,12	4,46	11,37

**Annexe 3 :** Effets du stress salin sur le potentiel hydrique des feuilles jeunes (**FJ**) et âgées (**FA**) de *M. sativa* cv Gabès.

	Potentiel hydrique	
	T	S
J	3.71 ± 0.31	17.59 ± 0.57
A	4.71 ± 0.51	22.91 ± 4.08



