



HAL
open science

Caractérisations biochimique et microscopique du piège extracellulaire de racine et des exsudats racinaires de trois essences ligneuses sahéliennes : balanites aegyptiaca D., Acacia tortilis subsp. raddiana S., et tamarindus indica L

Alexis Carreras

► **To cite this version:**

Alexis Carreras. Caractérisations biochimique et microscopique du piège extracellulaire de racine et des exsudats racinaires de trois essences ligneuses sahéliennes : balanites aegyptiaca D., Acacia tortilis subsp. raddiana S., et tamarindus indica L. Biologie végétale. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR017 . tel-02882909

HAL Id: tel-02882909

<https://theses.hal.science/tel-02882909>

Submitted on 28 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Caractérisation biochimique et microscopique du piège extracellulaire de racine et des exsudats racinaires de trois essences ligneuses sahéliennes : *Balanites aegyptiaca* D. , *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* S. et *Tamarindus indica* L.

Présentée et soutenue par
Alexis CARRERAS

Thèse soutenue publiquement le 28 mars 2018
devant le jury composé de

M. Christophe Clément	PR, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne (URVVC EA 4707), Université de Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
M. Olivier Van Wuytswinkel	PR, Laboratoire de Biologie des Plantes et Innovation (BIOPI EA 3900) Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur
M. Arnaud Lehner	MCU, HDR Laboratoire de Glycobiologie et Matrice extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358) Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme Anne-Barbara Pawlak	MCU, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358) Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme Deborah Goffner	Directrice de recherche CNRS, l'Unité Mixte Internationale 3189 Environnement Santé Sociétés UMI 3189 ESS Aix-Marseille Université	Codirecteur de thèse
Mme Marie-Laure Follet-Gueye	MCU, HDR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358) Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme Sophie Bernard	IE, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358) Université de Rouen Normandie	Membre invité

Thèse dirigée par Mme Marie-Laure Follet-Gueye et Mme Deborah Goffner, Laboratoire Glyco-MEV EA4358 et UMI 3189 ESS



Remerciements

Je souhaite dans un premier temps adresser tous mes remerciements aux rapporteurs, M. Olivier Van Wuytswinkel, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne et M. Christophe Clément, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je tiens également à remercier les examinateurs, Mme Anne-Barbara Pawlak, maître de conférences à l'Université de Rouen et M. Arnaud Lehner, maître de conférences HDR à l'Université de Rouen pour l'évaluation de mes travaux de recherche lors de ma soutenance de thèse.

J'ai effectué mes travaux de recherche à l'Université de Rouen au sein du laboratoire de recherche de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétales (GlycoMEV, EA 4358), ainsi que sur la Plateforme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie (PRIMACEN), de l'Université de Rouen. Je tiens à remercier les professeurs Patrice Lerouge et Azeddine Driouich, co-fondateur et co-directeur ; de m'avoir accueilli au sein du laboratoire GlycoMEV pour effectuer mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier le LabEx DRIIHM (Dispositif de Recherche Interdisciplinaire sur les Interactions Hommes-Milieus), ainsi que la structure Fédérative de Recherche Normandie Végétale (NORVEGE) d'avoir financé mes travaux de recherche. Je veux aussi exprimer ma reconnaissance à l'Université de Rouen qui m'a accordé un poste d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER), me permettant d'acquérir une première expérience dans l'enseignement.

Je souhaiterais adresser ma reconnaissance auprès de mes encadrantes de thèse, Mme Marie-Laure Follet-Gueye, maître de conférences HDR à l'Université de Rouen et Mme Deborah Goffner, directrice de recherche CNRS, pour leur gentillesse, leur patience, leur soutien et leurs corrections durant ce beau projet avec ces plantes si particulières, et si loin d'*A. thaliana*.

Je remercie également Mme Geneviève Grundmann, maître de conférences à l'Université Claude Bernard (Lyon) et Mme Claire Prigent-Combaret, chargée de recherche CNRS, ainsi qu'à l'équipe Rhizosphère de l'UMR CNRS 5557, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire pour appréhender et récupérer *Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescens*.

Je remercie Mme Valerie Mesnage maître de conférences à l'Université de Rouen et membre du laboratoire Morphodynamique Continentale et Côtière (M2C) UMR6143, pour

toute la partie sur la mise en place du mésocosme. Je te remercie pour ton aide et le temps que tu m'as accordé.

Je remercie également Mlle Justine Gevrey pour sa participation lors de son stage de L3 à la mise en place du mésocosme, ainsi que pour toutes les analyses et résultats associés à la partie physicochimique du mésocosme.

Je remercie chaleureusement Corinne Loutelier, de m'avoir accordé de son temps, d'avoir pu passer mes échantillons en GC-MS, et de m'avoir formé et aidé à analyser les spectres de PMAA.

Je remercie Sylvaine Buquet, membre du laboratoire LMSM, de m'avoir tant aidé durant mes expériences sur *A. brasilense*. D'avoir pris de ton temps pour te poser des questions et te demander des conseils. Mille mercis de m'avoir autoclavé et coulé tant de boîtes de LB.

Merci beaucoup Mathilde C. d'avoir été présente lors de mes manipes de microbio au labo LMSM. D'avoir partagé ton bureau avec moi, de m'avoir aidé, conseillé, d'être venue lancer mes cultures d'*A. brasilense* un dimanche et j'en passe. Ton aide a été précieuse et je te suis très reconnaissant, merci beaucoup Mathilde ;)

J'aimerais continuer ces remerciements avec un très grand merci à tous les membres du laboratoire GlycoMEV, d'avoir accueilli un petit Rémois dans votre grande famille de GlycoMEVistes au sein de votre verdoyante Normandie.

Merci Carole B. notre Maman du laboratoire avec qui on peut partager et échanger si facilement. Merci Carole de tes disponibilités, de tes conseils et discussions sur les protéines, les slotblots, les activités peroxydases etc....

Merci Muriel, tu as toujours été là pour répondre à mes questions, merci pour tes conseils ainsi que pour nos discussions sur la spectrométrie de masse et nos sessions MALDI ToF.

Merci Alain pour tes connaissances aussi bien théoriques que pratiques et ton aide précieuse sur les PME, PMEi et PG.

Merci Gaëlle, pour ta joie de vivre et ta positive attitude qui sont un réel plus dans le laboratoire. Merci d'avoir pu participer à mon projet de thèse avec de très beaux immuno sur coupes ;)

Merci Gérald, merci pour ton efficacité sur la gestion des ressources et des commandes, ainsi que nos discussions.

Merci Estelle, notre fée du logis au grand cœur. Grâce à toi, nous avons tous pu travailler dans des labos et des bureaux propres.

Merci Elodie pour nos discussions et ton aide autour de la biologie moléculaire. J'aurais aimé travailler davantage avec toi ;)

Merci Isa, j'aurais beaucoup aimé te connaître bien plus tôt. Merci pour tout ! Tu es géniale ! J'ai adoré discuter avec toi ;) Merci pour nos longues discussions sur les statistiques, la bio-informatique le RNAseq etc... Merci de ton implication concrète dans le chimiotactisme, mais aussi dans la relecture et correction de mon intro de thèse. Merci pour tout ;)

Merci sincèrement Bruno d'avoir partagé ton temps avec moi. Merci pour nos longues discussions sur tant de sujets, nos fous rires et moments qu'on a partagés à regarder si la GC-FID fonctionnait correctement. Merci aussi de m'avoir permis de consulter ta petite bibliothèque si pratique pour les amoureux de la biochimie que nous sommes et de m'avoir permis d'y emprunter quelques-uns de tes précieux ouvrages.

Merci beaucoup Sophie B., il m'est indicible de pouvoir exprimer pleinement toute ma reconnaissance, gratitude, remerciement, pour ton implication dans mon sujet de thèse. Merci pour tout le temps que tu as consacré à la correction de mon manuscrit de thèse avec Marie-Laure et Deborah. Merci pour tous les conseils, astuces aussi bien scientifiques, que sociaux. Tu es un réel pilier pour le laboratoire et je n'ose imaginer comment nous doctorants, nous ferions si tu n'étais pas là. Merci Sophie <(_)>

Merci à tous les anciens stagiaires dont certains ont repris la relève de doctorant du labo GlycoMEV. Merci à tous anciens et présents doctorants et post-doctorats de GlycoMEV : François, Abdoul, Maxime, Barbie, Ferdousse, Romain, Angèle, Marcus, Aline ; Marie D., Marie C., Imane, Magda, Coralie, Pierre-louis, Jeremy et Rodolphe pour tous les bon moments passés ensembles au labo ou à l'extérieur du labo : Hey, on se fait un petit Colbert ?

Un spécial merci à la *Dream team* du Ski : Rimounette, Clémentine, Joulie et Youyou pour ce moment inoubliable de pur bonheur, ainsi que d'effrayantes parties de Zombicides !!!

J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous tous dans cette très bonne ambiance familiale qu'a le GlycoMEV malgré les différentes thématiques. Je souhaite retrouver cette ambiance là où le vent m'emportera. Vraiment un très grand merci à vous tous, pour vos

échanges et conseils. Vous qui êtes membres de cette chaleureuse et grande Famille qu'est le laboratoire GlycoMEV. Vous m'avez tant appris sur le plan humain que scientifique. Je vous serais éternellement reconnaissant :

<(_)> どうもありがとうございました。<(_)>

J'aimerais remercier tous mes amis qui ont été là avant et/ou pendant ma thèse pour leur soutien et leur écoute lors de moments heureux, mais aussi stressants (≡ 益 〇) voir énervants (▲_▲), que nous fait subir la thèse. Merci à toi, Clémentine mon amie d'enfance. Merci à toi, Laurie toujours aussi proche depuis le BTS. Merci à toi, Benjamin, mon meilleur ami depuis notre L3. Mais aussi Guillaume un super ami de coloc, toujours là pour rendre service. Merci à toi Margaux, j'ai été plus que ravi d'avoir fait ta rencontre lors des évènements OHMs, nous étions liés par l'OHMi Téssekéré et maintenant je l'espère, par une grande amitié.

Ma petite voisine Normande, alias Mami Yougo qui a été une véritable grand-mère pour moi lors de ma thèse à Rouen. Tu as toujours été là pour moi, avec tes bons petits plats, nos joyeuses dégustations de bons vins, nos longues discussions avec tes sages conseils. Je te fais de gros bisous ma mamie Yougo !

J'aimerais maintenant remercier une personne qui m'est très chère et unique à mes yeux. Cette personne, c'est toi mon amour (●♥∀♥), ma petite plume, que j'aime tant. Tu es la meilleure chose qui me soit arrivée. Dès la première semaine de ton stage de M2 à GlycoMEV, le courant a très vite passé entre nous. Je me rappelle nos premiers Mugcakes qu'on faisait à la salle de pause, tout en sirotant du bon thé. Je suis tellement heureux qu'on se soit rencontré et qu'on soit ensemble maintenant. Merci d'avoir arrondi et assoupli ma façon de voir les choses et ma façon de vivre. Merci d'avoir été toujours présente, même quand tu étais fatiguée et pas très motivée. Merci d'avoir été là pour m'aider à semer, à repiquer et à récolter le RET et les exsudats racinaires de plus de 680 plantules (Oui, on aime le travail à la chaîne). Merci d'avoir préparé et rapporté au labo de petits べんと lors de mes cinétiques bactériennes. Merci pour tes câlins réconfortants, tes conseils, tes encouragements, pendant cette épreuve qu'est la fin de thèse avec sa période stressante (つ____<。) et très fatigante (´へ` ;) de rédaction. Merci d'avoir lu et relu mon manuscrit, mais surtout un grand merci pour ta relecture de la partie III de l'introduction, tu sais cette partie avec notre cher et tendre WOX5 et tous ses amis au pays du RAM et du Centre Quiescent /˘x_< \ même si tu étais malade (̄ ̄ *). Merci de t'être occupée de moi pendant que mon état physio était « *compliqué* » avec mon système

immunitaire très Eco⁺. Ne t'inquiète pas, je serai là aussi pour toi. Je lirai ta thèse avec la plus grande attention (* ^ ∇°)_Б

Petit remerciement au Chat de Gwen, alias Loki ou Globinou ou Pixel. Tu as été un bon petit chauffage ronronnant pour mes petites cuisses ainsi qu'une agréable compagnie lors ma rédaction.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille, dont mes grands-parents : Vôvô et Vóvó qui me manquent énormément, j'ai hâte de pouvoir venir te voir Vôvô. Merci, à mes frères Cyril et Denis et ma sœur Sophie. Je vais profiter de ces quelques lignes pour vous exprimer une chose qu'on ne se dit pas assez souvent et cela est bien dommage : je vous aime fort, et je suis très fier de vous avoir comme frères et sœur. Alors certes, il y a des hauts et des bas dans nos relations avec nos caractères si bien trempés, mais on fait du mieux qu'on peut et cela n'empêche qu'on soit une famille (^_^).

Enfin, j'aimerais exprimer mes derniers remerciements à mes parents. Vous m'avez toujours soutenu et encouragé dans mes choix mais aussi tout au long de mes études. À vous aussi je ne peux qu'être éternellement reconnaissant. Vous de m'avoir offert l'opportunité immense de pouvoir étudier sans jamais me préoccuper du financement lié aux études supérieures. C'est une immense chance ! J'ai vu tant d'étudiants devoir travailler en dehors des cours pour pouvoir payer leur loyer, leurs nourritures et leurs études, pendant que je pouvais vivre pleinement ma vie étudiante tranquillement. Pour ce confort, je vous dis un très grand merci.

Les dernières lignes que j'aurais écrites dans ce manuscrit :

やったね！ \ (★^∇^★) /

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	1
I-La rhizosphère.....	1
I-1 Généralités.....	1
I-2 Les microorganismes du sol.....	2
I-3 Les <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>	4
I-4 <i>Azospirillum brasilense</i>	6
II-Le système racinaire	7
II-1 Principales fonctions	7
II-2 Plasticité du système racinaire	7
III-Structure et morphologie d'une racine en croissance.....	9
III-1 Les différents territoires fonctionnels d'une racine en croissance	9
III-2 Le méristème subapical de racine ou <i>Root Apical Meristem</i> (RAM).....	11
III-2-1 Les différents types de RAM.....	11
III-2-2 Présentation du RAM fermé d' <i>A. thaliana</i>	13
III-3 La coiffe racinaire.....	17
III-3-1 Les cellules de la columelle et cellules latérales de coiffe	17
III-3-2 Les cellules frontières	18
III-3-3 Des initiales de coiffe aux cellules frontières : contrôle génétique et hormonal chez <i>A. thaliana</i>	22
IV-Le piège extracellulaire de racine ou <i>root extracellular trap</i> (RET)	36
IV-1 Les exsudats racinaires et le mucilage	36
IV-2 Les structures des principaux polymères pariétaux.....	39
IV-2-1 Les principaux polymères des parois primaires des plantes Angiospermes Eudicotylédones	39
IV-2-2 Les structures des arabinogalactanes protéines (AGPs).....	42
IV-3 Les fonctions majeures du RET	44
V-Le contexte de la thèse	47
V-1 La grande muraille verte	47
V-2 Les modèles végétaux.....	48
V-2-1 <i>Balanites aegyptiaca</i>	48
V-2-2 <i>Acacia raddiana</i>	50
V-2-3 <i>Tamarindus indica</i>	52
V-2-4 Le système racinaire de <i>B. aegyptiaca</i> et <i>A. raddiana</i>	53

VI-Les objectifs de thèse	56
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	59
I-Le matériel végétal.....	59
I-1 Stérilisation des graines.....	59
I-1-1 <i>Balanites aegyptiaca</i>	59
I-1-2 <i>Acacia raddiana</i> et <i>Tamarindus indica</i>	60
I-2 Mise en culture <i>in vitro</i>	60
I-2-1 <i>Balanites aegyptiaca</i>	60
I-2-2 <i>Acacia raddiana</i>	62
I-2-3 <i>Tamarindus indica</i>	63
I-3 Récupération des différentes fractions enrichies brutes	63
I-4 Préparation des résidus insolubles à l'alcool.....	64
I-4-1 AIR apex racinaires et cellules frontières	65
I-4-2 AIR d'exsudats racinaires	66
II-Les méthodes	67
II-1 Imagerie	67
II-1-1 Imagerie photonique	67
II-1-2 Imagerie électronique.....	71
II-2 Biochimie.....	73
II-2-1 Composition monosaccharidique par GC-FID	73
II-2-2 Analyse de la nature des liaisons des polysaccharides par GC-MS.....	74
II-2-3 Analyse semi-quantitative des arabinogalactanes protéines par électrophorèse en fusée	76
II-2-4 Spectroscopie en Infra-Rouge à Transformée de Fourier.....	77
II-2-5 Détection d'activités enzymatiques au sein des exsudats racinaires	78
II-3 Microbiologie.....	80
II-3-1 Culture <i>A. brasilense</i>	81
II-3-2 Effet des exsudats racinaires sur la croissance d' <i>A. brasilense</i>	82
II-5 Analyses statistiques	83
Chapitre 3 : Résultats et discussions	85
I-Characterisation <i>in vitro</i> du RET et des exsudats racinaires.....	85
I-1 Article.....	85

I-2 Analyses microscopiques du RET.....	127
I-2-1 Mesure des longueurs des cellules frontières.....	127
I-2-1 Etude cinétique de la viabilité des CF d'acacia après leur détachement.....	128
I-3 analyses biochimiques du RET et des exsudats racinaires.....	129
I-3-1 Aspect du culot RET (CF et mucilage) et exsudats lyophilisés.....	129
I-3-2 Activités enzymatiques au sein des exsudats racinaires.....	130
I-3-3 Profils FTIR.....	135
Chapitre 4 : Conclusions et perspectives.....	137
I-La caractérisation et les fonctions potentielles du RET de plantes ligneuses sahéliennes.....	138
II-Les perspectives.....	141
Références.....	143
I-Bibliographie.....	143
II-Webographie.....	160
Annexes.....	161
Annexe 1 : Revue scientifique sur les Extensines.....	161
Annexe 2 : Étude préliminaire en mésocosme.....	194
1-Matériel et méthodes.....	194
1-1- Étude physicochimique du sol de la GMV.....	194
1-2 Mise en place d'un mésocosme.....	197
1-3 Étude des polysaccharides libérés dans le sol.....	199
2-Résultats et discussions.....	200
2-1 Etude physicochimique du sol de la GMV.....	200
2-2 Polysaccharides libérés dans le sol.....	201
3-Conclusion et perspectives.....	204
Curriculum vitae.....	206
Résumé	

Listes des figures

Figure 1 : Les différentes zones de la rhizosphère.	1
Figure 2 : Mécanismes qui contrôlent la spécificité de l'hôte dans les interactions parasites, mutualistes et coopératives.	3
Figure 3 : Différents modes d'interactions entre bactéries telluriques et les racines des végétaux : les iPGPR et ePGPR.	5
Figure 4 : Les différents territoires cellulaires d'une racine en croissance d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.	9
Figure 5 : Coupes longitudinales d'organisation de méristèmes apicaux de racines.	11
Figure 6 : Schéma des différents types cellulaires du méristème sub-apical de la racine d'<i>A. thaliana</i>.	13
Figure 7 : Ultrastructure des cellules du centre quiescent et des cellules périphériques. ..	14
Figure 8 Localisation de l'expression du gène <i>WOX5</i> dans l'apex racinaire d'<i>A. thaliana</i>.	15
Figure 9 Les différents types cellulaires de la coiffe racinaire d'une plantule d'<i>A. thaliana</i>.	17
Figure 10 Cellules bordantes ou Border Cells (BC) de racine de maïs.	19
Figure 11 : Deux types de cellules frontières	20
Figure 12 Description des gradients <i>WOX5</i> et <i>CDF4</i> dans la coiffe racinaire d'<i>A. thaliana</i>	24
Figure 13 Localisation de l'expression du gène <i>FEZ</i> dans la coiffe racinaire d'<i>A. thaliana</i>.	25
Figure 14 Principaux acteurs moléculaires régulant la différenciation des dérivées des initiales centrales de coiffe en cellules de la columelle.	26
Figure 15 Localisation et diffusion des molécules <i>CLE40</i> et <i>WOX5</i> dans la coiffe racinaire d'<i>A. thaliana</i>.	27
Figure 16 Perception du peptide <i>CLE40</i> par les complexes membranaires <i>CLV1-ACR4</i>.	28
Figure 17 Modèle schématisant le contrôle génétique de la maturation des initiales centrales de la coiffe en cellules frontières chez <i>A. thaliana</i>.	31
Figure 18 Le processus de mort cellulaire programmée au sein des cellules latérales de coiffe d'<i>A. thaliana</i>.	33
Figure 19 Visualisation du piège extracellulaire de racine ou Root extracellular trap (RET).	36
Figure 20 Structure de la paroi cellulaire primaire.	39

Figure 21 Les polysaccharides majeurs de la paroi végétale.	40
Figure 22 Structure des arabinogalactanes protéines (AGPs).	42
Figure 23 Modèle de fonctionnement du Piège Extracellulaire de Racine (PER) ou Root Extracellular Trap (RET).	44
Figure 24 Diversité des rôles possibles des AGPs dans les interactions entre les microorganismes telluriques et la racine.	45
Figure 25 Carte représentant le tracé du projet de reforestation de la grande muraille verte	47
Figure 26 <i>Balanites aegyptiaca</i> (www.teline.fr).....	48
Figure 27 <i>Acacia raddiana</i> (www.ecologie.ma)	50
Figure 28 <i>Tamarindus indica</i> (www.seedsforafrica.co.za)	52
Figure 29 Représentation du système racinaire de <i>Balanites</i> et de l' <i>Acacia</i>	54
Figure 30 Architecture racinaire en station de <i>Balanites</i> et de l' <i>Acacia</i>	55
Figure 31 Schéma de mise en culture in situ de <i>B. aegyptiaca</i>	57
Figure 32 Graine de <i>B. aegyptiaca</i> dans son noyau ouvert.....	59
Figure 33 Graine imbibée de <i>B. aegyptiaca</i>	61
Figure 34 Système de mise en culture <i>in vitro</i> (germination) des graines de <i>Balanites</i> et de Tamarin.....	61
Figure 35 Système de germination <i>in vitro</i> des graines d' <i>A. raddiana</i>	62
Figure 36 Mucilage de graine de <i>T. indica</i>	63
Figure 37 Microtube Lysing Matrix D de 2mL (mpbio.com)	65
Figure 38 Lame spécifique pour microscopie inversée (thermo scientific).....	67
Figure 39 Répartition de la taille (μm) des cellules frontières des différentes plantes ..	127
Figure 40 Cinétique de suivi de viabilité par la Calcéine-AM de cellules frontières ...	128
Figure 41 Culots lyophilisés de fractions enrichies en RET et en exsudats racinaires ..	129
Figure 42 Histogramme représentant l'activité PME dans les exsudats racinaires de <i>B. aegyptiaca</i> , d' <i>A. raddiana</i> et de <i>T. indica</i>	130
Figure 43 Histogramme représentant l'activité spécifiques de peroxydase dans les exsudats racinaires de <i>B. aegyptiaca</i> , d' <i>A. raddiana</i> et de <i>T. indica</i>	132
Figure 44 Spectres FTIR de résidus insolubles à l'alcool (AIR)	135
Figure 45 Schéma de mise en place du mésocosme de <i>B. aegyptiaca</i> dans du sol natif de la GMV	197
Figure 46 Mise en culture en phytotron de <i>B. aegyptiaca</i> en sol natif.....	198
Figure 47 Coupe du pot de culture de <i>B. aegyptiaca</i> après 5 mois.....	198
Figure 48 Lavage du sol et récupération du surnageant	199

Figure 49 Composition monosaccharidique en mol.mg⁻¹ de sol des différentes conditions d'eaux de lavage après 2 mois culture en pot	201
Figure 50 Composition monosaccharidique en mol.mg⁻¹ de sol des eaux de lavage des différentes tranches en condition hydratées après 5 mois culture en pot	203
Figure 51 Composition monosaccharidique en mol.mg⁻¹ de sol des eaux de lavage des différentes tranches en condition non hydratées après 5 mois culture en pot.....	204

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taux de reprise d'essences ligneuses 2 mois après plantation <i>in situ</i> au sein de la parcelle expérimentale de la grande muraille verte.	57
Tableau 2 : Composition des différents milieux pour le suivi de croissance d'<i>A. brasilense</i>.	82
Tableau 3 : Composition ionique du sol nu de la GMV.	201

Liste des abréviations

ABC : *ATP Binbing Cassette*

Ac : *acetyl*

ACC désaminase : 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate désaminase

ACR4 : *ARABIDOPSIS CRINKLY4*

ADNex : ADN extracellulaire

AGPs : ArabinoGalactanes Protéines

AIR : *Alcohol Insoluble Residue*

Ara : Arabinose

ARF : *AUXIN REPOSE FACTOR*

Avr : Avirulence

BC : *Border Cell* (cellule bordante)

BFN1 : *BIFUNCTIONAL NUCLEASE 1*

BLC : *Border-Like Cell* (cellule apparentée aux cellules bordantes)

BRN1 : *BEARSKIN 1*

BRN2 : *BEARSKIN 2*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

C : Cortex

CaPMEI1 : inhibiteur de PME de *Capsicum annuum*

CC : *Columella Cell*

CDF4 : *CYCLING DOF FACTOR 4*

ce : *Cytoplasmic Extension*

CF : Cellule Frontière

CLE40 : *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40*

CLE40p : *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40 peptide*

CLE5 : *CELLULASE 5*

CLV1 : *CLAVATA1*

Col : Cellules de la Columelle

COP : *Conference Of the Parties* (conférence des parties)

CQ : Centre Quiescent

CR : Coiffe Racinaire

CSC : *Columella Stem Cell*

cw : *Cell Wall* (paroi cellulaire)

CYCD3 : *Cyclin D3*

DAMPs : *Damage-Associated Molecular Patterns*

DMSO : Diméthylsulfoxyde
DOF : *DNA-binding One zinc Finger*
eD : *epidermis* (rhizoderme)
ePGPR : *extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*
ExDNA : *Extracellular DNA*
EXP : Expansine
FITC : *Fluorescein IsoThioCyanate*
FTIR : *Fourier Transformed Infra-Red*
Fuc : Fucose
G : Golgi
Gal : Galactose
GalA : *Galacturonic Acid*
GC-FID : *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*
GC-MS : *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
GFP : *Green Fluorescent Protein*
Glc : Glucose
GlcA : *Glucuronic Acid*
GMV : Grande Muraille Verte
GRP : *Glycin Rich Proteins*
GUS : β -glucuronidase
H3K4me3 : 4 triméthylée de l'histone H3
HDA19 : Histone DésAcétylase 19
HG : HomoGalacturonane
HRPG : *Hydroxyprolin Rich Glyco Proteins*
IAA17 : *Indole-3-Acetic Acid 17*
IC : Initiale Centrale
ics : *InterCellular Space*
IL : Initiale Latérale
iPGPR : *intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*
ISR : *Induced Systemic Resistance*
LB : *Lysogeny Broth*
lw : *Longitudinal cell Wall*
LRC : *Lateral Root Cap*
m : *Mitochondrion*
m : Mucilage

Man : Mannose
ml : *Medullar Lamella*
MM : Milieu Minéral
MM+CN : Milieu Minéral + Carbone et Azote
mRNA : ARN messenger
MS : Murashige et Skoog
mt : *MicroTubule*
N : *Nucleus*
NAC : *No apical meristem Arabidopsis transcription activation factor Cup-shaped cotyledon*
NET : *Neutrophil Extracellular Trap*
NLP7 : *NIN-LIKE PROTEIN7*
nu : *Nucleolus*
OHM : Observatoires Hommes-Milieus
p : *Plaste*
PASPA3 : *ASPARTIC PROTEINASE A3*
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
PBST : *Phosphate Buffered Saline Teen*
PCD : *Programmed Cell Death*
PD : *PlasmoDesma*
PG : Polygalacturonase
PGPM : *Plant Growth Promoting Microorganisms*
PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*
PL : *PECTIN LYASE*
PLT : *PLETHORA*
PM : Plasma membrane
PMAA : *Partially Methylated Alditol Acetate*
PME : Pectine Méthylestérase
PMEi : inhibiteurs de Pectines Méthylestérases
PRP : *Prolin Rich Proteins*
PRs : *Pathogenesis Related Proteins*
QC : *Quiescent Center*
QC cell : *Quiescent Center cell*
RAM : *Root Apical Meristem* (méristème subapical de racine)
RBR : *RETINOBLASTOMA-RELATED*
RC : *Root Cap* (coiffe racinaire)

rc : *Ribosome Clusters*

RCPG : *ROOT CAP POLYGALACTURONASE*

RET : *Root Extracellular Trap* (piège extracellulaire de racine)

RGI : RhamnoGalacturonanes de type 1

RGII : RhamnoGalacturonanes de type 2

Rha : Rhamnose

ROW1 : *REPRESSOR OF WUS1 1*

R protein : protéine de résistance

sa : *stain Artifact*

SCR : *SCARECROW*

SHR : *SHORTROOT*

SMB : *SOMBRERO*

TFA : *TriFluoroacetic Acid*

TPL/TPR : *TOPLESS/TOPLESS-RELATED*

tw : *Transverse Wall*

UFC : Unité Formant Colonie

v : *Vacuole*

VC : *Vascular Cylinder*

WOX5 : *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5*

WT : *Wild Type*

XTHs : Xyloglucane endoTransglucosylases/Hydrolases

Xyl : Xylose

Résumé

Le paysage subsaharien tend à évoluer, avec la hausse des températures, de faibles précipitations et une avancée du désert rendant les terres cultivables infertiles. Cet environnement est moins propice à la vie et les plantes doivent s'adapter. Le système racinaire est l'une des premières priorités que la plante doit développer afin d'assurer sa survie. La racine au sein de la rhizosphère joue donc un rôle crucial dans la croissance de la plantule en quête d'eau et de nutriments. L'apex racinaire est recouvert d'une coiffe protectrice, qui permet de maintenir l'intégrité du méristème subapical de racine. Les cellules les plus matures de la coiffe se détachent et sont nommées cellules frontières. Elles sont associées à un mucilage plus ou moins dense, et l'ensemble constitué par les cellules frontières et le mucilage est nommé piège extracellulaire de racine ou *root extracellular trap* (RET). Alors que le RET et les exsudats racinaires sont décrits comme jouant un rôle majeur dans la protection de la racine contre certains pathogènes, leur fonction lors de stress abiotiques tel qu'un stress hydrique est moins documentée.

L'objectif de ces travaux de thèse est de caractériser le RET et les exsudats racinaires de trois plantes subsahariennes issues de la Grande Muraille Verte (GMV) *Balanites aegyptiaca* (D.), *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* (S.) et *Tamarindus indica* (L.). Ces trois plantes ont des degrés de tolérance à la sécheresse différents allant respectivement de tolérant à sensible. Afin d'identifier d'éventuels marqueurs de tolérance à l'aridité au sein du RET et des exsudats racinaires, l'étude de glycomolécules a été entreprise par des approches d'imagerie et de biochimie à partir de plantules cultivées *in vitro* dans des conditions normales d'hydratation.

Les études morphologiques et ultrastructurales des cellules frontières montrent que *B. aegyptiaca* produit des cellules uniquement de type *border cells* (BCs) et restreintes à la pointe racinaire. Par contre les cellules frontières associées aux apex racinaires de plantules d'*A. raddiana* et de *T. indica*, sont de type BCs au niveau de la pointe racinaire et de type *border like cells* (BLCs) en remontant jusqu'à respectivement 6 et 3mm de l'apex. Pour les trois plantules, les cellules frontières sont vivantes et entourées d'un riche mucilage, contenant de nombreux glycopolymères d'origine pariétale. L'analyse de la composition de fractions enrichies en RET et exsudats racinaires montre la présence de pectines, d'hémicelluloses, d'extensines et d'arabinogalactanes protéines (AGPs). Le RET et les exsudats racinaires de *B. aegyptiaca*, plante qui présente le meilleur taux de survie en conditions arides, renferment les plus importantes quantités d'AGPs en comparaison des quantités détectées pour l'*A. raddiana* et le *T. indica*. Par ailleurs, des analyses microbiologiques indiquent que les exsudats racinaires des trois plantes peuvent être métabolisés par *Azospirillum brasilense*, une bactérie tellurique bénéfique pour la croissance des végétaux lors de déficit hydrique. Là encore, *B. aegyptiaca* se distingue par ses exsudats racinaires qui sont métabolisés plus rapidement par cette bactérie.

Ces données soulèvent des questionnements portant notamment sur l'implication potentielle des AGPs dans le développement de jeunes plantes en milieu semi-aride à aride.

Mots clés : arabinogalactanes protéines (AGPs), *Balanites aegyptiaca* (D.), *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* (S.), *Tamarindus indica* (L.), *root extracellular trap* (RET), exsudats racinaires, cellules frontières.

Préambule

Depuis plus de 30 ans, des scientifiques et gouvernements se réunissent lors de conventions pour discuter et prendre des mesures contre les changements climatiques. En 1992 à Rio de Janeiro, 154 pays reconnaissent l'origine anthropique du changement climatique, et ont adopté la Convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques (<https://cop23.unfccc.int/>). Cette convention-cadre leur demandait d'agir en fonction de leurs responsabilités et capacités pour stabiliser la concentration de gaz à effet de serre dans l'atmosphère (<https://cop23.unfccc.int/>). Cette hausse de concentration de gaz à effet de serre serait la cause du dérèglement climatique, en entraînant notamment : une acidification et une montée du niveau des océans, des catastrophes météorologiques accrues (tempêtes, sécheresses, etc.), une diminution de la biodiversité etc. Puis chaque année à partir de 1995 se tient la conférence des parties (COP, conference of the parties), regroupant plus de 150 pays, afin d'y faire un bilan et d'entreprendre des discussions et des actions contre le changement climatique. En 1997 à Kyoto, lors de la COP3, il a été décidé de réduire d'au moins 5% les émissions de gaz à effet de serre d'ici 2012, par rapport au niveau de 1990 (<https://cop23.unfccc.int/>).

Or, les émissions de gaz à effet de serre n'ont cessé de croître depuis la ratification du traité de Kyoto, obligeant les gouvernements à décaler la date de 2012 à 2020. En 2015, à la COP21, l'accord de Paris est officiellement ratifié par 169 pays parmi les 195 pays participants, afin de limiter la hausse de la température à 2°C d'ici 2100, en diminuant notamment la production des gaz à effet de serre et en aidant les pays en développement à financer ces nouvelles normes environnementales afin de trouver des solutions pour pouvoir s'adapter aux effets du changement climatique.

C'est aux vues de ces changements climatiques telles que : hausses des températures, inondations, sécheresses, tempêtes etc., que certains gouvernements financent et poussent la recherche à mieux comprendre comment les organismes vivants pourront s'adapter à ces futurs changements afin d'y trouver des solutions.

Dans ce manuscrit, les organismes vivants étudiés sont 3 plantes issues de la zone subsaharienne, ayant des degrés de tolérance à la sécheresse différents, en se focalisant sur la racine. En effet, lors des premiers stades de développement d'une plante, il est vital qu'elle développe son système racinaire afin d'y puiser l'eau et les nutriments nécessaires à sa survie et sa croissance. L'objectif de ce manuscrit est de déterminer l'implication potentielle de glycomolécules présentes et libérées par l'apex racinaire dans la tolérance à la sécheresse.

Le manuscrit est organisé en 4 chapitres :

Le 1^{er} chapitre est une **introduction** subdivisée en 6 parties. La rhizosphère, l'environnement proche de la racine, est tout d'abord présentée. Puis, le système racinaire avec ses fonctions et plasticités est secondairement décrit. La structure et la morphologie de la coiffe racinaire, en particulier le contrôle moléculaire de l'identité et du fonctionnement du méristème de coiffe sont alors définis. Ainsi dans cette partie de l'introduction, les mécanismes moléculaires initiés dans les cellules du centre quiescent et aboutissant au détachement des cellules frontières, sont successivement détaillés. La présentation structurale et fonctionnelle du piège extracellulaire de racine est ensuite réalisée. Enfin le contexte particulier de cette thèse, *via* son origine dans le programme de la Grande muraille Verte, ainsi que ses objectifs clôturent ce chapitre d'introduction.

Le 2^{ème} chapitre est consacré aux **matériels et méthodes**, comprenant une description du matériel biologique et des conditions expérimentales utilisées *via* des approches biochimiques, microscopiques et microbiologiques réalisées dans ce travail.

Le 3^{ème} chapitre regroupe les **résultats et la discussion** du travail réalisé dans cette thèse en 2 parties. La 1^{ère} partie présente les résultats *in vitro* majoritaires discutés sous forme d'un article scientifique avec comité de lecture international (en soumission). Cet article est suivi de résultats complémentaires. En annexe 2, quelques résultats préliminaires obtenus en cultivant les plantes étudiées sur leur sol natif sont également présentés.

Enfin, le 4^{ème} et dernier chapitre, **conclusions et perspectives**, réunit la conclusion générale de cette étude et les perspectives associées à ce projet de thèse.

Chapitre 1 : Introduction

I-La rhizosphère

I-1 Généralités

La rhizosphère, du grec *rhiza* signifiant racine et du grec ancien *sfaira* signifiant sphère, est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les microorganismes associés (Larousse 2016). En 1904, un agronome allemand et spécialiste en physiologie végétale, définit pour la première fois la notion de rhizosphère (Hartmann *et al.*, 2008). La rhizosphère est décrite comme étant un milieu complexe et hétérogène qui présente des caractéristiques très particulières par rapport à un sol non rhizosphérique. Elle est constituée de 3 zones distinctes : l'ectorhizosphère, le rhizoplane (surface racinaire) et l'endorhizosphère (Huang *et al.*, 2014) [Fig 1]. L'endorhizosphère comprend des parties du cortex et de l'endoderme de la racine, dans laquelle les microorganismes peuvent occuper l'espace libre entre les cellules ou y pénétrer. Le rhizoplane (surface racinaire) est la zone médiane directement adjacente à la racine, incluant le rhizoderme et le mucilage. La zone la plus extérieure est l'ectorhizosphère qui s'étend du rhizoplane aux quelques premiers millimètres cubes du sol.

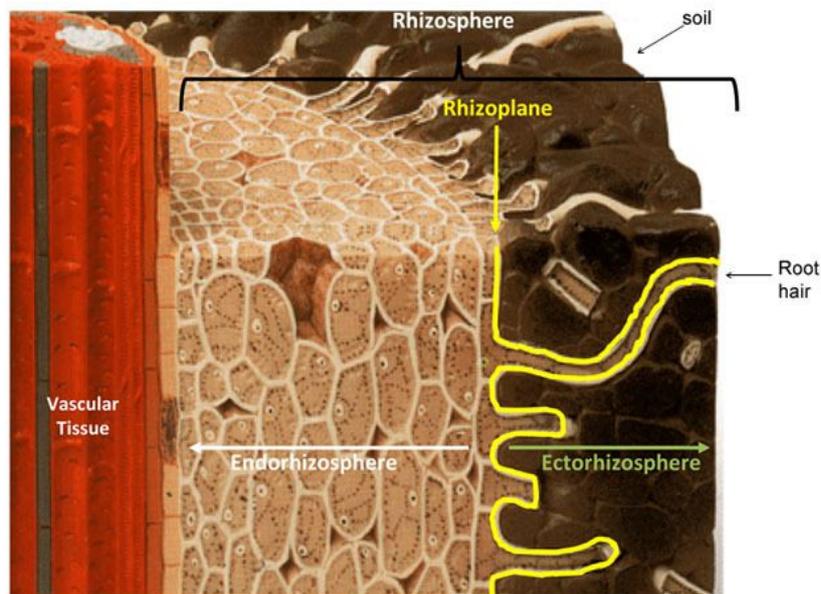


Figure 1 : Les différentes zones de la rhizosphère.

La rhizosphère comprend les quelques premiers millimètres de sol, ainsi que l'ectorhizosphère, le rhizoplane et l'endorhizosphère (Réf Web1).

Dans cet environnement, des interactions et des échanges entre les racines, les microorganismes et le sol s'opèrent (Hinsinger *et al.*, 2009). Il en résulte une modification des

propriétés physicochimiques du sol, pouvant à son tour modifier les populations microbiennes de la rhizosphère (Huang *et al.*, 2014).

La rhizosphère a une microflore dense, dont l'activité biologique est supérieure par rapport à un sol non rhizosphérique (Lynch & Whipps, 1991). La plante, *via* les exsudats racinaires, met à disposition des nutriments, notamment des sucres et des acides aminés pour ces microorganismes (Rovira, 1969; Chaboud & Rougier, 1984; Huang *et al.*, 2014; Tsunoda & van Dam, 2017). Ces nutriments favorisent le développement des microorganismes, qu'ils soient pathogènes ou bénéfiques. Des interactions complexes entre ces populations microbiennes et la plante se produisent, déterminant entre autres la santé du sol. Ces différentes interactions entre plantes, bactéries et champignons du sol ont été largement décrites (Grayston & Campbell, 1996; Hartmann *et al.*, 2008; Hinsinger *et al.*, 2009; Reece *et al.*, 2014) et peuvent être bénéfiques ou délétères pour la plante.

I-2 Les microorganismes du sol

Au sein de la rhizosphère vivent des populations particulièrement importantes de microorganismes. Les types et nombre de microorganismes que le sol héberge sont très divers. L'activité des microorganismes dans la rhizosphère d'une plante peut être jusqu'à 100 fois plus élevée que dans un sol nu (Reece *et al.*, 2014). Ces microorganismes utilisent les glucides, les acides aminés et diverses molécules organiques que la plante sécrète *via* ses racines. C'est dans cet environnement privilégié que des interactions peuvent naître entre la plante et les microorganismes telluriques. Ces multiples interactions entre les plantes et les microorganismes influent également la composition de la microflore rhizosphérique. En effet, chaque rhizosphère contient un cocktail unique et complexe de sécrétions issues de la racine, mais aussi de la microflore. À ce jour, 3 grands types d'interactions [Fig 2] entre les microorganismes et les plantes sont décrits : le **parasitisme**, le **mutualisme** et la **coopération** (Droge *et al.*, 2012).

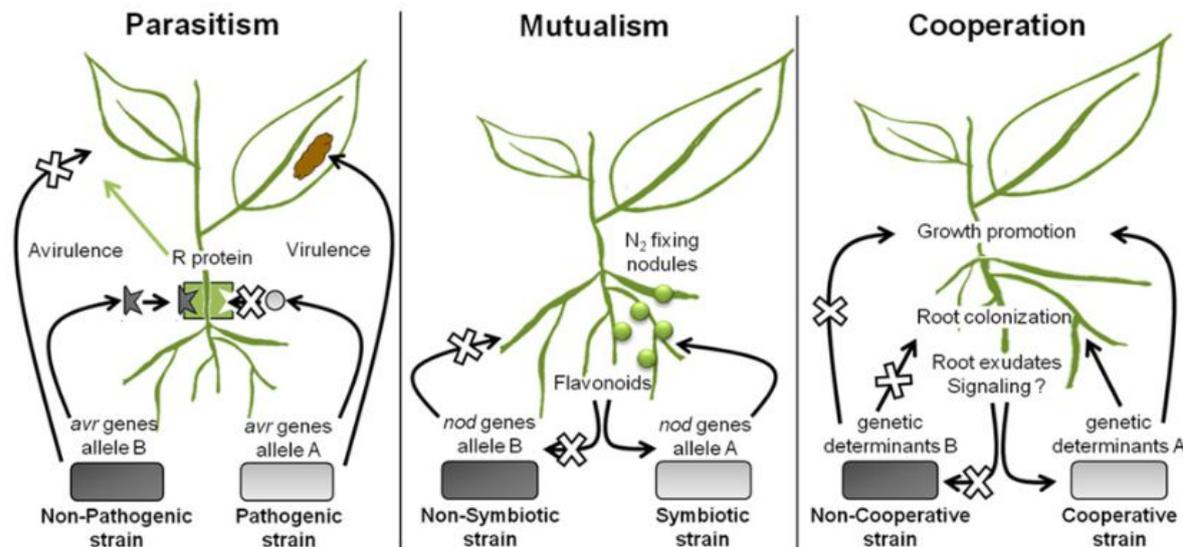


Figure 2 : Mécanismes qui contrôlent la spécificité de l'hôte dans les interactions parasites, mutualistes et coopératives.

Dans le cas du parasitisme, la plante hôte reconnaît les facteurs d'avirulence d'origine microbienne *via* des protéines de défense spécifiques, (*Resistant protein*, R protein). Concernant le mutualisme, ici est présenté un exemple d'interaction entre une légumineuse et une bactérie fixatrice d'azote. La plante libère des flavonoïdes dans la rhizosphère, activant les facteurs Nod bactériens, ces derniers interagissent avec la plante où ils induisent la formation de nodosités (cercles verts). Pour la coopération, des interactions entre la plante et des bactéries bénéfiques de type *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) sont impliquées (d'après Drogue *et al.*, 2012).

Le parasitisme est une relation dans laquelle l'un des organismes, le parasite, se nourrit et vit aux dépens de son hôte et lui porte préjudice. Dans la rhizosphère, les microorganismes ont un choix d'hôtes qui est contrôlé par le concept du « gène pour gène ». Cela implique la reconnaissance du microorganisme par la plante, à travers des protéines de résistance (*R protein*), et des facteurs d'avirulence (*Avr*) émis par l'agent pathogène (Drogue *et al.*, 2012; Skamnioti & Ridout, 2005). Si la plante n'a pas la protéine de résistance, le pathogène peut parasiter cette dernière.

Parmi les agents microbiens bénéfiques, les champignons mycorhiziens [Fig 2] et les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote [Fig 2] sont appelés agents mutualistes. Ces dernières sont parfois classées parmi les iPGPR (*intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Gray & Smith, 2005; Vejan *et al.*, 2016). Les interactions de type coopération [Fig 2] impliquent d'autres types de microorganismes bénéfiques pour la croissance des plantes (*Plant Growth Promoting Microorganisms*, PGPM) constitués essentiellement de bactéries (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR) aussi classées parmi les ePGPR (*extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).

I-3 Les *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Comme évoqué précédemment, sont parfois distingués deux groupes de PGPR : les bactéries intracellulaires (iPGPR) et les bactéries libres extracellulaires (ePGPR) (Gray & Smith, 2005). Les iPGPR sont généralement des bactéries symbiotiques qui interagissent avec un nombre restreint de plantes hôtes, dont les mécanismes de signalisation ont été largement étudiés (Hopkins & Hüner, 2008; Reece *et al.*, 2014). Ces bactéries sont définies comme *intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (iPGPR), car elles s'introduisent dans la racine *via* les poils absorbants, puis pénètrent les cellules du cortex racinaire et forment des nodules. Elles favorisent la croissance de la plante, en fournissant à cette dernière une source d'azote biodisponible en échange de sources de carbone et autres substances organiques (Gray & Smith, 2005; Reece *et al.*, 2014). Un des exemples de relation symbiotique bien décrit dans la littérature est celui entre les légumineuses (soja) et les bactéries du genre *Rhizobium* (Swinburne, 1986; Glick, 1995; Gray & Smith, 2005). Cette relation est définie au niveau moléculaire et repose essentiellement sur des événements de signalisation qui se déroulent entre les bactéries et la plante hôte. Dans un 1^{er} temps, les microorganismes perçoivent des composés végétaux (flavonoïdes) qui déclenchent la synthèse des facteurs Nod bactériens. Dans un 2^{ème} temps, la perception des facteurs Nod par des récepteurs spécifiques de la plante ayant des activités kinases, conduit à la différenciation des cellules situées dans le cortex de la plante, et enfin à la formation de nodules (Grayston & Campbell, 1996; Gray & Smith, 2005; Masson-Boivin *et al.*, 2009; Drogue *et al.*, 2012; Reece *et al.*, 2014).

La coopération, ou symbiose associative, peut également être établie entre les racines des plantes et des bactéries (Vessey, 2003). Dans ce cas, il n'y a pas de pénétration des bactéries dans les cellules du cortex racinaire, elles restent au niveau du rhizoplane. [Fig 3]. Ces bactéries sont donc définies comme *extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (ePGPR) et ne produisent pas de nodules. Les ePGPR se répartissent en trois types, en fonction du degré d'association avec les racines: i) celles qui vivent à proximité, mais pas en contact direct avec les racines ; ii) celles qui colonisent la surface de la racine (rhizoplane) ; et enfin, iii) celles qui vivent dans l'espace intercellulaire des cellules du cortex racinaire [Fig 3] (Gray & Smith, 2005). Parmi les ePGPR, on retrouve les genres *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas* et *Azospirillum*.

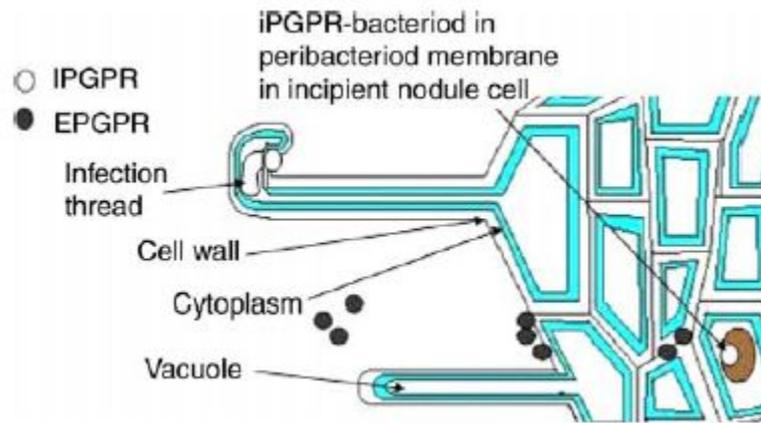


Figure 3 : Différents modes d'interactions entre bactéries telluriques et les racines des végétaux : les iPGPR et ePGPR.

Les iPGPR rentrent dans la racine *via* les poils absorbants, puis elles fusionnent avec une cellule végétale pour former la symbiose et des nodules. Alors que les ePGPR peuvent interagir soit près de la racine mais pas en contact avec le végétal, soit coloniser la surface racinaire, ou bien vivre dans les espaces entre les cellules du cortex racinaire (d'après Gray & Smith, 2005).

Cell wall : paroi cellulaire ; *ePGPR* : *extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ; *infection thread* : fil d'infection ; *iPGPR* : *intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria*.

Au vu de leurs nombreuses applications, notamment agronomiques, les bactéries extracellulaires de la rhizosphère font l'objet de nombreuses études depuis une dizaine d'années (Glick, 1995; Gouda *et al.*, 2018). Elles régulent la croissance et l'architecture racinaire, et participent à la protection des plantes contre des stress biotiques et abiotiques (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Gray & Smith, 2005; Drogue *et al.*, 2012; Verbon & Liberman, 2016; Meena *et al.*, 2017). Il n'est pas rare qu'une même PGPR exerce plusieurs effets bénéfiques pour les plantes. Les PGPR peuvent réguler la biodisponibilité des macro et micro éléments du sol (phosphore, azote, potassium, fer, zinc, etc) (Meena *et al.*, 2017) *via* la biofertilisation. De plus, elles peuvent agir sur la balance hormonale végétale, notamment sur l'auxine, favorisant ainsi la ramification racinaire (Cohen *et al.*, 2015; Verbon & Liberman, 2016; Meena *et al.*, 2017) *via* la phytostimulation. Elles peuvent protéger les plantes face à des stress biotiques, avec notamment la production d'enzymes lytiques contre les pathogènes (chitinases etc..), augmenter la compétition pour les nutriments *via* des sidérophores, et produire des antibiotiques ou autres molécules toxiques comme du cyanure d'hydrogène (Meena *et al.*, 2017). Enfin, les PGPR peuvent aider les plantes à faire face à des stress abiotiques, notamment en cas de sécheresse. Par exemple, il est décrit chez les plantes dont *Arabidopsis thaliana* (Cohen *et al.*, 2015) et le maïs (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009) une meilleure tolérance à un manque d'eau suite à l'inoculation avec une PGPR (genre *Azospirillum*). De plus, les PGPR *via* la rhizoremédiation aident les plantes face à des métaux lourds, notamment en diminuant leur biodisponibilité par

leur immobilisation dans le sol, notamment par leur précipitation (Ma *et al.*, 2016; Meena *et al.*, 2017).

I-4 *Azospirillum brasilense*

Parmi les ePGPR améliorant la tolérance à la sécheresse, *Azospirillum brasilense* est l'une des bactéries les plus documentées (Sarig *et al.*, 1988; Alvarez *et al.*, 1996; Creus *et al.*, 1998, 2004; Cohen *et al.*, 2008; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). *A. brasilense* est un bacille gram négatif, d'1 µm de largeur pour 2 à 3 µm de longueur. Cette bactérie est mobile en milieu liquide, mais aussi en milieu semi-liquide. Elle est capable d'utiliser une large gamme de sources de carbone, notamment des acides organiques tels que le malate, le succinate, le lactate, le pyruvate et divers sucres et acides aminés. En aérobie, elle utilise l'oxygène comme accepteur final d'électron, mais elle peut également, en absence d'oxygène, utiliser les nitrites, les nitrates comme accepteur final d'électron (Burdman *et al.*, 2000). Cette ePGPR est capable de répondre positivement à des chimio-attractants (Van Bastelaere *et al.*, 1999) tels que des sucres simples ou acides aminés libérés par la racine, pour ensuite s'adsorber et s'accrocher avec une ancre, afin de mieux coloniser la racine et former un biofilm (Bashan *et al.*, 1991; Broek *et al.*, 1993; Pagnussat *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017b). *A. brasilense* est connue pour ses différentes actions PGPR, telles que l'amélioration de croissance chez le blé, l'augmentation de la vitesse de germination et de la longueur racinaire chez le maïs, ou l'augmentation de la matière sèche chez l'orge (Costa *et al.*, 2015; García *et al.*, 2017; Meena *et al.*, 2017). De plus, *A. brasilense* peut protéger les plantes de la sécheresse, notamment *via* la libération dans le sol d'un disaccharide nommé tréhalose (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009), qui est connu pour être un osmorégulateur, en jouant sur l'augmentation de l'acide abscissique qui pourrait préparer la plante à subir un stress (Cohen *et al.*, 2015), et en inactivant la voie de l'éthylène avec l'action de son ACC désaminase (Glick, 2005; Glick *et al.*, 2007). Grâce à ces différentes actions, *A. brasilense* protège les plantes d'un stress hydrique. Mais pourquoi *A. brasilense* serait-elle intéressante dans ce contexte sahélien ? *A. brasilense* est une bactérie rhizosphérique remarquable capable de survivre dans zones tropicales à tempérées en passant par des zones arides (Bashan *et al.*, 1995). De plus cette bactérie a été trouvée au sein du sol (Grundmann *et al.*, communication personnelle, UMR CNRS 5557) de la parcelle expérimentale de la Grande Muraille Verte au Sénégal (cf §V-1). C'est par sa présence *in situ* et par ses actions bénéfiques pour les plantes qu'*A. brasilense* a été choisie comme modèle microbien pour la suite de ce manuscrit.

II-Le système racinaire

II-1 Principales fonctions

Lors de la germination d'une graine, la première structure à émerger est la radicule (racine embryonnaire). Le système racinaire est une structure essentielle pour la plante, dont les principales fonctions sont l'absorption de l'eau et des sels minéraux, ainsi que l'ancrage au sol du végétal (Arnaud *et al.*, 2010; Reece *et al.*, 2014). La conduction de l'eau et des sels minéraux par le xylème vers les parties aériennes participera, avec l'activité photosynthétique, à la synthèse de substances nutritives (Leucci *et al.*, 2008). Ces substances nutritives migrent par le phloème jusqu'aux tissus de stockage racinaires. Ainsi, les racines peuvent être un lieu de stockage de réserves, notamment en sucres (ex : la carotte et la betterave sucrière), mais aussi une réserve en eau comme chez certaines cucurbitacées (Raven *et al.*, 2007; Nabors & Sallé, 2008). L'apex racinaire est aussi le site de synthèse de phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscissique et l'éthylène, et d'autres types de métabolites secondaires. Les cytokinines et gibbérellines d'origine racinaire sont transportées jusqu'aux parties aériennes, où elles y jouent un rôle dans la croissance et le développement (Raven *et al.*, 2007; Hopkins & Hüner, 2008; Zurcher *et al.*, 2013; Birnbaum, 2016).

II-2 Plasticité du système racinaire

Lors de son développement dans le sol, la racine peut avoir plusieurs configurations spatiales. En effet, face à des environnements qui peuvent être très hétérogènes, la racine présente une forte plasticité pour continuer sa croissance, et par extension pour assurer la survie de la plante. Les ressources nutritives et le type de sol peuvent entre autre créer cette hétérogénéité pouvant moduler la croissance racinaire (Lynch, 1995; Satbhai *et al.*, 2015).

La sécheresse, les températures extrêmes, le manque de nutriments, l'exposition aux métaux lourds, les xénobiotiques et le compactage du sol sont des exemples de contraintes environnementales auxquelles le système racinaire peut être exposé au cours de son développement. Le système racinaire répond en adaptant son programme de développement par différentes stratégies (Jin *et al.*, 2017). Des modifications structurales des racines sont mises en place : remaniement racinaire avec une stimulation ou une inhibition du développement de la racine principale au profit des racines latérales, des changements du diamètre racinaire, des modulations sur la densité et sur la longueur des poils absorbants, par une réorientation de la direction de croissance des racines, ou alors par sa lignification (Sofa *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2010).

Lorsque les plantes sont soumises à un stress hydrique, les tissus aériens (feuilles et tiges) sont fortement inhibés dans leur croissance, alors que les racines continuent de se développer afin d'explorer le sol et de trouver de l'eau. Cette réaction de croissance différentielle des racines et des parties aériennes est considérée comme une adaptation des plantes terrestres aux milieux secs (Schnall & Quatrano, 1992; Leucci *et al.*, 2008). Au niveau de leur système racinaire, les plantes peuvent utiliser différents mécanismes pour faire face à la sécheresse (De Micco & Aronne, 2012). Elles peuvent notamment i) avoir une forte capacité de ramification, ii) avoir un double système racinaire : un proche de la surface pouvant capter rapidement l'eau après précipitation, et un autre avec des racines profondes et épaisses pour utiliser l'eau souterraine (Logbo *et al.*, 2013). De plus l'augmentation du ratio racine/tige-feuille est une stratégie pour éviter la transpiration et l'évaporation de l'eau par les feuilles tout en optimisant le volume du sol exploré par les racines. Il existe également des adaptations au niveau du système aérien qui permettent à la plante de tolérer la sécheresse avec une modification de l'élasticité et de la morphologie des feuilles, une fermeture stomatique précoce, ainsi que la formation d'une épaisse couche cireuse de cuticule (Radwan, 2007; Gowda *et al.*, 2011).

Les processus liés à la croissance racinaire de jeunes plantules sont cependant essentiels pour la survie des plantes dans des environnements stressants et associés aux changements climatiques actuels.

III-Structure et morphologie d'une racine en croissance

III-1 Les différents territoires fonctionnels d'une racine en croissance

La racine en croissance est classiquement divisée en 3 zones (Overvoorde *et al.*, 2010; Reece *et al.*, 2014) qui se chevauchent : la zone méristématique, la zone d'élongation et la zone de différenciation [Fig 4]. A ces 3 territoires s'ajoute la coiffe racinaire en position apicale qui est une structure protectrice vis-à-vis du méristème subapical (cf §III-2).

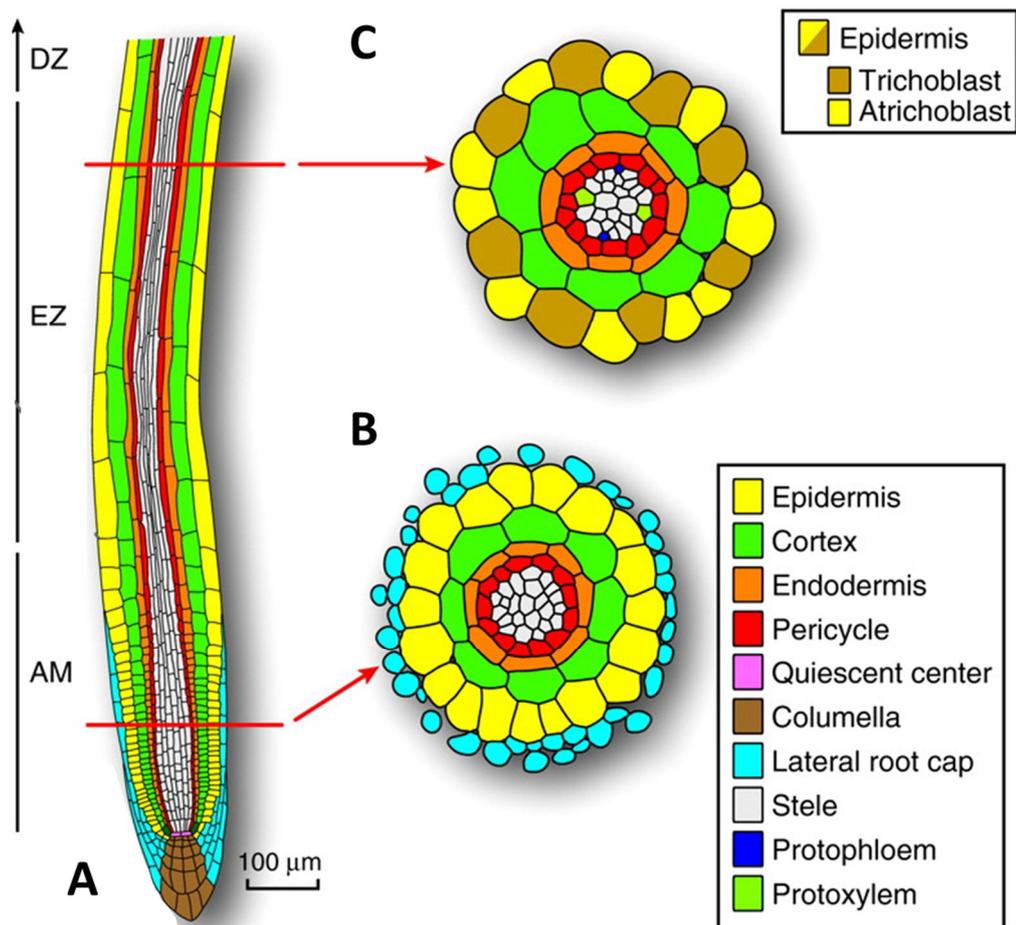


Figure 4 : Les différents territoires cellulaires d'une racine en croissance d'*Arabidopsis thaliana*.

(A) L'organisation proximo-distale de la racine provient du processus itératif de division et d'expansion cellulaire de quatre types d'initiales, qui sont immédiatement adjacentes aux cellules centrales quiescentes, mitotiquement inactives. Les initiales latérales donnent naissance au rhizoderme et cellules latérales de coiffe, les initiales centrales donnent naissance à la columelle, les initiales cortex/endodermique soutiennent la formation du tissu mou, et les initiales vasculaires donnent naissance aux tissus vasculaires et péricycle. (B) Section transversale d'une racine immature montrant l'organisation radiale des dérivées d'initiales. (C) La section transversale de la racine dans la zone de différenciation met en évidence l'organisation circonférentielle et radiale de la racine. La position de cellules trichoblastes et atrichoblastes est indiquée. On y trouve également l'emplacement du protoxylème et du protophloème qui donnent lieu à la symétrie diarchique de la racine mature d'*Arabidopsis thaliana* (Overvoorde *et al.*, 2010).

(AM) apical meristem ; (EZ) elongation zone ; (DZ) differentiation zone.

Au niveau de la zone méristématique, des cellules initiales sont à l'origine des cellules présentes dans les zones d'élongation et de différenciation, et sont également impliquées dans la formation de la coiffe. La division cellulaire est initiée au niveau de différentes cellules initiales qui entourent le centre quiescent (Raven *et al.*, 2007; Reece *et al.*, 2014; Somssich *et al.*, 2016; Nakamura & Grebe, 2018). Pour protéger cette zone, notamment contre des frottements mécaniques et des pathogènes, le méristème est recouvert d'une coiffe protectrice, composée de cellules et d'un épais mucilage (cf. §III-3) qui assure la pérennité du développement racinaire (Chaboud & Rougier, 1984; Brigham *et al.*, 1995a; Hopkins & Hüner, 2008).

Au dessus de la zone méristématique se trouve la zone d'élongation. Les cellules vont se développer et s'allonger rapidement le long de l'axe longitudinal. Cette croissance cellulaire [Fig 4] est entraînée par la pression de turgescence, créée par l'absorption de l'eau au niveau de la vacuole (Cosgrove, 2016). Cependant, la croissance est limitée par la tension de la paroi cellulaire. Afin de diminuer la pression, les cellules de cette zone modifient leur paroi en la rendant plus souple (Cosgrove, 2005; Somssich *et al.*, 2016). Il est admis que plusieurs acteurs moléculaires permettent le relâchement pariétal : des protéines non enzymatiques telles que les expansines (EXP) et les inhibiteurs de pectines méthylestérases (PMEi). Il existe également des enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi telles que les xyloglucane endotransglucosylases/hydrolases (XTHs), les cellulases, les pectines méthylestérases (PME), les pectine/pectates lyases, les polygalacturonases (PGs) et les radicaux hydroxyles (Xiao *et al.*, 2014, 2017; Xu *et al.*, 2014; Somssich *et al.*, 2016; Barnes & Anderson, 2017).

Un fois les cellules allongées, elles entrent dans une zone de transition qui se situe à la frontière entre la zone d'élongation et de différenciation. Cette zone de transition correspond à la formation de poils absorbants à la surface du rhizoderme (Nakamura & Grebe, 2018). En direction de la base de la racine, une rigidification des parois cellulaires de la stèle s'effectue par l'action d'extensines polymérisées par des peroxydases, aboutissant notamment à la lignification des éléments conducteurs xylémiens (Del Carmen Cordoba-Pedregosa, 2003; Dos Santos *et al.*, 2008; Somssich *et al.*, 2016). Plus haut, dans la zone de différenciation, à lieu l'émergence de racines latérales, initiées dans les cellules parenchymateuses du péri-cycle de la zone d'élongation (Dubrovsky *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2009).

III-2 Le méristème subapical de racine ou *Root Apical Meristem* (RAM)

III-2-1 Les différents types de RAM

Le méristème subapical de racine ou *Root Apical Meristem* (RAM) est à l'origine des cellules qui composent les tissus racinaires ainsi que la coiffe. Au sein du RAM, la position des cellules initiales reste identique et définit la spécificité tissulaire des cellules filles. Ainsi, ces lignées cellulaires organisées de façon concentrique sont générées de manière continue autour du centre quiescent, et forment un gradient de développement spatio-temporel (Drisch & Stahl, 2015). De l'extérieur vers l'intérieur de la racine, on retrouve ces couches cellulaires successives qui forment le rhizoderme, le cortex, l'endoderme, le péri-cycle et le système vasculaire.

Chez les angiospermes, 3 types majeurs d'organisation du RAM (Groot *et al.*, 2004; Rost, 2011) sont décrits: le RAM fermé, le RAM semi-ouvert et le RAM ouvert [Fig 5].

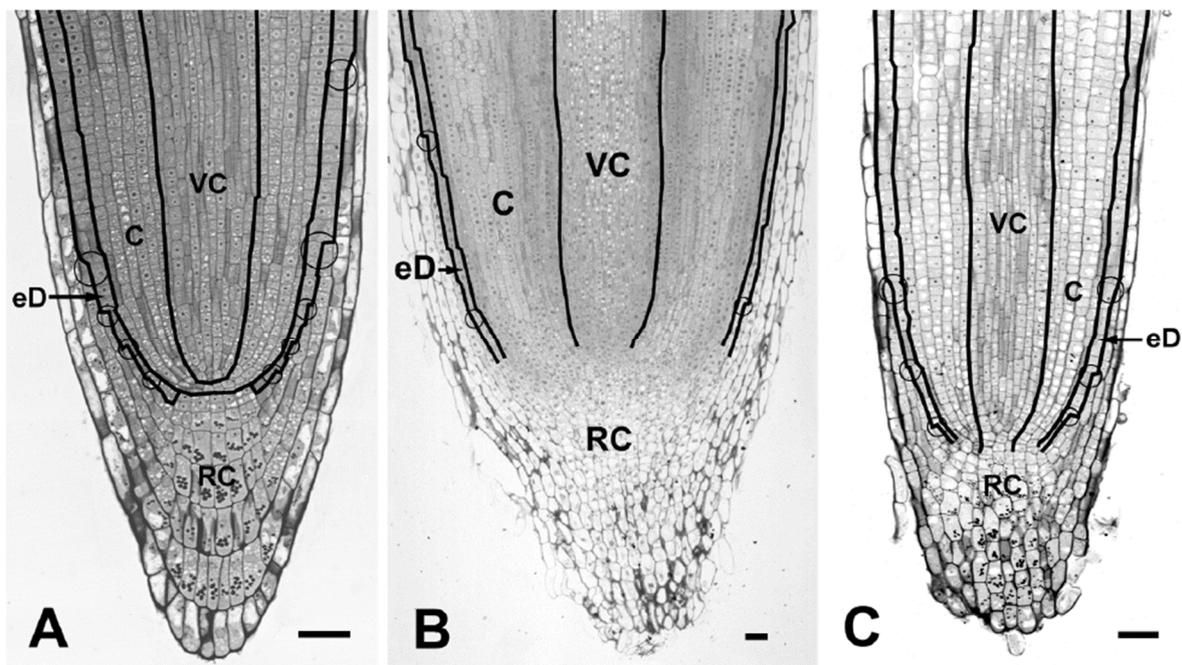


Figure 5 : Coupes longitudinales d'organisation de méristèmes apicaux de racines.

(A) RAM fermé de la racine de lin : l'organisation des cellules initiales est bien déterminée. (B) RAM ouvert de racine de pois : les cellules initiales ainsi que leurs dérivées sont difficiles à déterminer et ne sont pas nettement organisées. (C) RAM semi-ouvert de racine de carotte : l'organisation semble fermée, cependant les cellules initiales ne sont pas totalement déterminées (d'après Groot *et al.*, 2004).

C : cortex ; eD : epidermis ; RAM : root apical meristem ; RC : root cap ; VC : vascular cylinder.
Echelles : 50µm.

Le RAM fermé comprend 3 groupes d'initiales bien distincts qui forment un alignement de cellules. Ainsi, les cellules initiales du cylindre central, celles du cortex, celles de la columelle et celles qui seront conjointement à l'origine du rhizoderme et des cellules latérales de la coiffe sont parfaitement définies. Ce type d'organisation est retrouvé chez les plantes de la famille des *Brassicaceae* dont la plante modèle est *Arabidopsis thaliana* (cf, figure 6, §III.2.2). Concernant le RAM semi-ouvert, il présente un niveau d'organisation des cellules initiales moins clairement défini que le RAM fermé, mais on y distingue encore un alignement cellulaire entre les cellules initiales et certaines dérivées. Quant au RAM ouvert, il présente une zone d'initiales totalement « désorganisées ». Il est alors plus difficile de déterminer l'origine des cellules dérivées des initiales.

La détermination du RAM demeure complexe, elle ne se limite pas aux 3 types de RAM préalablement cités, puisque le type de RAM peut changer au cours du stade de développement de la racine. Effet, en 2002, une étude a montré que les méristèmes apicaux de racine de 5 espèces de dicotylédone ayant initialement un RAM fermé, subissent des modifications de leur organisation au cours du développement des racines. Ces modifications se traduisent *in fine* par des difficultés à distinguer les cellules dérivées, ainsi que le type de cellules initiales, montrant une évolution vers un RAM semi-ouvert. Il convient donc de préciser le stade de développement lors de l'identification du type de RAM (Chapman *et al.*, 2002).

Par ailleurs le type de RAM n'est pas strictement défini au sein d'une famille botanique. Effectivement, une étude en 2008 a pu mettre en lumière 15 types différents d'organisation du RAM chez plusieurs espèces d'angiospermes. Alors que certaines familles comme les *Fabaceae* et les *Zygophyllaceae* possèdent respectivement 2 et 4 types de RAM différents, un seul type de RAM a, à ce jour, été décrit chez les *Brassicaceae* (Heimsch & Seago, 2008).

Les RAM sont donc complexes, divers, et possèdent une variabilité temporelle. Or il a été important de trouver une plante avec un RAM assez simple (type fermé) pour faciliter la compréhension de sa structure et de son fonctionnement. *Arabidopsis thaliana* fut choisie pour étudier le fonctionnement du RAM (Benfey & Scheres, 2000). De nombreux outils moléculaires sont disponibles chez cette plante modèle. L'ensemble de ces éléments a largement contribué à proposer un modèle d'organisation cellulaire de l'apex racinaire d'*A. thaliana* (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 2002).

III-2-2 Présentation du RAM fermé d'*A. thaliana*

III-2-2-1 Les types cellulaires composant le RAM

L'organisation cellulaire du RAM fermé d'*A. thaliana* [Fig 6] est largement décrite dans la littérature (Dolan *et al.*, 1993; Van Den Berg *et al.*, 1997; Benfey & Scheres, 2000; Scheres *et al.*, 2002; Rahni *et al.*, 2016). Le RAM est composé en son centre de cellules qui forment le centre quiescent (CQ), qui est lui-même entouré de cellules non différenciées nommées cellules initiales (Sarkar *et al.*, 2007). Comme décrit plus haut, chez *A. thaliana*, il y a 4 types de cellules initiales : les initiales de la stèle formant le cylindre vasculaire comprenant le péricyle, les initiales formant l'endoderme et le cortex, les initiales centrales formant la columelle et les initiales latérales formant les cellules latérales de la coiffe et le rhizoderme [Fig 6]. Chaque type d'initiale va, à travers une division, générer sa descendance cellulaire nommée cellules dérivées, formant ainsi des colonnes bien distinctes dans un RAM fermé. De plus, la relation spatiale des cellules d'une colonne tissulaire reflète leur âge. Les cellules plus jeunes sont proches de l'apex racinaire, alors que les plus anciennes sont plus proches de la base. Par conséquent, tous les stades de développement sont présents dans chaque racine reflétant l'ontogénèse végétale.

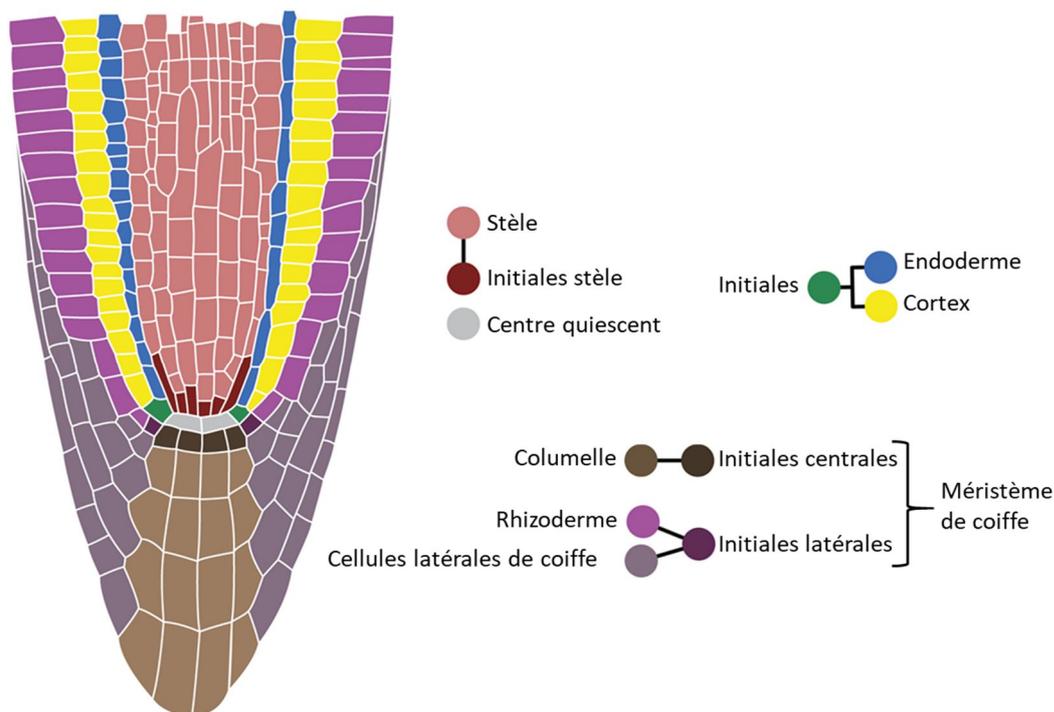


Figure 6 : Schéma des différents types cellulaires du méristème sub-apical de la racine d'*A. thaliana*.

Les cellules du centre quiescent sont entourées de cellules initiales. Les initiales vont se diviser pour donner différents types cellulaires. Les initiales de stèle donneront la stèle, les initiales centrales donneront la columelle, les initiales latérales donneront le rhizoderme et les cellules latérales de la coiffe. Les initiales centrales et latérales forment le méristème de la coiffe racinaire (d'après Rahni *et al.*, 2016).

III-2-2-2 Le centre quiescent : structure centrale du RAM

Le fonctionnement du RAM est sous le contrôle des cellules du centre quiescent (CQ) (Gaillochot & Lohmann, 2015). Ces cellules présentent des caractéristiques ultrastructurales spécifiques [Fig 7] par rapport aux autres cellules du RAM (Clowes & Juniper, 1964; Juniper & Barlow, 1969; Phillips & Torrey, 1974). De petite taille et de forme ovoïde, les cellules du CQ possèdent un gros noyau qui occupe une large partie de la cellule. Elles sont faiblement vacuolisées et présentent une paroi plus épaisse que celle des initiales [Fig 7].

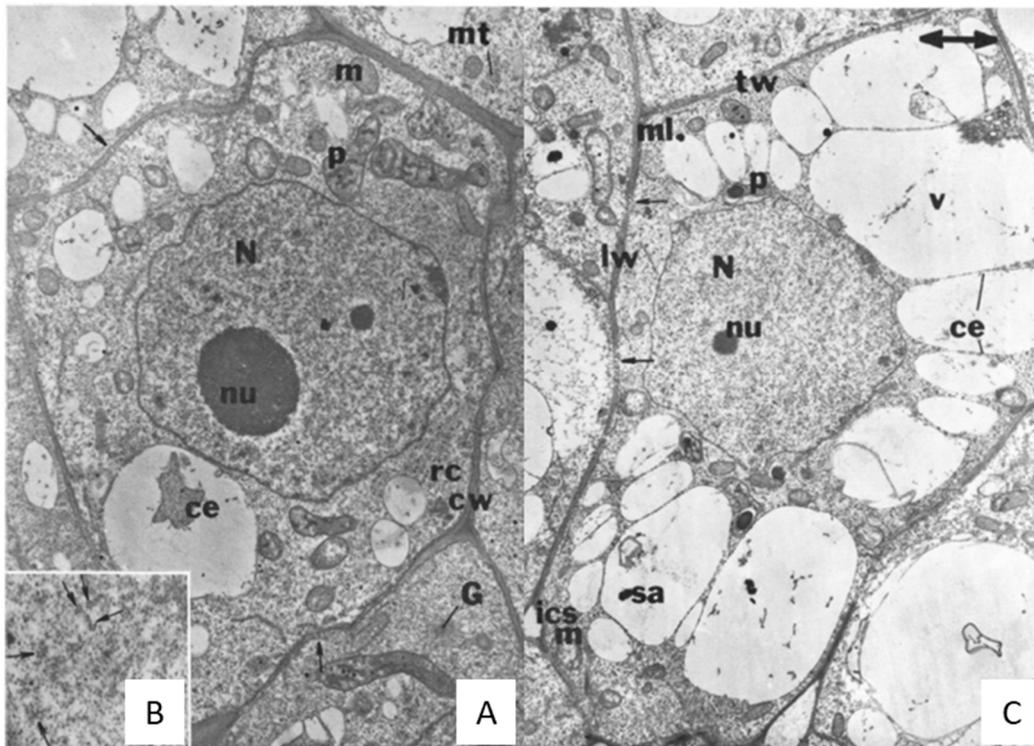


Figure 7 : Ultrastructure des cellules du centre quiescent et des cellules périphériques.

(A) Cellules du centre quiescent, ayant une épaisse paroi, et un système vacuolaire peu développé. (B) Zoom sur le cytoplasme du centre quiescent montrant des ribosomes ou polysomes. (C) Cellules fortement vacuolisées et allongées dans la périphérie du centre quiescent non loin des cellules initiales (d'après Phillips & Torrey, 1974).

cw : cell wall ; ce : cytoplasmic extension ; G : Golgi ; ics : intercellular space ; lw : longitudinal cell wall ; m : mitochondrion ; ml : medullar lamella ; mt : microtubule ; N : nucleus ; nu : nucleolus ; p : plaste ; rc : ribosome clusters ; sa : stain artifact ; tw : transverse wall ; v : vacuole.

Grossissement : A : 9 700 fois ; B : 33 100 fois ; C : 14 600 fois

L'activité mitotique au sein des cellules du CQ est peu fréquente (Van Den Berg *et al.*, 1997), 3 à 10 fois moindre que celle des cellules initiales qui l'entourent (Clowes, 1961; Heyman *et al.*, 2013; Fujinami *et al.*, 2017). Ceci semble être finement régulé par des gènes spécifiquement exprimés dans les cellules du CQ (De Tullio *et al.*, 2010; Drisch & Stahl, 2015), notamment le facteur de transcription *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5* (WOX5), qui

n'est exprimé qu'au niveau du CQ [Fig 8] (Sarkar *et al.*, 2007; Sebastian *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Pi *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2015).

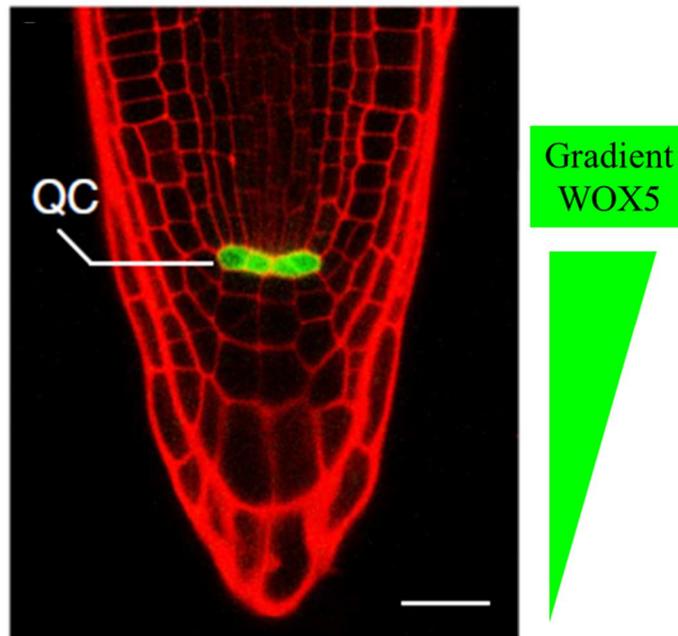


Figure 8 : Localisation de l'expression du gène WOX5 dans l'apex racinaire d'*A. thaliana*.

Le promoteur du gène WOX5 couplé à la GFP (WOX5::GFP) est exprimé qu'au niveau des cellules du centre quiescent dans l'apex racinaire d'*A. thaliana*. A partir du centre quiescent est généré un gradient du facteur de transcription WOX5 au sein de la coiffe (teneur maximale au niveau du centre quiescent et minimale au niveau des cellules de la columelle) (D'après Zhang *et al.*, 2015).

GFP : *green fluorescent protein* ; QC : *quiescent center* ; WOX5 : *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5*.
Echelle : 20 µm.

A partir des cellules du CQ, WOX5 va ensuite migrer vers les cellules initiales qui l'entourent. Ceci génère un gradient de WOX 5 caractérisé par des teneurs maximales au niveau du CQ et minimales au sein des cellules les plus apicales de la coiffe [Fig 8]. Cette migration s'effectue grâce à la présence de nombreux plasmodesmes au sein des parois des différents types cellulaires (Clowes & Juniper, 1964; Juniper & Barlow, 1969; Reece *et al.*, 2014).

Les concentrations élevées de WOX 5 au niveau du CQ conduisent à limiter la division et la différenciation de ses cellules. Pour prévenir la division des cellules du CQ, WOX5 réprime l'expression d'un gène codant pour une cycline, nommée CYCD3, qui participe à la division cellulaire (Forzani *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2015). La mutation du gène *WOX5* provoque une augmentation de la taille des cellules du CQ et des cellules initiales centrales par rapport au sauvage, suggérant une action de WOX5 sur la différenciation de ces cellules (Sarkar *et al.*, 2007). Par ailleurs, une ablation au laser des cellules du CQ induit la différenciation des cellules initiales contiguës, suggérant que le CQ agit pour maintenir les cellules initiales dans

un état indifférencié (Van Den Berg *et al.*, 1997). Ainsi, après chaque division d'une cellule initiale, une cellule fille n'étant plus connectée au CQ, peut se différencier et former les différents tissus racinaires.

Au niveau des cellules du CQ l'expression de *WOX5* est elle-même finement régulée et dépend notamment de l'action séquentielle de deux facteurs de transcription *SHORTROOT* (*SHR*) et *SCARECROW* (*SCR*). La protéine *SHR* est très présente au niveau des cellules du CQ, et va activer l'expression de la protéine *SCR*, ce qui permet l'expression de *WOX5* (Nakajima *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 2003). En 2007, Sarkar *et al.* ont montré que l'expression de *WOX5* est réduite ou indétectable chez des mutants *shr* et *scr*, montrant l'implication en amont de *SHR* et *SCR* sur l'expression de *WOX5* (Sarkar *et al.*, 2007).

De plus, l'expression de *WOX5* est dépendante des phytohormones présentes au niveau du CQ. Ainsi, au sein des cellules du CQ, il y a une accumulation d'auxine (Moubayidin *et al.*, 2013). Cela va induire l'activation de facteurs de transcription des gènes de réponse à l'auxine, nommés *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*) 10 et 16, qui vont réprimer la transcription de *WOX5* (Ding & Friml, 2010). Si ce dernier n'est plus produit, il y a différenciation cellulaire. Pour éviter ce phénomène, un microARN, *microRNA MIR160* (mRNA *MIR160*) permet une régulation post-transcriptionnelle d'*ARF10* et d'*ARF16* (Wang, 2005). De plus un répresseur de réponse à l'auxine l'*indole-3-acetic acid 17* (*IAA17*) permet au centre quiescent de garder son identité (Tian *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces données montre le rôle central du CQ dans le fonctionnement du RAM et par conséquent dans l'organisation des territoires cellulaires de la racine.

Ainsi, des échanges moléculaires entre les cellules du CQ et les différentes cellules composant le RAM sont réalisés. Ces échanges permettent la régulation spatiale fine de la division et de la différenciation cellulaire au sein de l'apex racinaire. Dans ce manuscrit, le maintien de l'activité mitotique des cellules initiales centrales et latérales de coiffe, ainsi que les processus de différenciation au sein de leurs dérivés *via* de nombreux facteurs de transcription (cf §III-3-3) seront détaillés, même si comme décrit précédemment *WOX5* joue le rôle principal.

III-3 La coiffe racinaire

La coiffe racinaire est un ensemble de cellules régulièrement renouvelé. Elle est composée de 2 types cellulaires : les cellules latérales de coiffe et les cellules de la columelle. Comme décrit précédemment, ces 2 types cellulaires sont issus respectivement des cellules initiales latérales et des initiales centrales formant le méristème de coiffe (Arnaud *et al.*, 2010; Rahni *et al.*, 2016). La coiffe racinaire a pour fonction première de protéger le RAM lors de sa croissance. Contrairement au reste de la racine, la taille de la coiffe racinaire est peu modifiée par les processus de prolifération et d'élongation cellulaires qui ont lieu dans le RAM et ces cellules dérivées. La coiffe maintient un volume stable suite à la libération dans la rhizosphère de ses cellules les plus périphériques que nous appellerons cellules frontières. Les cellules de la coiffe (cellules de la columelle et cellules latérales) et les cellules frontières issues de la coiffe sont décrites ci-après.

III-3-1 Les cellules de la columelle et cellules latérales de coiffe

Après la division des initiales centrales, les cellules de la columelle produites accumulent de l'amidon [Fig 9].

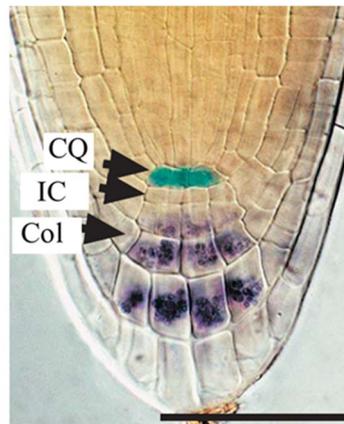


Figure 9 : Les différents types cellulaires de la coiffe racinaire d'une plantule d'*A. thaliana*.

WOX5 couplé à un GUS indique le centre quiescent. En dessous du CQ, 4 cellules initiales centrales (IC). Les cellules de la columelle (Col) présentent des amyloplastes colorés au lugol. Les cellules latérales de coiffe sont dépourvues d'amyloplastes (D'après Sarkar *et al.*, 2007).

CQ : centre quiescent ; Col : cellules de la columelle ; GUS : β -glucuronidase ; IC : initiales centrales ; WOX5 : WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5.
Echelle 50 μ m.

Ces cellules augmentent en poids et en taille, tout en diminuant la proportion de leur cytoplasme. Des amyloplastes spécialisés (statolithes) se forment pour donner naissance à des cellules spécialisées, les statocytes (Barlow *et al.*, 1984; Iijima *et al.*, 2008; Arnaud *et al.*, 2010;

Zhang *et al.*, 2015). Ces cellules permettent à la racine de percevoir la gravité. Sous l'effet de cette dernière, les statolithes sédimentent. Leur chute aboutit à une répartition asymétrique de l'auxine dans la coiffe racinaire, conduisant à une croissance racinaire asymétrique (Iino, 1995). À distance des initiales centrales, les couches cellulaires de la columelle plus âgées poursuivent leur différenciation. Une dégradation des molécules d'amidon et une agrégation des nombreuses petites vacuoles en un seul compartiment vacuolaire caractérisent ce processus de maturation. Lorsque les cellules de la columelle ont atteint la zone la plus superficielle de l'apex, elles sont appelées cellules périphériques de la columelle. Elles sont alors généralement des cellules sécrétrices (Juniper & Clowes, 1965; Arnaud *et al.*, 2010). Dans ces cellules, le nombre d'organites augmente. Les empilements golgiens et les vésicules de sécrétion, sont abondamment présents, témoignant des fonctions de sécrétion (Juniper & Clowes, 1965).

Concernant les cellules dérivées des initiales latérales de coiffe, elles se différencient uniquement en cellules sécrétrices. Quand elles sont complètement différenciées, les cellules périphériques sécrétrices de la racine peuvent augmenter leur volume initial d'un facteur 10 (Juniper & Clowes, 1965; Iijima *et al.*, 2008). Elles synthétisent et exportent un mucilage riche en polysaccharides à haut poids moléculaire, formant des capsules hydrosolubles (Rougier, 1981; Arnaud *et al.*, 2010).

D'un point de vue fonctionnel, outre la protection du RAM, ces deux types cellulaires de la coiffe racinaire sont impliqués dans de nombreuses fonctions. L'ablation de la coiffe racinaire stimule l'émergence de racines secondaires et inhibe la croissance de la racine principale (Van Den Berg *et al.*, 1997; Tsugeki & Fedoroff, 1999), traduisant la participation de la coiffe racinaire au contrôle de l'architecture racinaire. La coiffe est la structure racinaire impliquée non seulement dans le gravitropisme (Blancaflor *et al.*, 1999), mais également dans l'hydrotropisme et le thigmotropisme (réponse à une stimulation tactile) (Ishikawa & Evans, 1992; Iijima *et al.*, 2008; Arnaud *et al.*, 2010).

III-3-2 Les cellules frontières

Les cellules frontières sont issues des cellules de la columelle et des cellules latérales de coiffe, et représentent leur niveau de maturation ultime.

III-3-2-1 Les deux types de cellules frontières

À l'origine, les cellules frontières étaient nommées « *sloughed root cap* », qui signifie « mue de coiffe racinaire » (Hawes & Pueppke, 1986). Cependant ce nom changea rapidement, car d'après Hawes *et al.*, (1998) l'expression « *sloughed root cap* » était trop proche du champ

lexical de « *moribund* », de « *gangrenous* » et de « *putrid* » qui ne reflétait pas la réalité. En effet, il a été mis en évidence que ces cellules frontières étaient métaboliquement actives, vivantes, et qu'elles jouaient un rôle au sein de la rhizosphère. Ainsi, en 1998, Hawes *et al.*, décidèrent d'appeler ces cellules « *Border Cells (BCs)* », ou « Cellules Bordantes » (Hawes *et al.*, 1998).

Les cellules bordantes sont des cellules végétales disposant d'une paroi primaire riche en polysaccharides et enrobées de mucilage. Elles furent mises en évidence pour la première fois chez le maïs (Rougier *et al.*, 1979) [Fig 10 A et B].

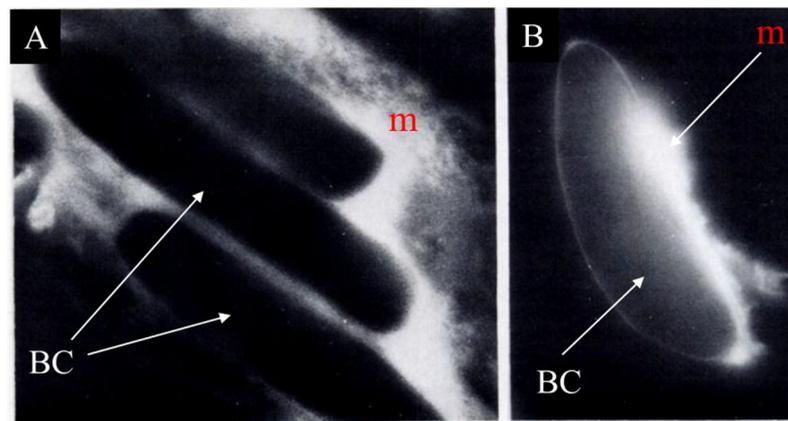


Figure 10 : Cellules bordantes ou *Border Cells (BC)* de racine de maïs.

(A) Groupe de cellules bordantes de coiffe racinaire, situées à la pointe de la racine, entourées d'un mucilage marqué avec un anticorps anti-fucose. Grossissement X2000 ; (B) Cellule isolée de la coiffe racinaire, avec un mucilage non uniforme marqué à l'aide d'un anticorps anti-fucose (d'après (Rougier *et al.*, 1979)).

BC : *border cells* ; m : mucilage. Grossissement : 1 800 fois.

En 1986, Hawes et Puppke entreprirent de compter le nombre de cellules bordantes libérées par racine en fonction de leur famille. Il s'avère que pour les 27 espèces différentes testées regroupées dans 10 familles, le nombre de cellules libérées une fois mises dans l'eau peut varier de moins de 10 cellules, à plus de 5000 (Hawes & Puppke, 1986), voire même à plus de 10000 cellules libérées par racine (Hawes *et al.*, 1998). Cependant, même si une grande hétérogénéité est observée sur le nombre de cellules libérées en fonction de la plante, ces cellules libérées sont, pour toutes les espèces testées, vivantes à plus de 85% au minimum pour la majorité des espèces. Le fait que les cellules bordantes puissent se diviser sous l'action de phytohormones, ainsi que se dédifférencier pour former des cals est très controversé. Seulement 6 à 8% des cellules bordantes récoltées à partir de racine de pois auraient été capables de se dédifférencier (Hawes & Puppke, 1986). Par ailleurs, les cellules bordantes de maïs peuvent

survivre lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions appropriées, et jusqu'à un mois après leur détachement (Gochnauer *et al.*, 1990; Iijima *et al.*, 2008).

En 1995, Brigham *et al.*, indiquent qu'ils n'ont pas détecté de cellules frontières chez des plantules d'*A. thaliana*, dans les conditions développées dans leur laboratoire. Ils suggèrent la possibilité que la séparation des cellules frontières d'*A. thaliana* pouvait survenir plus tard dans le développement, ou dans des conditions environnementales différentes (Brigham *et al.*, 1995a). Puis en 2002, Hawes *et al.* réaffirmèrent qu'ils n'avaient pas détecté de cellules bordantes chez *A. thaliana* et chez d'autres *Brassicaceae* après 24 h d'incubation (Hawes *et al.*, 2002).

Cependant, en 2005, Vicré *et al.*, ont décrit pour la première fois la présence de cellules frontières chez *A. thaliana*. En effet, l'apex racinaire d'*A. thaliana* libère des couches cellulaires selon un modèle organisé qui diffère de la libération plutôt dispersée, observée chez d'autres espèces comme le pois ou le maïs (Vicré *et al.*, 2005). Vicré *et al.*, baptisèrent ces cellules frontières, *Border Like Cells* (BLC). Une analyse ultrastructurale de ces cellules a indiqué que ces BLCs sont riches en mitochondries, appareils de Golgi et vésicules golgiennes, ce qui suggère qu'elles sont aussi activement engagées dans la sécrétion entre autres de glycomolécules vers notamment leurs parois cellulaires (Vicré *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2017a).

À ce jour, il a donc été décrit deux types de cellules frontières (Driouich *et al.*, 2010). Elles peuvent être bordantes (peu cohésives) aussi appelées BCs : *Border Cells* [Fig 11 A] ou apparentées aux cellules bordantes (cohésives) aussi appelées BLCs : *Border Like Cells* [Fig 11 B].

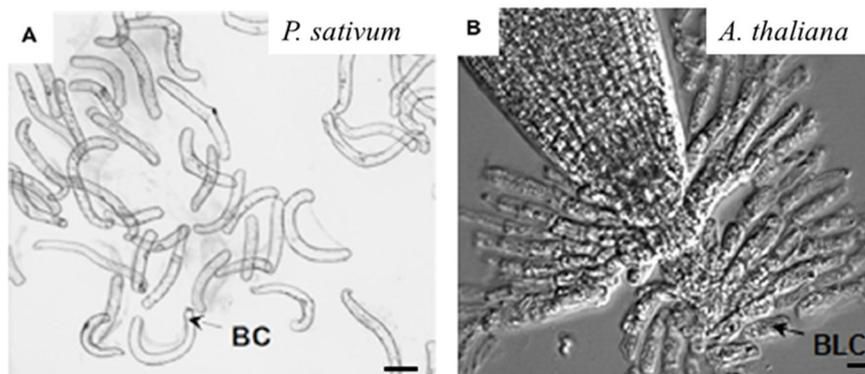


Figure 11 : Deux types de cellules frontières.

(A) Les cellules bordantes (*Border Cells*, BCs) non cohésives libérées par la racine de *Pisum sativum* ; (B) les cellules apparentées aux cellules bordantes (*Border like cells*, BLCs) cohésives d'*A. thaliana*. (d'après Driouich *et al.*, 2010).

BC : *border cells* ; BLC : *border-like cells*. Échelle A : 50 μm ; B : 20 μm .

Il est généralement admis que les plantes ayant un RAM ouvert produisent plus de cellules frontières que les plantes ayant un RAM fermé (Hamamoto *et al.*, 2006), et ces cellules sont souvent de type BC.

En 2011, Endo *et al.*, décrivent la particularité des cellules frontières d'*Acacia mangium*, un arbre de la famille des *Fabaceae*. À l'extrémité de la pointe racinaire (entre 0 et 1 mm), *A. mangium* possède des BCs mais aussi des BLCs, alors que son RAM est de type ouvert (Endo *et al.*, 2011). De plus, le nombre de BCs à l'extrémité racinaire est semblable à celui d'une autre *Fabaceae*, le soja, qui a aussi un RAM ouvert, mais ne libère pas de BLCs. Cependant, les BLCs d'*A. mangium* diffèrent sensiblement de celles d'*A. thaliana*, car elles ressemblent plus à de longs cheveux. Les auteurs suggèrent que l'absence de BC, entre 1 à 3 mm de la pointe, serait due à une modification pariétale des cellules de la columelle permettant de les rendre individuelles (type BC). Concernant la formation des BLCs à l'extrémité racinaire d'*A. mangium*, les auteurs suggèrent que des facteurs génétiques répriment l'hydrolyse de la paroi cellulaire des cellules latérales de coiffe lors du développement racinaire (Endo *et al.*, 2011). De plus, les auteurs proposent que la forte cohésion cellulaire des BLCs chez *A. mangium* pourrait résulter des composants pariétaux, tels que les subérines et les lignines, qui peuvent renforcer l'attachement intercellulaire.

III-3-2-2 Les fonctions des cellules frontières

Les cellules frontières jouent un rôle essentiel dans la protection de l'apex racinaire. En effet, elles peuvent être impliquées soit lors de stress biotiques (Vicré *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2016) ou soit lors de stress abiotiques tels que la présence de métaux lourds comme l'aluminium (Cai *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016), le fer (Xing *et al.*, 2008) et le cuivre (Liu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Leur activité sécrétrice intense conduit à la production d'un mucilage dont les fonctions au sein de la rhizosphère sont nombreuses. L'ensemble cellules frontières-mucilage a récemment été baptisé « piège extracellulaire de racine » ou RET (Root Extracellular Trap) par Driouich *et al.*, (2013). La structure du RET et ses principales fonctions seront présentées dans le §IV-3.

III-3-3 Des initiales de coiffe aux cellules frontières : contrôle génétique et hormonal chez *A. thaliana*

La plante modèle *A. thaliana* a fait l'objet de nombreuses études visant à appréhender les processus moléculaires contrôlant le fonctionnement des initiales de la coiffe ainsi que la différenciation de leurs dérivées.

Dans le RAM, les cellules du centre quiescent (CQ) jouent un rôle majeur dans le développement de la racine et de la coiffe racinaire par le maintien du méristème de coiffe. Le déplacement de facteurs de transcription issus du CQ vers les différentes couches cellulaires de la coiffe participe à la régulation de la différenciation. De plus, les processus de maturation cellulaire au sein de la coiffe sont modulés par les phytohormones comprenant les auxines et les cytokinines.

Lors de la croissance racinaire, il est connu que la prolifération cellulaire *via* l'activité des cellules initiales, est fortement impliquée. Comme rappelé précédemment, malgré l'activité des initiales de coiffe, la taille de la coiffe racinaire demeure quasi constante au cours du développement de la racine (Fendrych *et al.*, 2014).

III-3-3-1 La régulation des divisions cellulaires au sein des initiales de coiffe

Le méristème de coiffe est composé de cellules initiales centrales et de cellules initiales latérales. Les cellules dérivées de ces initiales se différencient respectivement en cellules de la columelle et en cellules latérales de coiffe [Fig 6]. Le maintien de l'activité mitotique au sein des initiales de coiffe est primordial. Il est assuré notamment par le facteur de transcription *SCARECROW* (Moubayidin *et al.*, 2013), qui régule en amont une protéine nommée *RETINOBLASTOMA-RELATED* (RBR). Cette dernière interagit avec des facteurs de transcription des gènes codant pour des protéines de la famille des cyclines indispensables dans la régulation du cycle cellulaire (Desvoves *et al.*, 2014). RBR est exprimée dans toutes les cellules mitotiquement actives et régule la taille de la population de cellules initiales. Par ailleurs, une réduction du transcrit de RBR induit une augmentation des couches ressemblant à des cellules initiales centrales, sans affecter leur future différenciation en cellules de la columelle (Bennett *et al.*, 2014). De plus, RBR agit sur le cycle cellulaire chez les dérivées des cellules initiales centrales, en régulant et en favorisant leur différenciation (Wildwater *et al.*, 2005).

Le gradient de concentration de *WOX5* au sein de la coiffe racinaire joue également un rôle capital sur les processus de division et de différenciation. Comme évoqué précédemment,

dans le CQ, une très forte concentration de WOX5 réprime la division cellulaire. Or, au niveau des cellules initiales de coiffe centrales et latérales, WOX5 y est en concentration plus faible, ce qui va maintenir un état de division cellulaire constant. La division perpétuelle de ces cellules initiales permet la formation des différentes couches cellulaires de la coiffe (Somssich *et al.*, 2016; Couzigou & Combier, 2016). Les cellules initiales adjacentes aux cellules du CQ doivent donc rester en constante division mais sous forme indifférenciées.

Une des raisons pouvant expliquer la faible quantité de WOX5 dans les cellules initiales de coiffe, est que son expression est réprimée par la protéine *REPRESSOR OF WUS1* (ROW1). Cette protéine répresseur se lie spécifiquement au motif lysine 4 triméthylée de l'histone H3 (H3K4me3) au niveau de la région proximale du promoteur de WOX5. Le facteur de transcription WOX5 n'est d'ailleurs pas exprimé au sein de ces cellules (Zhang *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2015).

En plus de permettre de maintenir un état de division cellulaire constant au niveau des cellules initiales de coiffe centrales et latérales, le gradient de WOX5 au sein de la coiffe racinaire [Fig 8 ; Fig 12] assure l'inhibition de la différenciation des cellules initiales, grâce à une concentration relativement importante, et ceci, malgré le fait qu'il soit réprimé dans ces cellules. En effet, WOX5 inhibe l'expression d'un autre facteur de transcription, la *CYCLING DOF (DNA-binding One zinc Finger) FACTOR 4* (CDF4), en se liant à son promoteur (Pi *et al.*, 2015; Rahni *et al.*, 2016). Une fois WOX5 fixé en amont du gène CDF4, il recrute séquentiellement des protéines appartenant à une famille de co-répresseurs transcriptionnels (Causier *et al.*, 2012), les protéines TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR), ainsi qu'une histone désacétylase (HDA19). Ce complexe protéique va induire la désacétylation de la région régulant l'expression du gène CDF4 (Pi *et al.*, 2015; Fisher & Sozzani, 2016), afin d'empêcher la différenciation des cellules initiales centrales. Cependant le mode de fonctionnement de CDF4 n'a pas encore été caractérisé (Pi *et al.*, 2015).

Les cellules initiales de coiffe sont donc au carrefour de deux gradients protéiques majeurs au sein de la coiffe racinaire qui sont : WOX5 provenant du CQ et CDF4 provenant des cellules matures de la columelle [Fig 12].

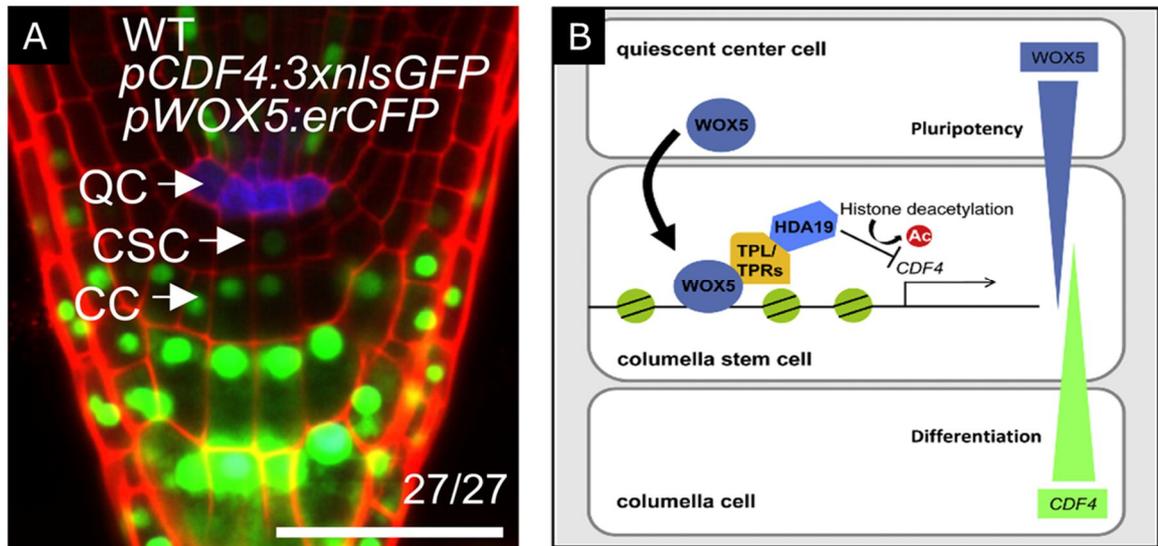


Figure 12 : Description des gradients WOX5 et CDF4 dans la coiffe racinaire d'*A. thaliana*.

(A) Localisation de l'expression du promoteur du gène CDF4 couplé à la GFP (en vert), au niveau des cellules de la columelle et des cellules latérales de coiffe, et localisation de l'expression du promoteur du gène WOX5 couplé à la CFP (en bleu) au niveau des cellules du centre quiescent. (B) schéma montrant les gradients de WOX5 et CDF4 au sein de la coiffe racinaire en lien avec les processus de prolifération et de différenciation cellulaires (d'après Pi *et al.*, 2015).

Ac: acetyl ; WT : wild type ; QC : quiescent center ; CSC : columella stem cell ; CC : columella cell ; CDF4 : CYCLING DOF FACTOR 4 ; TPL/TPR : TOPLESS/TOPLESS-RELATED ; HDA19 : Histone desacetylase ; WOX5 : WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5. Échelle 50 μ m.

En effet, Pi *et al.*, 2015 ont localisé une forte expression du gène CDF4 au niveau des cellules différenciées de la columelle, une faible expression au niveau des cellules initiales de coiffe, alors qu'aucune expression n'est détectable dans le CQ [Fig 12 A]. Le gradient protéique de CDF4 est donc inverse au gradient de WOX5 [Fig 12 B]. De plus, ces auteurs confirment que WOX5 est exprimé uniquement au niveau des cellules du CQ comme décrit chez Zhang *et al.*, 2015 [Fig 12 A].

Outre WOX5 et CDF4, d'autres facteurs de transcription permettent eux aussi de garder l'état indifférencié des cellules initiales. C'est notamment le cas du facteur de transcription PLETHORA (PLT), qui serait lui régulé par l'auxine. (Stahl & Simon, 2010; De Tullio *et al.*, 2010; Gaillochet & Lohmann, 2015; Drisch & Stahl, 2015). En effet, une activité élevée de PLT maintient les cellules initiales centrales indifférenciées, alors qu'une faible activité de PLT favorise leur différenciation (Ding & Friml, 2010). L'auxine joue un rôle dans l'état indifférencié des cellules initiales centrales *via* l'action de WOX5 qui la régule en amont (Ding & Friml, 2010). On pourrait donc dire que WOX5 régule indirectement PLT *via* l'auxine.

Certains facteurs de transcription sont donc capables de réguler le cycle cellulaire des cellules initiales, même s'ils ne sont pas exprimés dans ces cellules. Cependant, FEZ, un facteur de transcription ayant un domaine NAC (N : *No apical meristem*, A : *Arabidopsis transcription activation factor* et C : *Cup-shaped cotyledon*) est quant à lui exprimé au niveau des cellules initiales centrales et latérales (Willemsen *et al.*, 2008) [Fig 13].

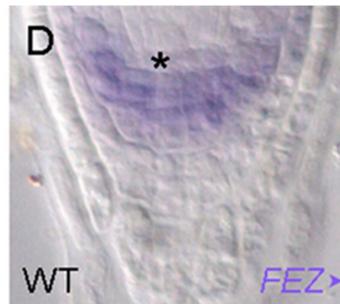


Figure 13 : Localisation de l'expression du gène FEZ dans la coiffe racinaire d'*A. thaliana*.

Expression de FEZ au niveau des cellules initiales centrales et latérales de coiffe d'un apex racinaire d'*A. thaliana*. Astérisque représente le centre quiescent (d'après Willemsen *et al.*, 2008).

WT : *wild type*. Echelle non donnée

Au sein des cellules initiales, l'activité de FEZ contribue à promouvoir la division cellulaire. De plus, il réduit l'activité de RBR qui est impliqué dans la différenciation cellulaire. Cependant, les mécanismes exacts de cette régulation ne sont pas connus à ce jour (Bennett *et al.*, 2014).

En résumé, l'effet dose de WOX5, *via* son gradient au sein de la coiffe racinaire, est très important dans le maintien des cellules initiales de coiffe à l'état proliférant et non différencié. Lorsque les cellules dérivées des initiales s'éloignent du CQ, la concentration en WOX5 ne permet plus de réprimer l'expression de CDF4, la différenciation cellulaire peut alors commencer. De plus, FEZ exprimé au sein des cellules initiales de coiffe, participe également au maintien de leur activité mitotique.

III-3-3-2 Le contrôle de la différenciation des cellules dérivées des initiales centrales en cellules de la columelle

Comme évoqué dans la partie précédente, les cellules initiales de coiffe sont composées de cellules initiales centrales et latérales. Ces cellules sont à l'origine respectivement des cellules de la columelle, des cellules latérales de coiffe et du rhizoderme. La différenciation des cellules initiales centrales en cellules de la columelle est assez bien décrite dans la littérature, due à l'une de leur fonction primordiale qu'est la perception de la gravité.

La maturation et la différenciation des cellules de la columelle sont régulées par différents acteurs. On y trouve encore des facteurs de transcription déjà cités précédemment comme WOX5 et CDF4, ainsi qu'un nouvel acteur, le peptide CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40 (CLE40) [Fig 14], également présent sous forme de gradient au sein de la coiffe racinaire.

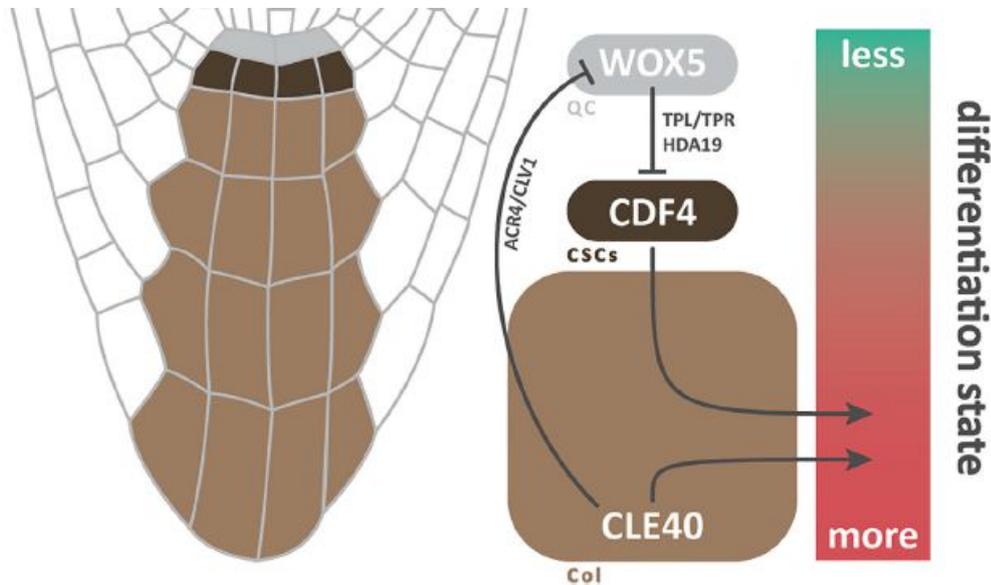


Figure 14 : Principaux acteurs moléculaires régulant la différenciation des dérivées des initiales centrales de coiffe en cellules de la columelle.

Depuis le centre quiescent (QC), WOX5 exerce une influence en se dirigeant vers la pointe et en inhibant la différenciation dans les CSC (initiale centrales). Au niveau des initiales, WOX5 recrute des répresseurs *TOPELESS* / *TOPELESS-RELATED* (TPL / TPR) et *HISTONE DEACETYLASE 19* (HDA19) pour réprimer le facteur de la différenciation, *CYCLING DOF FACTOR 4* (CDF4). À l'opposé, dans les cellules de la columelle, via *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40* (CLE40), l'expression de WOX5 est inhibée et la différenciation par le complexe récepteur kinases *ARABIDOPSIS CRINKLY4* (ACR4) et *CLAVATA1* (CLV1) est favorisée (D'après Rahni *et al.*, 2016).

Col : *columella*.

Au niveau des cellules latérales de coiffe et de la columelle, le facteur de transcription CDF4 est exprimé, permettant la différenciation cellulaire (Pi *et al.*, 2015). En effet, au niveau de ces cellules, la concentration en WOX5 n'est plus suffisante pour inhiber l'expression de CDF4. Par ailleurs, la faible concentration en WOX5 est maintenue grâce à ROW1 qui vient réprimer sa transcription.

Tout comme ROW1, CLE40 permet de réguler la quantité de WOX5 dans les cellules latérales de coiffe et de la columelle, en réprimant indirectement son expression. CLE40 est fortement exprimé au niveau des cellules différenciées de la coiffe où il est sécrété et forme un

gradient caractérisé par des teneurs maximales au niveau des cellules différenciées de la coiffe et minimales au sein des cellules initiales [Fig 15].

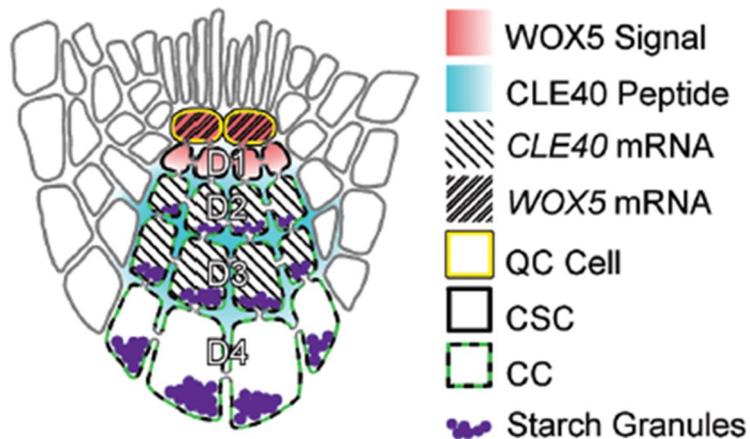


Figure 15 : Localisation et diffusion des molécules CLE40 et WOX5 dans la coiffe racinaire d'*A. thaliana*.

WOX5 est exprimé dans le CQ d'où il migre jusqu'aux cellules initiales adjacentes, où il maintient leur état indifférencié et en division constante. L'expression de CLE40 est localisée au niveau des cellules de la columelle (D2-D3). Une diffusion du peptide CLE40 se fait depuis les cellules de columelle jusqu'aux cellules initiales centrales, où il inhibe le signal de WOX5. Les cellules de la columelle sont reconnaissables par leurs grains d'amidon (d'après Richards *et al.*, 2015).

mRNA : ARN messenger ; QC Cell : cellule du centre quiescent ; CSC : cellules initiales centrales ; CC : cellule de la columelle ; Starch Granules : grains d'amidon.

Le peptide CLE40 est reconnu par des récepteurs membranaires de type récepteurs kinase : ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4) (Stahl & Simon, 2010; Stahl *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2015; Berckmans & Rüdiger, 2016). Les récepteurs ACR4 peuvent être sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec CLAVATA1 (CLV1). Ces complexes se lient avec CLE40, induisant la différenciation des cellules par des mécanismes partiellement caractérisés [Fig 16] (Berckmans & Rüdiger, 2016).

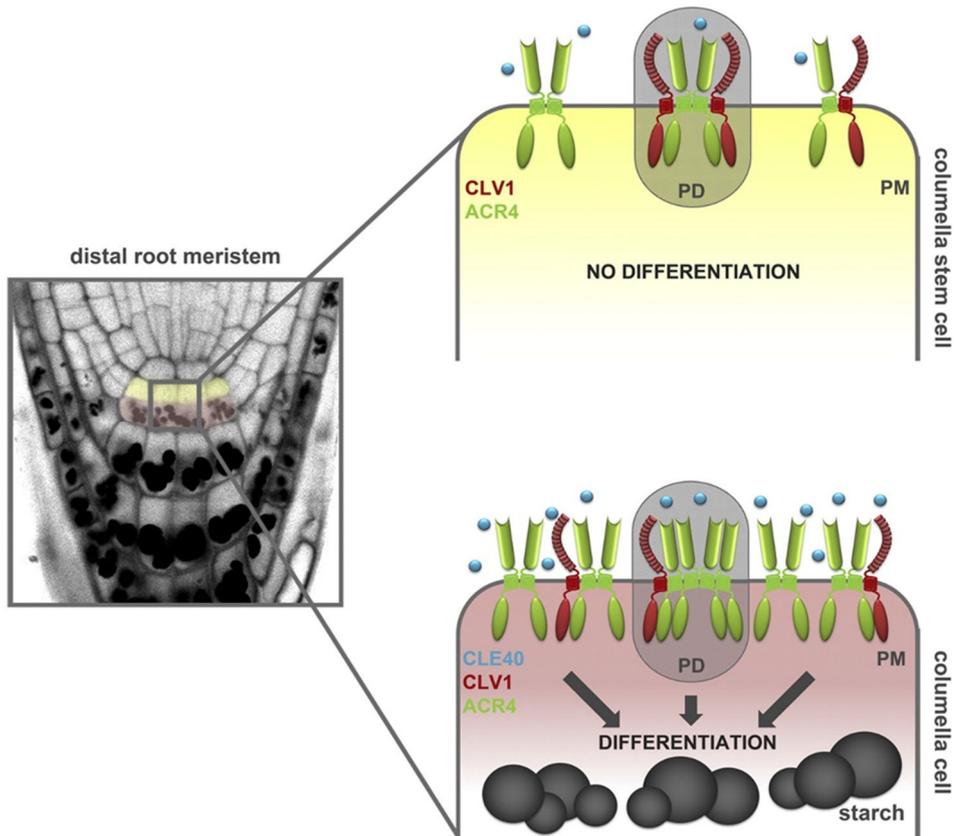


Figure 16 : Perception du peptide CLE40 par les complexes membranaires CLV1-ACR4.

Dans les cellules initiales centrales, au niveau de la membrane plasmique et des plasmodesmes, se trouvent des récepteurs de type kinase : les ACR4, pouvant se dimériser soit en homo ou hétérodimère avec CLV1. Quand CLE40 se lie à ACR4 la différenciation cellulaire est activée (d'après Stahl *et al.*, 2013).

ACR4 : ARABIDOPSIS CRINKLY4 ; CLV1 : CLAVATA1 ; CLE40 : CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40 ; Starch : amidon ; PD : plasmodesma ; PM : plasma membrane ; distal root meristem : méristème racinaire distale ; columella stem cell : cellules initiales centrale ; columella cell : cellule de la columelle.

Chez les mutants *cle40-2*, le domaine d'expression de WOX5 est étendu, tandis que la différenciation des cellules initiales centrales en leur dérivée est retardée, ce qui entraîne souvent le maintien de deux couches de cellules initiales centrales au lieu d'une seule. L'addition du peptide CLE40 synthétique (CLE40p) diminue le nombre de cellules initiales d'une manière dépendante de la dose ajoutée. Stahl *et al.*, (2009) suggèrent donc que CLE40 favorise la différenciation *via* deux voies, l'une dépendante de WOX5, et l'autre indépendante.

Par ailleurs, un autre facteur de transcription nommé SOMBRERO (SMB), ayant un domaine NAC, régule la différenciation des cellules de la coiffe. Il est exprimé dans les cellules de la columelle et dans les cellules latérales de coiffe (Bennett *et al.*, 2010, 2014; Kamiya *et al.*, 2016). SMB n'est pas régulé par RBR, mais il agirait en parallèle pour différencier les cellules dérivées des initiales centrales. De plus, SMB agirait également en parallèle de ARF10 et

ARF16 qui sont eux aussi impliqués dans la différenciation cellulaire (Bennett *et al.*, 2014). Dans la coiffe racinaire des mutants *smb*, alors que le nombre de couches de cellules formant la coiffe augmente (Willemsen *et al.*, 2008), la différenciation des cellules latérales de coiffe est retardée (Fendrych *et al.*, 2014).

Là encore, différents acteurs moléculaires régulent finement la différenciation des cellules initiales *via* leur concentration. CDF4, CLE40 *via* ACR4 et CLT1, mais aussi SMB permettent la différenciation des cellules de la columelle et latérales de coiffe, pour qu'elles puissent accéder enfin à leur prochaine étape : devenir des cellules frontières.

III-3-3-3 Le contrôle du détachement des cellules frontières

a- Les modifications pariétales

La dernière étape de différenciation des cellules de la coiffe racinaire nécessite des modifications structurales de la paroi. Ces dernières sont mises en jeu lors du détachement des cellules de l'apex racinaire. Ces modifications pariétales concernent essentiellement des composés de nature pectiques et cellulosiques.

Les modifications pariétales peuvent se faire *via* l'action d'enzymes. En effet, des études réalisées chez le pois, qui produit des cellules frontières de type BC, indiquent qu'une activité enzymatique de type polygalacturonase (PG) est impliquée dans le détachement de ces cellules. En effet, l'activité PG est effective au sein de la coiffe racinaire, alors qu'elle n'est pas détectée au sein des cellules détachées (Hawes & Lin, 1990). Cependant pour que les PGs puissent dégrader les pectines, il faut qu'elles soient déméthylées par des pectine-méthylestérases (PMEs). En effet, il a aussi été démontré par une approche d'ARNs anti-sens qu'une activité PME était nécessaire pour le détachement de ces cellules de la racine (Wen *et al.*, 1999). La déméthylation dynamique des homogalacturonanes lors du processus de maturation de la coiffe racinaire est confirmée à l'aide de sondes non-immunologiques (dérivé d'oligosaccharides de chitosanes), par des interactions de charges négatives et positives (Mravec *et al.*, 2014, 2017b).

Par ailleurs, chez des mutants de la *GALACTURONOSYLTRANSFERASE 8* d' *A. thaliana* (*QUASIMODO 1-1*), il a été montré que la synthèse déficiente d'homogalacturonanes provoque une libération individualisée des cellules bordantes (Durand *et al.*, 2009). Or, chez le sauvage, ces cellules sont cohésives et se détachent de manière groupée (Vicré *et al.*, 2005). Ces études semblent indiquer qu'une modification pariétale est nécessaire pour la maturation et la libération des cellules frontières de type BC au sein de la rhizosphère.

Chez *A. thaliana*, le contrôle génétique du détachement des cellules frontières est partiellement connu. Deux facteurs de transcription, BEARSKIN1 (BRN1) et BEARSKIN 2 (BRN2), régulent l'expression de gènes impliqués dans la production d'enzymes lytiques de la paroi cellulaire. Ils sont impliqués dans la différenciation cellulaire en favorisant la maturation des cellules de la coiffe, ainsi qu'en permettant la séparation pariétale de ces cellules, afin d'obtenir une coiffe racinaire fonctionnelle (Bennett *et al.*, 2010). SMB ne semble pas s'exprimer dans les cellules les plus périphériques de la coiffe racinaire alors que BRN1 et BRN2 y sont majoritairement exprimés. BRN1, semble s'exprimer plus fortement dans les cellules les plus périphériques de la columelle et les cellules latérales de coiffe adjacentes et supérieures, alors que l'expression de SMB est plus homogène dans la coiffe racinaire. BRN2 s'exprime de manière plus restreinte que SMB, en s'exprimant seulement dans les cellules les plus périphériques de la columelle et les cellules latérales de coiffe adjacentes (Bennett *et al.*, 2010).

Bennett *et al.*, (2014) ont proposé un modèle schématisant les interactions entre FEZ, RBR, SMB, BRN1 et BRN2 chez *A. thaliana*, en partant du centre quiescent pour aller jusqu'à la 6ème couche cellulaire (c6) de la columelle [Fig 17].

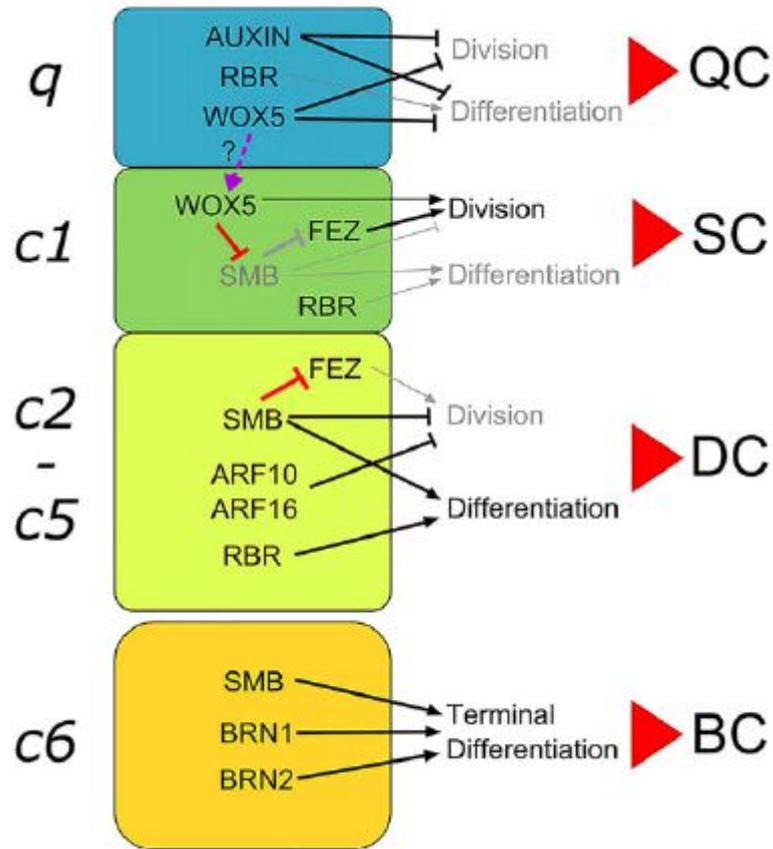


Figure 17 : Modèle schématisant le contrôle génétique de la maturation des initiales centrales de la coiffe en cellules frontières chez *A. thaliana*.

Les combinaisons de facteurs parallèles conduisent à différents comportements et à différentes positions dans la columelle (indiquée en italique sur le côté gauche). Dans le type sauvage, ces facteurs parallèles génèrent des combinaisons stéréotypées de comportement cellulaire, qui donnent l'apparence de types cellulaires distincts (QC : centre quiescent ; SC : cellules initiales centrales ; DC : cellules de la columelle ; BC : cellules frontières). Les interactions génétiques directes sont indiquées en rouge. Le mouvement de WOX5 hypothétique est montré en violet. Les effets sur les processus en aval sont indiqués par des flèches fines. Le texte gris et les flèches grises indiquent des niveaux faibles de facteurs ou de processus à ces positions, tandis que le texte noir et les flèches noires indiquent des niveaux élevés (Bennett et al., 2014).

Plus récemment, BRN1 et BRN2 ont été localisés uniquement au niveau de la couche externe de la coiffe racinaire, grâce à l'utilisation de plantes transformées avec les promoteurs BRN1 et BRN2, couplés avec un tag nuclear-localized signal (NLS) YFP-GUS (Kamiya et al., 2016). De plus, cette étude confirme l'expression de SMB dans les cellules différenciées de la coiffe racinaire. L'étude suggère que le rôle de BRN1 et BRN2 serait plus tardif dans la différenciation des cellules de la coiffe. Par ailleurs, BRN1 et BRN2 seraient impliqués dans l'activation d'un gène codant pour une polygalacturonase nommée ROOT CAP POLYGALACTURONASE (RCPG). En effet, chez les mutants *brn1* et *brn2*, une forte baisse de l'expression de RCPG est observée par rapport au sauvage, contrairement au mutant *smb*, où l'expression de RCPG est relativement identique au sauvage (Kamiya et al., 2016). Il est

suggéré que BRN1 et BRN2 se lient spécifiquement sur le promoteur du gène *RCPG* pour activer sa transcription.

RCPG est localisée dans l'apoplasme et favoriserait la séparation de la dernière couche cellulaire, des cellules latérales de coiffe et de la columelle. En effet, en surexprimant le gène *RCPG*, il a été observé un changement dans les propriétés d'adhésion cellulaire au niveau de la coiffe racinaire, avec un détachement individuel des cellules les plus externes de la coiffe (Kamiya *et al.*, 2016). De plus, une analyse *in silico* indique que SMB, BRN1 et BRN2 peuvent cibler des gènes codant pour des enzymes de synthèse lipidique. Il a été proposé que dans les cellules des couches les plus externes de la coiffe racinaire, l'amidon stocké dans les amyloplastest soit rapidement transformé en lipides pour être utilisés comme source d'énergie par ces cellules (Kamiya *et al.*, 2016).

Récemment, un nouveau facteur de transcription NIN-LIKE PROTEIN7 (NLP7) a été découvert par Karve *et al.*, (2016). NLP7 est requis pour réguler la libération des cellules frontière chez *A. thaliana*. En effet, la composition pariétale de ces cellules joue un rôle important dans leur détachement *via* des enzymes modifiant leur paroi. Chez les mutants *nlp7* d'*A. thaliana*, une libération individuelle des cellules frontières est observée. Par ailleurs, les mutants *nlp7* conduisent à une diminution du niveau de la cellulose et des pectines neutres et acides (Karve *et al.*, 2016). De plus, chez les mutants *nlp7*, une augmentation de l'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription tels que BRN1, BRN2 et SMB ; mais aussi pour des enzymes modifiant la paroi telles que la XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE 5 (XTH5), la CELLULASE 5 (CEL5), et une PECTIN LYASE-like (PL) est observée. Comme évoqué précédemment, une insuffisance en homogalacturonane pariétal provoque une libération individuelle des cellules frontières chez *A. thaliana* (Durand *et al.*, 2009). Alors que chez un mutant *cellulase5* (*cle5*), où la dégradation de la cellulose est diminuée, une réduction du détachement des cellules frontières est observée (Del Campillo *et al.*, 2004).

L'expression chez *A. thaliana* de NLP7 permet donc le maintien du niveau de la cellulose et des pectines de la paroi, en réprimant la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans leur modification, ainsi qu'en régulant des facteurs de transcriptions impliqués dans la maturation des cellules de coiffe.

b- La mort cellulaire programmée des cellules latérales de la coiffe d'*A. thaliana*

Une fois les cellules de coiffe différenciées, les cellules latérales entrent dans un processus de mort cellulaire programmé (PCD) hautement organisé (Fendrych *et al.*, 2014) [Fig 18].

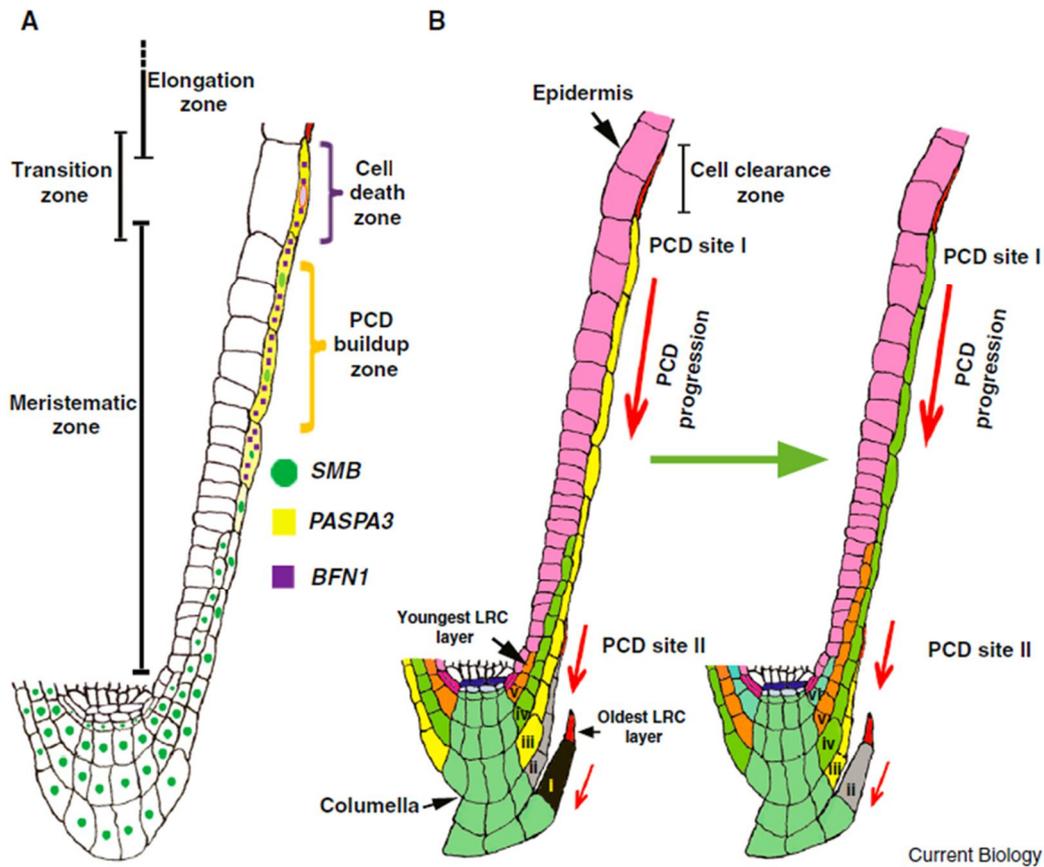


Figure 18 : Le processus de mort cellulaire programmée au sein des cellules latérales de coiffe d'*A. thaliana*.

(A) Diagramme schématisant le profil d'expression / la distribution des protéines de SMB (vert), PASPA3 (jaune) et BFN1 (pourpre) lors du développement des cellules latérales de coiffe. Les cellules se préparent à la mort dans la « zone d'accumulation de PCD » et finissent par mourir dans la « zone de mort de la cellule ». L'expression PASPA3 augmente dans les cellules allongées qui meurent par la suite. La protéine BFN1 est localisée dans le reticulum endoplasmique avant la mort cellulaire (boîtes violettes), mais lors de la mort cellulaire, la protéine est libérée dans la cellule, y compris dans le noyau (couleur fusionnée verte / violette dans le noyau). (B) progression de PCD dans les couches de cellules LRC de la racine. Les différentes couches du LRC sont mises en surbrillance avec différentes couleurs. Dans le panneau de gauche, cinq couches LRC (de I à V) sont affichées. Dans le panneau de droite, la couche la plus ancienne (I) a été détachée du capteur racine et la couche la plus jeune (VI) est formée. La PCD est établie sur le site PCD I de la couche (III) de l'image de gauche, progresse cellule par cellule jusqu'à PCD site II vers l'apex de la racine. Pendant ce temps, la couche de cellule sous-jacente (couche IV) atteint la zone de transition dans l'image de droite et réinitialise un nouveau cycle de PCD dans la zone de mort de la cellule. Le dégagement de la cellule suit le front progressif de PCD (Yadav & Helariutta, 2014)

BFN1 : BIFUNCTIONAL NUCLEASE 1 ; LRC : Lateral Root Cap ; PASPA3 : ASPARTIC PROTEINASE A3 ; PCD : Programmed Cell Death ; SMB : SOMBRERO.

Le processus de mort cellulaire programmé est un processus utilisé par la plante pendant son développement, mais aussi comme réponse face à des stress biotiques et abiotiques (Gadjev *et al.*, 2008). Ce processus fait partie du programme de différenciation génétiquement contrôlé dans un certain nombre de tissus. Il est notamment essentiel dans les tissus du xylème, pour assurer la fonction de ce tissu en ayant des cellules mortes et lignifiées (Zhao *et al.*, 2007).

Lors du processus de mort cellulaire programmée, deux enzymes ont été décrites comme étant impliquées : la BIFUNCTIONAL NUCLEASE 1 (BFN1) (Farage-Barhom *et al.*, 2008, 2011), qui par son action nucléase bifonctionnelle, dégrade rapidement et irréversiblement des espèces nucléaires et cytoplasmiques d'ARN et d'ADN (Fendrych *et al.*, 2014) ; et l'ASPARTIC PROTEINASE A3 (PASPA3) qui sont le plus souvent actives à pH acide (Chen *et al.*, 2002). Ces enzymes sont hautement régulées, et produites lors de la mort cellulaire programmée. Les gènes codant pour ces enzymes sont exprimés spécifiquement dans les cellules latérales de coiffe, au niveau d'une zone appelée « PCD buildup zone », où les cellules se préparent à rentrer en mort cellulaire (Fendrych *et al.*, 2014).

PASPA3 est plus spécifiquement exprimée dans les cellules latérales de coiffe les plus distales, qui sont situées dans une zone de transition entre la zone méristématique et la zone d'élongation racinaire appelé « PCD site I ». L'expression de PASPA3 implique une rupture des tonoplastes et un effondrement vacuolaire lors de la mort des cellules latérales de coiffe (Fendrych *et al.*, 2014). L'effondrement vacuolaire provoque l'acidification du cytoplasme et la libération d'hydrolases. Cette acidification cytoplasmique est suffisante et nécessaire pour déclencher la mort cellulaire spécifiquement de ces cellules. Cette chute du pH intracellulaire rend la membrane plasmique perméable à l'iodure de propidium, ce qui permet de désigner le point de repère de la mort cellulaire au sein des cellules latérales de coiffe (Fendrych *et al.*, 2014). Ces cellules augmentent l'expression de PASPA3 lorsqu'elles approchent la fin de la zone de transition, puis meurent au PCD site I. Fendrych *et al.*, (2014) suggèrent qu'une fois la PCD établie, la mort cellulaire progresse vers l'apex racinaire, formant le PCD site II. Au niveau de cette zone, les cellules perdent leur contact avec la racine à l'extrémité proximale de la columelle.

Chez des mutants *smb*, l'expression de PASPA3 et de BFN1 est complètement absente de la zone cellulaire distale et la mort cellulaire est retardée. Cela indique que l'expression de SMB est nécessaire pour la mort cellulaire au cours des étapes finales de différenciation des cellules initiales latérales (Fendrych *et al.*, 2014).

L'étude de Fendrych *et al.* (2014) fournit des informations intéressantes sur le rôle du processus de mort cellulaire programmée dans le contrôle de la taille de la coiffe racinaire. De plus, ce processus est coordonné de manière temporelle à la partie distale de la coiffe racinaire, et permet l'évacuation des cellules latérales de la coiffe et participe au maintien de la taille de la coiffe racinaire chez *A. thaliana*. Il est important de noter que ce processus de mort cellulaire est proposé uniquement pour expliquer le détachement des cellules latérales de coiffe. Les cellules frontières issues de la columelle ne présentent pas ce processus et sont bien vivantes au moment de leur détachement (Vicré *et al.*, 2005; Plancot *et al.*, 2013).

IV-Le piège extracellulaire de racine ou *root extracellular trap* (RET)

La notion de piège extracellulaire de racine ou *Root Extracellular Trap* (RET) a été proposée par (Driouich *et al.*, 2013). Cette rhizodéposition, élément clé de la rhizosphère, comprend les cellules frontières (cf. § III-3-2-1) issues de la coiffe racinaire, associées à un mucilage plus ou moins dense, riche en exsudats racinaires. Le RET peut être visualisé grâce à l'encre de chine, car le colorant ne peut pas pénétrer cette matrice complexe. Comme il est montré [Fig 19] pour le pois, les cellules frontières se trouvent libérées autour de la pointe racinaire, et elles sont enrobées d'un mucilage de plusieurs millimètres de diamètre [Fig 19 b]. Ce dernier est riche en polysaccharides, glycoprotéines, protéoglycanes, jouant un rôle protecteur sur l'apex racinaire (Driouich *et al.*, 2013).

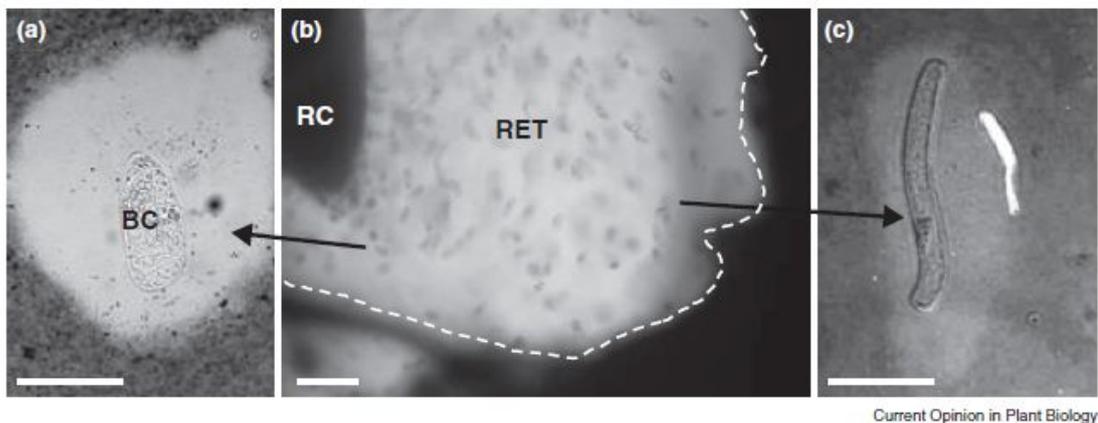


Figure 19 : Visualisation du piège extracellulaire de racine ou *Root Extracellular Trap* (RET).

Mise en évidence du *root extracellular trap* (RET) grâce à l'encre de chine (délimité par les tirets blancs) entourant la coiffe racinaire (RC) chez le pois ; (b) Induction du RET sur une cellule bordante (BC) isolée en réponse à *Pseudomonas aeruginosa* (a) et aux zoospores de *Fusarium solani* (c) (d'après Driouich *et al.*, 2013).

BC : border cells ; RC : root cap ; RET : root extracellular trap. Echelle 20 μm .

IV-1 Les exsudats racinaires et le mucilage

Alors que les exsudats racinaires correspondent à l'ensemble des composés produits par la racine, le mucilage est une matrice plus ou moins dense, selon les espèces végétales, associée aux cellules frontières et donc localisée à l'apex racinaire. Dans le mucilage, il est possible que des exsudats, sécrétés par d'autres zones de la racine, s'y trouvent inclus (Driouich *et al.*, 2013; Koroney *et al.*, 2016).

Pour plusieurs auteurs, la majorité des exsudats racinaires serait issue des cellules frontières (Wen *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2014). La racine utilise ses exsudats entre autres pour

solubiliser les minéraux et les nutriments organiques et faciliter l'assimilation des nutriments inorganiques, *via* notamment une modification du pH du sol. Les nutriments et les sels minéraux seront ainsi plus biodisponibles pour la plante (Badri & Vivanco, 2009).

Au sein de racines de plantes saines et intactes, les exsudats racinaires sont définis comme des substances libérées par transporteurs passifs, et sécrétées par transporteurs actifs de type ABC (*ATP Binding Cassette*), dans le milieu environnant (Badri & Vivanco, 2009). En terme d'origine moléculaire, il y a une grande diversité dans les exsudats racinaires (Rovira, 1969). De plus, des composés issus de la lyse cellulaire sont mélangés avec ces sécrétions.

En 1984, une des premières études caractérisant les exsudats racinaires et le mucilage chez le riz indiqua que la majeure partie des glucides libérée dans les exsudats sous forme soluble est principalement du glucose. Les polymères associés au mucilage ne représentent qu'une fraction mineure de l'exsudat entier contenant du glucose, du galactose, du xylose, de l'arabinose et des quantités mineures de fucose et de mannose (Chaboud & Rougier, 1984).

La quantité et la qualité des exsudats racinaires sont déterminées par les espèces végétales, l'âge d'une plante et les facteurs externes tels que les stress biotiques et abiotiques (Badri & Vivanco, 2009). On peut classer les exsudats racinaires en 2 types de composés : les exsudats de faibles poids moléculaires et ceux de hauts poids moléculaires.

Parmi les composés de bas poids moléculaires, on retrouve les mono et oligosaccharides, les acides organiques, les acides aminés, les composés phénoliques et autres métabolites secondaires. La nature et les effets de ces composés ont été largement documentés (Bais *et al.*, 2006).

Au niveau des composés de haut poids moléculaires, on retrouve des polysaccharides et des protéines (Bais *et al.*, 2006; Badri & Vivanco, 2009). À l'apex racinaire, l'ensemble des composés de haut poids moléculaire sécrété par les cellules frontières s'organise en un mucilage plus ou moins dense. Différentes lectines ont permis de mettre en évidence la nature glucidique du mucilage enrobant les BC de maïs (Rougier *et al.*, 1979). Cinq ans plus tard, il a également été montré chez le riz la présence de cellules frontières enrobées d'un mucilage glucidique (Chaboud & Rougier, 1984).

Les cellules frontières sécrètent également des protéines au sein du mucilage. En effet, en 1995 Brigham *et al.*, ont démontré que chez le pois 13% des protéines sécrétées par les cellules bordantes étaient absentes des protéines sécrétées par le reste de la racine. Par ailleurs,

25% des protéines produites par les cellules bordantes étaient libérées dans le milieu seulement après 1 h de culture (Brigham *et al.*, 1995b). En 2007, Wen *et al.*, ont réalisé une étude du « sécrétome » (l'ensemble des protéines sécrétés) de la coiffe racinaire. Ils ont décrit plus de 100 protéines libérées par la racine avec les cellules frontières immergées dans l'eau (Wen *et al.*, 2007). Certaines protéines étaient impliquées dans le métabolisme des glucides et des protéines qui composent la paroi cellulaire. Ils ont notamment identifié des extensines, des glycoprotéines riches en hydroxyproline, des endoxyloglucanes transférases, des invertases, des β -galactosidases, des cellulases, des α -mannosidases et des oligosaccharyltransférases (Wen *et al.*, 2007). Ces protéines libérées par la racine doivent être impliquées dans la modification pariétale, mais aussi dans les interactions potentielles avec le sol.

Le mucilage associé aux cellules frontières est essentiellement constitué de composés pariétaux de natures polysaccharidique et protéique (Baetz & Martinoia, 2014; Wang *et al.*, 2017b). Le mucilage peut ainsi contenir des xyloglucanes (Durand *et al.*, 2009; Mravec *et al.*, 2017a; Wang *et al.*, 2017a), des homogalacturanes (Durand *et al.*, 2009; Mravec *et al.*, 2017a), des xylogalacturonanes (Wang *et al.*, 2017a), des acides polygalacturoniques / Rhamnogalacturonane de type 1 (Wang *et al.*, 2017a), des arabinogalactanes protéines (AGPs) (Durand *et al.*, 2009; Koroney *et al.*, 2016), des extensines (Koroney *et al.*, 2016) et des peptides (defensin peptides) (Weiller *et al.*, 2016). De plus, il a été mis en évidence la présence d'ADN extracellulaire (ADNex) au sein du mucilage (Wen *et al.*, 2009). La diversité et la complexité moléculaire du mucilage doivent être liée aux potentielles interactions avec le sol (cf §IV-3).

IV-2 Les structures des principaux polymères pariétaux

IV-2-1 Les principaux polymères des parois primaires des plantes Angiospermes Eudicotylédones

La cellule végétale est caractérisée par la présence d'une paroi cellulaire, encore appelée matrice extracellulaire végétale [Fig 20]. La paroi cellulaire est un compartiment extrêmement dynamique dont la composition évolue au cours de la croissance, de la différenciation cellulaire et en réponse à des facteurs environnementaux tels que des stress abiotiques et biotiques. Toutes les cellules végétales ont une paroi primaire qui entoure leur membrane plasmique, hors protoplaste.

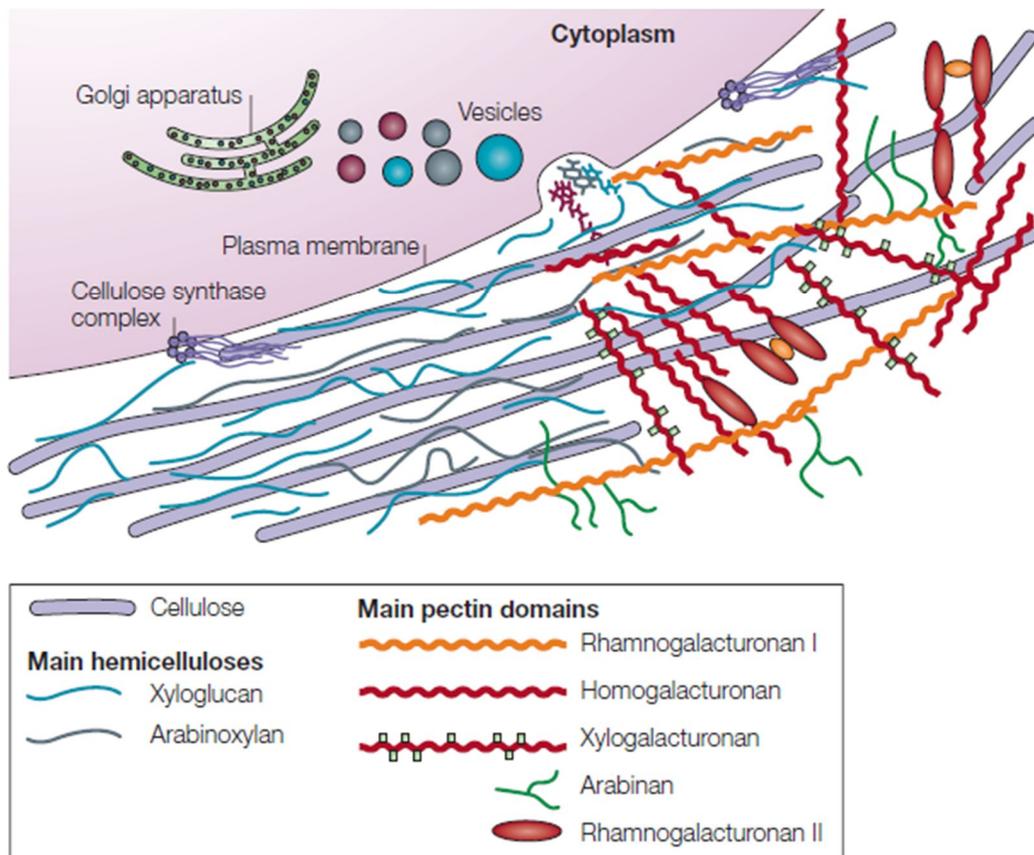


Figure 20 : Structure de la paroi cellulaire primaire.

Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées par de grands complexes hexamériques dans la membrane plasmique, tandis que les hémicelluloses et pectines qui composent les polysaccharides matriciels sont synthétisées dans l'appareil de Golgi, et déposées à la surface des parois par des vésicules. Pour plus de clarté, le réseau hémicellulose-cellulose est représenté sur la partie gauche de la paroi cellulaire sans pectines, qui sont soulignés sur la partie droite de la figure. Dans la plupart des espèces végétales, l'hémicellulose principale est le xyloglucane (bleu), tandis que les hémicelluloses comme les arabinoxylyanes (gris) et les mannanes (non montrés) se retrouvent en quantités moindres. Les pectines comprennent le rhamnogalacturonane I et des homogalacturonanes, avec de plus petites quantités de xylogalacturonane, d'arabinane, d'arabinogalactane I (non représenté) et de rhamnogalacturonane II. Les domaines pectiques seraient liés entre eux par covalence et également liés au xyloglucane par des liaisons covalentes et non covalentes. Les pectines neutres (verts) peuvent aussi se lier à la surface de la cellulose (Cosgrove, 2005).

La paroi primaire est majoritairement constituée de polysaccharides [Fig 21], sa composition est complexe et peut varier selon l'espèce, l'organe et l'état de différenciation de la cellule. Typiquement, elle est composée de 20 à 25% de cellulose, de 30% de pectines, de 20 à 30% d'hémicelluloses et 1 à 10% de protéines (Olmos *et al.*, 2017).

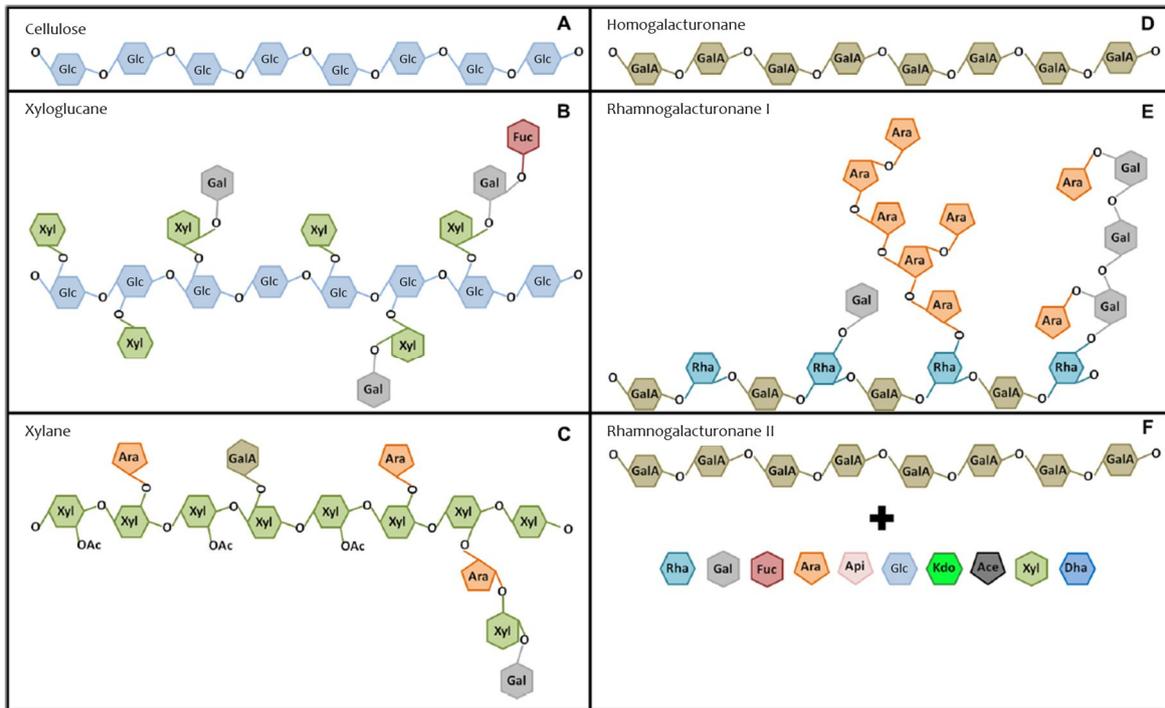


Figure 21 : Les polysaccharides majeurs de la paroi végétale.

(A) La cellulose est une longue chaîne constituée β -(1-4) Glucose (Glc). (B) le xyloglucane (hémicellulose) est constitué d'un corps de glucoses liés β -(1-4) avec des ramifications de type Glc (6-1)-xylose(Xyl), Glc (6-1)-Xyl-(2-1)-galactose (Gal), ou Glc (6-1)-Xyl-(2-1)-Gal-(2-1)-fucose(Fuc). (C) Les xylanes (hémicellulose) sont constitués d'un corps de β (1-4) xylose pouvant être lié soit avec son carbone 2 ou 3 avec de l'arabinose (Ara), de l'acide galacturonique (GalA) ou avec Ara-(2-1)-Xyl-(2-1)-Gal. Les xyloses peuvent être o-acétylés (OAc). (D) Les homogalacturonanes (HG) (pectine) sont constitués d'un corps d' α -(1-4) GalA. (E) le rhamnogalacturonane I (RGI) (Pectine) est constitué d'un corps GalA-(4-1)-Rhamnose(Rha)-(2-1)-GalA qui se répète. Le Rha du corps peut avoir des ramifications plus ou moins longues de type Rha-(4-1)-Gal ou Rha-(4-1)-Ara. (F) le rhamnogalacturonane II (RGII) est composé d'un corps d'HG lié avec diverses ramifications : Rha, Gal, Fuc, Ara, apiose (Api), Glc, acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo), acide L-acérique-O-acétylé (Ace), Xyl et acide 3-désoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha) (Somssich *et al.*, 2016).

La paroi primaire de type I est retrouvée chez les Eudicotylédones, les Monocotylédones non-communes, et les Gymnospermes (Minic & Jouanin, 2006). Les espèces végétales qui appartiennent à la famille des *Poaceae* possèdent un type de paroi particulier appelé paroi de type II (Carpita & Gibeaut, 1993; Carpita, 1996; Carpita *et al.*, 1996). La paroi primaire de type I est composée de microfibrilles de cellulose, incluses dans une matrice constituée d'hémicelluloses, de pectines et de glycoprotéines [Fig 21]. La cellulose est un polymère comportant 500 à 14 000 résidus de β -1,4-D-glucopyranose, et synthétisée au niveau de la membrane plasmique *via* des complexes de cellulose synthase (McFarlane *et al.*, 2014). Les

hémicelluloses sont des polysaccharides de la paroi primaire composées d'une chaîne principale de sucres, liés en β -(1,4) (Yang *et al.*, 2007; Scheller & Ulvskov, 2010). Chez les plantes Eudicotylédones, l'hémicellulose la plus abondante dans la paroi primaire est le xyloglucane. Il est constitué d'une chaîne principale de β -(1,4)-D glucose, avec des chaînes latérales composées de résidus D-xylose, D-xylose-D-galactose ou D-xylose-D-galactose-L-fucose. Les pectines sont des polysaccharides constitués principalement d'homogalacturonane (HG), de rhamnogalacturonane I (RGI) et de rhamnogalacturonane II (RGII). Elles se composent soit d'une chaîne principale d'acide galacturonique (RGII et HG), soit d'une chaîne principale d'acide galacturonique et de rhamnose alternés (RGI) (Willats *et al.*, 2001; Ridley *et al.*, 2001).

La paroi primaire contient également des glycoprotéines et protéoglycans formant des réseaux dans les parois des cellules végétales. Elles sont réparties en trois classes : Les *Glycin Rich Proteins* (GRP), les *Prolin Rich Proteins* (PRP) et les *Hydroxyprolin Rich Glyco-Proteins* (HRGP). Parmi les HRGP sont distinguées les extensines (glycoprotéines), les arabinogalactanes protéines (AGPs) et les lectines. Les extensines ont fait l'objet d'une revue bibliographique placée en annexe 1.

Différents outils sont utilisés pour étudier la paroi végétale. De nombreux anticorps reconnaissant des motifs oligosaccharidiques associés aux glycopolymères pariétaux sont utilisés en analyses biochimiques ou histochimiques. De plus, la composition monosaccharidique des glycopolymères peut être étudiée par des approches de chromatographie couplées ou non à la spectrométrie de masse.

IV-2-2 Les structures des arabinogalactanes protéines (AGPs)

Les AGPs furent découvertes en 1969, dans une suspension cellulaire d'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus L.*) (Aspinall *et al.*, 1969; Lamport & Várnai, 2013). Les AGPs sont des protéoglycane que l'on retrouve chez les Bryophytes et les plantes supérieures (Ellis *et al.*, 2010). Elles forment une famille complexe de protéoglycane de haut poids moléculaire [Fig 22] assez ubiquitaire chez les plantes. En effet, on les trouve dans les parois cellulaires, les membranes plasmiques, le tonoplaste et les espaces intercellulaires.

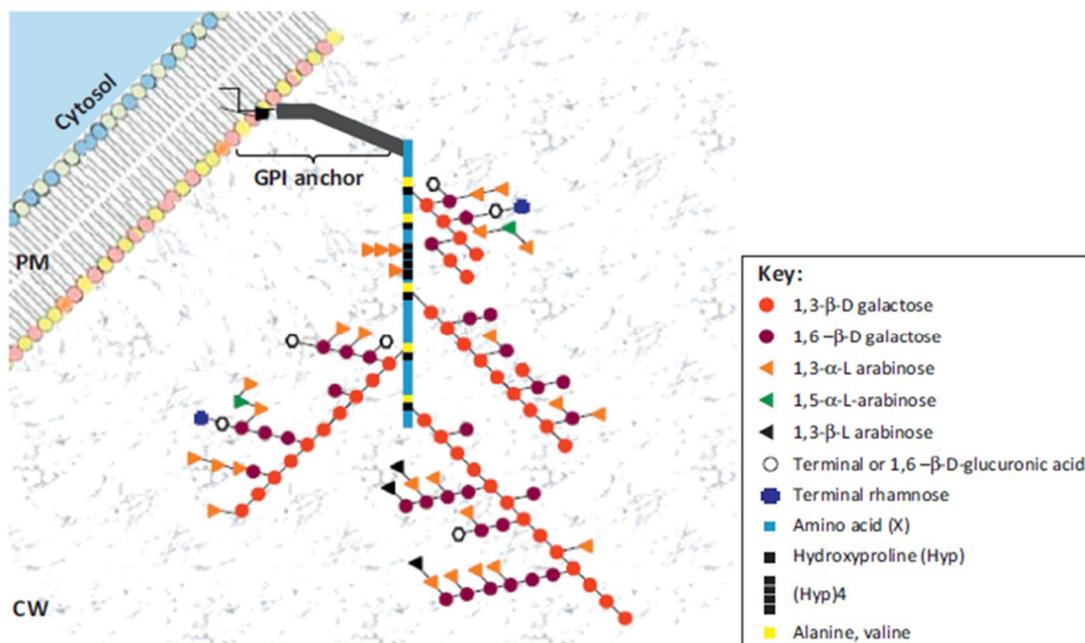


Figure 22 : Structure des arabinogalactanes protéines (AGPs).

Les principaux sucres constitutifs des AGPs sont le galactose et l'arabinose, avec la présence de sucres mineurs tels que le rhamnose et l'acide glucuronique. Les AGPs peuvent être ancrées à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Nguema-Ona *et al.*, 2013).

PM : membrane plasmique ; CW : paroi cellulaire.

Les AGPs sont composées d'un corps protéique représentant 1 à 10% de la molécule. Ce corps est riche en hydroxyproline, proline, alanine, sérine et thréonine, avec des motifs dipeptides tels que l'alanine-hydroxyproline, la sérine-hydroxyproline, la valine-proline, la glycine-proline et la thréonine-proline. Ce corps protéique est O-glycosylé au niveau des résidus hydroxyproline par des arabino-3,6-galactanes. La partie glycanique des AGPs représente 90 à 98% de la molécule (Ellis *et al.*, 2010; Lamport & Várnai, 2013). Les monosaccharides constituant la partie glycanique des AGPs sont majoritairement du galactose et de l'arabinose formant des chaînes arabinogalactanes de type II, où le galactose peut être lié

en 1,3 et 6. D'autres sucres composent les AGPs, tels que le rhamnose, le fucose, le xylose et l'acide glucuronique. La plupart des résidus d'hydroxyproline sont O-glycosylés, mais de courts arabinosides sont également présents (Ellis *et al.*, 2010). De plus, les AGPs peuvent disposer d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) en C-terminal, leur permettant de s'accrocher au niveau des membranes plasmiques, des vésicules et du tonoplaste (Olmos *et al.*, 2017).

La famille des AGPs est subdivisée en six sous-familles: les AGPs classiques, les peptides AGPs, les AGPs riches en lysine, les AGPs de type fascicine (Fasciclin-like AGP), les AGPs non classiques et les AGPs chimériques (Showalter *et al.*, 2010).

Pour étudier les AGPs, différents outils ont été développés. Le réactif de β -glucosyl-Yariv, composé de couleur rouge-brun, est le plus fréquemment utilisé. Les AGPs ont la capacité de se lier spécifiquement au réactif β -glucosyl-Yariv. Même si le mécanisme de complexation est mal compris, il a été montré qu'il faut au minimum une chaîne de 7 résidus β -1,3-galactose pour que les chaînes arabinogalactanes de type II soient précipitées par le β -glucosyl-Yariv (Kitazawa *et al.*, 2013). Ce réactif est très utile pour la détection, la quantification et la purification de nombreuses AGPs (Yariv *et al.*, 1967; Lamport *et al.*, 2006; Kitazawa *et al.*, 2013). D'autre part, le développement d'un grand nombre d'anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre des épitopes d'AGPs constitue le principal outil de localisation subcellulaire de ces protéoglycanes (Yates *et al.*, 1996; Moller *et al.*, 2008).

IV-3 Les fonctions majeures du RET

Outre la présence de glycomolécules et de métabolites secondaires au sein du mucilage, la présence d'ADN extracellulaire a également été décrite chez plusieurs espèces végétales (Wen *et al.*, 2009; Koroney *et al.*, 2016). Cet ADN semble être impliqué dans des mécanismes de défense vis-à-vis d'agents pathogènes (Wen *et al.*, 2009, 2017). En effet, le traitement de l'apex racinaire de pois par des ADNases augmente la colonisation de la coiffe par le champignon *Nectria haematococca*. L'ADN extracellulaire est un élément important et bien étudié du système immunitaire animal. Lors d'une infection, les polynucléaires neutrophiles sécrètent de l'ADN extracellulaire capable d'inhiber la croissance ou de détruire de nombreuses bactéries ou champignons pathogènes (Brinkmann, 2004; Brinkmann & Zychlinsky, 2007; Wartha *et al.*, 2007). C'est par analogie avec la structure décrite chez les polynucléaires neutrophiles, appelé *Neutrophil Extracellular Trap* (NET), que Driouich *et al.*, en 2013, ont proposé le *Root Extracellular Trap* (RET) pour nommer l'ensemble constitué des cellules frontières et du mucilage associé [Fig 23].

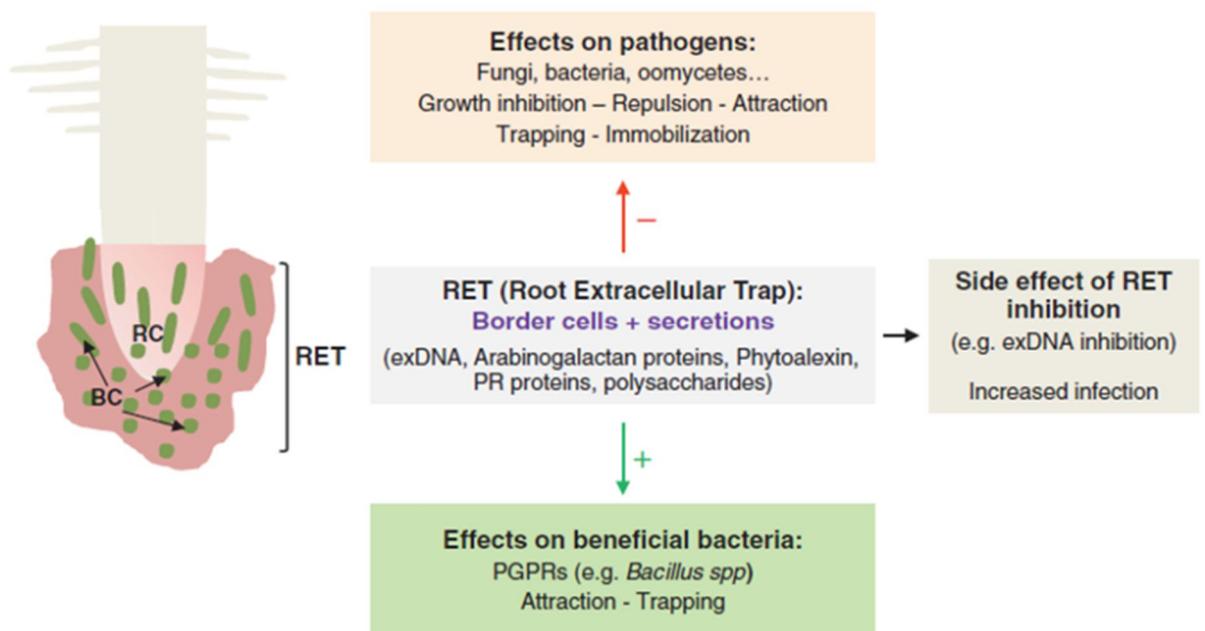


Figure 23 : Modèle de fonctionnement du Piège Extracellulaire de Racine (PER) ou Root Extracellular Trap (RET).

Le RET est formé par les cellules frontières et le mucilage associé. Le RET contient diverses molécules (protéines anti-microbiennes, AGPs, ADN extracellulaire, etc...) synthétisées et sécrétées par les cellules frontières. Plusieurs travaux montrent la capacité du RET à modifier les interactions plante(s)-microorganisme(s) et à participer ainsi à la protection de la plante. Lorsque la formation du RET est expérimentalement inhibée, de sévères symptômes infectieux sont observés (d'après Driouich *et al.*, 2013).

BCs : Border Cells ; ExDNA : Extracellular DNA ; PRs : Pathogenesis Related Proteins ; PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria ; RC : Root Cap..

Au sein du RET, les glycopolymères, et plus particulièrement les AGPs, semblent jouer un rôle dans les interactions plantes-microorganismes. Les AGPs peuvent inhiber la croissance des pathogènes, par attraction-immobilisation ou par répulsion [Fig 24] (Cannesan *et al.*, 2011). Il a également été montré un effet d'attraction et d'adhésion vis-à-vis de PGPRs sur les cellules frontières, *via* des AGPs, chez *A. thaliana* (Vicré *et al.*, 2005).

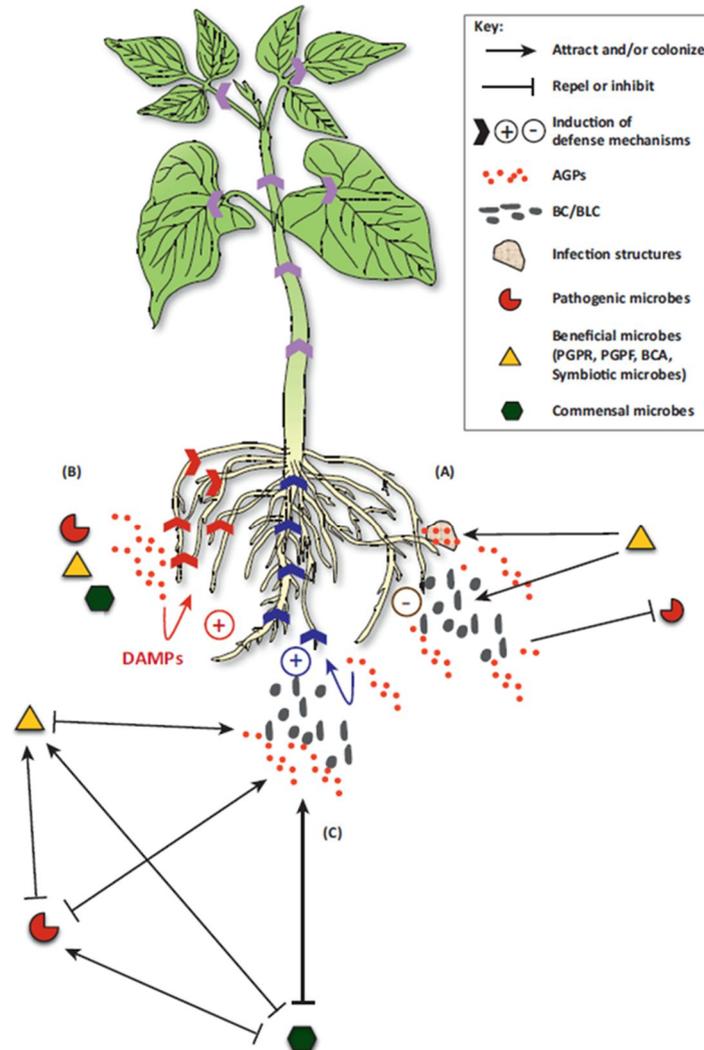


Figure 24 : Diversité des rôles possibles des AGPs dans les interactions entre les microorganismes telluriques et la racine.

(A) Les AGPs ont la capacité d'attirer les microorganismes qui vont adhérer sur la racine, puis développer des structures d'infection. Cependant les AGPs sont aussi capables de repousser les microorganismes et / ou d'inhiber leur développement. (B) Les microorganismes du sol sont capables de dégrader les AGPs de la racine, libérant potentiellement des oligosaccharides et / ou des glycopeptides sous forme de motifs DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) qui activeraient des mécanismes de défense chez la plante (flèches rouges). (C) Les AGPs sécrétées peuvent également favoriser la colonisation de la rhizosphère par des microorganismes bénéfiques tels que des PGPRs ou agents de biocontrôle, qui vont permettre d'activer l'ISR (résistance systémique induite) (flèches bleues) ou d'inhiber les pathogènes et réprimer la maladie. Les flèches violettes indiquent une possible induction et ou modulation des mécanismes de défense dans les parties aériennes, suite à l'activation de mécanismes de défense par des produits de dégradation d'AGPs (B) ou par des microorganismes bénéfiques (C). (-) : répression du système immunitaire des plantes (A); (+) : activation du système immunitaire des plantes (B, C)(Nguema-Ona *et al.*, 2013).

Le RET est une notion récente (Driouich *et al.*, 2013), qui implique qu'il y a encore peu de données disponibles dans la littérature sur son rôle et son fonctionnement. La majorité des données disponibles sur l'implication du RET et de l'ensemble des exsudats racinaires est liée à des stress biotiques. Toutefois quelques études concernant les stress abiotiques ont été entreprises, notamment sur les métaux lourds. Néanmoins, à ce jour il n'y a pas de donnée sur de possibles implications du RET dans un autre type de stress abiotique. En effet, l'implication potentielle du RET dans la défense racinaire face aux stress liés à notamment : à une modification de la température, à une ou des carence(s) en nutriments ou encore à un stress hydrique reste encore à explorer.

V-Le contexte de la thèse

V-1 La grande muraille verte

Cette thèse est codirigée par le Dr M-L. Follet-Gueye, maître de conférences HDR à l'Université de Rouen (Laboratoire GlycoMEV), et le Dr D. Goffner, directrice de recherche CNRS, UMI 3189, Marseille (laboratoire Environnement, Santé, Sociétés). Le Dr. Goffner travaille au sein de l'Observatoire Hommes-Milieus Téssékéré, au Sénégal. Les Observatoires Hommes-Milieus (OHM) se consacrent à l'étude de socio-écosystèmes fortement impactés par l'homme sur les plans écologique, économique et social. L'OHM Téssékéré se situe dans le Ferlo, région du Nord du Sénégal, et étudie le système socio-écologique qui entoure la mise en place du projet panafricain de la grande muraille verte (GMV).

Ces dernières décennies, la hausse des températures, de faibles précipitations, l'aridité omniprésente et l'avancée du désert sur les terres cultivables sont de plus en plus présentes dans la zone subsaharienne. Ces modifications environnementales perturbent les écosystèmes à toutes les échelles, du microorganisme aux pachydermes, en passant par la flore et l'homme. C'est dans ce contexte, et pour combattre la désertification, que 11 pays situés en zone sahélienne ont adopté l'initiative du projet panafricain, appelé la Grande Muraille Verte (GMV). L'objectif global de la GMV est de contribuer i) à la lutte contre l'avancée du désert, ii) à la mise en valeur des zones saharo-sahéliennes pour une gestion durable des ressources naturelles et iii) à la lutte contre la pauvreté. Il s'agit de l'édification d'un ensemble de zones de reboisement d'environ 15 km de large traversant à terme tout le continent africain (7000 km d'est en ouest), entre le Sénégal et Djibouti [Fig 25].

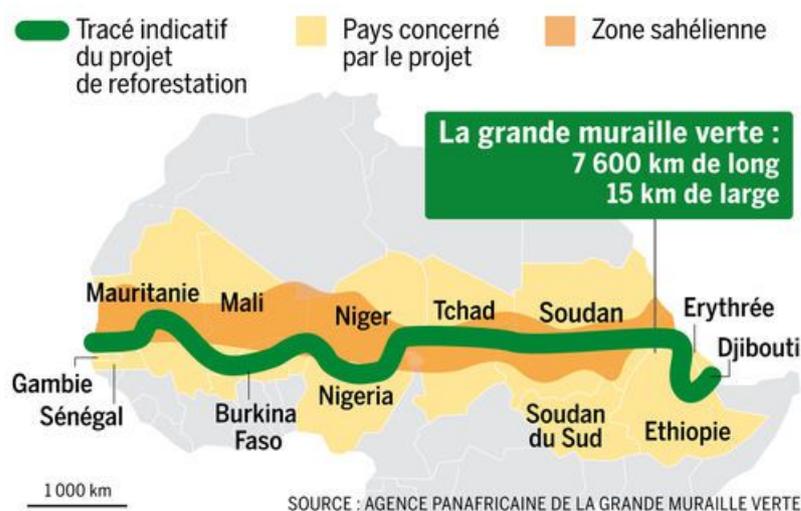


Figure 25 : Carte représentant le tracé du projet de reforestation de la grande muraille verte.

V-2 Les modèles végétaux

En 2009, lors d'un colloque scientifique international au Sénégal, des espèces végétales ont été choisies pour le reboisement de la GMV (Réf *Web2*). Puis lors d'études préliminaires *in situ* sur la survie après plantation en terre dans une parcelle expérimentale au Sénégal, 3 plantes ont été sélectionnées pour ce projet de thèse pour leur degré de tolérance différente à l'aridité. Ces plantes sont *Balanites aegyptiaca* (Delile), *Acacia tortilis* subsp *raddiana* (Savi) et *Tamarindus indica* (Linné). *B. aegyptiaca* et *A. raddiana* présentent une capacité de survie remarquable aux milieux arides et semi-arides, contrairement à *T. indica* qui se développait pourtant dans cette zone il y a 30 ans.

V-2-1 *Balanites aegyptiaca*

B. aegyptiaca, couramment appelé le dattier du désert, est un arbre de la famille des *Zygophyllaceae*, une famille composée d'arbres, d'arbustes ou de plantes herbacées des régions tempérées à tropicales, souvent dans les zones arides [Fig 26].



Figure 26 : *Balanites aegyptiaca* (www.teline.fr).

B. aegyptiaca est un petit arbre épineux atteignant 10 m de hauteur et 50 cm de diamètre. Ses épines peuvent atteindre 12 cm de longueur. Il produit des drupes jaunes ou rougeâtres, dont la pulpe renferme une graine d'environ 15 mm, protégée par un noyau très dur. Cette espèce

tolère des pluviométries variant de 250 mm à 1000 mm par an, et supporte une gamme variée de températures allant de 20°C à 45°C. Elle pousse sur des sols sableux à sablo-limoneux (Eyog Matig *et al.*, 2006). *B. aegyptiaca* a su adapter son système aérien pour mieux tolérer les conditions semi-arides ou arides de la zone sub-saharienne. En effet, ses feuilles sont petites, rugueuses, riche en stomates, recouvertes de cuticules cireuses et de trichomes (Radwan, 2007). Les auteurs suggèrent que ces adaptations foliaires permettent à *Balanites* une meilleure assimilation du CO₂, de diminuer les radiations solaires pouvant inhiber la photosynthèse, d'améliorer les flux d'air chaud et de vapeur, de diminuer la transpiration lors de sa respiration et de protéger ses feuilles du dessèchement.

Cette espèce est cultivée depuis la haute antiquité, en Egypte, au Sud du Sahara en général, et dans la région soudano-sahélienne en particulier, où elle occupe une place importante dans la vie quotidienne des populations. En effet, grâce à ses fruits, ses feuilles, son huile et ses divers autres produits, cette essence constitue une importante source alimentaire complémentaire. Les parties de *B. aegyptiaca* utilisées sont le fruit, la pulpe, l'amande, et la coque. Le fruit est légèrement laxatif et contient une gomme, douce et amère, mangée comme un bonbon, et vendu sous le nom de dattier sauvage. La pulpe sucrée du fruit est comestible crue ou cuite, fraîche ou séchée. Cette pulpe sert parfois à préparer un jus de fruit ou une boisson alcoolisée. Les noyaux représentant 50 % du poids du fruit et les amandes contenant 40 % d'huile sont également comestibles pour l'homme. Les rameaux et les fruits, une fois tombés au sol, peuvent être utilisés pour nourrir le bétail (Eyog Matig *et al.*, 2006).

En médecine et en pharmacopée traditionnelle, *B. aegyptiaca* est très utilisé pour lutter contre une large gamme de maladies. L'espèce semble posséder des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anticancéreuses, diurétiques, hypocholestérolémiantes, antivirales, antidiabétiques, hépatoprotectrices, larvicides, anti-inflammatoires et analgésiques, antivenin, anthelmintiques et cardioprotectrices. L'écorce, les fruits, les graines, l'huile issue des graines et les feuilles de cette plante sont largement utilisées en médecine traditionnelle. Ces dernières années, la recherche a privilégié l'étude de l'utilisation de médicaments traditionnellement utilisés dans le traitement de diverses maladies (Morsy *et al.*, 2010; Chothani & Vaghasiya, 2011).

Les amandes de *B. aegyptiaca* sont transformables en savon. Les noyaux moulus donnent une sorte de tourteau huileux. On les emploie aussi comme bibelots ou comme jetons de jeu. L'amande contient environ 50 % de lipides et donne une huile alimentaire après broyage

et trempage dans l'eau bouillante. *B. aegyptiaca* peut aussi être utilisé pour décontaminer les points d'eau, car l'arbre n'est pas toxique pour l'homme et les animaux domestiques. Les racines et les écorces, riches en saponine, sont utilisées comme narcotique pour le poisson. Le bois, réputé résistant aux termites et autres insectes xylophages, est utilisé en artisanat (manche de houe, lit...) (Eyog Matig *et al.*, 2006).

V-2-2 *Acacia raddiana*

L'*A. raddiana* est généralement un arbre, mais il peut être parfois arbuste ou buisson faisant partie de la famille des *Fabaceae*. Il mesure entre 1,5 et 18 m de hauteur, et peut aller occasionnellement jusqu'à 21 m. L'écorce de son tronc est généralement rugueuse et fissurée, grise à noire ou brun foncé (Floc'h & Grouzis, 2013) [Fig 27].



Figure 27 : *Acacia raddiana* (www.ecologie.ma).

A. raddiana est répandu dans toute l'Afrique, (de l'Afrique du Sud à l'Algérie en passant par l'Egypte) et au moyen-Orient (présent en Israël et au sud de l'Arabie), et en Asie. Cette plante est décrite comme pouvant relativement bien s'adapter à la sécheresse. En effet, les échanges gazeux foliaires (transpiration et photosynthèse) sont élevés en saison des pluies et correspondent à un relatif équilibre thermodynamique sol-plante. Au cours de la saison sèche, il y a une diminution de l'intensité transpiratoire, attribuable à la fois à la perte du feuillage et à la réduction de la conductance stomatique. Ces propriétés traduisent une bonne adaptation aux conditions d'aridité (Floc'h & Grouzis, 2013).

Il a aussi été démontré que les racines s'allongent d'autant plus en profondeur que l'humidité du sol de culture décroît. Cela traduit une grande aptitude des jeunes plants à rechercher l'humidité. C'est aussi un caractère d'accommodation aux variations saisonnières de disponibilité en eau de son milieu naturel, car il permet à la plante d'exploiter dès le stade jeune les horizons inférieurs du sol plus humides, et d'atteindre plus rapidement ces zones profondes pour survivre à la longue saison sèche (Floc'h & Grouzis, 2013).

Les diverses utilisations des différentes parties de l'acacia sont assez reconnues. Un grand intérêt fourrager pour nourrir entre autres les chèvres et les dromadaires, avec les feuilles, les gousses, les jeunes rameaux et même les épines (Floc'h & Grouzis, 2013).

En cas de disette, il est possible d'utiliser l'acacia pour l'alimentation humaine, mais il semblerait que ce recours soit anecdotique en dehors des périodes d'insuffisance de disponibilités alimentaires. Les graines des gousses séchées, collectées puis pilées au mortier de bois, sont transformées en une farine qui est consommée telle quelle, sèche ou humectée d'un peu d'eau. Cette farine est aussi parfois mélangée à de la farine de blé, de mil ou encore d'orge pour faire des bouillies. Par ailleurs, en période de grave disette, il arrive que les hommes consomment également les feuilles crues. La gomme qui s'écoule des blessures des parties basses des troncs est très amère quand elle est molle et fraîche. Cette amertume est moindre à l'état solide, mais cette gomme n'est cependant que peu consommée comme aliment, alors que la gomme qui exsude des branches hautes des jeunes arbres est parfois mâchée par les enfants (Floc'h & Grouzis, 2013).

L'acacia est lui aussi utilisé pour divers usages en médecine populaire. Sa gomme peut être utilisée pour panser les blessures et les brûlures. La consommation de la gomme d'acacia est utilisée pour soulager les maux de ventre. Elle peut être dissoute dans l'eau est utilisée pour traiter les affections oculaires, la jaunisse et les maladies pulmonaires. L'écorce est réduite en poudre est active la cicatrisation et la désinfection des plaies (Floc'h & Grouzis, 2013; Kumar Bhateja & Singh, 2014; Alli *et al.*, 2016; Maroyi, 2017).

Le bois d'acacia est utilisé comme combustible avec un pouvoir calorifique relativement élevé. Le charbon de bois qu'il procure est également apprécié. De plus, le bois est utilisé pour la fabrication des poulies et des supports de poutre pour le puisage de l'eau. Il peut aussi être utilisé pour la fabrication d'objets (mortiers, plats, piquets centraux de tente, clôtures, etc.) en cas de non-disponibilité de bois de *B. aegyptiaca*. Il n'est cependant pas utilisé pour la construction car considéré comme trop cassant (Floc'h & Grouzis, 2013).

V-2-3 *Tamarindus indica*

T. indica est originaire de Madagascar et d’Afrique orientale. C’est un arbre de la famille des *Fabaceae*, qui est actuellement répandu dans toute l’Afrique tropicale semi-aride et au sud de l’Asie. L’arbre résiste aux grands vents et aux fortes pluies grâce à son système racinaire très profond. Il exige une pluviométrie minimale de 500 mm par an et une température minimale de 20°C (Réf Web3 ; Réf Web4). Les branches de *T. indica* peuvent atteindre 20 m de haut et 80 cm de diamètre. Il dispose d’une cime dense et sphérique et une écorce grise crevassée et écailleuse (Eyog Matig *et al.*, 2006) [Fig 28].



Figure 28 : *Tamarindus indica* (www.seedsforafrica.co.za).

T. indica est généralement planté dans les zones sèches d’Afrique Centrale et de l’Ouest pour ses fruits, l’ombrage et la protection du sol. Les parties utilisées de la plante sont : les fruits, les feuilles, les fleurs, les rameaux, les racines, l’écorce et le bois. Le fruit est un condiment alimentaire. La pulpe de *T. indica* est très riche en vitamine C. Elle donne par macération dans de l’eau froide (ou tiède) additionnée au sucre ou au miel, une boisson acidulée très rafraîchissante. La pulpe est également consommée sous forme de bouillie. Au Burkina Faso et en Côte d’Ivoire, elle fait l’objet de produits industriels : jus de tamarin, bonbon de tamarin, etc. Les fleurs et les feuilles sont d’excellents fourrages. Les feuilles sont douées de propriétés vermifuges. Elles soignent la fièvre et la diarrhée. Elles sont très appréciées du bétail.

Les fleurs sont préconisées contre certaines infections du foie. Le fruit a des propriétés laxatives et est couramment utilisé en Afrique de l'Ouest pour soigner le rhume, l'ictère, les vers intestinaux, l'amibiase, les affections intestinales infantiles, la folie, l'impuissance et la stérilité. Ces fruits macérés dans de l'eau et légèrement salés sont absorbés contre les troubles de la vue. La poudre de la graine sert à coaguler le caoutchouc ; il en est de même de la pulpe du fruit en décoction. De plus, la poudre des graines et la gousse additionnée de cuivre servent à teindre les tissus. Les graines sont employées dans la fabrication de la poudre à fusil. Les racines utilisées en décoction auraient des propriétés aphrodisiaques. Les racines, les rameaux et les écorces de *T. indica* ont des propriétés médicinales. Ils sont purgatifs et diurétiques. Les racines sont généralement utilisées pour traiter la conjonctivite, l'ophtalmie et la paralysie. Les écorces servent dans le traitement des coliques, la constipation, l'ictère, l'hépatite, la gonococcie, la toux, les plaies, l'asthme etc. Les rameaux sont des fortifiants qui entrent dans le traitement de l'hépatite, des coliques, de la fièvre et de la bronchite. Le bois est utilisé en construction et en charonnage. Il sert à la fabrication des mortiers, des pilons, des manches d'outils etc. C'est un excellent bois de feu (Eyog Matig *et al.*, 2006).

V-2-4 Le système racinaire de *B. aegyptiaca* et *A. raddiana*

Peu de données sont disponibles sur le système racinaire de ces 3 plantes. Cependant en 2013, Logbo *et al.*, ont étudié le système racinaire de *B. aegyptiaca* et *A. raddiana* face à un stress hydrique en milieu naturel et en station (Sénégal). Les auteurs ont remarqué que depuis quelques décennies, il y avait une diminution du couvert ligneux au sein de la zone subsaharienne. Ils notent également que le système racinaire de *B. aegyptiaca* est plus profond par rapport à l'*A. raddiana*, respectivement 187 cm et 100 cm. Cependant l'*A. raddiana* a un système racinaire plus ramifié sur sa longueur [Fig 29] (Logbo *et al.*, 2013).



Figure 29 : Représentation du système racinaire de *B. aegyptiaca* et d'*A. raddiana*.

En milieu naturel, l'architecture racinaire d'*A. raddiana* (A) et de *B. aegyptiaca* (B) est différente. Plus profonde pour *B. aegyptiaca* et plus ramifiée pour l'*A. raddiana*. Figure modifiée (d'après Logbo *et al.*, 2013).

De plus, *A. raddiana* présente une longueur racinaire maximale plus grande que *B. aegyptiaca* en milieu naturel, respectivement 16,4 m et 6,5 m. Or c'est l'inverse en station : *B. aegyptiaca* présente alors une longueur racinaire maximale plus grande que l'*A. raddiana*, respectivement 74,3 m et 25 m (Logbo *et al.*, 2013).

Par ailleurs, en station, le système racinaire de *B. aegyptiaca* est plus ramifié en surface qu'en profondeur par rapport à *A. raddiana* [Fig 30].

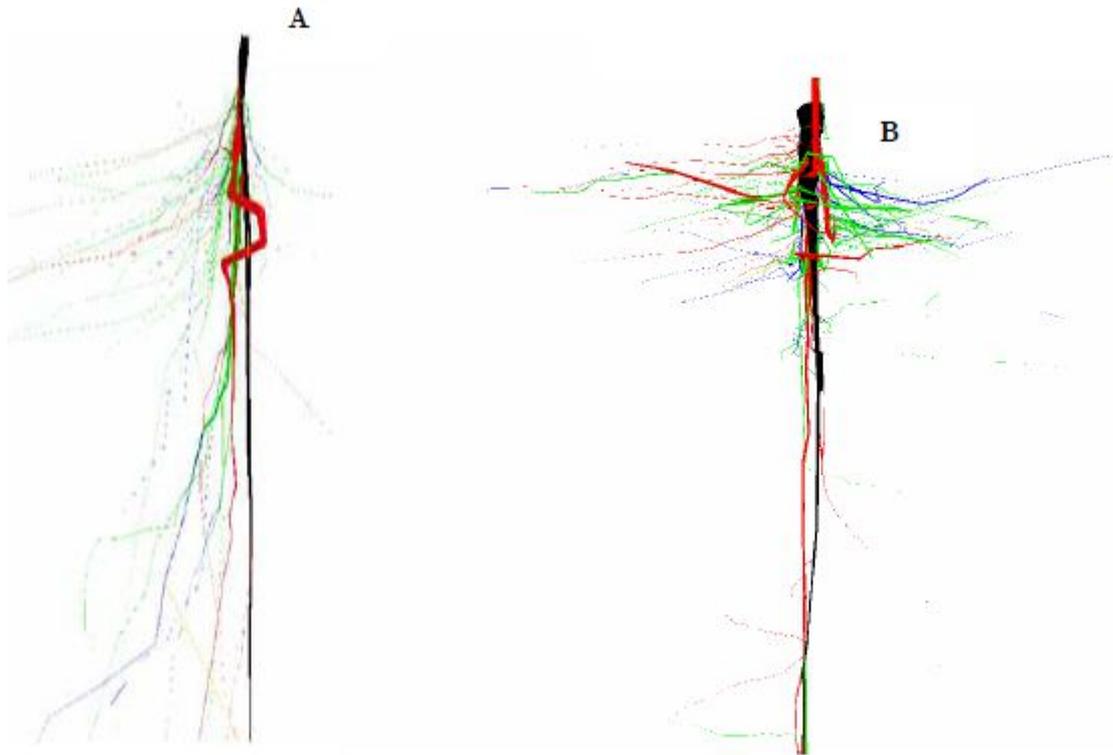


Figure 30 : Architecture racinaire en station de *B. aegyptiaca* et d'*A. raddiana*.

En station, l'architecture racinaire d'*A. raddiana* (A) et de *B. aegyptiaca* (B) est différente. Une ramification du système racinaire plus importante pour *B. aegyptiaca* et par rapport à *A. raddiana* (d'après Logbo *et al.*, 2013).

De plus, Logbo *et al.* (2013) indiquent que les espèces dont le système racinaire est plus profond tolèrent mieux la sécheresse, d'où l'importance de l'architecture du système racinaire face à un stress hydrique pour la recherche d'eau et de nutriments. De plus, nous avons vu l'importance du RAM dans la croissance racinaire ainsi que sa coiffe qui le protège des agressions physico-chimiques. Cependant quels sont les acteurs moléculaires qui peuvent participer à la tolérance à la sécheresse ? Quel peut être le rôle du RET dans cette tolérance ?

VI-Les objectifs de thèse

Au sein de la Grande Muraille Verte, les conditions de vie sont très rudes pour la survie de jeunes plantes. En effet, la saison des pluies ne dure que 2 mois par an, des stratégies doivent être mises en place par les plantes afin d'assurer leur pérennité. Comme évoqué précédemment, il est crucial lors des premiers stades de développement d'une plante, qu'elle accroisse rapidement son système racinaire, afin qu'il soit le plus efficace possible pour explorer le sol et y récupérer de l'eau et des nutriments.

Or pour maintenir une croissance racinaire, il faut que le méristème subapical de racine reste viable, malgré les agressions physicochimiques (abrasion lors de l'enracinement) ou encore biologiques (attaque de pathogènes). Pour maintenir l'intégrité du méristème subapical de racine, la coiffe racinaire est composée de cellules frontières associées à un mucilage et des exsudats racinaires. Cet ensemble joue un rôle protecteur du RAM. En effet, comme évoqué dans ce manuscrit le RET et l'ensemble des exsudats racinaires sont fortement impliqués notamment dans les interactions plantes-microorganismes telluriques. Cependant, la caractérisation du RET est un sujet de recherche récent. Cela implique qu'il y a peu de données disponibles sur ses rôles et son fonctionnement. Bien que des axes de recherche sur les rôles du RET et des exsudats racinaires face à des stress biotiques aient été entrepris et le soient encore aujourd'hui, les mécanismes exacts ne sont pas encore totalement compris. Concernant les stress abiotiques il y a en encore moins de données. En effet, seuls les stress dus à quelques métaux lourds ont été décrits dans la littérature. Toutefois, avec les changements climatiques qui s'opèrent, notamment avec la sécheresse grandissante sur les surfaces agricoles, quelle serait l'implication du RET et des exsudats racinaires face à ce type de stress abiotique qu'est le stress hydrique ?

Ici, trois plantes ayant des degrés différents de tolérance à la sécheresse lors de leurs premiers mois de vie seront étudiées : *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* et *T. indica*. En effet, pour pouvoir reboiser la grande muraille verte, une étude préliminaire *in situ* de diverses essences ligneuses, a été réalisée suivant le mode opération décrit dans la figure ci-après [Fig 31].

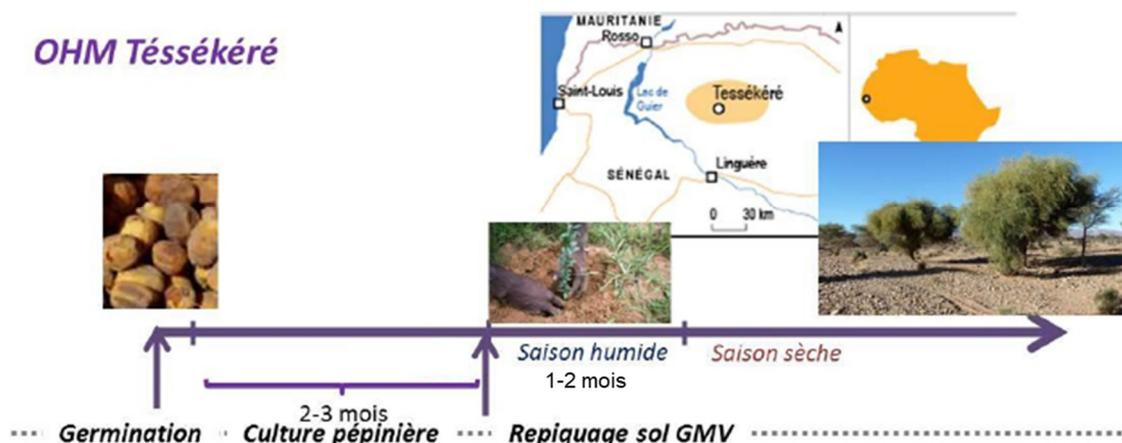


Figure 31 : Schéma de mise en culture *in situ* de *B. aegyptiaca*.

Après germination, les graines sont mises en culture dans des pépinières pendant 2 à 3 mois, puis les plantules sont repiquées au sein de la parcelle expérimentale à Tessékéré au Sénégal (D'après HDR de Marie-Laure Follet-Gueye 2014).

Après le repiquage des plantules, une étude sur la capacité de ces jeunes plantes à survivre a été menée (Wade *et al.*, 2017). Cette étude a montré différents taux de reprise 2 mois après leur plantation *in situ* [Tableau 1].

Tableau 1 : Taux de reprise d'essences ligneuses 2 mois après plantation *in situ* au sein de la parcelle expérimentale de la grande muraille verte (d'après Wade *et al.*, 2017).

Essences ligneuses	Taux de reprise 2 mois après plantation (%)
<i>Balanites aegyptiaca</i>	95,8
<i>Sclérocarya birrea</i>	94,9
<i>Acacia nilotica</i>	72,5
<i>Acacia raddiana</i>	67,5
<i>Acacia senegal</i>	63,3
<i>Ziziphus mauritiana</i>	60,8
<i>Acacia seyal</i>	59,2
<i>Adansonia digitata</i>	50,8
<i>Dalbergia melanoxylon</i>	44,1
<i>Tamarindus indica</i>	31,7

Le choix des plantes étudiées durant cette thèse est basé sur ces données préliminaires.

Ces plantes vivent dans un contexte particulier, un climat de semi-aride à aride. Les adaptations morphologiques des parties aériennes expliquent leur adaptation dans cet environnement assez hostile. Cependant, lors des premières semaines de réimplantation en milieu arides et semi-arides, le développement de la racine est crucial pour la survie de la plante. Le système racinaire de ces plantes est relativement peu connu, surtout lors des stades précoces du développement, et sont si différents des modèles étudiés en laboratoire. De plus, la littérature sur leurs apex racinaires et leur RET est inexistante.

Dans ce contexte, la caractérisation de l'apex racinaire, du piège extracellulaire de racine ou *Root extracellular trap* (cellules frontières et mucilage associé) et de l'ensemble des exsudats racinaires de ces trois ligneux a été réalisée dans cette thèse. Ce travail a été conduit à partir de plantules cultivées *in vitro* par des approches d'imagerie et de biochimie. La capacité d'*Azospirillum brasilense*, une bactérie bénéfique pour la croissance racinaire notamment en cas de stress hydrique et présente dans le sol de la grande muraille verte, à métaboliser les exsudats racinaires de ces trois ligneux, a également été évaluée.

Après cette introduction bibliographique, ce manuscrit comporte successivement un chapitre matériel et méthodes (chapitre 2), une partie consacrée aux résultats majeurs obtenus et discussions associés (chapitre 3) et un dernier chapitre (chapitre 4), où une conclusion générale et les perspectives de ce travail sont présentées. Des résultats préliminaires associés à ce travail portant sur l'étude de mésocosmes sont présentés en annexe 2.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

I-Le matériel végétal

Il est décrit dans cette partie comment obtenir les différentes fractions enrichies en apex racinaire, en cellules frontières et en exsudats racinaires à partir de graines. Ces 3 fractions constituent les échantillons qui seront par la suite analysés par différentes méthodes.

I-1 Stérilisation des graines

I-1-1 *Balanites aegyptiaca*

Les graines sont extraites du noyau de leur fruit à l'aide d'un étai. Une précaution particulière doit être faite durant l'étape d'extraction pour casser l'endocarpe, afin de récupérer la graine sans endommager l'embryon [Fig 32].

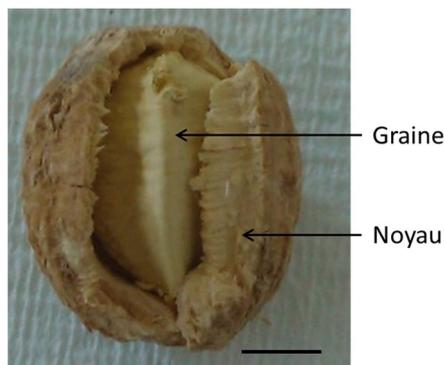


Figure 32 : Graine de *B. aegyptiaca* dans son noyau ouvert.

Échelle : 5mm

Une fois les graines extraites, une stérilisation de surface est effectuée. Sous hotte à flux laminaire stérile, les graines sont mises dans des pots stériles (6 graines par pot de 40 mL). Les graines subissent un 1^{er} bain de 20 mL d'éthanol à 70% (v/v eau distillée stérile) pendant 10 min. Une fois le 1^{er} bain terminé, l'éthanol est retiré du pot. Les graines subissent un 2^{ème} bain de 20 mL pendant 15 min d'eau de Javel 0,9% (v/v eau distillée stérile). Une fois terminé, l'eau de Javel est retirée, puis les graines sont rincées 5 fois avec 30 mL d'eau distillée stérile pendant 2 min. Une fois la stérilisation de surface terminée, les graines sont mises dans 30 mL d'eau distillée à l'obscurité pendant 48 h à 25°C afin de les imbiber.

I-1-2 *Acacia raddiana* et *Tamarindus indica*

Contrairement à *B. aegyptiaca*, les graines d'*A. raddiana* et de *T. indica* sont disponibles en sachets, déjà sorties de leurs gousses. Cependant, elles doivent être traitées avec de l'acide sulfurique pour perméabiliser leur tégument et permettre leur imbibition. Les graines sont mises par pesée dans des bouteilles de 100 mL en verre supportant la chaleur et avec des bouchons supportant les acides forts. Cent graines d'*A. raddiana* pèsent environ 7 g alors que 100 graines de *T. indica* pèsent environ 60 g. Une scarification chimique par 25 mL d'acide sulfurique à 95% est effectuée pendant 1 h sous sorbonne (à manipuler avec des gants en caoutchouc épais). Puis, l'acide sulfurique est retiré à l'aide d'une pipette en verre. Une première étape de rinçage à l'eau distillée stérile est effectuée avec la plus grande précaution, pour éviter une réaction exothermique. Une fois ce 1^{er} rinçage effectué, il faut le répéter 5 fois pour retirer toute trace d'acide sulfurique. En effet, s'il reste de l'acide sulfurique, l'ajout d'eau de Javel lors de la stérilisation, peut produire un dégagement toxique de dichlore. Par ailleurs une fois les étapes de rinçage de l'acide effectuées, l'ajout de 50 mL d'eau de Javel à 0,9% (v/v eau distillée stérile) est réalisée sous hotte à flux laminaire stérile pendant 10 min. Puis, l'eau de Javel est retirée et rincée 5 fois avec 50 mL d'eau distillée stérile. Une fois la stérilisation de surface terminée, les graines sont mises dans 50 mL d'eau distillée à l'obscurité pendant 48 h à 25°C afin de les imbiber.

I-2 Mise en culture *in vitro*

La culture stérile *in vitro* a été choisie afin de faciliter la récupération la fraction RET et la fraction exsudats racinaires. De plus, il est important d'éviter la contamination par des microorganismes qui pourrait dégrader les glycomolécules étudiées, mais aussi ajouter des enzymes. En effet, les microorganismes peuvent libérer des polygalacturonases, peroxydases etc. modifiant la composition notamment en glycomolécules mais aussi en activités enzymatiques.

I-2-1 *Balanites aegyptiaca*

La mise en culture *in vitro* des graines de *B. aegyptiaca* est effectuée sous hotte à flux laminaire stérile. Une fois l'imbibition de 48h des graines effectuées, les téguments sont retirés délicatement à l'aide de pinces stériles pour éviter les contaminations tégumentaires [Fig 33].

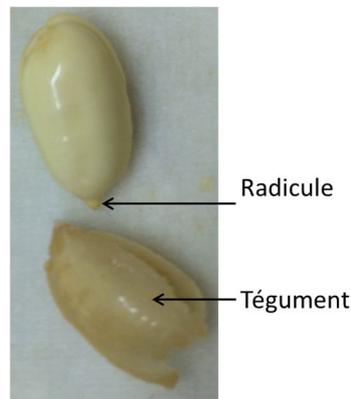


Figure 33 : Graine imbibée de *B. aegyptiaca*.

Le tégument d'une graine imbibée de *B. aegyptiaca* est retiré à l'aide de pinces stériles

Puis, elles sont placées au sein d'une boîte de Pétri carrée (120 mm) contenant 50 mL d'agar stérile à 1% (m/v) dissout dans de l'eau distillée. Pour faciliter la mise en germination de ces grosses graines, elles sont placées dans des « logettes » préalablement taillées dans la gélose, puis elles sont recouvertes d'un papier Whatman stérile imbibé de 1,5 mL d'eau distillée stérile, afin de conserver une forte teneur en humidité dans la boîte, pour faciliter la germination et le développement des plantules [Fig 34].

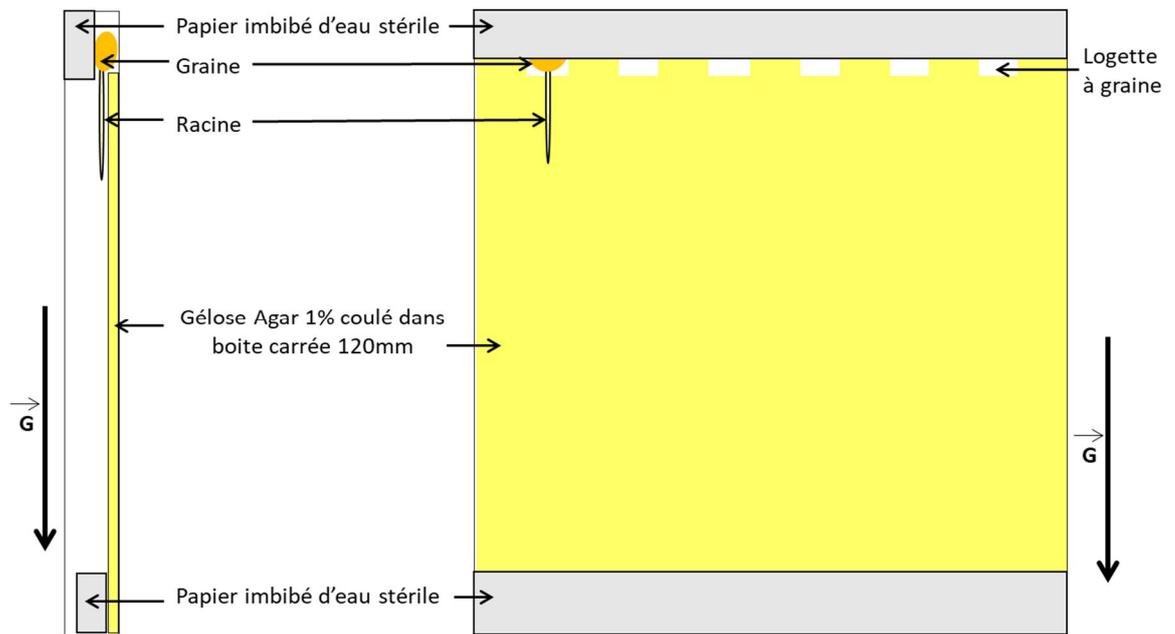


Figure 34 : Système de mise en culture *in vitro* (germination) des graines de Balanites et de Tamarin.

\vec{G} : gravité terrestre

La taille des graines ne permet que de mettre 6 graines par boîte de Pétri carrée. Une fois le système mis en place, il est fermé avec un ruban adhésif micropore qui permet les

échanges gazeux tout en gardant la stérilité au sein de la boîte. Les boîtes sont mises verticalement à 25°C et à l'obscurité.

Grâce à ce système vertical, peu de racines sont en contact avec la gélose, ce qui minimise la perte des cellules frontières et des sécrétions de la racine dans la gélose.

I-2-2 *Acacia raddiana*

La mise en culture *in vitro* des graines est effectuée sous hotte à flux laminaire stérile. Une fois l'imbibition de 48 h des graines effectuées, les graines sont mises à germer horizontalement dans une boîte de Pétri carrée (120 mm) contenant 25 mL d'agar à 1% (m/v) dissout dans de l'eau distillée stérile. Les graines sont déposées sur du papier Whatman stérile imbibé de 2 mL d'eau distillée stérile, à 25°C à l'obscurité [Fig 35]. Le système est fermé avec un ruban adhésif micropore.

Malheureusement, la taille des graines étant nettement plus petite que celles de balanites ou que celles du tamarin, le système évoqué précédemment n'était pas le plus adapté pour *A. raddiana*.

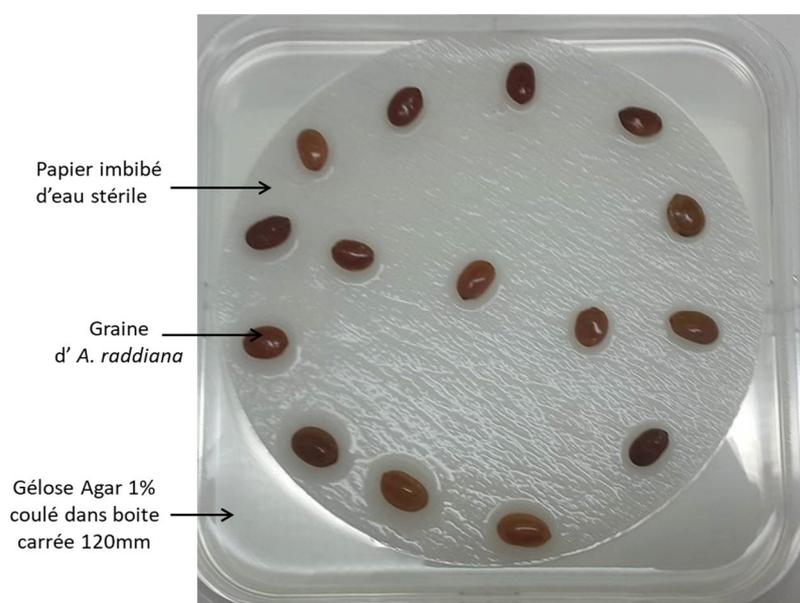


Figure 35 : Système de germination *in vitro* des graines d'*A. raddiana*.

I-2-3 *Tamarindus indica*

Après une imbibition de 48 h à 25°C, un épais mucilage visqueux enrobe les graines, rendant la manipulation des graines relativement délicate [Fig 36].

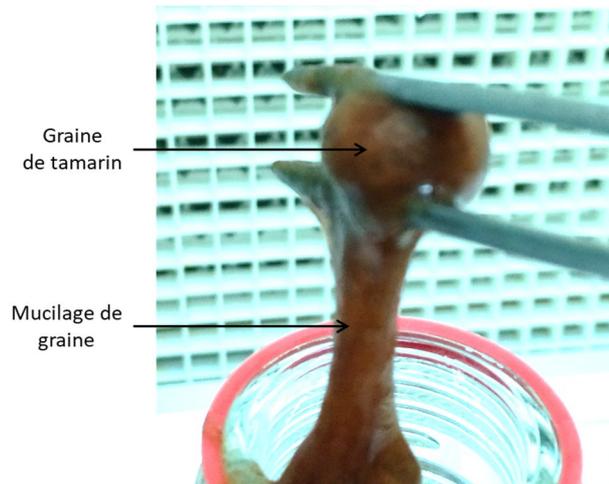


Figure 36 : Mucilage de graine de *T. indica*.

Plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile sont effectués pour retirer ce mucilage tégumentaire avant la mise en germination qui est strictement identique à celle effectuée pour les graines de *B. aegyptiaca*.

I-3 Récupération des différentes fractions enrichies brutes

Lors de la récupération des différentes fractions avec 3 plantes différentes ayant des vitesses de croissance distinctes, une normalisation non pas sur l'âge des plantules a été effectuée, mais plutôt sur une taille de racine primaire similaire. La taille choisie est comprise entre 2 et 4 cm à partir de la pointe racinaire. En effet, dans les mêmes conditions de culture, il faut entre 7 à 14 jours pour que les racines de balanites et de tamarin fassent entre 2 et 4 cm, alors qu'il n'en faut que 3 pour l'acacia.

Lorsque les racines ont une longueur comprise entre 2 et 4 cm, les plantules sont transférées en conditions stériles, dans un corning 50 mL (1 plantule par tube) contenant suffisamment de milieu liquide de Murashige et Skoog (MS), complété avec 3 g.L⁻¹ de saccharose (filtré 0,2 µm) pour que la pointe racinaire soit submergée d'1 cm. La complémentation au saccharose permet d'accélérer la croissance racinaire, mais aussi de détecter rapidement une contamination microbienne potentielle.

Les tubes sont placés en chambre de culture pendant 3 jours avec une phase de lumière *via* des néons ($100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) de 16 h à 25°C et une phase d'obscurité de 8 h à 22°C. Puis, le milieu est jeté et les plantules sont rincées avec de l'eau distillée stérile 5 fois. Les racines sont à nouveau submergées sur une hauteur de 1 cm dans de l'eau distillée stérile pendant de nouveau 3 jours.

À la fin des 3 jours, les plantules sont retirées du milieu de culture, les apex racinaires dépourvus de cellules frontières et d'une longueur de 5 mm sont coupés à l'aide d'un scalpel stérile. Ces morceaux d'apex racinaire forment un « pool » nommé : *fraction enrichie en apex racinaire*.

Le milieu de culture est centrifugé à 1400 g pendant 15 min. Des tests microscopiques ont été réalisés afin de vérifier que la centrifugation était suffisante pour culoter les cellules frontières. Deux fractions sont ainsi obtenues, le surnageant est la fraction enrichie en exsudats racinaires, alors que le culot est la fraction enrichie en *root extracellular trap* (RET) correspondant aux cellules frontières et au mucilage associé. Les 3 fractions sont congelées, puis lyophilisées et pesées.

Chaque pool biologique est constitué d'au moins 100 plantules. Cette valeur a été choisie afin de récupérer suffisamment de matériel biologique (RET et exsudats racinaires) pour réaliser les différentes analyses demandant plusieurs mg de matières sèches d'échantillons. Ce nombre de 100 plantules permet également de lisser l'hétérogénéité des plantules, sachant que les graines ne proviennent pas d'un semencier.

I-4 Préparation des résidus insolubles à l'alcool

Pour l'étude des polymères saccharidiques, il est courant de réaliser un résidu insoluble à l'alcool ou *Alcohol Insoluble Residue* (AIR). En effet, une grande partie des polysaccharides et autres glycomolécules ne sont pas solubles dans une solution éthanolique à plus de 80% éthanol (v/v eau distillée), ces polymères précipitent à -20°C. On obtient un précipité enrichi en polysaccharides. Il est important lors du processus d'obtention des AIR de faire attention à toute contamination par des polymères plastiques. Il faut donc utiliser le plus possible du matériel en verre, et dans la moindre mesure du matériel en plastique certifié ne relarguant pas de polymères. En effet, les polymères plastiques peuvent être très gênants lors des analyses des sucres, notamment en spectrométrie de masse.

I-4-1 AIR apex racinaires et cellules frontières

Pour préparer les AIR d'apex ou de cellules frontières, 50 mg de matières sèches lyophilisées sont mises dans un microtube Lysing Matrix D de 2 mL [Fig 37].



Figure 37 : Microtube Lysing Matrix D de 2 mL (mpbio.com).

Ces microtubes contiennent des billes en céramique (1,4mm) permettant le broyage des tissus et la lyse des cellules sous agitation. Puis, 1mL d'éthanol à 70% (v/v eau distillée) est ajouté pour broyer et retirer les pigments potentiels (avantage de travailler sur la racine c'est qu'il y a moins de pigment à éliminer comparer à la feuille). Le microtube est mis dans le FastPrep®-24 Instrument avec comme consigne une agitation à $6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant 30 secondes, et répété 3 fois.

Le surnageant est récupéré puis mis dans un tube de 50mL. Le microtube du Lysing matrix D et ses billes sont rincés 5 fois avec 1 mL d'éthanol 70% (v/v eau distillée), puis le liquide de rinçage est récupéré et regroupé dans le tube de 50 mL. Le tube de 50 mL est mis dans une étuve à 70°C pendant 20 min pour permettre un éclatement cellulaire. Puis, une centrifugation de 15 min à 4000 g à 4°C est réalisée pour précipiter entre autres les polysaccharides, et le surnageant est jeté.

Le culot est lavé avec un mélange méthanol-chloroforme (v/v) avec un volume final de 20 mL sous agitation, sur la nuit à température ambiante. Le lendemain, une centrifugation est réalisée à 4000 g, pendant 15 min et à 4°C , puis le surnageant est retiré. Le culot est lavé avec de l'acétone, sous agitation à température ambiante pendant 24 h, puis une nouvelle centrifugation est effectuée à 4000 g, pendant 15 min et à 4°C . Le surnageant est jeté et le culot contenant l'AIR est séché sous rampe à air.

Une fois l'AIR sec, il est pesé pour préparer une suspension d'AIR de la fraction enrichie en apex racinaire ou en RET à $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans de l'eau distillée stérile.

I-4-2 AIR d'exsudats racinaires

Une fois la récolte en exsudats racinaires effectuée et lyophilisée, une précipitation à froid et à l'éthanol des exsudats racinaires est réalisée. Pour ce faire, dans le tube de 50 mL contenant les exsudats lyophilisés, on y ajoute 1 volume d'eau pour 5 volumes d'éthanol. Le mélange est homogénéisé, puis placé à -20°C sur la nuit. Les polysaccharides et autres molécules vont précipiter. Une centrifugation est effectuée à 4000 g, pendant 15 min et à 4°C. On obtient 2 fractions, un surnageant et un culot. Le culot est séché puis pesé, afin de préparer une suspension à 2 mg.mL⁻¹ d'AIR de la fraction enrichie en exsudats racinaires.

II-Les méthodes

II-1 Imagerie

II-1-1 Imagerie photonique

II-1-1-1 Caractérisation du RET

Afin de caractériser le RET de ces plantules, diverses approches histochimiques ont été utilisées. Pour les différentes méthodes, les plantules utilisées ont toujours une longueur racinaire comprise entre 2 et 4 cm. Par ailleurs, il est important de bien filtrer (0,2 μm) les solutions tampon avant de préparer les échantillons en imagerie, afin d'éviter les bruits de fond.

a-analyses morphologiques du RET

L'apex racinaire est déposé sur une lame de verre, et il est submergé avec une goutte de Phosphate Buffered Saline (PBS) à 1X (NaCl 137 mmol.L^{-1} ; KCl 2,7 mmol.L^{-1} ; Na_2HPO_4 , 12 H_2O 7 mmol.L^{-1} ; KH_2PO_4 1,5 mmol.L^{-1}), à pH 7. Le tampon est utilisé pour éviter une déformation des cellules qu'un stress osmotique pourrait provoquer. Puis, l'apex est observé par un stéréo-microscope. Par cette technique, il est possible de déterminer jusqu'où les cellules frontières remontent dans la racine, mais aussi leur mode de détachement.

Par ailleurs, pour déterminer la différence de morphotypes au sein des cellules frontières produites par ces plantules, les apex racinaires sont mis à tremper 10 min à température ambiante dans des microtubes de 1,5 mL contenant 500 μL de PBS 1X à pH 7 filtré. Une fois l'incubation terminée, un cône de P1000 est découpé à son extrémité afin de ne pas détériorer l'organisation cellulaire du RET lors du pipetage. Puis, 300 μL de cette suspension sont déposés dans des lames spécifiques disposant de chambres pouvant recevoir 400 μL de liquide et ayant une lamelle en dessous [Fig 38].

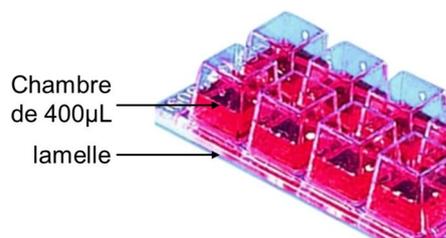


Figure 38 : Lame spécifique pour microscopie inversée (thermo scientific).

Une lamelle est placée dessous les chambres afin de permettre l'observation des cellules sédimentées ou tapis cellulaires avec un microscope inversé.

Ainsi, grâce à ce type de lame, il est possible de visualiser un grand volume sous microscope inversé, facilitant l'observation des cellules frontières contenues dans les 300 μ L de suspension cellulaire. Un rapport est calculé entre la longueur sur la largeur de chaque cellule frontière. Si le rapport est compris entre [1 ; 1,5[les cellules sont considérées comme sphériques, si le rapport est entre [1,5 ; 5,5[les cellules sont des intermédiaires, et enfin si le rapport est supérieur à 5,5 les cellules sont considérées comme allongées.

b-analyses histochimiques du RET

Coloration par le rouge de Ruthénium. La coloration au rouge du Ruthénium permet de mettre en évidence les charges négatives et est utilisé ici pour colorer les pectines de la paroi végétale. Une suspension de cellules frontières est mise en contact avec 0,05% (m/v eau distillée) de rouge de ruthénium pendant 10 à 15 min à température ambiante. Puis, une centrifugation à 700 g de 5 min est effectuée pour rincer les cellules frontières avec du PBS 1X à pH 7 filtré. Enfin, la suspension est mise entre lame et lamelle pour être observée au microscope en lumière transmise.

Coloration à l'encre de Chine. La coloration à l'encre de Chine ou encre d'Inde, est une coloration négative qui met en évidence le mucilage produit par les cellules frontières (Hawes *et al.*, 1998, 2000). Pour ce faire, des « touch » d'apex racinaires sont effectués sur une lame en verre dans une goutte de PBS 1X à pH 7 filtré. Après 5 min d'incubation dans le PBS, une solution diluée d'encre de Chine (1 : 2000) filtrée, est mise en contact des cellules frontières. Enfin, une lamelle est déposée pour une observation immédiate en microscopie en lumière transmise.

Viabilité des cellules frontières. Pour déterminer la viabilité cellulaire, la calcéine acétoxyméthyle (AM) est utilisée. La calcéine AM est un ester acétique non-fluorescent de la fluorescéine. Par sa nature hydrophobique, elle est capable de traverser passivement les membranes biologiques des cellules. Après les avoir traversées, des estérases cytosoliques clivent le groupe ester (AM) acétoxyméthyle. La calcéine-AM est alors transformée en calcéine fluorescente, elle devient hydrophile et ne peut plus traverser les membranes intactes passivement. La calcéine est excitée de manière optimale à $\lambda=495$ nm, et son pic d'émission est à $\lambda=515$ nm.

Dans un microtube d'1,5 mL, 1 mL de la solution de calcéine AM à $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (diluée dans du PBS 1X à pH 7) est délivré. Puis, 1 à 3 apex racinaires sont submergés dans le microtube pendant 60 min à température ambiante et à l'obscurité. L'obscurité est importante, car la calcéine AM est sensible à la lumière. Un témoin négatif est parallèlement réalisé, en subissant une mort cellulaire avec une température d'incubation à 100°C pendant 60 min.

c-Immunocytochimie du RET (immunomarquage de surface)

Afin d'identifier les glycopolymères du RET, l'outil anticorps est utilisé *via* les immunomarquages de surface. Les apex racinaires sont fixés dans un 1^{er} temps avec du paraformaldéhyde 4% (v/v) dilué dans du PBS 1X à pH 7 filtré, pendant 60 min. (L'usage d'une sorbonne et de gants sont indispensables, car le paraformaldéhyde est toxique). Puis, les échantillons sont rincés 5 fois pendant 10 min à l'aide de PBS 1X à pH 7 filtré puis, leurs sites non spécifiques sont saturés pendant 30 min à l'aide d'une solution filtrée de bovine serum albumin (BSA) à 1% (m/v) dissout dans du PBS 1X à pH 7. Une incubation des échantillons pendant la nuit à 4°C en chambre humide est réalisée en présence d'un anticorps primaire monoclonal (Plantprobes) dilué au $1/5^{\text{ème}}$ dans du PBS 1X à pH 7, complété avec 0,1% (v/v) de Tween 20 (PBST). Après l'incubation en présence d'anticorps primaire, les échantillons sont rincés 5 fois pendant 10 min, très délicatement avec du PBST filtré ($0,2 \mu\text{m}$) pour éviter de perdre la structure du RET et des cellules frontières. Puis, les échantillons sont incubés 1 h à 37°C et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire couplé au fluorescein isothiocyanate (FITC) dilué au $1/50^{\text{ème}}$ avec du PBST filtré. Une fois l'incubation terminée, les échantillons sont rincés à l'aide de PBST filtré et montés entre lame et lamelle dans un anti-blanchiment (Citifluor : antifading) et observé au microscope confocal. Pour le FITC, la longueur d'onde d'excitation $\lambda = 488 \text{ nm}$ et sa fenêtre d'émission s'étend de 510 à 530 nm.

Les anticorps monoclonaux (Plant probes) utilisés dans cette étude reconnaissent une gamme variée d'épitopes associés aux polymères de la paroi végétale incluant : les extensines (LM1), les AGPs (LM2, JIM4, JIM8, JIM13, JIM14 and JIM16), le xyloglucane (LM15), le rhamnogalacturonane-I (LM5, LM6, LM13 and LM16), les homogalacturonanes (LM19 and LM20) et les xylogalacturonanes (LM8).

d-Immunocytochimie (Immunomarquage sur coupe semi-fine)

Afin de déterminer la morphologie du RAM des différentes plantes et de détecter les polysaccharides dans les pointes racinaires entourées des cellules bordantes et du mucilage, des coupes longitudinales ont été effectuées sur des échantillons enrésinés préparés comme suit.

Les pointes racinaires sont fixées dans un mélange 1% paraformaldéhyde (v/v) et 1% glutaraldéhyde (v/v) dans un tampon cacodylate 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,2 durant 2 h à température ambiante, puis lavées 4 fois dans de l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol : 10min dans 30% éthanol, 10 min dans 50% éthanol, 2x10 min dans 70% éthanol, 2x20 min dans éthanol absolu. Deux derniers bains de 10 min sont de nouveaux effectués dans de l'éthanol absolu pour retirer toute trace d'eau de l'échantillon. Les pointes racinaires sont ensuite enrésinées progressivement à 4°C dans un mélange éthanol : LRW (v/v, London Resin White medium grade) comme suit : 2v/1v durant 6 h, 1v/1v durant 48 h, 1v/2v durant 24 h, puis 48 h en LRW 100%. Les échantillons sont mis en moule puis polymérisés pendant 24 h à 50°C. Des sections longitudinales de 2 µm d'épaisseur sont effectuées avec un ultramicrotome (UC6, Leica Microsystems) et récupérées sur des lames à puits coatées à la polylysine 0,01% filtrée (filtre PVDF 0,2 µm).

Pour déterminer le type de RAM, une coupe longitudinale de la zone centrale de la pointe racinaire est effectuée et colorée au bleu de toluidine 0,5% (toluidine blue O 5 g.L⁻¹ ; borax 10 g.L⁻¹ ; diluer dans eau ultrapure) durant 1 min sur plaque chauffante, puis rincée à l'eau ultrapure et séchée sur la plaque avant d'être observée.

Pour l'immunomarquage des polysaccharides, les coupes sont incubées dans l'anticorps primaire (Plant probes) dilué au 1/10 dans un tampon PBS 1X + 1% BSA sur la nuit à 4°C, en chambre humide. Les coupes sont ensuite lavées 6 fois dans la solution PBS 1X + 1% BSA, puis incubées dans l'anticorps secondaire (goat anti rat couplé au fluorochrome Alexa 488) dilué au 1/100 dans solution PBS 1X + 1% BSA durant 1 h à 25°C, en chambre humide. Enfin, les coupes sont rincées 3 fois dans la solution PBS 1X + 1% BSA, puis observées avec un microscope à épifluorescence (DMI600B, Leica Microsystems). Un témoin sans anticorps primaire est systématiquement effectué et utilisé comme référence pour déterminer le temps d'exposition.

*II-1-2 Imagerie électronique**Cryofixation*

La congélation sous haute pression a été réalisée avec l'appareil HPM100 (Leica Microsystems). Le cryogène utilisé est l'azote liquide. La pression (2000 bars), appliquée à l'intérieur de l'échantillon est synchronisée avec le refroidissement (jet d'azote liquide) appliqué à l'extérieur de l'échantillon entraînant une congélation ultrarapide de l'échantillon, avec un taux de refroidissements d'environ 18 000°C/sec. Lorsque l'échantillon est congelé, il tombe automatiquement dans un réservoir d'azote où il est conservé en attendant son transfert dans l'automate de substitution.

Les pointes de racine ont été congelées dans du tampon MES (20 mmol.L⁻¹ MES; 2 mmol.L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O; 2 mmol.L⁻¹ KCl; pH 5,5) additionné de 0,2 mol.L⁻¹ sucrose, dans des cupules d'aluminium (diamètre 6 mm et profondeur 300 µm, Leica microsystems), préalablement coatées à la lécithine de soja.

Cryosubstitution et enrésinement

Après congélation sous haute pression, les échantillons sont transférés dans l'automate de substitution à froid AFS2 (Leica Microsystems) pré-refroidi à -110°C. Les échantillons sont substitués dans l'acétone anhydre contenant 0,5% d'acétate d'uranyle à -90°C pendant 72 h. La température est graduellement augmentée de 2°C/h jusqu'à -60°C et maintenue pendant 12 h. La température est de nouveau remontée à -30°C (2°C/h). Après un pallier de 12h à -30°C, les échantillons sont maintenus à -15°C.

Les échantillons sont rincés deux fois 15 min dans l'éthanol sec. L'infiltration est réalisée à -15°C dans un mélange London Resin White (LRW) : éthanol (ratio 1:2; 1:1; 2:1, 8h chaque étape) puis en résine pure 2x24 h. Les échantillons sont retirés de leur cupule et mis en moule, avant d'être polymérisés sous ultra-violet à -15°C pendant 48 h. La résine LRW est une résine acrylique polyhydroxyaromatique. Pour polymériser cette résine sous UV, il est nécessaire de lui ajouter un catalyseur d'éther de benzoïne dans une proportion de 0,5% m/v.

Coupes ultrafines

Des sections de 100 nm d'épaisseur ont été obtenues sur un ultramicrotome UC6 (Leica Microsystems), puis recueillies sur des grilles nickel 100 mesh à trames hexagonales recouvertes d'une membrane formvar-carbone.

Immunomarquage des polysaccharides

Les anticorps primaires testés sont JIM13, JIM14 et LM1 (Plant probes). L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti rat conjugué à une particule d'or de 25 nm, produit chez la chèvre (Aurion).

Afin de saturer les sites non spécifiques, les sections sont incubées durant 30 min dans un tampon TBS (Tris 20 mmol.L⁻¹ ; NaCl 150 mmol.L⁻¹) + BSA 0,2%. Puis, les coupes sont incubées dans l'anticorps primaire pur durant 3 h, à 25°C, avant d'être rincées 6x5 min dans le tampon (TBS + BSA 0,2% + normal goat serum 1/30). L'incubation dans l'anticorps secondaire dilué au 1/20 dans une solution de (TBS + BSA 0,2%) s'effectue 1 h à 25°C. Les rinçages sont effectués 6x5 min avec du tampon (TBS + BSA 0,2%), puis 5 min dans du TBS seul. Afin de fixer les complexes immuns, on incube 10 min dans une solution de (TBS + glutaraldéhyde 2 %). Les coupes sont ensuite rincées 2x5 min dans l'eau ultrapure, avant d'être séchées à l'air.

Observation des coupes au microscope électronique à transmission

Après l'immunomarquage, les sections sont contrastées 2 min avec une solution d'UranylLess (Delta microscopie, ref : 11.000), et 2 min dans une solution 3% de citrate de plomb de Reynolds (Delta microscopie, ref : 11.300). Les coupes sont rapidement rincées dans 12 gouttes d'eau ultrapure après chaque étape de contraste, puis séchées à l'air. Les observations ont été effectuées sur un microscope électronique à transmission TECNAI 2 Biotwin (FEI) opérant à 80kV avec une camera CCD ES500W Erlangshen (Gatan).

II-2 Biochimie

II-2-1 Composition monosaccharidique par GC-FID

L'analyse de la composition monosaccharidique permet de donner des pistes sur les polymères glucidiques potentiels présents au sein des différentes fractions en fonction des profils obtenus. Cette analyse est réalisée à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), équipée d'une colonne CP-Sil5-CB d'Agilent Technologies. Avant l'injection, les échantillons doivent être hydrolysés en monosaccharides (coupure les liaisons osidiques des polysaccharides), puis ils doivent être dérivés, c'est à dire rendus volatils par l'ajout de triméthylsilyles ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) sur leurs groupement hydroxyles. Durant toutes les étapes de dérivation, l'utilisation de gants ainsi qu'une sorbonne sont obligatoires étant donnée la toxicité des réactifs utilisés.

La dérivation se fait dans une microfirole en verre, 2 mg de matière sèche d'AIR d'échantillon, est mélangé avec 50 μL d'inositol à 2 mmol.L^{-1} . L'inositol est un étalon interne qui permet entre autres d'attester que la dérivation s'est bien déroulée. Puis, l'échantillon est mis en contact avec 500 μL de trifluoroacetic acid (TFA) à 2 mol.L^{-1} avant de fermer la microfirole. L'échantillon est homogénéisé à l'aide d'un vortex, puis chauffé à 110°C pendant 2 h, c'est l'étape d'hydrolyse acide. Les liaisons osidiques des polysaccharides vont être découpées en monosaccharides. Après l'hydrolyse au TFA, l'échantillon est remis à température ambiante, puis le TFA est évaporé sous rampe à air et sous sorbonne. Puis, l'échantillon est lyophilisé pour éliminer l'eau résiduelle. En effet, la seconde étape est la lyse des liaisons osidiques résiduelles, mais plus important encore, c'est l'ajout d'un méthyl sur la fonction hémiacétalique du sucre. Or, s'il reste des molécules d'eau dans l'échantillon, le rendement de la méthylation de cette fonction hémiacétalique est diminué. Cette étape est réalisée à l'aide d'acide chlorhydrique dissout dans du méthanol anhydre à 1 mol.L^{-1} , c'est la méthanolyse acide. L'échantillon est mis en contact avec 200 μL de methanolic HCl 1 mol.L^{-1} (HCl dans du méthanol pur) pendant une nuit à 80°C. Ensuite, l'échantillon est remis à température ambiante, et le méthanol HCl est évaporé sous rampe à air. L'échantillon est ensuite lavé 2 fois avec 200 μL de méthanol. Chaque lavage est suivi d'une évaporation sous rampe à air.

La dernière étape de la dérivation des monosaccharides est l'ajout de triméthylsilyles sur leurs groupements hydroxyles. L'échantillon est mis en contact avec 100 μL du kit Sydon

HTP pendant 20 min à 100°C. Ce kit contient de l'hexamethyldisilazane (HMDS), du trimethylchlorosilane (TMCS) et de la pyridine, suivant ces proportions (3:1:9). Une fois la Silylation terminée, l'échantillon est remis à température ambiante (l'échantillon est maintenant très volatile), puis séché sous rampe à air pour éliminer les réactifs, pour ensuite être rincé et séché avec 500 µL de cyclohexane. Enfin, l'échantillon est repris dans 1 mL de cyclohexane et 1 µL est injecté en GC-FID. En parallèle des échantillons, un mélange de différents monosaccharides standards sont dérivés, ils permettent l'identification et la quantification des sucres dans l'échantillon.

Les paramètres d'éluion de la GC-FID sont les suivants : un gradient de température de 120°C à 160°C avec un pas de 10°C.min⁻¹, puis de 160°C à 220°C avec un pas de 1,5°C.min⁻¹, et enfin de 220°C à 280°C avec un pas de 20°C.min⁻¹.

II-2-2 Analyse de la nature des liaisons des polysaccharides par GC-MS

Après avoir déterminé les sucres présents dans les différentes fractions, le type de liaisons engagées par les différents sucres au sein des polymères permet d'affiner l'identification des polysaccharides. Les échantillons sont dérivés en PMAA (Partially Methylated Alditol Acetate) avant d'être injectés dans une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) équipé d'une colonne HP-5MS (Agilent Technologies). Cette dérivation se décompose en 4 étapes :

- une perméthylation en milieu alcalin anhydre des groupements hydroxyles libres des polysaccharides,

- une hydrolyse acide des polymères pour former des monomères,

- une linéarisation des monosaccharides par ouverture de leur cycle en ajoutant du deutérium sur le carbone 1, créant ainsi une asymétrie par différence de masse sur les fragments générés lors de leur passage en MS,

- une acétylation des groupements hydroxyles, qui étaient pris dans les liaisons au sein des polymères glucidiques et n'avaient donc pas pu être méthylés lors de l'étape 1, car l'hydrolyse acide n'avait pas encore libéré leurs groupements hydroxyles.

C'est donc la différence de masse entre l'ajout d'un méthyle et d'un acétyle qui détermine par quel ou lesquels carbone(s) le sucre est lié.

Comme évoqué précédemment, il est crucial d'utiliser le plus possible du matériel en verre, ainsi que des réactifs de grade « spectrométrie de masse », pour éviter toute trace de polymères, lors de la préparation d'échantillons pour la spectrométrie de masse. En effet, les

polymères plastiques peuvent être très gênants lors des analyses des sucres, en augmentant considérablement le bruit de fond. De plus, toutes les étapes sont réalisées à l'aide de gants, sous sorbonne, ainsi qu'une bonne homogénéisation de l'échantillon par vortex.

Pour générer des PMAA, 5 mg de matière sèche d'AIR d'échantillon est mis dans un tube en verre. Un mélange de pastilles de NaOH, broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon, et de diméthylsulfoxyde (DMSO) anhydre est préparé dans un rapport d'une pastille de NaOH pour 1 mL de DMSO. L'échantillon est mis en contact avec 1 mL de ce mélange préparé extemporanément à l'aide d'une pipette Pasteur en verre. Puis, 400 μ L d'iodométhane est ajouté à l'échantillon. Le tube est fermé et mis sous agitation pendant 2 h à température ambiante. C'est l'étape de perméthylation. Une fois l'incubation terminée, il est possible que le liquide devienne très visqueux et puisse former un agrégat blanc. Lors de l'ouverture du bouchon, un petit « pchit » est signe d'une bonne méthylation. La réaction est alors arrêtée à l'aide d'1 mL d'eau ultrapure de grade MS qu'il faut mettre avec prudence, car son ajout provoque une réaction exothermique pouvant dans de rares cas faire exploser le tube. Une fois le tube refroidi, les glycanes perméthylés sont solubilisés dans 2 mL de chloroforme. Lors de cette étape deux phases apparaissent dans le tube : une phase aqueuse, moins dense que le chloroforme, se retrouve en surface, et une phase organique (chloroforme) se retrouve au fond du tube. Le tube est bien homogénéisé pour permettre une extraction des polysaccharides méthylés par le chloroforme. Puis, 3 mL d'eau ultrapure est ajoutée au tube, suivi d'une homogénéisation. Après décantation, la phase aqueuse est retirée du tube à l'aide d'une pipette en verre. De nouveau 5 mL d'eau ultrapure est ajouté, le tube est homogénéisé et la phase aqueuse est retirée. Ces étapes de lavage sont répétées jusqu'à l'élimination du NaOH présent dans l'échantillon, à environ pH 7. Le pH de la phase aqueuse est vérifié à l'aide d'un papier indicateur de pH.

Une fois l'échantillon à pH neutre, une hydrolyse acide est réalisée à l'aide 500 μ L de TFA à 2 N pendant 2 h à 100°C. Une fois l'hydrolyse terminée, le TFA est évaporé sous rampe à air. Puis, l'échantillon est lavé et séché sous rampe à air, 2 fois avec 200 μ L d'isopropanol à 50% (v/v eau ultrapure).

Quand l'échantillon est sec, la 3^{ème} étape consiste à ouvrir le sucre cyclisé par l'action sur la nuit à température ambiante de 200 μ L de sodium borodeuteride pur à 70% (NaBD₄) à 10 mg.mL⁻¹ dissout dans de l'hydroxyde d'ammonium à 1 mol.L⁻¹. Une fois la réaction terminée, l'excès de NaBD₄ est neutralisé par l'acide acétique. En effet, 200 μ L d'acide acétique

à 30% (v/v eau ultrapure) est ajouté dans l'échantillon, puis il est laissé à évaporer sous rampe à air. Différents lavages de l'échantillon sont réalisés et suivis d'évaporations. Le premier lavage est avec 200 μL de méthanol, et répété 3 fois. Puis le 2^{ème} avec 200 μL d'un mélange méthanol-acide acétique glaciale (9 : 1), répété lui aussi 3 fois.

Une fois l'échantillon sec, la 4^{ème} étape peut être lancée. C'est l'acétylation des groupements hydroxyles par l'action d'un mélange équivalent de pyridine et d'anhydride acétique (v/v) pendant 10 min à température ambiante. Quand l'acétylation est terminée, l'échantillon est placé sous rampe à air pour éliminer le réactif. L'échantillon est lavé et séché 2 fois avec 200 μL de toluol. Puis l'échantillon est repris dans 1mL de cyclohexane et homogénéisé avant l'injection d'1 μL en GC-MS.

Les paramètres de la GC-MS sont les suivants : la température du four est initialement à 100°C, puis il augmente jusqu'à 160°C avec un pas de 10°C.min⁻¹, puis jusqu'à 220°C avec un pas de 2°C.min⁻¹ et finalement jusqu'à 280°C avec un pas de 15°C.min⁻¹.

L'analyse des spectres pour déduire les liaisons des polymères se fait à l'aide de spectres obtenus sur des standards de PMAA glycaniques *via* une base de données d'internet (<http://www.ccruc.uga.edu/databases/PMAA>), mais aussi grâce au logiciel du spectromètre de masse.

II-2-3 Analyse semi-quantitative des arabinogalactanes protéines par électrophorèse en fusée

Comme d'écrit dans l'introduction, les AGPs peuvent être quantifiées *via* leur chaîne arabinogalactanes de type II qui peuvent être précipitées en présence du réactif β -glucosyl-Yariv. En effet, si elles disposent d'au moins 7 résidus β -1,3-galactose, les AGPs ont la capacité de se lier spécifiquement à ce réactif.

La préparation du gel rocket au β -Yariv est relativement simple. En effet, pour 100 mL de gel d'agarose à 1% (m/v tampon Rocket) au β -Yariv à 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, il faut mettre dans un bécher 100 mL de solution tampon Rocket (Tris 25 mmol.L^{-1} et glycine 200 mmol.L^{-1} pH 8,4). Puis ajouter 1% d'agarose soit 1g. Le tout est porté à ébullition sous agitation magnétique afin de dissoudre l'agarose. Puis il faut ajouter 400 μL de la solution mère de Yariv à 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Le gel est coulé et laissé à température ambiante pour qu'il prenne en masse. Le gel est déposé sur un support électrophorétique horizontal. Du papier Whatman imbibé de tampon Rocket est

utilisé pour faire le pont salin. Des puits sont réalisés à l'aide d'un embout coupé de cône de P200.

Une gamme étalon de gomme arabique commerciale est réalisée de 0 à 0,5 mg.mL⁻¹. Un volume de 7 µL est déposé pour chacun des puits correspondant à la gamme étalon, ainsi que pour les échantillons. Ce volume choisi permet d'avoir des rockets fines. Pour pouvoir déposer 1 mg d'AIR des différentes fractions, 3 mg d'échantillon sont repris et homogénéisés dans 21 µL de tampon Rocket. Puis 7 µL sont déposés par puits. Les paramètres de migration du gel rocket au β-Yariv sont : 200 V à 5 mA et à 10 W pendant 16 h à 4°C.

Après la migration, le gel est décoloré dans un bain d'une solution de NaCl à 2% (m/v eau distillée) sous agitation douce pendant au moins 4 h. Des pics orangés se dessinent sur le gel. Enfin, le gel est scanné ou photographié. L'estimation de la quantité d'AGPs précipitée par le β-Yariv s'effectue par la relation de proportionnalité entre la quantité d'AGPs par rapport à l'air du pic de la rocket observée.

II-2-4 Spectroscopie en Infra-Rouge à Transformée de Fourier

La spectroscopie en infra-rouge à transformée de Fourier ou FTIR (*Fourier Transformed Infra-Red spectroscopy*) est une technique qui permet d'obtenir des informations sur la composition des groupements chimiques d'une molécule et d'obtenir son « empreinte moléculaire ». Lorsque la molécule est exposée à de la lumière infra-rouge, il est possible qu'elle absorbe de l'énergie qui provient de cette dernière. Cette énergie va alors provoquer un phénomène de vibration d'une des liaisons chimiques de la molécule. Au contraire si la lumière infra-rouge n'est pas absorbée et ne fait que traverser la molécule il n'y a pas de phénomène de vibration, la lumière est donc transmise. Le signal qui en résulte au niveau d'un détecteur est un spectre qui représente une empreinte moléculaire de l'échantillon (<https://www.thermofisher.com>).

La FTIR est utilisée dans l'étude de la paroi végétale (Wilson *et al.*, 2000), notamment pour déterminer le degré de méthyl estérification des pectines (Manrique & Lajolo, 2002; Gribaa *et al.*, 2013; Leroux *et al.*, 2015). De plus, cette méthode n'est pas destructive après obtention du spectre, notamment pour les échantillons d'AIR de paroi ou d'exsudats racinaires. Les échantillons peuvent être récupérés pour d'autres analyses.

Avant l'obtention du spectre infra-rouge, 4 mg d'AIR des différentes fractions enrichies (Apex racinaire, RET et exsudats racinaires) sont mises avec 500 μL d'eau ultrapure dans un microtube de 1,5 mL. Les tubes sont mis à 100°C sous agitation pendant 1h30 afin de maximiser la libération des pectines des différentes fractions. Enfin, les microtubes sont placés dans un lyophilisateur afin de retirer l'eau des échantillons. Une fois la lyophilisation terminée, les échantillons sont stockés sous cloche à vide contenant du silica-gel afin d'éviter leur réhydratation qui pourrait perturber l'intégrité de leur spectre.

Les échantillons sont analysés à l'aide du spectromètre FTIR Nicolet iS50 de thermoscientific avec une résolution de 2 cm^{-1} et 64 balayages sur une plage du nombre d'onde allant de 800 cm^{-1} à 1800 cm^{-1} . De plus des pectines commerciales ont aussi été analysées afin d'identifier le pic d'absorption caractéristique de pectines fortement méthylestérifiées aux alentours de 1740 cm^{-1} et faiblement méthylestérifiées aux alentours de 1630 cm^{-1} .

II-2-5 Détection d'activités enzymatiques au sein des exsudats racinaires

Pour doser les différentes activités enzymatiques présentées ci-dessous au sein des exsudats racinaires, le protocole de traitement diffère par rapport aux analyses précédentes. En effet, après obtention de la fraction enrichie en exsudats racinaires, il n'y a pas de lyophilisation, ni de précipitation à l'éthanol. Les exsudats racinaires sont concentrés à l'aide d'un centricon (Merck Millipore Life Science UFC901024) avec un seuil de coupure de 10kDa à 4°C pendant 20 min à 4000 g. 1,5mL d'anti-protéase (Thermo SCIENTIFIC 88266) y est ajouté (une pastille pour 10 mL d'eau distillée stérile) après leur concentration.

Le dosage des protéines totales hydrosolubles des fractions enrichies en exsudats racinaires s'effectue par la méthode de Bradford à l'aide du réactif Bradford (Kit BIO-RAD 500-0006). Une gamme étalon de sérum albumine bovine commerciale de 0 à 10 μg de protéines est réalisée, afin d'estimer la concentration en protéines des échantillons.

Un test de croissance bactérienne est effectué sur un milieu LB (lysogeny broth low Salt 20 g.L^{-1}) gélosé à 12 g.L^{-1} , où 20 μL de la fraction enrichie en exsudats racinaires y est déposé, puis étalé et incubé 96 h à 25°C.

II-2-5-1 Activité pectine méthylesterase

Le dosage de l'activité pectine méthylesterase (PME) est réalisé à l'aide d'un gel par diffusion radiale de l'enzyme. Cette méthode se base sur l'interaction de charges entre le rouge

de Ruthénium (charges positives) et les acides polygalacturoniques des pectines acides (non méthylestérifiées ; charges négatives) par une coloration rose fuchsia. Plus la pectine est déméthylée, plus l'intensité de la coloration du halo formé est intense. En effet, les PME déméthylestérifient les acides galacturoniques provenant des pectines, ce qui entraîne l'apparition de groupements carboxyles libre au sein des pectines pouvant interagir avec le rouge du ruthénium.

Un gel à 1% (m/v) d'agarose contenant 0,1% (m/v) de pectine de citron estérifiée à 90% sont mélangés dans un tampon ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de citrate, $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de Na_2HPO_4) à pH 6,3. La dissolution du mélange se fait à 80°C . Une fois le mélange dissout, il est coulé dans des boîtes de Pétri carrée (50 mL coulés par boîte carrée 120 mm). Après la prise en masse, des puits de 2 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'un cône de P200 coupé. Le volume délivré par puits est de 10 μL pour les échantillons et de 10 μL par point de la gamme (6,5 U à 0,0065 U) contenant une PME commerciale (PME d'orange SIGMA P5400). Enfin, le gel est incubé pendant 16 h à 37°C .

Après l'incubation, le gel est rapidement rincé à l'aide d'eau distillée, et coloré à l'aide du rouge de Ruthénium à 0,02% (m/v eau distillée) pendant 60 min. Le gel est de nouveau rincé à l'aide d'eau distillée 3 fois, puis il est égoutté et scanné. Les diamètres des halos sont mesurés, puis une relation de proportionnalité est établie entre l'activité PME et le diamètre de la zone colorée en rose fuchsia. Deux répliques techniques sont réalisés sur 3 répliques biologiques.

II-2-5-2 Activité polygalacturonase (PG)

La recherche de l'activité de Polygalacturonase (PG) peut être réalisée à l'aide d'un gel à diffusion radiale. Les PG en présence d'acides polygalacturoniques faiblement méthylés vont l'hydrolyser en petits fragments qui seront éliminés lors d'un lavage. Le rouge de Ruthénium ne trouvera plus de groupement carboxyle pour s'y fixer. Cela va engendrer la formation de halos non colorés autour des zones du gel où l'activité PG est présente.

Un gel contenant 50 mg d'acide polygalacturonique (SIGMA P3850) est dissout dans un tampon acétate de sodium à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ dont le pH est ajusté à 5 ; 4,5 ; 4 ou 3,5. Après polymérisation du gel (50 mL par boîte de pétri carrée), des puits sont percés, et 10 μL d'une gamme de PG commerciale (MEGAZYME 5000 U) y est déposé. La gamme utilisée est comprise entre 10 U à 10^{-5} U. Les échantillons sont également déposés (10 μL par puits).

Après une incubation de 16 h à 37°C, le gel est coloré avec du rouge de Ruthénium à 0,04% (m/v eau distillée) pendant 45 min. Après coloration, le gel est lavé 3 fois avec de l'eau distillée. L'activité PG est révélée par la formation d'un halo non coloré. Deux répliques techniques sont réalisés sur 3 répliques biologiques.

II-2-5-3 Activité peroxydase

La méthode utilisée pour le dosage de l'activité peroxydase est la formation du tétragaïacol en présence de gaïacol. Les peroxydases sont des oxydoréductases. En présence du peroxyde d'hydrogène, elles catalysent l'oxydoréduction du gaïacol (substrat donneur de proton) et permettent ainsi la formation du tétragaïacol. Le tétragaïacol est un composé rouge qui absorbe la lumière à $\lambda=470$ nm. Lors du dosage, un suivi de l'absorbance est réalisé. Une relation de proportionnalité est alors établie entre l'activité peroxydase et la pente de la droite.

Pour effectuer le dosage, dans un microtube de 2 mL, 1 mL de tampon est ajouté contenant du tris maléate à 50 mmol.L⁻¹ à pH7, du guaiacol à 10 mmol.L⁻¹, et du CaCl₂ à 1 mmol.L⁻¹. Puis 500 µL d'exsudats racinaires y sont ajoutés et incubés pendant 10 min à 25°C en bain marie. Ce mélange est transféré dans une cuve de spectrophotomètre et 20 µL d'H₂O₂ y est délivré. La cuve est homogénéisée rapidement et l'absorbance à $\lambda=470$ nm est mesurée pendant 5 min. Deux répliques techniques sont réalisés sur 3 répliques biologiques.

II-3 Microbiologie

Un suivi de la croissance *Azospirillum brasilense* a été entrepris en présence de différentes fractions enrichies en exsudats racinaires bruts (non précipité à l'éthanol) comme seule source de carbone et d'azote. Les différentes manipulations qui découleront de la partie II-3 seront faites stérilement avec du matériel stérile sous un PSM (poste de sécurité microbiologique) de type II, afin de protéger le manipulateur et les manipulations de toutes contaminations non désirées.

Par ailleurs il est nécessaire de prévoir 1 journée complète pour préparer les différents milieux de cultures, de les stériliser par un autoclave, de couler les différents milieux gélosés. Lors de la préparation du milieu minimum d'*A. brasilense* une attention particulière a été faite pour préparer séparément chaque solution mère de sels constituant ce milieu pour éviter leur précipitation après leur autoclavage. Toutefois la solution de FeSO₄-7H₂O précipitée après

autoclavage malgré qu'elle soit seule en solution. Cette solution n'a donc pas été autoclavée mais stérilisée par une filtration à 0,2 μm .

II-3-1 Culture *A. brasilense*

Jour 1 : À partir d'une colonie isolée *A. brasilense* (Sp245 pMP244), culture réalisée sur un milieu solide LB (*lysogeny broth*) contenant 10 g.L^{-1} de tryptone, 5 g.L^{-1} de NaCl, 5 g.L^{-1} d'extrait de levure, 15 g.L^{-1} d'agar et complétement avec 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de gentamicine (pression de sélection) ; une pré-culture d' *A. brasilense* en milieu de LB liquide de 25 mL complétement avec 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de gentamicine (filtré 0,2 μm) est lancée sur 24 h à 25°C sous agitation dans un Erlenmeyer stérile de 250 mL fermé à l'aide d'un bouchon permettant les échanges gazeux tout en évitant les contaminations externes potentielles. La souche a une croissance plutôt lente même en milieu riche, or les bactéries étant en milieu solide, il faut encore plus de temps pour qu'elle retrouve toute sa vitalité (phase de latence). En effet, il lui faut au minimum 24h à partir d'une colonie et en milieu LB pour être en phase exponentiel de croissance avec une densité optique (DO) de 0,5 à $\lambda=580$ nm.

Jour 2 : Une seconde pré-culture de 25 mL est lancée le soir, en milieu de minimum spécifique à *A. brasilense* (Vanstockem *et al.*, 1987) à 25°C sous agitation avec comme inoculation la 1^{ère} pré-culture. Ce milieu minimum (MM+CN) est un milieu synthétique dont la composition est connue. Il contient une source de carbone (malate) et une source d'azote (NH_4Cl), sa composition est la suivante : 3 g.L^{-1} de K_2HPO_4 , 2,5 g.L^{-1} de malate, 1 g.L^{-1} de NH_4Cl , 1 g.L^{-1} de NaH_2PO_4 , 0,3 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15 g.L^{-1} de KCl; 0,01 g.L^{-1} de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mg.L^{-1} de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mg.L^{-1} de biotine (filtré 0,2 μm). Ce milieu est aussi complétement avec 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de gentamicine (filtré 0,2 μm).

Il est important de noter que la seconde pré-culture doit être lancée vers 18 h avec une DO initiale de 0,02 à $\lambda=580$ nm pour que le lendemain matin à 9 h les bactéries de cette pré-culture soient en phase exponentielle de croissance avec une DO environ de 0,5 à $\lambda=580$ nm pour pouvoir lancer le suivi de la croissance d'*A. brasilense* en présence des différentes fractions enrichies en exsudats racinaires.

II-3-2 Effet des exsudats racinaires sur la croissance d'*A. brasilense*

Jour 3 : Une vérification de la DO de la seconde pré-culture en milieu MM+CN est réalisée pour vérifier la bonne vitalité de la souche et pouvoir calculer le volume initial de pré-culture à délivrer dans les différentes conditions qui seront testées [Tableau 2] pour avoir une DO initiale de 0,1 à $\lambda=580\text{nm}$ lors du lancement de l'expérience ($t=0\text{ h}$). La composition du milieu témoin positif (MM+CN) est basé sur les travaux de Vanstockem *et al.*, 1987.

Tableau 2 : Composition des différents milieux pour le suivi de croissance d'*A. brasilense*.

g.L ⁻¹	Témoin positif (MM+CN)	Témoin négatif (MM)	Essai Exsudats racinaires	Témoin contamination Exsudats racinaires
K₂HPO₄	3	3	3	3
Malate	2,5	0	0	0
NH₄Cl	1,0	0	0	0
NaH₂PO₄	1	1	1	1
MgSO₄-7H₂O	0,3	0,3	0,3	0,3
KCl	0,15	0,15	0,15	0,15
CaCl₂-2H₂O	0,01	0,01	0,01	0,01
FeSO₄-7H₂O	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025
Biotine	0,005	0,005	0,005	0,005
Gentamicine	0,025	0,025	0,025	0,025
Exsudats racinaires	0	0	1	1
Inoculation avec <i>A. brasilense</i>	Oui	Oui	Oui	Non

Trois témoins sont lancés en parallèle de chaque essai en exsudats racinaires. Le *témoin positif* (MM+CN) est le milieu minimum qui contient tout le nécessaire à la bonne croissance d'*A. brasilense*. Le *témoin négatif* (MM) est un milieu minéral sans source de carbone et sans source d'azote. Ce témoin négatif est indispensable pour démontrer que l'inoculum bactérien de la seconde pré-culture n'apporte pas ou peu de nutriments, mais aussi par absence de croissance bactérienne que la capacité de la bactérie à utiliser les exsudats racinaires comme source de carbone et d'azote. Le *témoin de contamination exsudats racinaires*, a pour objectif de montrer que s'il y a une croissance microbienne, elle est bien due à *A. brasilense* et non à une contamination endogène. Toutefois, le contrôle qualité réalisé au préalable lors de la récolte des fractions enrichies en exsudats racinaires couplé à l'utilisation de la gentamicine limite les risques de contamination.

Dans la condition *essai exsudats racinaires*, il n'y a pas de source de carbone ni de source d'azote dans le milieu, mais seulement un tampon, sels minéraux et un facteur de croissance (biotine).

Le volume final des différentes conditions est de 15 mL, ce volume fut choisi pour différentes raisons, la première est d'économiser au maximum la quantité d'exsudats racinaires nécessaires pour lancer une expérience. En effet, pour un volume final de 15 mL avec une concentration massique en exsudats racinaires de 2 g.L^{-1} , il faut 30 mg d'exsudats par essai. Ceci représente 3 mois de récolte. La seconde est qu'il faut un minimum de volume afin de pouvoir faire tous les prélèvements nécessaires pour tous les temps de la cinétique sans altérer la culture bactérienne par un volume trop faible dans l'Erlenmeyer.

La cinétique de croissance dure 48 h à 25°C sous agitation. De $t=0 \text{ h}$ à $t=12 \text{ h}$, un prélèvement pour chaque point de cinétique (toutes les 3 h) de $100 \mu\text{L}$ de la culture bactérienne pour réaliser la gamme de dilution et $900 \mu\text{L}$ de la culture bactérienne pour la lecture de la DO à $\lambda=580\text{nm}$ afin de choisir quelle dilution doit être étalée sur les boîtes pour le dénombrement. A $t=24 \text{ h}$ à $t=36 \text{ h}$, un prélèvement de $100 \mu\text{L}$ pour réaliser la gamme de dilution et un autre prélèvement de $100 \mu\text{L}$ pour lecture de la DO afin de choisir quelle dilution doit être étalée sur les boîtes pour le dénombrement. Un dernier prélèvement de $100 \mu\text{L}$ est réalisé à $t=48 \text{ h}$.

Pour chaque point de la cinétique de croissance, une dilution appropriée dans de l'eau physiologique ($\text{NaCl } 8,5 \text{ g.l}^{-1}$) est préparée, puis $0,1 \text{ mL}$ de cette dilution appropriée est étalée dans une gélose LB sans gentamicine. Les unités formants des colonies (UFC) sont dénombrées après une incubation de 96 h à 25°C , afin d'y établir le nombre d'UFC.mL⁻¹.

II-5 Analyses statistiques

Les graines fournies pour obtenir les échantillons biologiques n'étaient ni certifiées ni calibrées. Par conséquent, pour limiter et linéariser l'hétérogénéité des échantillons, mais aussi afin d'obtenir suffisamment de matériel biologique (apex racinaires, RET et exsudats racinaires) pour effectuer les diverses analyses : 3 répliques biologiques contenant un pool de 100 plantes par ligneux ont été réalisés. Sur chaque réplique biologique, des exsudats bruts (sans précipitation à l'éthanol), ainsi que des AIR de fractions enrichies : en apex racinaires, en RET et en exsudats racinaires ont été réalisés.

Une fois les données récupérées, un test de normalité a été réalisé *via* le test Shapiro-Wilk pour déterminer si la distribution des échantillons est compatible avec l'hypothèse de distribution gaussienne (normale, paramétrique), puis un test d'homogénéité de variances a été utilisé *via* le teste de Brown-Forsythe afin de vérifier que les données étaient comparables.

Dans le cas où l'on souhaite faire une multi-comparaison à un facteur, les données étant paramétriques et homogènes, une One-way ANOVA a été utilisé avec un post-test de Tukey incluant une correction due à la multi-comparaison.

Dans le cas où les données n'étaient pas paramétriques, un test de comparaison 2 à 2 de Mann-Whitney a été réalisé. L'utilisation d'un test paramétrique de comparaison 2 à 2 (type Student avec ou sans correction de Welch) a été écartée à cause du « n » trop petit (réplicas biologiques et techniques). Par ailleurs pour une comparaison multiple non paramétrique un test Kruskal-Wallis avec un post-test de Dunn incluant une correction due à la multi-comparaison a été utilisé.

Pour effectuer ces analyses statistiques le logiciel GraphPad Prims 7.0 a été utilisé avec un risque de première espèce $\alpha = 5\%$.

Chapitre 3 : Résultats et discussions

I-Caractérisation *in vitro* du RET et des exsudats racinaires

L'objectif de cette partie est la caractérisation *in vitro* du RET et des exsudats racinaires de 3 plantes ligneuses subsahariennes ayant des degrés différents de tolérance à la sécheresse. Une partie des résultats obtenus est présentée sous forme d'un article scientifique qui sera soumis dans le journal *New Phytologist*, puis des données supplémentaires microscopiques (cf :I-2) et biochimiques (cf :I-3) ne figurant pas dans cet article, mais également des résultats préliminaires d'une approche en sol natif (cf :annexe 2), sont également présentées dans ce manuscrit.

I-1 Article

***In vitro* characterization of root border cells and exudates of three Sahelian woody seedlings from the Great Green Wall program differentially tolerant to drought.**

Alexis Carreras¹, Sophie Bernard^{1,2}, Gaëlle Durambur¹, Bruno Gügi¹, Corinne Loutelier³, Barbara Pawlak¹, Isabelle Boulogne¹, Maïte Vicré¹, Azeddine Driouich¹, Deborah Goffner⁴ and Marie-Laure Follet-Gueye^{1,2}.

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, Glyco-MEV EA4358, 76000 Rouen, France

² Normandie Univ, UNIROUEN, PRIMACEN, IRIB, 76000 Rouen, France

³ Normandie Univ, UNIROUEN, COBRA CNRS UMR 6014 76000 Rouen, France

⁴ CNRS UMI 3189 ESS, Pôle France, 13344 Marseille CEDEX 15, France

Author for correspondence:

Marie-Laure Follet-Gueye

Tel : +332 35 14 00 39

Email : marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

SUMMARY

- The root cap is primordial for seedling growth and supports root apical meristem integrity. The root cap releases root border cells (RBCs) that surround the root tip and ensure seedling protection against numerous stresses. RBCs and their associated mucilage form the root extracellular trap (RET). Here, RET and root exudate characterization of three Sahelian woody seedlings are performed.

- *Balanites aegyptiaca*, *Acacia raddiana* and *Tamarindus indica* seedlings were sub-cultured *in vitro*. RBC morphologies and RET organization were determined using confocal and transmission electron microscopy. The polysaccharide composition and arabinogalactan protein (AGPs) content were determined in the RET and the root exudates.

- While *Balanites aegyptiaca* produces only border cell (BC) type, the two Fabaceae seedlings release both BCs and border-like cells (BLCs). BCs are enclosed in a dense mucilage enriched in cell wall polymers. Compared to *Tamarindus indica*, RET and root exudates of *Balanites aegyptiaca* and *Acacia raddiana* include significantly more abundant AGPs.

- In contrast to *Balanites aegyptiaca* and *Acacia raddiana* which thrive in semi-arid areas, *Tamarindus indica* is more sensitive to drought. In this context, AGPs could contribute to woody seedling survival. This work opens new research perspectives regarding involvement of root tip chemistry in plant survival to aridity.

Key words: arabinogalactan proteins (AGPs), *Balanites aegyptiaca*, *Acacia raddiana*, *Tamarindus indica*, *Azospirillum brasilense*, root extracellular trap (RET), root exudates, root border cells (RBCs), woody plants.

INTRODUCTION

Plant soil anchorage and hydro-mineral acquisition are two vital functions mainly carried out by the underground root system. From the early stages of plant development, root system functionality impacts seedling survival. During root growth, the root cap ensures plant sensing (Chen *et al.*, 1999) and numerous protective functions (Hawes *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2009; Cannesan *et al.*, 2012). To preserve the root apical meristem from damage, the root cap produces root border cells (RBCs) (Driouich *et al.*, 2007). The RBCs comprise two types of cells named “border cells” (BCs) and “border-like cells” (BLCs), which differ in terms of morphology, organization and their degree of detachment. Indeed, following root tip hydration, BCs are released in the rhizosphere as living individual cells that surround the root tip (Hawes & Pueppke, 1986). However, BLCs remain tightly attached to the root tip and form adhesive layers of cells, as is the case in the model plant, *Arabidopsis thaliana* (Vicré *et al.*, 2005). Detachment of RBCs, correlated with the final step of root cap maturation, is an essential process to ensure root cap size maintenance (Kumpf & Nowack, 2015). RBC production appears to be dependent on cell wall-modifying enzyme activities that regulate intercellular connections (Stephenson & Hawes, 1994; Wen *et al.*, 1999; Durand *et al.*, 2009) and their last step of detachment from lateral root border cells is associated with cell death (Fendrych *et al.*, 2014). Among all of the cell wall polymers, homogalacturonan, a pectic compound, seems particularly critical in the RBC detachment process (Stephenson & Hawes, 1994; Wen *et al.*, 1999). In *Arabidopsis*, four NAC transcription factors, SOMBRERO (SMB), FEZ, BEARSKIN 1 (BRN1) and BRN 2, have also been identified for their involvement in root cap cell maturation and detachment (Willemsen *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2010; Kamiya *et al.*, 2016). Moreover, Karve *et al.*, (2016) showed that the transcription factor NIN-LIKE PROTEIN7 (NLP7) is required for the release of an adhesive layer of BLCs in *Arabidopsis*. The majority of these transcription factors mediates the expression of genes encoding cell wall modifying enzymes such as cellulase, xyloglucan-endo-trans-glucosylase, pectin lyase-like (Karve *et al.*, 2016), and polygalacturonase (Kamiya *et al.*, 2016).

RBCs secrete abundant mucilage (BLCs to a lesser extent) consisting of polysaccharides and proteins, combined with extracellular DNA and other metabolites (Hawes *et al.*, 2000; Vicré *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2007, 2009; Cannesan *et al.*, 2011). The mucilage, together with RBCs, form a protective web-like structure termed “Root Extracellular Trap” (Driouich *et al.*, 2013). The RET plays a key role in plant biotic and abiotic interactions in the rhizosphere. Some

RET compounds may attract or repel beneficial (Nagahashi & Douds, 2004) or pathogenic (Hawes *et al.*, 2000; Gunawardena, 2005; Cannesan *et al.*, 2012) telluric microorganisms respectively. BCs-associated mucilage is also described to reduce aluminium toxicity in bean and rice plants (Miyasaka & Hawes, 2001; Cai *et al.*, 2011). At the whole root level, the control of biotic and abiotic processes in the rhizosphere is ensured by the combined action of the RET and the root exudates. It is commonly accepted that over half of the root exudates are produced by RBCs (Griffin *et al.*, 1976; Hawes *et al.*, 2011). Root exudates are defined as the suite of chemical compounds secreted by plant roots, which contain small and high molecular weight molecules. The small molecules category represents amino or organic acids, sugars and secondary metabolites, and the high-molecular weight compounds include polysaccharides and proteins (Bais *et al.*, 2006). Among the molecules present in the RET or root exudates, arabinogalactan proteins (AGPs) are often cited in plant microorganism interactions (Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013; Koroney *et al.*, 2016). Nevertheless, the function of the RET and root exudates, and more particularly their cell wall polymers in relation to abiotic stress tolerance such as drought remains less understood.

Balanites aegyptiaca (*B. aegyptiaca*), *Acacia tortilis subsp. raddiana* (*A. raddiana*) and *Tamarindus indica* (*T. indica*) are among the indigenous Sahelian tree species that have been selected for large-scale reforestation in the framework of the African Great Green Wall (Grande Muraille Verte 2009). These species are gradually being reintroduced in the semi-arid areas of the Ferlo region in northern Senegal. After two to three months in nurseries, saplings are transplanted into field plots at the onset of the rainy season. *B.aegyptiaca* and *A. raddiana* thrive better in semi-arid areas compared to *T. indica*. In experimental field trials, two months after transplantation, *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* saplings had an average survival rate of 90% and 70% respectively, whereas *T. indica* saplings exhibited a survival rate of 30% (Wade *et al.*, 2017). With the exception of the study from Endo *et al.*, (2011), few studies have been devoted to the characterization of woody plant RBCs. Given the key role of RET in root meristem protection and seedling development, we have undertaken the microscopic and biochemical characterization of RET of these three woody seedlings. We have also explored the cell wall polymer composition of the root exudates.

Azospirillum brasilense (*A. brasilense*), a PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) living in soil, which can survive in arid and semiarid soils (Bashan *et al.*, 1995) *A. brasilense* is particularly known to promote growth and drought tolerance of plants

(Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2015). Moreover, *A. brasilense* is known to make a biofilm on plant roots (Bashan *et al.*, 1991; Broek *et al.*, 1993; Pagnussat *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017b) as a result of positive chemotaxis on saccharides and amino acids released by roots (Van Bastelaere *et al.*, 1999).

Ours data show that RBCs maturation features are distinct in woody *Fabaceae A. raddiana* and *T. indica* seedlings compared to *B. aegyptiaca*. Nevertheless, RBCs from all seedlings produce a mucilage which contains cell wall polysaccharides and proteoglycans. Some cell wall polymers are also identified in the root exudates. Although sugar composition of the root tip is similar in the three seedlings, arabinose and galactose content in RET and root exudates are species-dependent. While pectins have been detected for all seedling RET and root exudates, AGPs are mainly found in *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* exudates suggesting their putative involvement in root tip protection toward drought stress.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Balanites aegyptiaca fruits, *Acacia tortilis ssp. raddiana* and *Tamarindus indica* seeds were collected by the *Projet National de Semences Forestières* (PRONASEF) in Senegal.

The hardwood endocarp of *B. aegyptiaca* fruits was mechanically broken to release the seeds. Seeds were surface sterilized with 70 % (v/v) ethanol (10 min), then with 0.9% (v/v) sodium hypochlorite (15 min), washed 5 times in sterile water and incubated at 25°C for at least 48 h for imbibition. *A. raddiana* and *T. indica* seeds were scarified by 95 to 98% sulfuric acid (Sigma-Aldrich) for 1 h. After sulfuric acid removal, seeds were washed with sterile water, surface sterilized with 0.9% (v/v) sodium hypochlorite (15 min), and washed 5 times in sterile water before incubation at 25°C for at least 24 h for imbibition.

Sterilized seeds were deposited on Bacto Agar (1%). The plates were placed vertically in a growth chamber at 25°C in darkness. Microscopic observations and biochemical analysis were performed on roots that were 2 to 4 cm long.

Histochemical staining and light microscopy

Root tips from woody seedlings were mounted on microscope slides in a drop of 1X Phosphate-buffered saline pH 7 (PBS 1X) for observation using a stereomicroscope (Leica M125). Root border cells were collected on microscope slides in a drop of water for examination using bright-field microscopy. The ratio between cell length and cell width was determined for each root border cell. For the cytochemical staining of pectins, detached root border cells were treated with a solution of 0.05% (w/v) ruthenium red dye (Sigma) in deionized water (10 to 15 min), then washed extensively in deionized water. Detached root border cells were mounted as described above, and observed using a bright-field microscope. In order to examine the mucilage produced by the root border cells, India ink staining was performed on microscope slides. Five min after collection of root border cells in a drop of PBS, diluted India ink (1:2000) aqueous solution was added. To observe root border cells and root tip morphologies, longitudinal sections of root tips fixed with 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde mixture (v/v) in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2, dehydrated and embedded in London Resin White, were stained with toluidine blue and observed in bright field microscopy. Images were acquired with a Leica DMLB DFC 300 FX camera using bright-field microscopy.

Vital staining of root border cells was performed with 5 μ M calcein AM (Sigma-Aldrich) as previously described by Vitré *et al.*, (2005). Briefly, root border cells were stained for 60 min, and observed using a microscope equipped with UV fluorescence (excitation filter, 490 nm; emission filter, 520 nm). Images were acquired with a Leica DCF 300 FX camera.

Immunofluorescence labelling

Immunofluorescence analyses were performed both on freshly harvested root tips and on fixed-embedded longitudinal root tip sections. Plant Probes monoclonal antibodies (mAbs) were used to recognize epitopes of a range of plant cell wall polymers: α -D-glucans (LM1), AGP (LM2, JIM4, JIM8, JIM13, JIM14 and JIM16), xyloglucan (LM15), rhamnogalacturonan-I (LM5, LM6, LM13 and LM16), homogalacturonans (LM19 and LM20) and xylogalacturonans (LM8). For immunofluorescence labelling of freshly harvested material, root tips were fixed for 60 min with 4 % paraformaldehyde in PBS (v/v). Samples were washed and saturated for 30 min in PBS + 1 % (w/v) bovine serum albumin (BSA). After an overnight incubation (4°C, humid chamber saturated) with diluted mAbs (1:5) in PBS + 0.1% Tween 20 (PBST), samples were carefully washed in PBST. Then, samples were incubated 1h at 37°C in darkness with secondary antibody (anti-rat Goat-IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate, 1:50, Sigma). After washing in PBST, root tips were mounted in antifading agent (Citifluor; Agar Scientific) and examined using laser scanning confocal Leica TCS SP2 DMIRE2 microscope. Control experiments in the absence of antibodies were routinely performed.

To detect cell wall polymers in root tips and surrounding border cells, root tips were fixed in 1% paraformaldehyde (v/v) and 1% glutaraldehyde (v/v) in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2 for 2 h at room temperature. Samples were then washed with distilled water and dehydrated in a progressive ethanol gradient. Finally, root tips were embedded and polymerized in LRWhite resin. Semi-thin sections were stained with specific mAbs (see Table 1). Root tips sections were incubated overnight at 4°C, with primary antibody (1:10 in PBS + 1% BSA). After 6 washes in PBS + 1% BSA, sections were incubated 1h at 25°C with secondary antibody (goat IgG anti-rat FITC conjugated, 1:100, Sigma). Finally, sections were washed 3 times in PBS + 1% BSA. Observations were made using an epifluorescence microscope Leica DMI600B.

Ultrastructural and immunogold analyses using transmission electron microscopy

Root tips were frozen in MES buffer (20mM MES; 2mM CaCl₂ 2H₂O; 2mM KCl; pH 5.5) and 0.2 M sucrose with the high pressure freezer HPM100 (Leica microsystems). Samples were freeze substituted with automate AFS2 (Leica microsystems) in anhydrous acetone + 0.5% uranyl acetate at -90°C for 72 h, dehydrated and embedded in LRWhite resin. Ultrathin sections (90 nm; EM UC6 Leica microsystems) of root tips were collected on nickel grids and blocked in TBS (20 mM Tris-base; 200 mM NaCl; pH 7.2) + 0.2% of BSA. Sections were then incubated with the primary antibody (JIM13, Plantprobes) for 3 h at 25°C. After washing in TBS buffer + 0.2% BSA + normal goat serum 1/30, grids were incubated for 1 h at 25°C with the goat anti-rat secondary antibody conjugated to 25 nm gold particles (dilution 1/20 in TBS+ 0.2%BSA, Aurion, ref : 825.055). Then, sections were washed and fixed in TBS + 2% glutaraldehyde. Prior to transmission electron microscopy observation, all sections were stained with UranylLess (Delta microscopie, ref: 11.000) and Reynolds lead citrate 3% (Delta microscopie, ref: 11.300). Observations were made with a FEI Tecnai 12 Biotwin transmission electron microscope operating at 80 kV, with ES500W Erlangshen CCD camera (Gatan).

Collection of root fractions

Root tips, RET (RBCs and associated mucilage) and root exudates were collected from 4 cm-long seedlings. Seedlings were placed vertically in 50 mL Falcon tubes (1 plant per tube) and kept in a growth chamber for 3 days at 25°C 16 h light / 22°C 8 h dark cycle, in Murashige and Skoog medium supplemented with 3% (w/v) sucrose. After 3 days, seedlings were washed with distilled water and transferred into distilled water for an additional 3 days. Medium was then centrifuged (1,400 g for 15 min) to separate root border cells and associated mucilage from the root exudates. Two fractions were thus obtained, one enriched in root exudates and another enriched in root border cells with associated mucilage, the latter constituting the root extracellular trap (RET). Finally, a root tip fraction was also collected by excision of 5mm root length fragments from the washed root tip (free of root border cells). The root tip, root exudates and RET fractions were freeze-dried and weighed for subsequent biochemical analyses.

Preparation of Alcohol Insoluble Residues (AIR)

Root tip and RET fractions were crushed in 70% ethanol. In order to remove pigments, successive incubations were performed in 70% ethanol at 70°C for 15 min and centrifuged at 4,000 g for 15 min at 4°C. Once pigments were completely removed from samples, the insoluble residue was washed in methanol: chloroform (1: 1) overnight at RT and centrifuged at 4,000 g for 15 min at 4°C. After another incubation in acetone overnight at RT, the fraction was centrifuged at 4 000 g for 15 min at 4°C to obtain the Alcohol Insoluble Residue (AIR) of the root tip and RET fractions. AIR were then freeze-dried and weighed. Glycopolymers of root exudates enriched fraction were precipitated in distilled water and ethanol mixture (1:5, v-v) at -20°C overnight. After another centrifugation, soluble supernatant was removed and AIR from root exudates fraction was freeze-dried and weighed.

Monosaccharide analysis using Gas Chromatography

Two mg of AIR from root tip, RET and root exudate--enriched fractions were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (TFA) for 2 h at 110°C. After freeze-drying, samples were then converted in methylglycosides by heating in 1 M methanol-HCl (Supelco) overnight at 80 °C. Samples were dried under a stream of air, washed twice with methanol and then treated with hexamethyldisilazane (HMDS): trimethylchlorosilane (TMCS): pyridine solution (3:1:9, Supelco), for 20 min at 80°C. The resulting trimethylsilyl methyl glycosides were dried, resuspended in 1ml of cyclohexane and injected in the 3800 GC system equipped of a CP-Sil5-CB capillary column (Agilent Technologies). Elution was performed with the following temperature gradient: 120°C to 160°C at a rate of 10°C min⁻¹, 160°C to 220°C at a rate of 1.5°C min⁻¹, 220°C to 280°C at a rate of 20°C min⁻¹. Monosaccharide quantification was carried out using standards determined for each monosaccharide.

Sugar linkage analysis of AIR from root exudates

AIR (5mg) from RT, RET and root exudates were permethylated with iodomethane in a suspension of NaOH in dry DMSO and the resulting partially methylated alditol acetate derivatives were prepared according to protocols described by (Thevis *et al.*, 2000) GC-MS experiments were performed using an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled with a time-of-flight mass spectrometer JEOL GC-AccuTOF (Tokyo, Japan) equipped with the Mass Center 3.1 data system. Chromatographic

separations were obtained using either a (30m, 0.25mm id, 0.25 μ m film thickness, ZB-5MS, Phenomenex, Torrance, CA, USA) or a (30m, 0.25mm id, 0.25 μ m film thickness, HP-5MS, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) capillary columns. Helium was the carrier gas and the flow-rate was 0.8mL.min⁻¹. The oven temperature was programmed initially from 100°C (1 min hold time) to 160°C with a 10°C min⁻¹ ramp, then to 220°C with a 2°C min⁻¹ ramp and finally to 280°C with a 15°C min⁻¹ ramp. The final temperature hold time was 5 min (total run: 53 min). The temperatures of the injector and the interface were 250°C and 260°C, respectively. Injections of 1 μ L were performed in splitless mode using an Agilent 7693A front injector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Electron ionization mass spectra were recorded using an electron energy of 70 eV, an ionizing current of 300 μ A and a detector voltage of 2200 V. The temperatures of the ion source and interface were 250°C and 260°C, respectively. The m/z range was 35-650. The instrument mass resolution was 8,000 (full width at half maxima (FWHM)) and PDMS ion m/z 207 was used as the internal reference. Sugar linkage analysis was deduced from the EI-MS fragmentation patterns of partially methylated alditol acetate derivatives according to <http://www.ccruc.uga.edu/databases/PMAA>.

Arabinogalactan II (AGII) detection by rocket electrophoresis

Yariv reagent (β -D-Glc Y) (Nguema-Ona et al, 2012; Kitazawa *et al.*, 2013) was used to detect the presence of free or attached AGII to AGPs in RET and root exudates using rocket electrophoresis. Gels were composed of 1% agarose containing 90 mM Tris (pH 8.3), 90 mM boric acid, 2 mM EDTA, and 20mg ml⁻¹ of β -D-Glc Y reagent according to van Holst and Clarke (1986). AIR from the RET and root exudates fractions (1mg) were loaded into each well and run for 16 h at 200V/5 mA/10 W. Gum arabic from acacia (Fisher Scientific) was used as a standard. After migration, gels were rinsed with 2% NaCl (w/v). Quantity of AGII was estimated using peak areas of gum arabic as standard. Peak areas of AGII were from the three seedling fractions and gum arabic were calculated using ImageJ software.

Growth curves of the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense Sp245 pMP244 was tested for the ability to utilize *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* enriched exudate fraction as carbon and nitrogen source.

A. brasilense was pre-cultured in liquid LB medium with 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of gentamicin for 24 h at 25°C, under constant agitation. When the OD_{580nm} of the strain reached 1.5, the pre-culture was transferred to mineral medium complemented with carbon and hydrogen source (MM+CN, see table S1 for composition) (Vanstockem *et al.*, 1987) supplemented with 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of gentamicin, under constant agitation. The medium MM+CN inoculated with *A. brasilense* was used to inoculate samples for the growth studies with initial OD_{580nm} = 0.1.

The negative control was the mineral medium (MM, see table S1 for composition) inoculated with *A. Brasilense*. The positive control was mineral medium complemented with carbon and hydrogen source (MM+CN) inoculated with *A. Brasilense*. The enriched exudates contamination control was done without bacteria inoculation. Assays were done with *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* enriched exudate fraction (1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) in mineral medium inoculated with *A. Brasilense* (MM+RE, see table S1 for composition)

Samples were taken from the cultures at each time point, and the appropriate dilutions were prepared in physiological water (NaCl 8.5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) and 0.1 ml was plated on solid LB medium without gentamicin. Colony-forming units were counted after incubation at 25°C for 96 h.

Statistical analysis

Three biological replicate pools of 100 plants were made to obtain RT, RET and root exudate fractions. GraphPad Prims 7.0 software was used for statistical analysis with $\alpha = 5\%$. Normality test was performed with Shapiro-Wilk normality test, and equality of variances was performed with Brown–Forsythe test. Parametric test (one way ANOVA with Tukey’s multiple comparisons) was performed on samples following normality and equality of variances. Nonparametric tests (Kruskal-Wallis with Dunn’s multiple comparisons and Mann-Whitney) were performed on samples not following normality.

RESULTS

RET morphology of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica*

RBCs detachment and associated mucilage

RBCs from the seedlings are very cohesive, and form sheath-like structures in *B. aegyptiaca* (Fig. 1a,b), *A. raddiana* (Fig. 1d,e) and *T. indica* (Fig. 1g,h). Force was needed to obtain the sheath-like structures containing RBCs and mucilage from the root tips of the Fabaceae (Fig. 1e,h), whereas they readily detached from the root tip of *B. aegyptiaca* (Fig. 1b).

B. aegyptiaca RBCs detachment is restricted to the root tip area (Fig. 1a), and the root cap produces uniquely BCs embedded in a thick mucilage (Fig. 1c). RBCs of the two Fabaceae *T. indica* and *A. raddiana* surround the root apex up to 3 mm and 6 mm above the tip respectively (Fig. 1d,g). *A. raddiana* root tip produces mainly BLC forming long sheaths of cells (Fig. 1d,e). Roots of *T. indica* release almost exclusively BLCs (Fig. 1g,h) in the form of fibrous sheaths of cells, although less elongated compared to those observed in *A. raddiana*. Moreover, spherical RBCs located to the root tip of *A. raddiana* (Fig. 1f) and *T. indica* (Fig. 1i) seedlings are individually detached and can be categorized as BCs. Mucilage surrounds RBCs in *A. raddiana* and *T. indica* close to the root tip (Fig. 1f,i).

After detachment of RBCs, an extensive white halo of the mucilage enclosing RBCs with India ink staining in all three plants were observed, RBCs produce a mucilage (Fig. 1 j-l). Moreover, calcein-AM staining showed that RBCs are still living at the time of their release from the root tip of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* (Fig. S1).

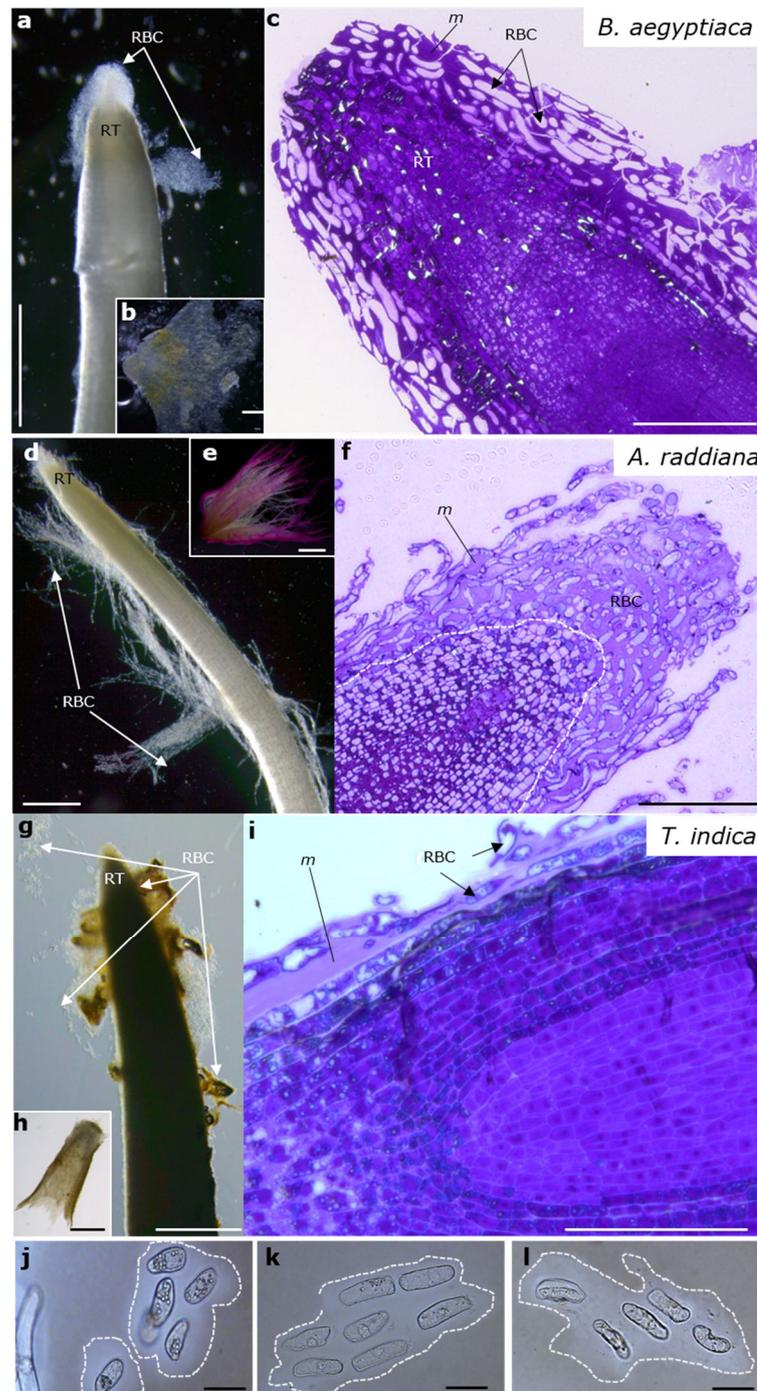


Figure 1 : RBC detachment following hydration of *B. aegyptiaca* (a), *A. raddiana* (d) and *T. indica* (g) root tips. Sheath-like structures are isolated from the root tip of *B. aegyptiaca* (b), *A. raddiana* (e) and *T. indica* (h). (e) sheath-like structure from *A. raddiana* root tip is stained with ruthenium red. Longitudinal semi-thin sections of fixed, dehydrated and embedded root tip of *B. aegyptiaca* (c), *A. raddiana* (f) and *T. indica* (i) are stained with the toluidine blue and observed using bright-field microscopy. (f) The white dashed line define the root tip area. (i) The open root apical meristem of *T. indica* seedling. (j-l) mucilage staining of RBC with India ink (white dashes

lines surround the mucilage). *m*, mucilage; RBC, root border cells; RT, root tip; Scale bars: 1 mm (a, b, d, e, g and h); 100 μm (c, f, and i) ; 50 μm (j-l).

The different morphotypes of RBCs

To determine the relative proportions of the different RBC cellular morphotypes, 2,500 RBCs were observed for each of the three plants (Fig. 2 a-c), and the ratio between cell length and cell width was calculated. Three morphotypes were defined : “spherical” (ratio 1 - 1.5), “intermediate” (ratio 1.5 - 5.5) and “elongated” (ratio ≥ 5.5). The averages of the different morphotypes for the three species are shown in Fig 2d. RBCs from *B. aegyptiaca* are composed of $3.5 \pm 2.1\%$ spherical, $68.0 \pm 6.6\%$ intermediate and $28.5 \pm 8.0\%$ elongated morphotypes. RBCs from *A. raddiana* are composed of $5.2 \pm 1.6\%$ spherical, $76.0 \pm 3.9\%$ intermediate and $18.8 \pm 3.3\%$ elongated morphotypes. RBCs from *T. indica* are composed of $3.3 \pm 1.0\%$ of spherical, $66.3 \pm 7.2\%$ of intermediate and $30.4 \pm 7.6\%$ of elongated morphotypes.

Thus, the relative proportion of the three RBCs morphotypes did not differ among the three species: the spherical RBCs represented around 5%, the intermediate RBCs represented 70% (the most highly represented), and the elongated RBCs constituted 25%. The spherical RBCs were easily isolated from all the three species, without strong cellular adhesion, suggesting they are mainly BCs type.

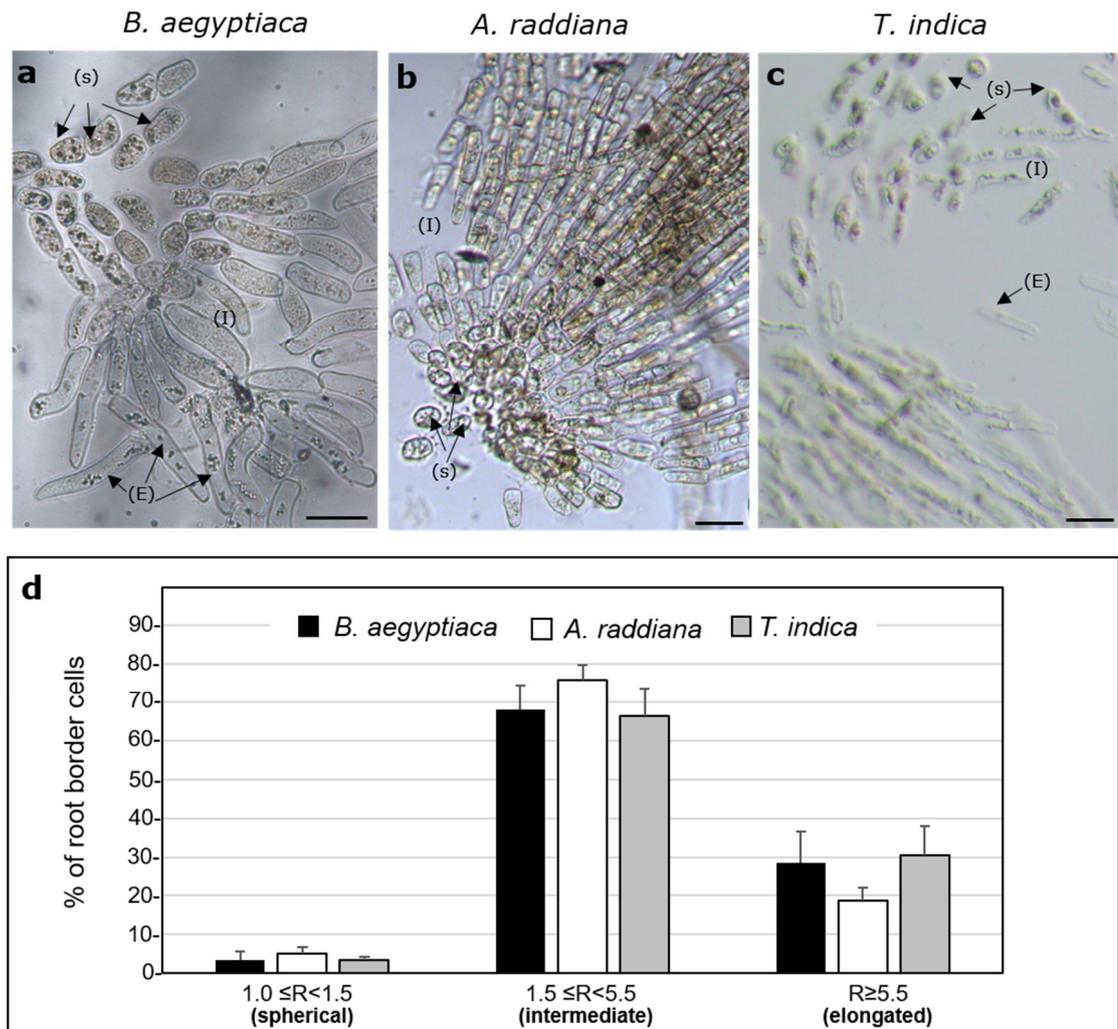


Fig. 2: RBC morphology (a-b) bright-field micrograph of detached RBC from *B. aegyptiaca* (a), *A. raddiana* (b) and *T. indica* (c) root tip. (c) The ratio between the cell length and the cell width (n=2,500, Tukey's multiple comparisons test used * : p value<0.05). E: elongated cell; i: intermediate cell; R: ratio; S, spherical cell;. Scale bar, 100 μ m.

Ultrastructure of RBCs

To investigate in more details the ultrastructure of RBCs of the three woody seedlings, transmission electron microscopy was performed on longitudinal ultrathin sections from root tips with associated RBCs and mucilage, prepared by high-pressure freezing and subsequent freeze substitution (Figs. 3 and 4). RBCs located at *B. aegyptiaca* (Fig. 3) root tip and approximately located to 2 mm above the root tip of, *A. raddiana* (Fig. 4a-c) and *T. indica* (Fig. 4d-f) were observed.

RBCs of *B. aegyptiaca* were BC type, and contained a dense cytoplasm particularly enriched in mitochondria, multivesicular bodies, endoplasmic reticulum, Golgi stacks and enlarged secretory vesicles, suggesting that they are metabolically active (Fig. 3b,c). The thick mucilage which surrounded the detached cells most likely plays a role in their strong cohesion (Fig. 3a, zone 2).

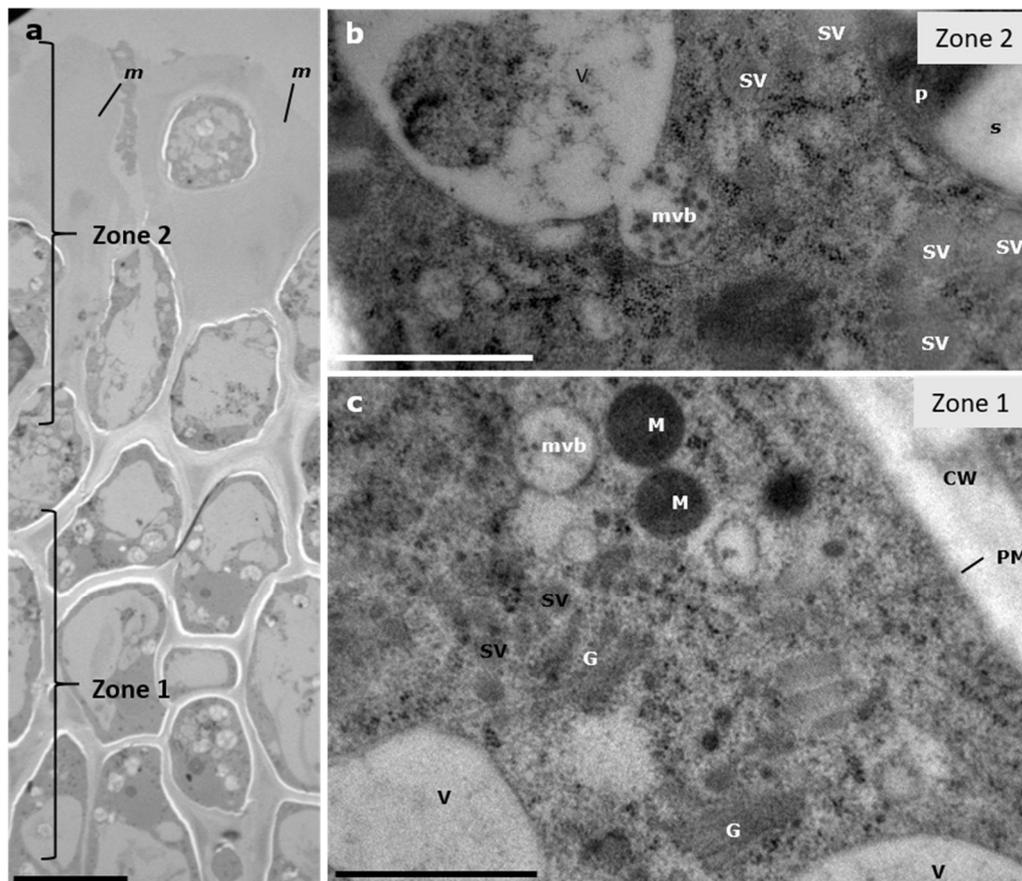


Figure 3: TEM micrographs showing the ultrastructural *B. aegyptiaca* RBC

CW: cell wall, G: golgi, mvb: multivesicular body, M: mitochondrion, m: mucilage, PM: plasma membrane, P: plaste, SV: secreted vesicle, S: starch, V: vacuole

Scale bars: a: 20 μm ; b and c: 1 μm

RBCs of *A. raddiana* and *T. indica* observed at 2 mm from the root tip are BLC type. Numerous cytoplasmic organelles, including endoplasmic reticulum, Golgi stacks and enlarged secretory vesicles are also observed for *A. raddiana* (Fig. 4b,c) and *T. indica* (Fig. 4e,f), suggesting that BLCs of the two Fabaceae are alive. The uppermost BLCs layers (Fig. 4a,d, zone 2) have a large vacuole and a thin cytoplasm oppressed between the tonoplast and the plasma membrane, compare to inner BLCs layers (Fig. 4a,d, zone 1). In fact, a gradual decrease of cytoplasm volume combined to an increase of vacuolar size is detected in the upper BLCs layers of *A. raddiana* and *T. indica* (Fig. 4a,d, zone 1). The plasma membrane and the cell wall seem to remain intact during this evolution. Besides, these morphological changes detected here are concomitant to the accumulation of some highly electron dense elements in the space between the plasma membrane and the cell wall (see stars in Fig. 4b,e). Moreover, it is worth noting that some electron dense material is specifically observed in the cytoplasm of inner BLCs layer of *A. raddiana* (see stars in Fig 4a, zone 1 and 4c).

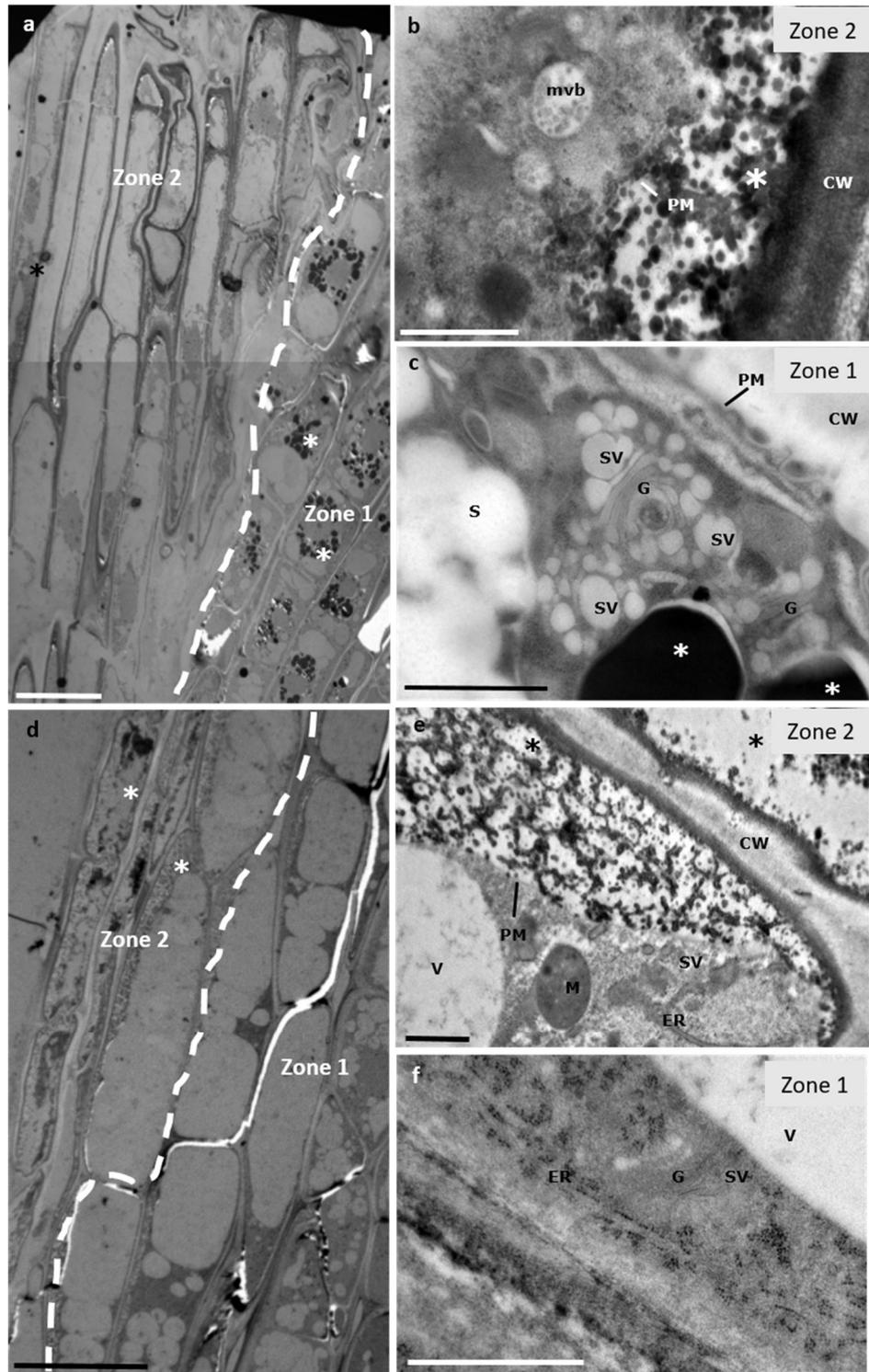


Figure 4: TEM micrographs showing the ultrastructural of *A. raddiana* and *T. indica* RBC
 CW: cell wall, G: golgi, mvb: multivesicular body, M: mitochondrion, PM: plasma membrane, SV: secreted vesicle, S: starch, V: vacuole. Asterisk represent some electron dense materials.
 Scale bars: a and d: 20 μm ; b,c,e and f: 1 μm

Monosaccharide composition of the root tip, RET and root exudate enriched fractions

The monosaccharide composition of AIR of the root tip, RET and root exudate fractions of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* was determined by GC-FID (Fig. 5). The monosaccharide composition of the root tip fraction of the three plants do not any show significant differences (Fig. 5a). Galactose (Gal), galacturonic acid (GalA), glucose (Glc), arabinose (Ara) and xylose (Xyl) represent the major monosaccharides. In contrast, the AIR of the RET fraction present significant differences among the three plants (Fig. 5b). The major monosaccharides represented in the three plants are Ara, Xyl, Gal and Glc, suggesting that pectin compounds with galactan and/or arabinan chains, xyloglucan and AGPs could be present in the RET. Yet, the proportion of Ara and Gal are highly different according to plant species. The relative proportion of Ara is high in *A. raddiana* (45%) compare to *T. indica* (25%) and *B. aegyptiaca* (10%). On the contrary, the relative proportion of Gal is highest in *B. aegyptiaca* (30%), followed by *T. indica* (25%) and *A. raddiana* (5%).

The root exudate fractions show the greatest differences in monosaccharide proportion among the three plants. Of the the nine monosaccharides analyzed seven show significant differences among plant species (Fig. 5c). Thus, the monosaccharide composition of the root exudate fraction seems plant specific. Root exudate fraction of *B. aegyptiaca* is mostly composed of Gal (40%), the other representative sugars are Ara, Xyl, GlcA and Glc (around 10% each), and the less represented are Rha, Man and GalA (around 5% each). The three major monosaccharides in the root exudate fraction of *A. raddiana* are Ara, Xyl and Gal (around 25% each), the other sugars are few represented (between 2% to 5% each). Root exudate fraction of *T. indica* is mostly composed of Xyl (40%), the other representative sugars are Glc (25%), Ara and Gal (around 12% each), the proportion of the other monosaccharides is extremely low (between 1% to 3% each).

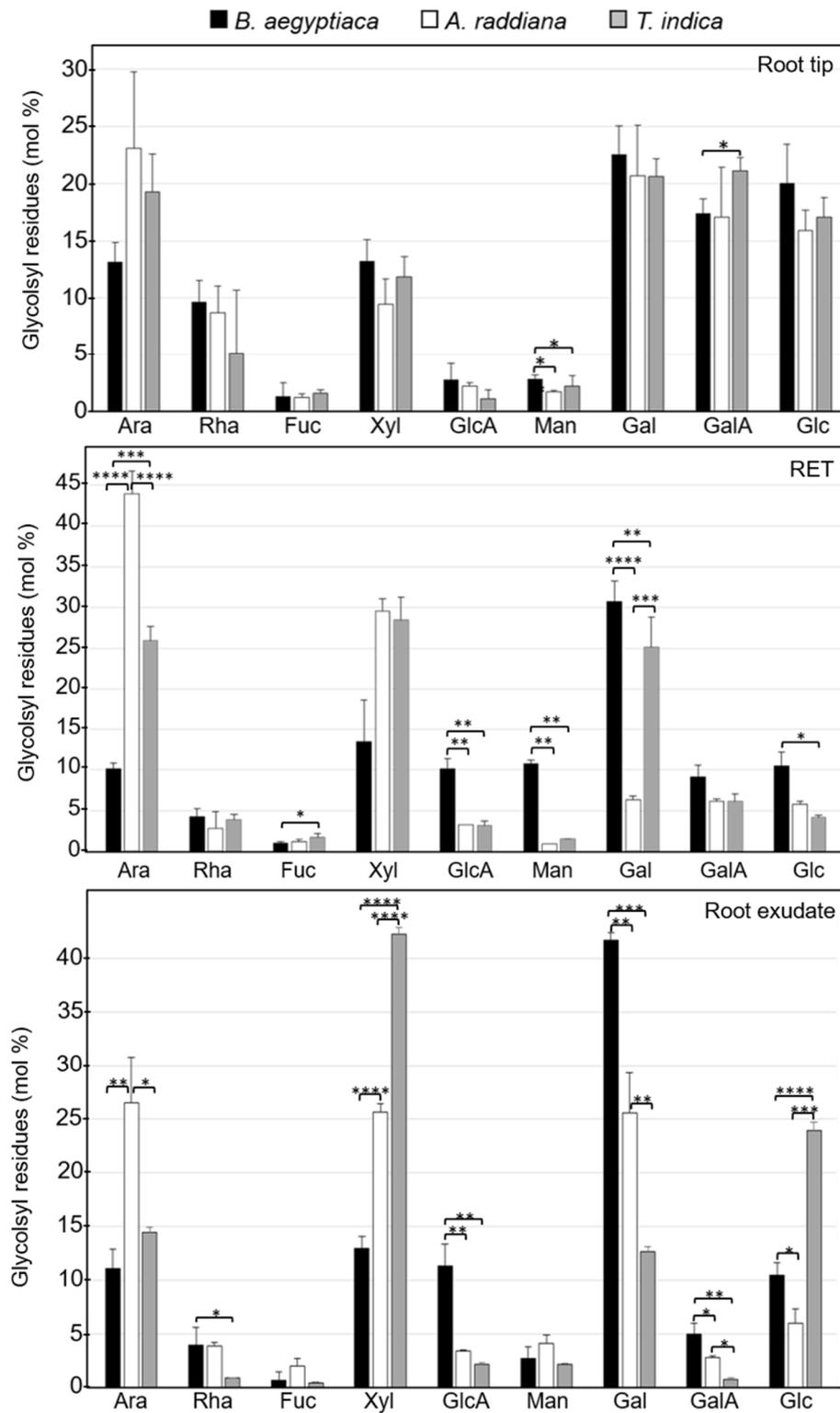


Figure 5 : Monosaccharide composition of alcohol insoluble residu of the root tip (A), RET (B) and root exudate (C) fractions from *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* seedlings. Each histogram represents the means of 3 technical replicates from 3 biological replicates. (n=9, Dunn’s multiple comparisons test used. **** $P \leq 0.0001$ *** $P \leq 0.001$ ** $P \leq 0.01$ * $P \leq 0.05$)

Nature of CW polymers in the root exudates of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica*

Sugar linkage analysis of the four major monosaccharides of the AIR of the root exudate fraction was performed (Table 1) to link to corresponding polysaccharides. The root exudate fraction of the three plants show typical sugar linkage of arabinan side chain of rhamnogalacturonan-I, type II arabinogalactan, xyloglucan and xylan. The two Fabaceae *A. raddiana* and *T. indica* root exudate fractions show typical sugar linkage of arabinoxylan, but not *B. aegyptiaca*. Furthermore, *A. raddiana* root exudate fraction is the only one with a galactan side chain on rhamnogalacturonan-I.

Table 1 : Sugar linkage analysis of major polysaccharides from alcohol insoluble residu of root exudate fraction.

Sugar	<i>B.aegyptiaca</i>	<i>A.raddiana</i>	<i>T.indica</i>	Polysaccharides
Arabinose	T-Ara	T-Ara	T-Ara	Type II Arabinogalactan (AG-II)
		3-Ara		Rhamnogalacturonan type I (RG-I)
		5-Ara	5-Ara	Arabinoxylan (AX)
	3,5-Ara	3,5-Ara	2,5-Ara	RG-I
	2,3,4 Ara	2,5-Ara		RG-I
Xylose	T-Xyl	T-Xyl	T-Xyl	Xylan, Xyloglucan (XyG)
	3,4-Xyl	3,4-Xyl		Xylan
	2,3,4-Xyl		2,3,4-Xyl	Xylan
Galactose	T-Gal	T-Gal	T-Gal	Type I AG (AG-I), AG-II
	3-Gal	3-Gal	3-Gal	AG-II
		4-Gal		AG-I
	3,6-Gal	3,6-Gal	3,6-Gal	AG-II
Glucose	T-Glc	T-Glc	T-Glc	XyG

AGPs content in the RET and root exudate enriched fraction

Monosaccharide composition combined to sugar linkage analysis suggests the presence of type II arabinogalactan, a typical side chain of AGPs. AGPs can be detected and quantified by rocket gel electrophoresis with the β -D-glucosyl Yariv reagent (β -D-Glc Y), as AGPs form a colored insoluble complex with it (Nguema-Ona *et al.*, 2012; Kitazawa *et al.*, 2013). Rocket gel electrophoresis of the AIR of RET-enriched fractions only detected AGPs in *B. aegyptiaca* ($0.38 \mu\text{g AGPs.mg}^{-1}$ RET enriched fraction) and not in the other two species (Fig. 6a). As for

the AIR rocket gel of root exudate-enriched fractions, AGPs were detected in all the three plants, albeit with AGP content higher in *B. aegyptiaca* followed by *A. raddiana* and finally, *T. indica* (Fig. 6b). Based on the gum arabic standard, *B. aegyptiaca* contained the highest level of AGPs with 3 $\mu\text{g. g}^{-1}$ dry weight of AIR of root exudates (Fig. 6c).

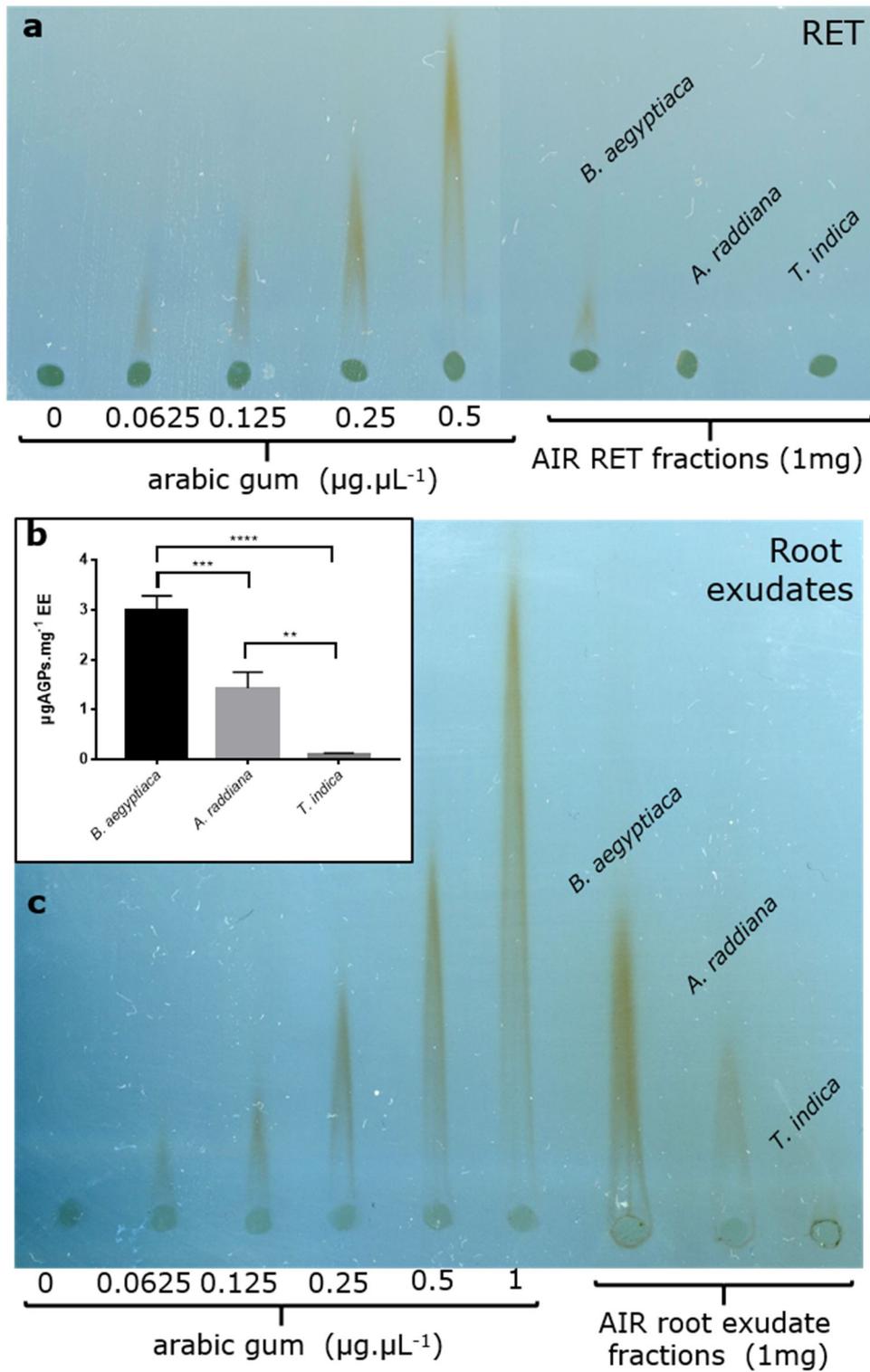


Figure 6 : AGPs content in enriched RET and root exudate fractions.

Histograms of arabinangalactan protein estimation (a), and an exemple of estimation of arabinangalactan protein gel precipitated with β -Yariv reagent (b). Each histogram represents the means of 3 biological replicates. (n=3, Tukey's multiple comparisons test used. **** $P \leq 0.0001$ *** $P \leq 0.001$ ** $P \leq 0.01$).

Nature of CW polymers in the RET of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica*

Immunofluorescence labelling experiments using mAbs recognizing a large panel of CW polymers were performed on fresh root tips and embedded root tip sections of the three plant species (Table 2).

Table 2: Result of immunolabeling of major cell wall sugar motifs in the RET of the three woody seedlings by immunofluorescence microscopy. AGP: arabinogalactan protein ; G: Glucose ; HG: homogalacturonan ; RG: Rhamnogalacturonan ; X: Xylose.

Antibody	Antigen	References	<i>B. aegyptiaca</i>	<i>A. raddiana</i>	<i>T. indica</i>
LM15	XXXG-motif , XyG	Marcus et al., 2008	+	+	+
LM5	[β (1-4) galactan] _{>3} , RG-I	Jones et al., 1997	nd	nd	+
LM6	[α (1-5) highly branched arabinan] _{5/6} , RG-I	Verhertbruggen et al., 2009	+	+	+
LM13	[α (1-5) unbranched arabinan] _{5/11} , RG-I	Moller et al., 2007	nd	nd	+/-
LM16	Galactosyl residue/galactan stub between arabinan chain and RGI backbone, RG-I	Verhertbruggen et al., 2009	nd	nd	+/-
LM19	HG with low degree of esterification	Verhertbruggen et al., 2009	+	+	+
LM20	HG with high degree of esterification	Verhertbruggen et al., 2009	+	+	+
LM8	Xylogalacturonans	Willats et al., 2004	+	nd	+/-
LM1	Extensin	Smallwood et al., 1995	+	+	+
LM2	β -D-GlcpA , AGPs	Yates et al., 1996 Smallwood et al., 1996	+	+	+
JIM4	β GlcA-(1,3)- α GalA-(1,2) Rha, AGPs	Yates et al., 1996	nd	+	nd
JIM8	AGPs	Pennell et al., 1991 McCabe et al., 1997	+	+	+
JIM13	β GlcA-(1,3)- α GalA-(1,2)-Rha, AGPs	Knox et al., 1991	+	+	+
JIM14	AGPs	Yates et al., 1996	+	nd	nd
JIM16	AGPs	Yates et al., 1996	+	nd	+/-

Fresh root tips allowed surface localization of the epitopes whereas root tip sections enabled epitope detection from the inner cells of the root tip. Immunocytochemical analysis was done with antibodies recognizing CW polymer epitopes like hemicellulose named

xyloglucan (XyG), pectins named rhamnogalacturonan-I (RG-I), homogalacturonans (HG), xylogalacturonan; and hydroxyprolin rich glycoproteins (HRGPs) named extensins and arabinogalactan proteins (AGPs). Results on fresh root tips and/or on embedded root tip sections are summarized in table 2.

For XyG, the XXXG epitope is detected in RBCs cell wall and mucilage of all three species (table 2, Fig. 7a-c).

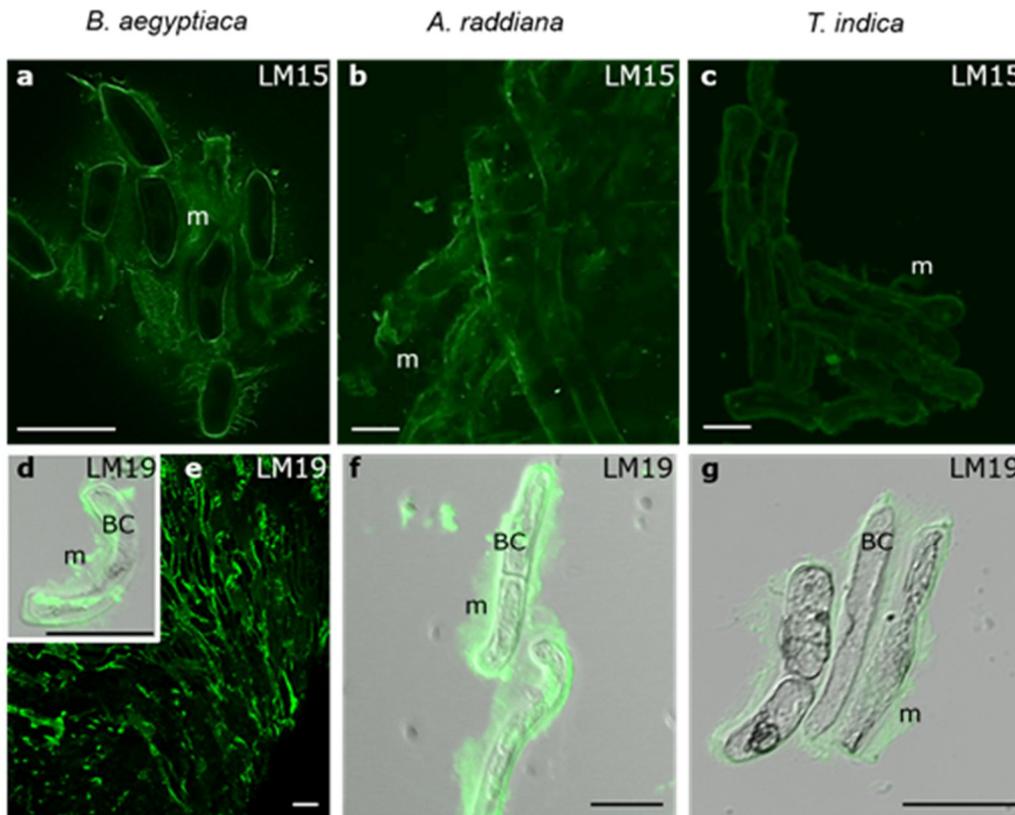


Figure. 7 : (d-f) Immunofluorescence labelling of xyloglucan epitopes recognized by mAb LM15 at the cell surface of the RBC and in their associated mucilage. (g-j) Immunofluorescence labelling of homogalacturonan epitopes recognized by mAb LM19 mainly in the mucilage associated to RBC. BC: Border cells; m: mucilage; Scale bar: a-g: 50 μ m.

For RG-I, epitope recognized by mAb LM6 (short chain arabinan) is the only one detected in all species in the RBCs cell wall and mucilage. The other RG-I epitopes were only detected in *T. indica* (table 2), and the epitope recognized by the mAb LM5 (galactan chains) is present only in RBCs cell wall, not the mucilage (Fig. S2). HG epitopes with high and low degree of esterification were detected in RBCs cell wall and mucilage of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* (table 2, Fig. 7d-f). Xylogalacturonans epitope recognized by the mAb

LM8 is present in RBCs cell wall and mucilage of *B. aegyptiaca*, but not detected on *A. raddiana* (table 2). (table 2, Fig. S2).

Using mAb LM1, extensins are detected in RBCs cell wall and mucilage of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* (table 2, Fig. 8a-c). To detect the presence of AGPs, we used six different mAbs. LM2, LM8 and JIM13 label detected in RBCs cell wall and mucilage of all three plants (table 2, Fig. 8d-i). JIM 13 epitopes were less abundant in *T. indica* RBCs cell wall and mucilage compared to *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* (Fig. S3). Epitope recognized by mAb JIM4 was only present on *A. raddiana* root tip and *B. aegyptiaca* was also the only one to show fluorescence with mAbs JIM14 and JIM16. For JIM14 we observed fluorescence restricted to the RBCs cell wall (table 2, Fig. S2).

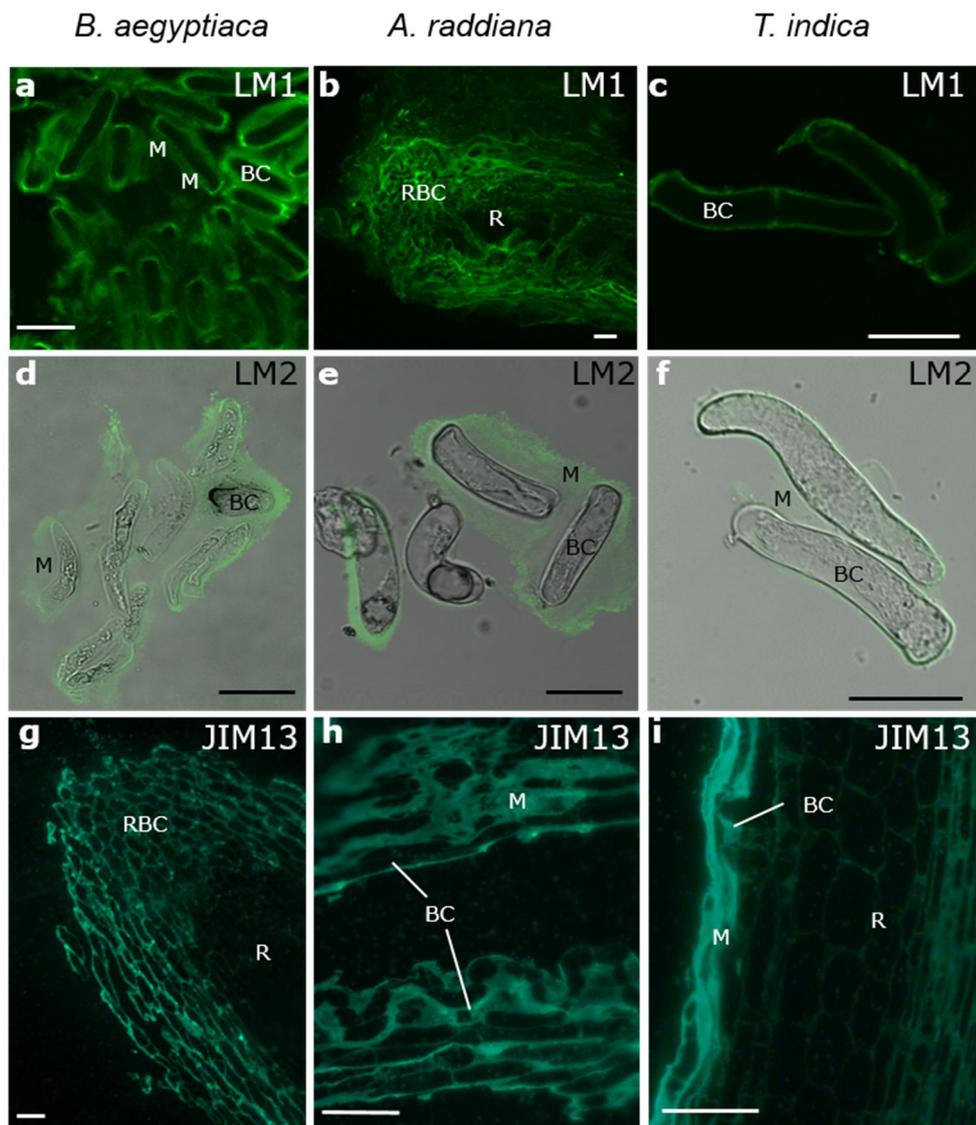


Figure 8 : (a-b) Immunofluorescence labelling of extensin epitopes recognized by mAb LM1 mainly in the mucilage associated to *B. aegyptiaca* (a) and *A. raddiana* (b) RBC. (d-e) Immunofluorescence labelling of arabinogalactan protein epitopes recognized by mAb LM2 mainly in the mucilage associated to *B. aegyptiaca* (d) and *A. raddiana* (e) RBC. (g-i) Immunofluorescence labelling of arabinogalactan protein epitopes recognized by mAb JIM13 on longitudinal section of root tips. BC: border cell; M: mucilage, R: Root; RBC: root border cells. Scale bars: a and c: 50 μ m; b: 100 μ m; d-i : 50 μ m.

Growth effects of root exudates enriched fraction on the Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) *A. brasilense*

The root exudate-enriched fractions of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* were added to a mineral medium inoculated with *A. brasilense*. Growth curves were measured and compared to inoculated mineral medium with or without carbone and azote source, as positive and negative controls respectively (Figure 9).

The root exudateenriched fraction from *B. aegyptiaca* is more quickly catabolized by *A. brasilense* compare to *A. raddiana* and *T. indica*. Indeed, *A. brasilense* generation time (G) in inoculated medium with root exudates from *B. aegyptiaca* is 2.5h, i.e., comparable with the positive control (MM+CN) where G=2.3h (table S1), and more rapid than when inoculated with *A. raddiana* (G=4h) and *T. indica* (G=4.1h) root exudates. Furthermore, the stationary phase of in the presence of *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* root exudates is longer than when inoculated medium is supplemented with *T. indica* exudates.

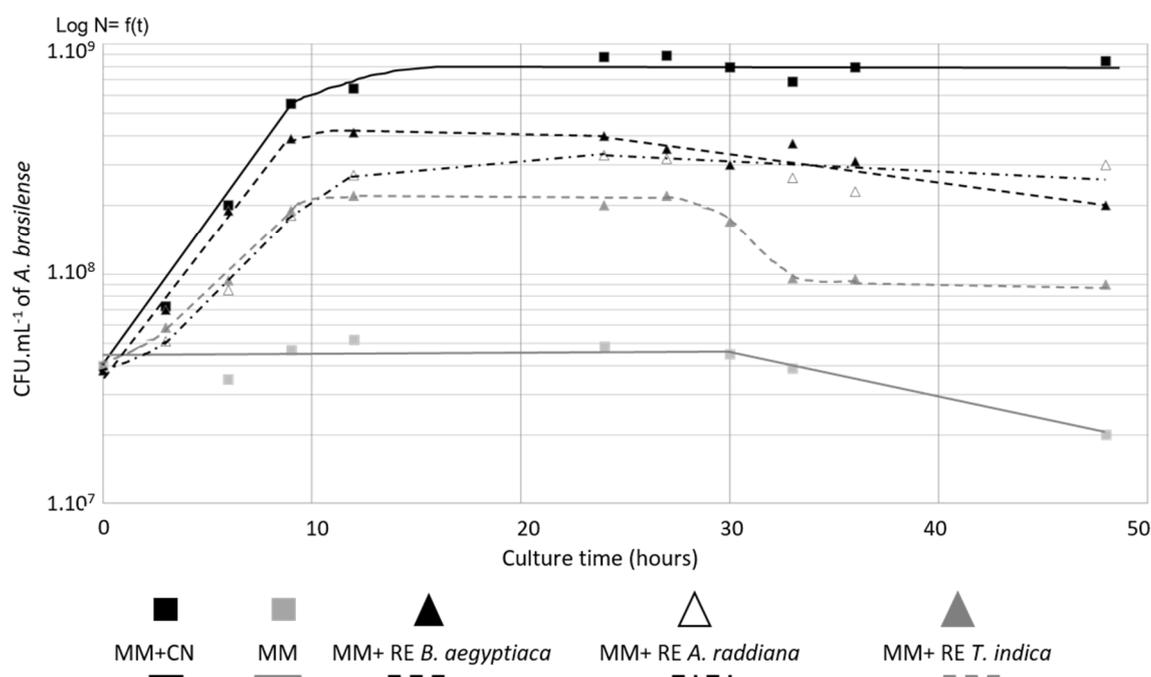


Figure 9 : Growth curves of *A. brasilens* Sp245 on crude root exudates.

A. brasilense were suspended with: mineral medium (MM), no added carbon and nitrogen source), minimum media complemented with 0.25% malate and 0.1% NH₄Cl minimum media, or with 0.1% (w/v) root exudates (RE). Experiment was performed twice with same profil.

DISCUSSION

For survival of woody seedlings in semi-arid environments, the maintenance of optimal root growth is crucial. In the context of reforestation, it is particularly important in the critical stages following sapling transfer from the nursery to the field and during the first dry season. The integrity of the root apical meristem (RAM) which controls root system establishment, depends on the root cap zone (Darwin and Darwin, 1880) and border cell activities. Here, we studied the RET (root border cells and their associated mucilage) and the root exudates of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* seedlings cultured *in vitro* by combined microscopy and biochemistry approaches. Our data provide complementary information relative to RBC and RET from woody species. Moreover, the results herein concerning cell wall polymer composition in both RET and root exudates reveal that AGPs that participate in regulating plant-microorganism interactions in the rhizosphere may also participate in protecting the root tip against drought stress.

Root border cell features in woody Sahelian seedlings

In angiosperms, RBC produced by the root cap seem to be correlated to the RAM organization (Hamamoto *et al.*, 2006; Rost, 2011). Plants from the Brassicaceae family exhibit a closed RAM, with three distinctive tiers of initials (vascular cylinder, cortex and both root cap and epidermal initials), and release border-like cells (Vicré *et al.*, 2005; Driouich *et al.*, 2012). Basic and intermediate-open RAM, corresponding to meristem with more or less indistinct tiers of cells, are described in numerous angiosperms (Heimsch & Seago, 2008). Leguminous plants from the Fabaceae family, like pea or soybean, exhibit a basic-open RAM and produce border cells type (Hawes *et al.*, 2000; Driouich *et al.*, 2010). Nevertheless, the RAM organization is highly plastic, changing according to the root growth stage (Chapman *et al.*, 2002b; Heimsch & Seago, 2008; Rost, 2011b).

Herein, we observed the RBC detachment in root seedlings. Plants of the *Zygophyllaceae* family, such as *B. aegyptiaca*, exhibit several RAM types ranging from closed RAM and transitional RAM to open RAM (Heimsch & Seago, 2008). Considering we observed mainly border cells type confined in root tip seedlings, we postulate that *B. aegyptiaca* possess an open RAM at least in the growing part of the root. *A. raddiana* and *T. indica* are leguminous trees belonging to the *Fabaceae* family which are described to exhibit open RAM (Heimsch & Seago, 2008; Endo *et al.*, 2011). As it was already showed by Endo *et al.*, (2011) for *A.*

mangium, these two *Fabaceae* plants release mainly sheaths of cells. Based on the ratio between cell length and cell width, we showed that all three species studied produce three RBC morphotypes: spherical, intermediate and elongated. Spherical RBCs are mainly of the BC type. As already observed by Endo *et al.*, (2011), we confirmed here that *Fabaceae* woody plants produce both single BC (spherical) and BLC (intermediate and elongated). While RBC released from *B. aegyptiaca* were restricted to the root tip, RBC from *T. indica* and *A. raddiana* were also observed 3 mm and 6 mm respectively above the tip. Considering their position, we could postulate that these BLC were originated from the lateral root cap. In *Arabidopsis*, which exhibits a closed-RAM and produces BLC, the peripheral columella root cap cells are sloughing alive in the rhizosphere (Vicré *et al.*, 2005; Durand *et al.*, 2009), whereas the peripheral lateral root cap cells are released following cell death process (Fendrych *et al.*, 2014; Kumpf & Nowack, 2015).

In the two *Fabaceae* species, *A. raddiana* and *T. indica*, BLC located around 2 mm above the root tip (Figure 4), exhibit morphological features commonly associated with vacuolar cell death (Van Doorn, 2011). This type of plant cell death is generally associated to a drop in cytoplasmic pH. Fendrych *et al.*, (2014) registered a decrease of cytoplasmic pH in *Arabidopsis* peripheral lateral root cap cells previously to their death. According to the other studies, we showed that in two *Fabaceae* woody plants, release of BLC originated from lateral root cap is probably a cell death process. No cell death feature is detected in *B. aegyptiaca* BC confirming that BC are mainly the result of root cap sloughing.

Moreover, UV-reactive substances detection in detached BLC from *A. mangium* (Endo *et al.*, 2011) postulate the deposit of cell wall secondary compounds during BLC differentiation. We note here that cellular morphological changes observed in both *A. raddiana* and *T. indica* BLC are concomitant with the accumulation of some wax-like substances in the space between the plasma membrane and the cell wall, presumably phenolic compounds such as suberins (Pollard *et al.*, 2008; Beisson *et al.*, 2012). Recently, comparative transcriptomic analysis between the root tip and border cells of *Medicago trunculata* showed enhanced transcript levels associated with secondary metabolism (phenylpropanoids, phenolics and waxes) in border cells (Watson *et al.*, 2015). Their cytoplasm is particularly enriched in Golgi apparatus with numerous associated vesicles probably involved in the mucilage production (Hawes *et al.*, 2000; Driouich *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017a).

Cell wall polymers in RET and root exudates of Sahelian woody seedlings

Root-associated mucilage is particularly enriched in cell wall polysaccharides including pectins, hemicellulose, proteins and proteoglycans like AGPs (Chaboud, 1983; Bacic *et al.*, 1986; Moody *et al.*, 1988; Ray *et al.*, 1988; Knee *et al.*, 2001; Timotiwi & Sakurai, 2002). In this study, we detected the presence of pectins including homogalacturonans, rhamnogalacturonans I (RG-I), xyloglucan, extensins and AGPs in the RET of the three woody species. With the exception of extensins, biochemical data also indicate the presence of these cell wall polymers in root exudates. Immunocytochemical analysis confirmed the presence of these polymers in the RET of the three woody seedlings. Moreover, the pectic compound xylogalacturonan (XGA), known to improve root defense against some telluric pathogens, is also detected. Based on immunogold labeling in alfafa, Wang *et al.*, (2017) propose a model of cell-wall polymer secretion in the mucilage. While xyloglucan, AGPs and pectins including polygalacturonan-RGI are secreted both in the peripheral root cap cells and BC from the same trans-Golgi-derived vesicles, XGA are only released from BC within distinct trans-Golgi vesicles. The RBC mucilage showed a strong fluorescent signal in all immunolabelling assays. Besides, as already described for pea BCs (Mravec *et al.*, 2017), and alfafa BCs (Wang *et al.*, 2017a).

As already reported in pea (Mravec *et al.*, 2017), monosaccharide composition showed differences between root tip and RET. In all three woody species, while GalA level was lower in the RET compared to the root tip, on the contrary, Gal, Ara, and Xyl levels are greater in the RET of *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* respectively. Moreover, while the monosaccharide composition in the root tip was similar for the three woody species studied, significant differences are detected among species in the RET and exudate fractions. These data reveal that the mucilage and root exudate cell wall composition exhibit present some degree of species specificity. In a review focusing on the plasticity of the rhizosphere, Carminati and Vetterlein (2013) explain that mucilage increases the water-holding capacity of the rhizosphere in proximity with young roots growing in a drying sandy soil (Carminati & Vetterlein, 2013). This suggests a possible involvement of polysaccharide composition to impact seedling survival in arid environments.

As it was previously described (Mravec *et al.*, 2017), Galacturonic acid (GalA) content is lower in the RET of the three seedlings compared to the root tip (Fig. 5), suggesting that HG

degradation facilitates RBC detachment. *B. aegyptiaca* RET contains high amounts of mannose (Man), which could be due to the presence of glucomannans. The RET is particularly enriched in cell wall polymers which could be involved in RBC adhesion (Durand *et al.*, 2009) and its web-like properties (Driouich *et al.*, 2013).

In contrary to *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* which thrive in semi-arid areas, *T. indica* was more sensitive to drought (Wade *et al.*, 2017). Although AGPs are present in the RET and the root exudates of all three species, we show that AGPs are more abundant in *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* seedlings compared to *T. indica*. AGP is a family of non-enzymatic cell surface hydroxyproline-rich glycoproteins found in plant cell walls, in the plasma membrane or in plant secretions (Nguema-Ona *et al.*, 2012, 2014). These proteoglycans are known to control cell morphology and growth, and also play a major role in defense against pathogens (Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Furthermore, the involvement of AGP in low temperature tolerance (Yan *et al.*, 2015) and salt-adaptation processes (Olmos *et al.*, 2017) have been recently described. It is worth noting that AGPs are extremely hydroscopic and have a high water-holding capacity (Fincher *et al.*, 1983; Showalter, 2001). Moreover, unlike polygalacturonan pectins, AGPs have the capacity to form gels without the presence of calcium ions (Chaboud, 1983). Physicochemical analysis of soil from the Ferlo area where Green Wall reforestation is currently underway, showed that the cation levels are particularly low (data not shown). In this context the higher content of AGP in the RET and root exudate fractions of *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* seedlings could contribute to their better survival in semi-arid environments. Moreover, AG-II are mostly found attached to AGPs, already described as a compound of pea (Cannesan *et al.*, 2012) and potatoes root exudates (Koroney *et al.*, 2016).

Metagenomic data of the Ferlo soil (Geneviève Grundmann and Claire Pringent-Combaret personal communications) revealed the presence of *A. brasilense*, a soil-beneficial bacteria involved in enhancement of plant drought tolerance (Cohen *et al.*, 2015). Although root exudates of the three woody seedlings could be catabolized by the beneficial bacteria, root exudates from *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* seedlings are more efficient compare to those from *T. indica*. Chemotaxis analysis comparing the effect of crude root exudates to those treated by the β -Yariv reagent could be of interest to investigate the involvement of AGP in woody plant root -*A. brasilense* interactions in the rhizosphere.

The RET and root exudates ensure numerous functions in the rhizosphere to control biotic (Cannesan *et al.*, 2012) and abiotic (Miyasaka & Hawes, 2001; Cohen *et al.*, 2015) processes. Although their role is not directly elucidated here, this study emphasizes that AGPs could contribute in protecting the root tip against drought injury. Now, it could be interesting to explore the AGP content of woody seedlings RET and exudates following a dehydration process. These analyses could be first done with *in vitro* studies and finally conduct in a soil *in situ*. This work opens new research perspectives regarding involvement of root tip chemistry in plant survival to aridity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Labex DRIIHM (ANR-11-LABX-0010)) the OHM Tessekéré and the research network VASI. Images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primcaen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont Saint Aignan. *A. brasilense* was provided by Geneviève Grundmann and Claire Pringent-Combaret from CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France.

REFERENCES

- Bacic A, Moody SF, Clarke AE. 1986.** Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* **80**: 771–777.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233–266.
- Bashan Y, Levanony H, Whitmoyer RE. 1991.** Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Microbiology* **137**: 187–196.
- Bashan Y, Puente ME, Rodriguez-Mendoza MN, Toledo G, Holguin G, Ferrera-Cerrato R, Pedrin S. 1995.** Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1938–1945.
- Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M. 2012.** Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 329–337.
- Bennett T, van den Toorn A, Sanchez-Perez GF, Campilho A, Willemsen V, Snel B, Scheres B. 2010.** SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in *Arabidopsis*[C][W]. *The Plant Cell* **22**: 640–654.
- Broek AV, Michiels J, Van Gool A, Vanderleyden J. 1993.** Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 592–600.
- Cai M-Z, Wang F-M, Li R-F, Zhang S-N, Wang N, Xu G-D. 2011.** Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**: 966–971.
- Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2012.** Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination12[C][W]. *Plant Physiology* **159**: 1658–1670.
- Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vicré-Gibouin M. 2011.** Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany* **108**: 459–469.
- Carminati A, Vetterlein D. 2013.** Plasticity of rhizosphere hydraulic properties as a key for efficient utilization of scarce resources. *Annals of Botany* **112**: 277–290.
- Chaboud A. 1983.** Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant and Soil* **73**: 395–402.
- Chapman K, Groot EP, Nichol SA, Rost TL. 2002.** Primary Root Growth and the Pattern of Root Apical Meristem Organization are Coupled. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 287–295.

Chen R, Rosen E, Masson PH. 1999. Gravitropism in higher plants. *Plant physiology* **120**: 343–350.

Cohen AC, Bottini R, Pontin M, Berli FJ, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia CN, Piccoli PN. 2015. Azospirillum brasilense ameliorates the response of Arabidopsis thaliana to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* **153**: 79–90.

Driouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vicro-Gibouin M. 2010. Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of Experimental Botany* **61**: 3827–3831.

Driouich A, Durand C, Vicro-Gibouin M. 2007. Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* **12**: 14–19.

Driouich A, Follet-Gueye M-L, Bernard S, Kousar S, Chevalier L, Vicro-Gibouin M, Lerouxel O. 2012. Golgi-Mediated Synthesis and Secretion of Matrix Polysaccharides of the Primary Cell Wall of Higher Plants. *Frontiers in Plant Science* **3**.

Driouich A, Follet-Gueye M-L, Vicro-Gibouin M, Hawes M. 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 489–495.

Durand C, Vicro-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A. 2009. The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of Arabidopsis Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan. *Plant Physiology* **150**: 1411–1421.

Endo I, Tange T, Osawa H. 2011. A cell-type-specific defect in border cell formation in the Acacia mangium root cap developing an extraordinary sheath of sloughed-off cells. *Annals of Botany* **108**: 279–290.

Fendrych M, Van Hautegeem T, Van Durme M, Olvera-Carrillo Y, Huysmans M, Karimi M, Lippens S, Guérin CJ, Krebs M, Schumacher K, et al. 2014. Programmed Cell Death Controlled by ANAC033/SOMBRERO Determines Root Cap Organ Size in Arabidopsis. *Current Biology* **24**: 931–940.

Fincher GB, Stone BA, Clarke AE. 1983. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology* **34**: 47–70.

Griffin GJ, Hale MG, Shay FJ. 1976. Nature and quantity of sloughed organic matter produced by roots of axenic peanut plants. *Soil Biology and biochemistry* **8**: 29–32.

Gunawardena U. 2005. Tissue-Specific Localization of Pea Root Infection by Nectria haematococca. Mechanisms and Consequences. *PLANT PHYSIOLOGY* **137**: 1363–1374.

Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL. 2006. The Production and Release of Living Root Cap Border Cells is a Function of Root Apical Meristem Type in Dicotyledonous Angiosperm Plants. *Annals of Botany* **97**: 917–923.

Hawes MC, Curlango-Rivera G, Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z. 2011. Extracellular DNA: The tip of root defenses? *Plant Science* **180**: 741–745.

- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000.** The role of root border cells in plant defense. *Trends in plant science* **5**: 128–133.
- Hawes MC, Pueppke SG. 1986.** Sloughed Peripheral Root Cap Cells: Yield from Different Species and Callus Formation from Single Cells. *American Journal of Botany* **73**: 1466.
- Heimsch C, Seago JL. 2008.** Organization of the root apical meristem in angiosperms. *American Journal of Botany* **95**: 1–21.
- Kamiya M, Higashio S-Y, Isomoto A, Kim J-M, Seki M, Miyashima S, Nakajima K. 2016.** Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in *Arabidopsis*. *Development* **143**: 4063–4072.
- Karve R, Suárez-Román F, Iyer-Pascuzzi AS. 2016.** The Transcription Factor NIN-LIKE PROTEIN7 Controls Border-Like Cell Release1[OPEN]. *Plant Physiology* **171**: 2101–2111.
- Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, et al. 2013.** β -Galactosyl Yariv Reagent Binds to the β -1,3-Galactan of Arabinogalactan Proteins1[W][OA]. *Plant Physiology* **161**: 1117–1126.
- Knee EM, Gong F-C, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD. 2001.** Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 775–784.
- Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vitré-Gibouin M. 2016.** Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**: 797–808.
- Kumpf RP, Nowack MK. 2015.** The root cap: a short story of life and death. *Journal of Experimental Botany* **66**: 5651–5662.
- Miyasaka SC, Hawes MC. 2001.** Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiology* **125**: 1978–1987.
- Moody SF, Clarke AE, Bacic A. 1988.** Structural analysis of secreted slime from wheat and cowpea roots. *Phytochemistry* **27**: 2857–2861.
- Mravec J, Guo X, Hansen AR, Schüchel J, Kracun SK, Mikkelsen MD, Mouille G, Johansen IE, Ulvskov P, Domozych D, et al. 2017.** Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics. *Plant Physiology*: pp.00097.2017.
- Nagahashi G, Douds DD. 2004.** Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea*. *Mycological Research* **108**: 1079–1088.
- Nguema-Ona E, Coimbra S, Vitré-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012.** Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* **110**: 383–404.

- Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A. 2013.** Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**: 440–449.
- Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A. 2014.** Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Olmos E, García De La Garma J, Gomez-Jimenez MC, Fernandez-Garcia N. 2017.** Arabinogalactan Proteins Are Involved in Salt-Adaptation and Vesicle Trafficking in Tobacco by-2 Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Pagnussat LA, Salcedo F, Maroniche G, Keel C, Valverde C, Creus CM. 2016.** Interspecific cooperation: enhanced growth, attachment and strain-specific distribution in biofilms through *Azospirillum brasilense*-*Pseudomonas protegens* co-cultivation. *FEMS microbiology letters* **363**: fnw238.
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB. 2008.** Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **13**: 236–246.
- Ray TC, Callow JA, Kennedy JF. 1988.** Composition of root mucilage polysaccharides from *Lepidium sativum*. *Journal of Experimental Botany* **39**: 1249–1261.
- Rodríguez-Salazar J, Suárez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G. 2009.** Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiology Letters* **296**: 52–59.
- Rost TL. 2011.** The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of Botany* **107**: 1213–1222.
- Showalter AM. 2001.** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1399–1417.
- Stephenson MB, Hawes MC. 1994.** Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant physiology* **106**: 739–745.
- Thevis M, Opfermann G, Schänzer W. 2000.** Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates derived from hydroxyethyl starch. *Journal of Mass Spectrometry* **35**: 77–84.
- Timotiwu PB, Sakurai N. 2002.** Identification of mono-, oligo-, and polysaccharides secreted from soybean roots. *Journal of plant research* **115**: 0077–0085.
- Van Bastelaere E, Lambrecht M, Vermeiren H, Van Dommelen A, Keijers V, Proost P, Vanderleyden J. 1999.** Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Molecular microbiology* **32**: 703–714.
- Van Doorn WG. 2011.** Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4749–4761.

Vanstockem M, Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool AP. 1987. Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 410–415.

Vicré M, Santaella, C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005. Root Border-Like Cells of *Arabidopsis*. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *PLANT PHYSIOLOGY* **138**: 998–1008.

Wade TI, Ndiaye O, Mauclaire M, Mbaye B, Sagna M, Guissé A, Goffner D. 2017. Biodiversity field trials to inform reforestation and natural resource management strategies along the African Great Green Wall in Senegal. *New Forests*.

Wang P, Chen X, Goldbeck C, Chung E, Kang B-H. 2017a. A distinct class of vesicles derived from the *trans*-Golgi mediates secretion of xylogalacturonan in the root border cell. *The Plant Journal*.

Wang D, Xu A, Elmerich C, Ma LZ. 2017b. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME Journal* **11**: 1602–1613.

Watson BS, Bedair MF, Urbanczyk-Wochniak E, Huhman DV, Yang DS, Allen SN, Li W, Tang Y, Sumner LW. 2015. Integrated metabolomics and transcriptomics reveal enhanced specialized metabolism in *Medicago truncatula* root border cells. *Plant Physiology* **167**: 1699–1716.

Wen F, VanEtten HD, Tsapraillis G, Hawes MC. 2007. Extracellular Proteins in Pea Root Tip and Border Cell Exudates. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**: 773–783.

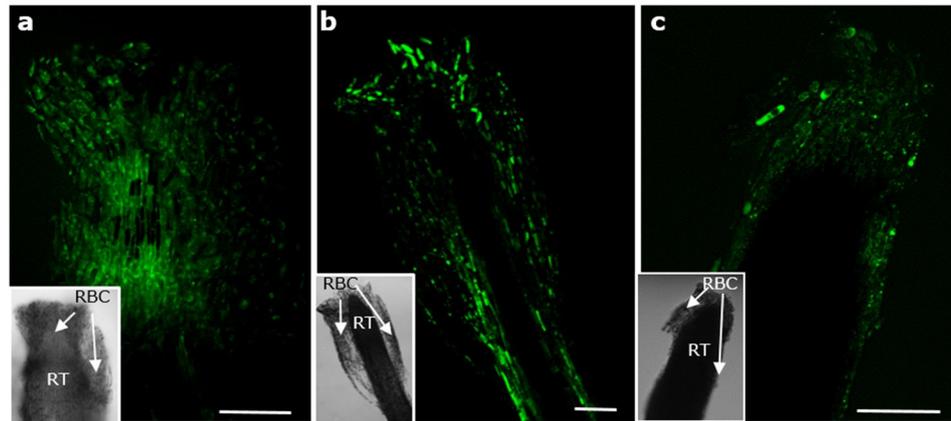
Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. 2009. Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. *Plant Physiology* **151**: 820–829.

Wen F, Zhu Y, Hawes MC. 1999. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *The Plant Cell* **11**: 1129–1140.

Willemsen V, Bauch M, Bennett T, Campilho A, Wolkenfelt H, Xu J, Haseloff J, Scheres B. 2008. The NAC Domain Transcription Factors FEZ and SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in *Arabidopsis* Root Stem Cells. *Developmental Cell* **15**: 913–922.

Yan Y, Takáč T, Li X, Chen H, Wang Y, Xu E, Xie L, Su Z, Šamaj J, Xu C. 2015. Variable content and distribution of arabinogalactan proteins in banana (*Musa* spp.) under low temperature stress. *Frontiers in Plant Science* **6**.

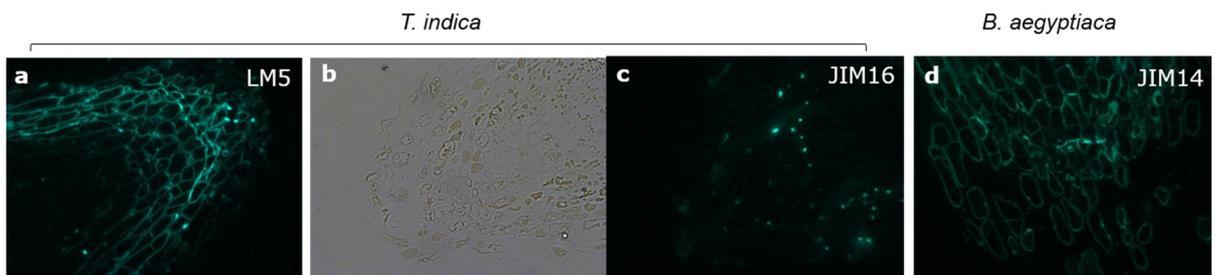
SUPPLEMENTARY DATA



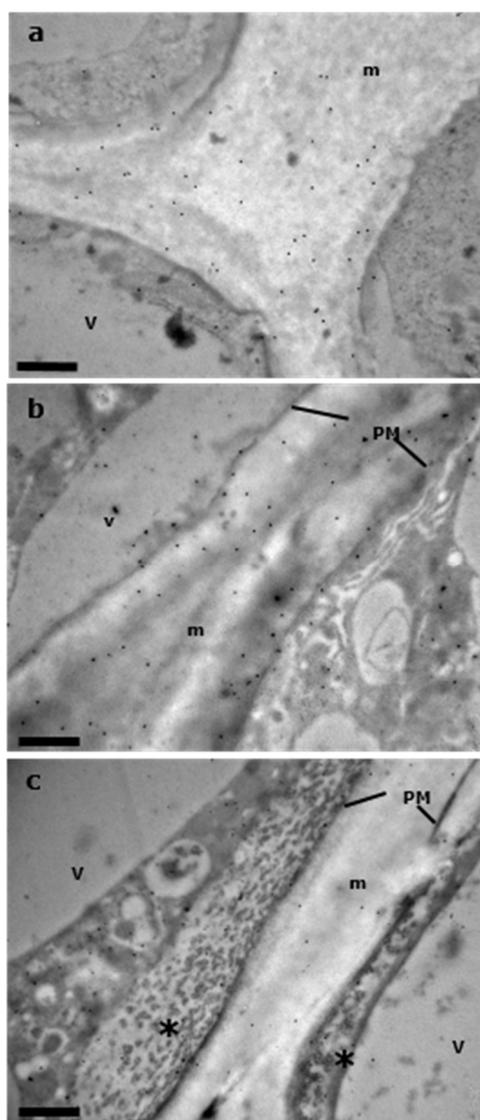
Supplementary Fig. S1: Viability of root border cells

RBC of *B. aegyptiaca* (a), *A. raddiana* (b) and *T. indica* (c) stained with calcein-AM.

Scale bars : 100µm. Little left squares correspond to bright field images. RBC : root border cell; RT : root tip



Supplementary Figure S2 : Immunofluorescence labelling of RG-1 epitopes recognized by mAb LM5 and AGP epitopes recognized by mAb JIM14 and JIM16. *T. indica* (a to c) and *B. aegyptiaca* (d).



Supplementary Figure S3: TEM micrographs showing immunogold labelling AGPs epitopes recognized by mAb JIM13

a: B. aegyptiaca; b: A. raddiana; c: T. indica m: mucilage, PM: plasma membrane, V: vacuole

Scale bars: a - c: 1 μ m

Table S 1 Composition of different medium for Growth curves of *A.brasilens* Sp245 on crude root exudates

g.L ⁻¹	MM+CN Positive control	MM Negative control	RE contamination control	MM + Root Exudate
K ₂ HPO ₄	3	3	3	3
Malate	2.5	0	0	0
NH ₄ Cl	1.0	0	0	0
NaH ₂ PO ₄	1	1	1	1
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.3	0.3	0.3	0.3
KCl	0.15	0.15	0.15	0.15
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.01	0.01	0.01	0.01
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
biotin	0.005	0.005	0.005	0.005
Gentamicin	0.025	0.025	0.025	0.025
EE fraction	0	0	1	1
Inoculation	yes	yes	no	yes

MM: mineral medium with no added carbon and nitrogen source; MM+CN mineral medium complemented with carbon and nitrogen source; MM+RE: mineral medium complemented with 0.1% (m/v) root exudates (RE).

Résultats complémentaires

I-2 Analyses microscopiques du RET

I-2-1 Mesure des longueurs des cellules frontières

Dans l'étude morphologique présentée précédemment dans l'article, *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* et *T. indica* présentent 3 morphotypes de cellules frontières avec une même répartition dans les proportions, à savoir une forte dominance du morphotype intermédiaire. En informations complémentaires, une distribution de la taille de 2500 cellules frontières de chacune des plantes en nuage de points est présentée [Fig 39]. On constate que la longueur maximale des cellules frontières des *Fabaceae* *A. raddiana* et *T. indica* semble être aux alentours de 300 μm . À contrario, pour la *Zygophyllaceae* *B. aegyptiaca* cela serait aux alentours de 400 μm , si on fait abstraction des quelques valeurs aux dessus de 500 μm , qui semblent ne pas être représentatives des 2500 cellules frontières mesurées.

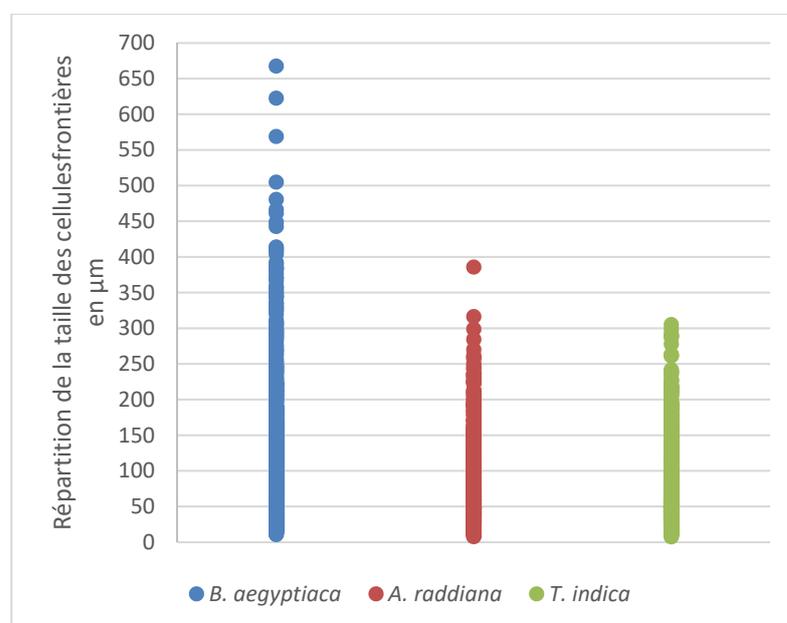


Figure 39 : Répartition de la taille (μm) des cellules frontières des différentes plantes.

La répartition de la taille des cellules est exprimée en μm d'un pool de 250 cellules frontières par racine, $n=10$ racines.

(Mravec *et al.*, 2017a), ont décrit une taille maximale de cellules frontières aux alentours de 300 μm pour une autre *Fabaceae*, *Pisum sativum*. Il est donc possible que la famille botanique puisse jouer un rôle sur la taille des cellules frontières.

I-2-1 Etude cinétique de la viabilité des CF d'acacia après leur détachement

Un suivi de viabilité par la calcéine-AM a été réalisé toutes les 24 h pendant 5 jours sur des cellules frontières isolées d'apex racinaires d'*A. raddiana* [Fig 40].

D'après les observations, les cellules frontières d'*A. raddiana* sont capables de survivre 96 h après leur détachement [Fig 40 E]. Cependant, au fur et à mesure que les jours passent, la viabilité des cellules frontières diminue. Cela corrobore les résultats de Plancot *et al.*, (2013), où un suivi de la viabilité des BLCs d'*A. thaliana* en fonction du temps avait également montré une diminution après 48 h de culture en $\frac{1}{2}$ MS (Plancot *et al.*, 2013). De plus, il semblerait que les cellules frontières de taille intermédiaire, formant des chainettes [Fig 40 C et E] soient celles qui restent viables plus longtemps.

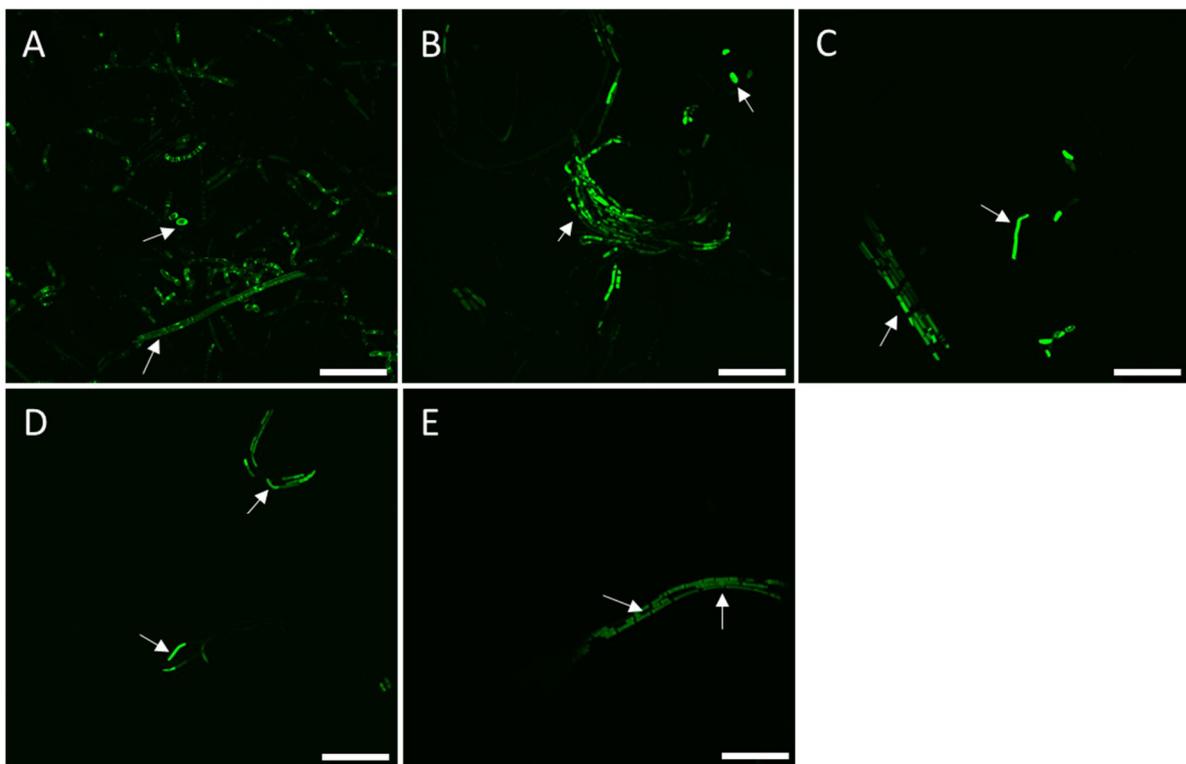


Figure 40 : Cinétique de suivi de viabilité par la Calcéine-AM de cellules frontières.

Cellules frontières (flèche blanche) d'*A. raddiana* après leur détachement en milieu $\frac{1}{2}$ MS stérile. La fluorescence indique la viabilité. (A) : 0 h ; (B) : 24 h ; (C) : 48 h ; (D) : 72 h ; (E) : 96 h Échelle 250 μ m.

Cependant, il serait intéressant de déterminer un suivi de viabilité en fonction des 3 morphotypes observés pour limiter les biais, ainsi que d'établir un taux de cellules vivantes.

I-3 analyses biochimiques du RET et des exsudats racinaires

I-3-1 Aspect du culot RET (CF et mucilage) et exsudats lyophilisés.

Après avoir récolté et séparé les cellules frontières des exsudats racinaires, deux fractions sont obtenues : une fraction enrichie en RET (cellules frontières et mucilage) nommée fraction « RET », et une seconde enrichie en exsudats nommée « exsudats racinaires ». Une lyophilisation est réalisée [Fig 41] afin d'obtenir une masse pour normaliser la quantité de matériel utilisée pour les différents dosages et expériences.

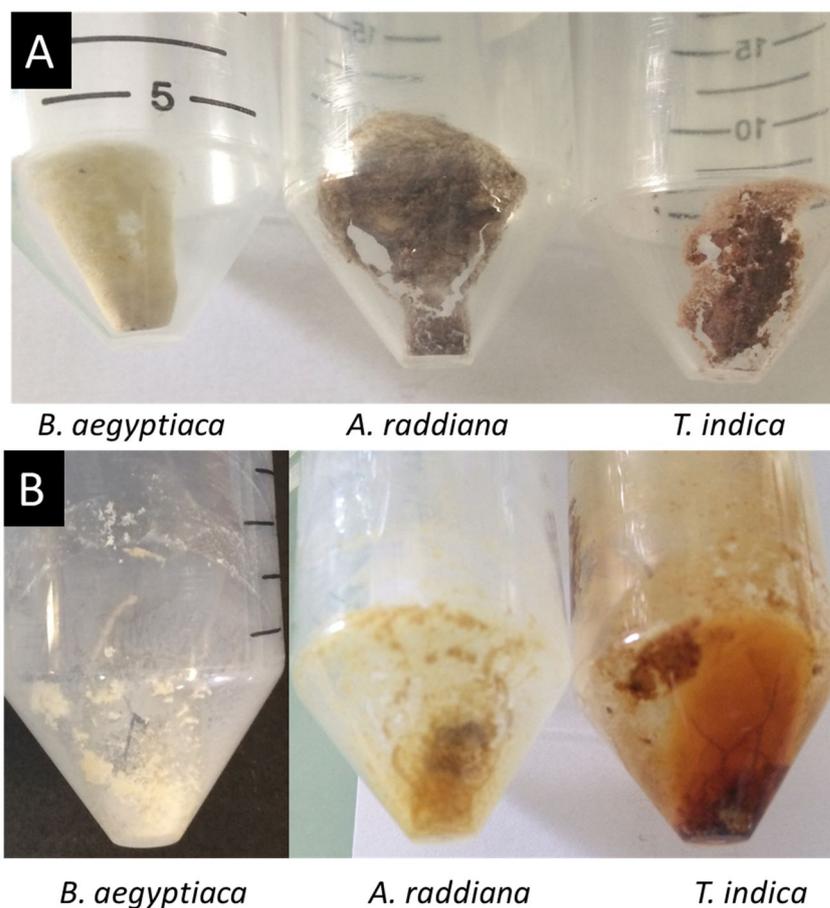


Figure 41 : Culots lyophilisés de fractions enrichies en RET et en exsudats racinaires.

(A) Culots lyophilisés de RET ; (B) Culots lyophilisés d'exsudats racinaires.

Une nette coloration est observée pour le RET et les exsudats racinaires d'*A. raddiana* et *T. indica* par rapport à *B. aegyptiaca*. Il est possible que cette coloration soit due à une oxydation de molécules, possiblement des composées phénoliques. Par ailleurs, lors de la préparation des AIR de paroi des cellules frontières, la texture des cellules frontières de *B. aegyptiaca* lyophilisé était cotonneuse et très souple alors que pour les cellules frontières d'*A.*

raddiana et de *T. indica*, la texture était cassante comme des feuilles sèches d'algues japonaises (Nori). Ces différences de textures peuvent être dues à la composition différentielle des parois des cellules frontières et/ou de leur mucilage associé.

I-3-2 Activités enzymatiques au sein des exsudats racinaires

I-3-2-1 Activité pectine methyl esterase (PME)

Des tests d'activités PME par diffusion radiale ont été réalisés sur des fractions enrichies en exsudats racinaires bruts de *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* et *T. indica*. Les exsudats bruts ont été concentrés à l'aide d'un centricon au seuil de coupure de 10 kDa [Fig 42].

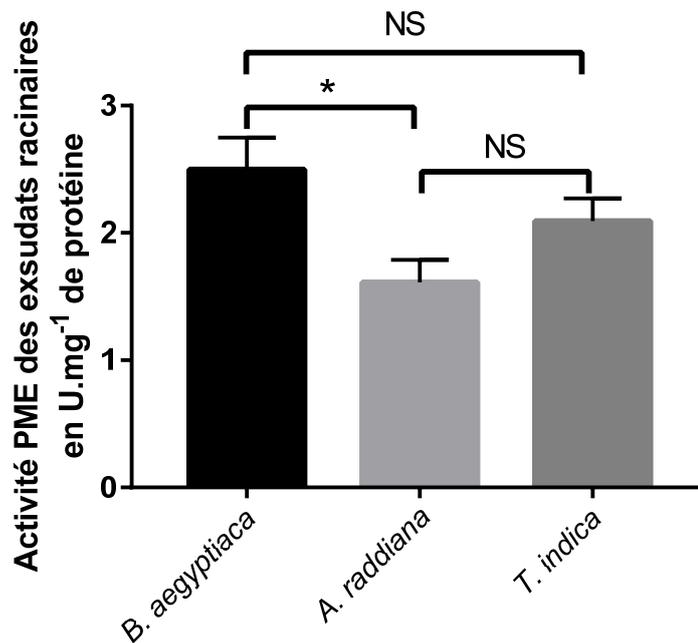


Figure 42 : Histogramme représentant l'activité PME dans les exsudats racinaires de *B. aegyptiaca*, d'*A. raddiana* et de *T. indica*.

L'activité enzymatique est exprimée en U.mg⁻¹ de protéine présente dans les exsudats racinaires, une comparaison multiple a été réalisée via un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn, n=6, $\alpha=5\%$ * : P value ajustée < 0,0449.

Les fractions enrichies en exsudats racinaires des 3 plantes présentent une activité PME. *B. aegyptiaca* a une activité spécifique de 2.5 ± 0.3 U.mg⁻¹ protéine, *A. raddiana* 1.6 ± 0.2 U.mg⁻¹ protéine et enfin *T. indica* de 2.1 ± 0.2 U.mg⁻¹ protéine. Une différence significative a été observée entre l'activité PME de *B. aegyptiaca* qui est supérieure que celle d'*A. raddiana*. Un des groupes de polymères majeurs de la paroi primaire des parois cellulaires chez les Dicotylédones sont les pectines. Au sein des pectines, les acides homogalacturoniques sont

synthétisés dans le Golgi et adressés à la paroi sous leur forme fortement méthylestérifiée. Une fois au niveau de la paroi, des PME peuvent les déméthyliser (Pelloux *et al.*, 2007; Mohnen, 2008; Jolie *et al.*, 2010). La déméthylation des pectines peut permettre aux acides polygalacturoniques des pectines de former des gels grâce au calcium (Willats *et al.*, 2001), augmentant la fermeté de la paroi et influençant la porosité (Jolie *et al.*, 2010). De plus, cette gélification des pectines limiterait les dommages cellulaires lors de stress hydrique (Tenhaken, 2015). D'autre part, l'action des PME rend les pectines plus susceptibles d'être dépolymérisées par les polygalacturonases (PG) et les pectate lyases, contribuant ainsi au ramollissement de la paroi cellulaire. De plus, l'action des PME produit des protons et, par conséquent, entraîne une diminution locale du pH de la paroi cellulaire (Pelloux *et al.*, 2007), tout en activant d'autres enzymes de paroi cellulaire telles que des PGs, entraînant un relâchement de la paroi cellulaire. Ici, *B. aegyptiaca* semblerait avoir la plus grande activité PME dans sa fraction enrichie en exsudats racinaires par rapport aux 2 autres plantes. Il est possible que cette activité lui donne un avantage en créant au sein de son RET un mucilage riche en acides homogalacturoniques qui pourraient se lier à des ions calcium et former un gel protecteur et rétenteur d'eau. Cependant, il faut pondérer l'action des PME comme favorisant la tolérance à la sécheresse. En effet, il a été montré chez des plantes transgéniques d'*A. thaliana* surexprimant un inhibiteur de PME de *Capsicum annuum* (CaPMEI1) une augmentation de la tolérance à la sécheresse (An *et al.*, 2008). L'implication dans la tolérance à la sécheresse des PME et des PMEI ne semble pas encore totalement comprise. Par ailleurs, une étude réalisée sur des plantules de haricot en condition de stress hydrique, montre qu'à l'apex racinaire, il y a une diminution de la portion pectique dans la paroi totale ainsi qu'une diminution du degré de méthylation de ces composés pariétaux (Yang *et al.*, 2010).

I-3-2-2 Activité polygalacturonase (PG)

Des tests d'activités PGs par diffusion radiale ont également été réalisés sur des fractions enrichies en exsudats racinaires bruts de *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* et *T. indica*. Aucune activité n'a été détectée pour aucun des exsudats racinaires aux différents pH testés : 3,5 / 4,0 / 4,5 / 5,0. Or, pour que les PGs puissent agir au sein des pectines, il faut préalablement que les pectines soient déméthylées. Pourtant, il y a au sein des exsudats racinaires des 3 plantes une activité PME. Il est possible que la méthode utilisée ne soit pas assez sensible pour détecter une activité PG. Cependant Hawes & Lin, (1990) ont décrit chez le pois, qu'il y avait une activité PG uniquement avant que les premières cellules bordantes ne se détachent de la coiffe racinaire.

De plus, ils ne détectaient pas d'activité PG dans les suspensions de cellules bordantes, ni dans le milieu de culture de racine ayant une coiffe racinaire intacte. Ils suggèrent que l'activité PG est seulement localisée dans la coiffe racinaire et présente uniquement au moment du détachement des cellules bordantes (Hawes & Lin, 1990). Il est donc possible que l'absence d'activité PG au sein de la fraction enrichie en exsudats racinaires des différentes plantes soit comparable à celles décrites dans la littérature et uniquement présente lors du détachement des cellules bordantes. En effet, le rôle des PGs se limiterait peut-être uniquement au détachement des cellules frontières, et qu'une fois celles-ci détachées le maintien de l'activité PG serait inutile pour les cellules frontières. De plus, s'il n'y a pas d'activité PG au sein de la fraction enrichie en exsudats racinaires des 3 plantes, c'est peut-être une stratégie pour éviter la dislocation des pectines et la perte du gel produit par les acides homogalacturoniques liés aux ions Calcium.

I-3-2-3 Activité peroxydase

Enfin des tests d'activités spécifiques de peroxydases [Fig 43] ont été réalisés à l'aide du suivi de la production de tétragaïacol sur des fractions enrichies en exsudats racinaires bruts de *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* et *T. indica*.

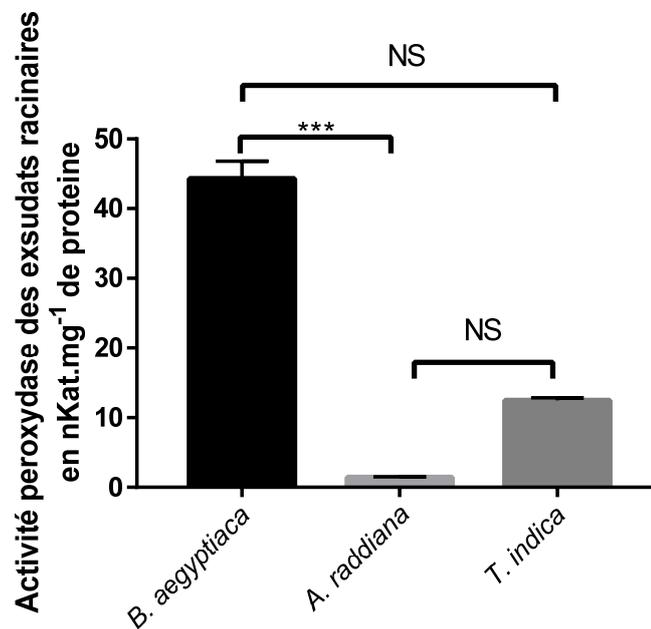


Figure 43 : Histogramme représentant l'activité spécifique de peroxydase dans les exsudats racinaires de *B. aegyptiaca*, d'*A. raddiana* et de *T. indica*.

L'activité est exprimée en nKat.mg⁻¹ de protéines présentes dans les exsudats racinaires, une comparaison multiple a été réalisée via un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn, n=6, α=5% *** : P value ajusté < 0,0003
NS : non significatif.

L'activité peroxydase en nKat.mg⁻¹ de protéine de *B. aegyptiaca* est de 2,66±0,15, de 0,09±0,01 pour *A. raddiana* et de 0,75±0,01 pour *T. indica*.

Les peroxydases jouent un rôle dans la modification de la paroi végétale lors de la croissance cellulaire, soit en la relâchant ou soit en la raidissant (Francoz *et al.*, 2015; Somssich *et al.*, 2016). En effet, une production d'espèces réactives de l'oxygène permet la lignification de la paroi cellulaire (Blokhina *et al.*, 2003; Gall *et al.*, 2015; Francoz *et al.*, 2015). De plus, l'activité des peroxydase est nécessaire dans la formation et le développement des poils absorbants racinaires (Kwon *et al.*, 2015).

Sous un stress hydrique ou osmotique, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène est observée, s'accumulent dans la cellule (Maia *et al.*, 2012; Gall *et al.*, 2015), entraînant des dommages sur l'ADN, l'oxydation de lipides, et protéines au sein de la cellule (Sharp *et al.*, 2004) jusqu'à perturber son fonctionnement (Farooq *et al.*, 2009; Csiszár *et al.*, 2012). De plus, une augmentation du niveau d'éthylène vient inhiber la croissance racinaire. Des mécanismes de régulation et dégradation des espèces réactives de l'oxygène sont mis en place dont l'action d'enzymes telles que des peroxydases, des Glutathion S-Transférases, des SuperOxydes Dismutases et des catalases (Blokhina *et al.*, 2003; Nagy *et al.*, 2004; Farooq *et al.*, 2009; Sandhya *et al.*, 2010; Ranjan *et al.*, 2012). En effet, sous un stress hydrique, l'activité peroxydase augmente dans des racines de cultivars de riz (Shi *et al.*, 2014), mais aussi dans des cultivars de blé sensibles et tolérants (Csiszár *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été décrit chez 2 cultivars de coton tolérants à la sécheresse une forte transcription pour des peroxydases (Ranjan *et al.*, 2012).

L'activité peroxydase au sein d'exsudats racinaires a déjà été démontrée dans la littérature (Gramss & Rudeschko, 1998; Yu *et al.*, 2003; Badri & Vivanco, 2009). La forte activité en peroxydases de *B. aegyptiaca* par rapport à l'*A. raddiana* et au *T. indica* pourrait expliquer la faible coloration (phénomène d'oxydation) du RET et des exsudats racinaires. De plus, il est possible que cette forte activité peroxydase pourrait aider entre autres à maintenir la croissance racinaire de *B. aegyptiaca* en cas de stress hydrique. Cependant il faudrait tester d'autres activités enzymatiques impliquées dans la régulation des espèces réactives de

l'oxygène pour soutenir l'hypothèse que *B. aegyptiaca* dispose d'un système anti-oxydant efficace face à un stress hydrique.

I-3-3 Profils FTIR

Des profils FTIR sur *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* et *T. indica* ont été réalisés sur des AIR, de fractions enrichies en apex racinaires [Fig 44 A] dépourvues du RET, de fractions enrichies en RET [Fig 44 B], et de fractions enrichies en exsudats racinaires [Fig 44 C]. Cette technique permet d'obtenir des informations sur la nature des groupements chimiques présents dans l'échantillon mais aussi son empreinte moléculaire.

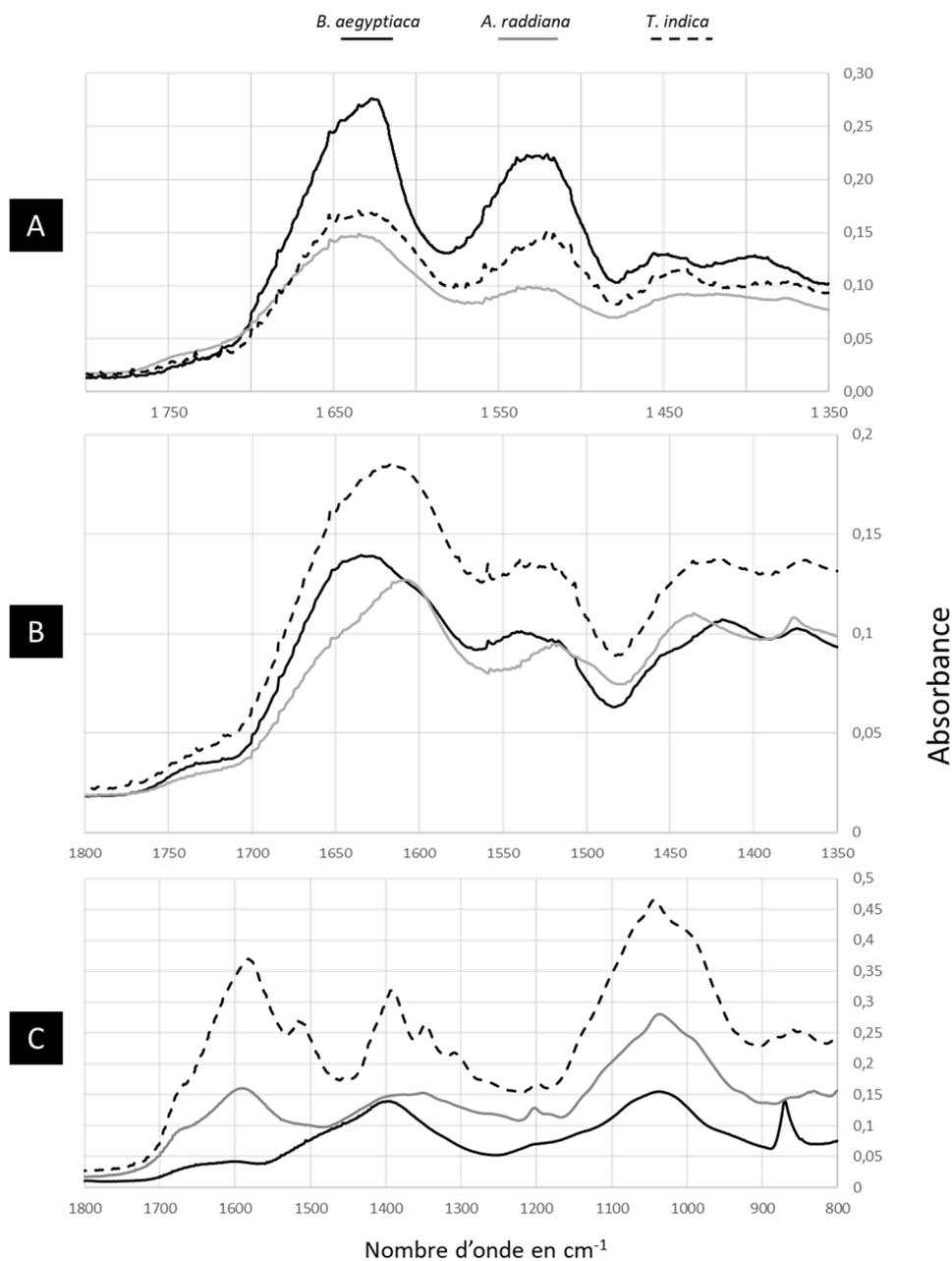


Figure 44 : Spectres FTIR de résidus insolubles à l'alcool (AIR).

(A) AIR de pointe racinaire ; (B) AIR de RET ; (C) AIR d'exsudats racinaires.

On observe un même profil des spectres FTIR des fractions enrichies en apex racinaire et des fractions enrichies en RET sur les 3 plantes. Cependant, il semblerait que les fractions enrichies en exsudats racinaires aient une différence de profil. Par ailleurs, en 2017, Mravec *et al.* dans une étude réalisée sur le pois, ont montré des spectres similaires pour les fractions enrichies en apex et en RET (Mravec *et al.*, 2017a). Il est probable que les apex racinaires et le RET (cellules frontières + mucilage) partagent le même type de molécule, alors que les exsudats seraient plus spécifiques de l'espèce. De plus, nous avons montré que les exsudats racinaires n'avaient pas le même type d'effet sur *A. brasilense*, ce qui renforce cette idée que les exsudats racinaires seraient plus spécifiques d'une plante.

Chapitre 4 : Conclusions et perspectives

B. aegyptiaca, *A. raddiana* et *T. indica*, trois plantes subsahariennes originales qui détonent des plantes modèles utilisées au laboratoire telles qu'*A. thaliana*, le lin, le pois, le maïs ou encore le blé. Procéder à la caractérisation *in vitro* du RET et des exsudats racinaires de ces plantes afin d'établir un lien entre les éléments étudiés *in vitro* et le degré différent de tolérance à l'aridité de ces ligneux lors de leur réimplantation *in situ* est un objectif osé et ambitieux.

Pour mener à bien ce travail, des mises au point des protocoles de culture et d'observations microscopiques ont dû être réalisées pour chacune des plantes. A ceci s'ajoute une disponibilité limitée des fruits et des graines, ainsi qu'un contrôle qualité de l'état sanitaire des graines souvent médiocre. En effet, des contaminations parasitaires et microbiennes, ajouté à des taux de germination et de croissance inférieure à 10%, ont participé à limiter considérablement le matériel biologique disponible afin de réaliser l'ensemble des expériences.

La taille des racines principales des plantules de ces 3 espèces ligneuses a cependant avantageusement facilité leurs manipulations et la récupération en quantité suffisante de leurs RET et de leurs exsudats racinaires en comparaison de plantes modèles classiques. Néanmoins, des stratégies d'adaptation ont été nécessaires notamment pour la partie imagerie. Par exemple, la mise entre lame et lamelle de racines épaisses est laborieuse pour ne pas écraser et abimer l'échantillon. De même, il a été difficile de réaliser des coupes optiques par microscopie confocale sur l'ensemble de la racine, vue son épaisseur, et ce même à un âge juvénile. De plus, lors de l'enrésinement des racines après leur cryofixation, des temps nettement supérieurs d'incubation avec la résine ont été nécessaires par rapport aux autres plantes modèles pour assurer un enrobage correct.

Pourtant, malgré les difficultés rencontrées, des éléments se dégagent sur l'implication potentielle du RET et des exsudats racinaires dans la tolérance à l'aridité *via* les glycomolécules ; ouvrant ainsi des hypothèses et des perspectives de recherche intéressantes.

I-La caractérisation et les fonctions potentielles du RET de plantes ligneuses sahéliennes

Pour la survie de jeunes plantes dans un environnement hostile à la vie tant par le manque d'eau que par le manque de sels minéraux et nutriments, il est capital pour la plante que sa croissance racinaire soit maintenue et efficace lors de ses premiers stades de développement afin de garantir sa survie et sa pérennité.

La croissance racinaire est possible grâce à la division des cellules du méristème subapical de racine. L'intégrité et la protection du RAM face aux diverses agressions sont assurées par la coiffe racinaire, le RET (correspondant aux cellules frontières issues de la coiffe et au mucilage que ces cellules produisent) et également par les exsudats racinaires dans leur globalité.

B. aegyptiaca, *A. raddiana*, *T. indica* sont trois plantes ligneuses choisies par le programme de reboisement de la grande muraille verte dont le degré de tolérance à la sécheresse diffère. *B. aegyptiaca* a une très bonne tolérance, *A. raddiana* a une tolérance moindre mais présente, alors que *T. indica*, a une assez mauvaise tolérance à l'aridité.

Ces plantes subsahariennes présentent toutes trois, des cellules frontières vivantes, métaboliquement actives avec la présence de Golgi et de vésicules de sécrétion. Ces cellules *via* leur sécrétion s'entourent d'un épais mucilage. De plus, ces plantes présentent trois morphotypes de cellules frontières : sphérique, intermédiaire et allongé. Curieusement, même si elles ne sont pas issues de la même famille botanique, elles ont la même répartition en proportion des différents morphotypes se caractérisant par une majorité de cellules du morphotype intermédiaire. Il serait intéressant d'établir un suivi de viabilité des cellules frontières en fonction de leurs morphotypes, afin de mieux comprendre le rôle potentiel de chaque morphotype dans la protection de l'apex racinaire.

Cependant quelques différences ont été observées entre ces 3 plantes concernant la morphologie des cellules frontières. Le type de cellules frontières de *B. aegyptiaca* est de type Border cells (BC) comme c'est le cas chez le pois (*Pisum sativum*). *A contrario* pour *A. raddiana* et *T. indica* dont les 2 types de cellules frontières BC et BLC ont été mis en évidence dans ce travail. Chez ces 2 ligneux de la famille des *Fabaceae*, les cellules de type BC correspondent au morphotype sphérique tandis que les cellules frontières de type border like cells (BLC) sont observées au sein des morphotypes intermédiaire et allongé. Il est possible que

chez les ligneux de la famille des *Fabaceae*, la présence des deux types de cellules frontières, BC et BLC coexistent comme décrit chez l'*Acacia mangium* (Endo *et al.*, 2011). Toutefois, il ne semblerait pas que le fait d'être ligneux soit une condition suffisante pour produire les deux types de cellules frontières. En effet, *B. aegyptiaca* étant aussi un ligneux ne produit que des cellules frontières de type BC. Par ailleurs, le soja (*Glycine max*) qui appartient à la famille des *Fabaceae* semblerait produire lui aussi des BCs et BLCs (Ropitiaux, data non publiées). Il semblerait donc que l'appartenance à la famille des *Fabaceae* soit propice à la production de BCs et de BLCs. Néanmoins, chez le pois (*Pisum sativum*), une autre *Fabaceae*, les cellules frontières produites par son apex racinaire ne sont que de type BC (Hawes & Lin, 1990; Hawes *et al.*, 1998).

Une des possibilités qui pourrait expliquer pourquoi certaines plantes issues de la même famille ne produisent pas les mêmes types de cellules frontières, serait qu'en fonction du type de méristème subapical de racine, il y aurait un type de cellules frontières produit (Driouich *et al.*, 2012). En effet, *A. thaliana* ayant un RAM fermé produit des BLCs, tout comme le lin (*Linum usitatissimum*) alors que *P. sativum* ayant un RAM ouvert produit des BCs (Hawes *et al.*, 1998; Chapman *et al.*, 2002; Groot *et al.*, 2004; Vicré *et al.*, 2005; Heimsch & Seago, 2008; Plancot *et al.*, 2013). Toutefois, chez *A. mangium*, le RAM est ouvert et produit les deux types de cellules frontières (Endo *et al.*, 2011). Les auteurs suggèrent qu'il y a un autre facteur indépendant du type de RAM qui influencerait la production des différents types de cellules frontières.

L'étendue du RET enrobant les apex racinaires n'est pas similaire pour ces 3 plantes. En effet, le RET est restreint à la pointe racinaire chez *B. aegyptiaca*, alors qu'il s'étend sur une distance de 6 et 3 mm de l'apex pour respectivement *A. raddiana* et *T. indica*. La zone où s'étendent les cellules frontières d'*A. raddiana* semble corroborer avec celle d'*A. mangium* (Endo *et al.*, 2011). Il serait intéressant de déterminer si le genre d'une espèce végétale est lié à l'étendue du RET enrobant son apex racinaire.

L'analyse de la composition monosaccharides par GC-FID ainsi que l'analyse par FTIR des 3 plantes sur leurs différentes fractions enrichies en AIR d'apex racinaire, de RET et d'exsudats racinaires montrent une similitude de profils pour l'apex racinaire, de légères différences pour le RET et des différences marquées pour les exsudats racinaires. Ceci semble suggérer qu'une spécificité glycanique des plantes se trouve au sein de leur RET et surtout de

leurs exsudats racinaires. Il serait intéressant de coupler l'analyse de composition monosaccharidique par des analyses de liaison par GC-MS. De plus une séparation des pectines et des hémicelluloses pourrait être envisagée afin d'affiner la caractérisation du RET et des exsudats racinaires. Toutefois, la question de la faisabilité de ce type d'analyses doit être posée.

Le mucilage des cellules frontières est riche en polysaccharides pariétaux de types pectines (homogalacturonanes, rhamnogalacturonanes), hémicellulose (xyloglucane) et HRGP (AGPs et extensines). De plus nous avons montré que la richesse en AGPs des exsudats racinaires de *B. aegyptiaca* est significativement plus grande que celle d'*A. raddiana* et de *T. indica*. Cette richesse pourrait être un des éléments qui permet à *B. aegyptiaca* de mieux tolérer la sécheresse *via* les propriétés physicochimiques des AGPs à retenir l'eau. Il serait intéressant d'approfondir la caractérisation des AGPs présentes dans les exsudats racinaires mais aussi au sein du RET, en déterminant s'il existe plusieurs populations d'AGPs.

Enfin, des travaux en microbiologie ont aussi été initiés durant cette thèse. Les données obtenues indiquent que les exsudats racinaires des 3 plantes subsahariennes peuvent être une source de carbone et d'azote pour assurer la croissance de la ePGPR *Azospirillum brasilense*. Toutefois les exsudats racinaires de *B. aegyptiaca* semblent être plus facilement assimilables par la bactérie que les exsudats racinaires d'*A. raddiana* et de *T. indica*. Il serait intéressant de voir si les exsudats racinaires activent des gènes PGPRs au sein de la bactérie. De plus, des tests de chimiotactisme entre la bactérie et les exsudats racinaires pourraient être étudiés.

II-Les perspectives

Une des premières perspectives à envisager, est de compléter cette étude *in vitro* en mimant un stress hydrique par exemple *via* dans un premier temps avec l'utilisation du polyéthylène glycol dans un second temps avec différents degrés d'arrosage afin de voir s'il y a une modification au niveau de la répartition et de la viabilité des différents morphotypes de cellules frontières. D'éventuelles modifications dans la composition glycanique du RET et des exsudats racinaires pourraient être observées. De plus il faudrait ajouter l'analyse d'autres enzymes liées au stress hydrique telles que la catalase, la superoxyde dismutase, etc qui sont connues pour être impliquées dans la résistance à la sécheresse. L'activité enzymatique de la xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases (XTHs) (Tabuchi *et al.*, 2001; Rose *et al.*, 2002) au sein du RET et des exsudats racinaires a déjà été mise en évidence. En effet, l'expression constitutive de CaXTH chez des plantes transgéniques d'*A. thaliana* améliore sa résistance à la sécheresse (Cho *et al.*, 2006). Il serait peut-être possible que *B. aegyptiaca* ait elle aussi une forte activité XHT par rapport aux deux autres plantes qui tolèrent moins bien la sécheresse.

Par ailleurs, une étude du protéome et du transcriptome du RET et des exsudats racinaires dans des conditions de stress hydriques avec témoin sans stress hydrique seraient également intéressantes à réaliser, associée d'une comparaison avec des plantes modèles type : *A. thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, etc.

Il serait intéressant d'analyser la capacité des différents RET à garder l'eau, par analyse de la teneur en eau avant et après déshydratation. De plus, il serait intéressant d'analyser la présence et la quantité de tréhalose dans le RET et ou les exsudats, car ce disaccharide de 2 glucoses liés par leur carbone 1, est un osmorégulateur permettant aux plantes de mieux résister à la sécheresse (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2016; Asaf *et al.*, 2017).

Il serait également intéressant de compléter l'étude sur l'effet des exsudats racinaires avec ou non un stress hydrique sur la croissance d'*A. brasilense* avec notamment un fractionnement des exsudats racinaires soit par leur taille moléculaire ou soit par précipitation sélective des glycomolécules *via* l'outil anticorps. De plus, une étude sur l'expression de gènes responsables de l'activité PGPR en présence ou absence d'exsudats racinaires serait intéressant à réaliser.

Une étude approfondie de la fonction des AGPs dans la tolérance ou résistance à la sécheresse serait intéressante à réaliser sur la plante modèle *A. thaliana* ou sur des plantes de grandes cultures comme le blé, maïs ou le riz.

Par ailleurs, avec les résultats préliminaires obtenus lors de la mise en place du mésocosme, il serait nécessaire de pouvoir réaliser des travaux *in situ* au Sénégal (parcelle expérimentale du Ferlo) afin de réaliser dans un premier temps des expérimentations en pot avec du sol de la GMV (non limitant), puis de poursuivre avec des expérimentations *in situ*. Ceci permettrait de se rapprocher le plus possible de la réalité de terrain.

Cette caractérisation du piège extracellulaire de racines et des exsudats racinaires de plantes issues de la Grande Muraille Verte, évoque leurs possibles implications dans la tolérance à la sécheresse. Les résultats obtenus confirment l'importance de la nature des polymères pariétaux au sein du RET et des exsudats racinaires dans les interactions abiotiques et/ou biotiques au sein de la rhizosphère.

Le travail réalisé a contribué à accroître les connaissances fondamentales sur la structure d'apex racinaires de trois ligneux. Les données obtenues sur la caractérisation du RET et des exsudats racinaires soulèvent des questionnements quant à l'implication potentielle des glycomolécules dans la tolérance à la sécheresse, et notamment dans le développement du système racinaire de plantules lors de leur culture en milieu aride ou semi-aride.

Références

I-Bibliographie

- Alli LA, Adesokan AA, Salawu AO. 2016.** Antimalarial activity of fractions of aqueous extract of *Acacia nilotica* root. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* **5**: 180–185.
- Alvarez MI, Sueldo RJ, Barassi CA. 1996.** Effect of *Azospirillum* on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress. *Cereal Research Communications* **24**: 101–107.
- An SH, Sohn KH, Choi HW, Hwang IS, Lee SC, Hwang BK. 2008.** Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. *Planta* **228**: 61–78.
- Arnaud C, Bonnot C, Desnos T, Nussaume L. 2010.** The root cap at the forefront. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 335–343.
- Asaf S, Khan AL, Khan MA, Imran QM, Yun B-W, Lee I-J. 2017.** Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Sphingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiological Research* **205**: 135–145.
- Aspinall GO, Molloy JA, Craig JWT. 1969.** Extracellular polysaccharides from suspension-cultured sycamore cells. *Canadian journal of biochemistry* **47**: 1063–1070.
- Badri DV, Vivanco JM. 2009.** Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* **32**: 666–681.
- Baetz U, Martinoia E. 2014.** Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* **19**: 90–98.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233–266.
- Barlow PW, Hawes CR, Horne JC. 1984.** Structure of amyloplasts and endoplasmic reticulum in the root caps of *Lepidium sativum* and *Zea mays* observed after selective membrane staining and by high-voltage electron microscopy. *Planta* **160**: 363–371.
- Barnes WJ, Anderson CT. 2017.** Release, Recycle, Rebuild: Cell wall remodeling, autodegradation, and sugar salvage for new wall biosynthesis during plant development. *Molecular Plant* **11**: 31–46.
- Bashan Y, Levanony H, Whitmoyer RE. 1991.** Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Microbiology* **137**: 187–196.
- Bashan Y, Puente ME, Rodriguez-Mendoza MN, Toledo G, Holguin G, Ferrera-Cerrato R, Pedrin S. 1995.** Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1938–1945.
- Benfey PN, Scheres B. 2000.** Root development. *Current Biology* **10**: 813–815.

- Bennett T, van den Toorn A, Sanchez-Perez GF, Campilho A, Willemsen V, Snel B, Scheres B. 2010.** SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in *Arabidopsis* [C][W]. *The Plant Cell* **22**: 640–654.
- Bennett T, van den Toorn A, Willemsen V, Scheres B. 2014.** Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development* **141**: 4055–4064.
- Berckmans B, Rüdiger S. 2016.** A Feed-Forward Regulation Sets Cell Fates in Roots. *Trends in Plant Science* **21**: 373–375.
- Birnbaum KD. 2016.** How many ways are there to make a root? *Current Opinion in Plant Biology* **34**: 61–67.
- Blancaflor EB, Fasano JM, Gilroy S. 1999.** Laser ablation of root cap cells: implications for models of graviperception. *Advances in space research* **24**: 731–738.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ. 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology* **4**: 343–350.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003.** Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
- Brigham LA, Woo H-H, Hawes MC. 1995a.** Root Border Cells as Tools in Plant Cell Studies. *Methods in Cell Biology* **49**: 377–387.
- Brigham LA, Woo H-H, Nicoll SM, Hawes MC. 1995b.** Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of pea. *Plant Physiology* **109**: 457–463.
- Brinkmann V. 2004.** Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**: 1532–1535.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007.** Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 577–582.
- Broek AV, Michiels J, Van Gool A, Vanderleyden J. 1993.** Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 592–600.
- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E. 2000.** Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical reviews in microbiology* **26**: 91–110.
- Cai M, Zhang S, Xing C, Wang F, Ning W, Lei Z. 2011.** Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. *Plant Science* **180**: 702–708.
- Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vitré-Gibouin M. 2011.** Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany* **108**: 459–469.
- Carpita NC. 1996.** STRUCTURE AND BIOGENESIS OF THE CELL WALLS OF GRASSES. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 445–476.

- 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. *The Plant Journal* **3**: 30.
- Carpita NC, McCann M, Griffing LR. 1996.** The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *The Plant Cell* **8**: 1451–1463.
- Causier B, Lloyd J, Stevens L, Davies B. 2012.** TOPLESS co-repressor interactions and their evolutionary conservation in plants. *Plant signaling & behavior* **7**: 325–328.
- Chaboud A, Rougier M. 1984.** Identification and localization of sugar components of rice (*Oryza sativa* L.) root cap mucilage. *Journal of plant physiology* **116**: 323–330.
- Chapman K, Groot EP, Nichol SA, Rost TL. 2002.** Primary Root Growth and the Pattern of Root Apical Meristem Organization are Coupled. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 287–295.
- Chen X, Pfeil JE, Gal S. 2002.** The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed: Differential expression of aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry* **269**: 4675–4684.
- Cho SK, Kim JE, Park J-A, Eom TJ, Kim WT. 2006.** Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters* **580**: 3136–3144.
- Chothani DL, Vaghasiya HU. 2011.** A review on *Balanites aegyptiaca* Del (desert date): phytochemical constituents, traditional uses, and pharmacological activity., A review on *Balanites aegyptiaca* Del (desert date): phytochemical constituents, traditional uses, and pharmacological activity. *Pharmacognosy reviews, Pharmacognosy Reviews* **5**, **5**: 55, 55–62.
- Clowes FAL. 1961.** Duration of the mitotic cycle in a meristem. *Journal of experimental botany* **12**: 283–293.
- Clowes FAL, Juniper BE. 1964.** The fine structure of the quiescent centre and neighbouring tissues. *Journal of Experimental Botany* **15**: 622–623.
- Cohen AC, Bottini R, Piccoli PN. 2008.** *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regulation* **54**: 97–103.
- Cohen AC, Bottini R, Pontin M, Berli FJ, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia CN, Piccoli PN. 2015.** *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* **153**: 79–90.
- Collins C, Maruthi NM, Jahn CE. 2015.** CYCD3 D-type cyclins regulate cambial cell proliferation and secondary growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **66**: 4595–4606.

- Cosgrove DJ. 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 850–861.
- Cosgrove DJ. 2016.** Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany* **67**: 463–476.
- Costa RRGF, Quirino G da SF, Naves DC de F, Santos CB, Rocha AF de S. 2015.** Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize1. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **45**: 304–311.
- Couzigou J-M, Combier J-P. 2016.** Plant microRNAs: key regulators of root architecture and biotic interactions. *New Phytologist* **212**: 22–35.
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA. 1998.** Water relations in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Canadian Journal of Botany* **76**: 238–244.
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA. 2004.** Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany* **82**: 273–281.
- Csiszár J, Gallé Á, Horváth E, Dancsó P, Gombos M, Váry Z, Erdei L, Györgyey J, Tari I. 2012.** Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **52**: 119–129.
- De Micco V, Aronne G. 2012.** Morpho-Anatomical Traits for Plant Adaptation to Drought. In: Aroca R, ed. *Plant Responses to Drought Stress*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 37–61.
- De Tullio MC, Jiang K, Feldman LJ. 2010.** Redox regulation of root apical meristem organization: Connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 328–336.
- Del Campillo E, Abdel-Aziz A, Crawford D, Patterson SE. 2004.** Root cap specific expression of an endo- β -1, 4-glucanase (cellulase): a new marker to study root development in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* **56**: 309–323.
- Del Carmen Cordoba-Pedregosa M. 2003.** Zonal Changes in Ascorbate and Hydrogen Peroxide Contents, Peroxidase, and Ascorbate-Related Enzyme Activities in Onion Roots. *PLANT PHYSIOLOGY* **131**: 697–706.
- Desvoyes B, de Mendoza A, Ruiz-Trillo I, Gutierrez C. 2014.** Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2657–2666.
- Ding Z, Friml J. 2010.** Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 12046–12051.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993.** Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84.

- Dos Santos WD, Ferrarese MLL, Nakamura CV, Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O. 2008.** Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. *Journal of Chemical Ecology* **34**: 1230–1241.
- Driouich A, Cannesan M-A, Dardelle F, Durand C, Plancot B, Bernard S, Follet-Gueye M-L, Vicro-Gibouin M. 2012.** Unity Is Strength: The Power of Border Cells and Border-Like Cells in Relation with Plant Defense. In: Vivanco JM, Baluška F, eds. Secretions and Exudates in Biological Systems. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 91–107.
- Driouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vicro-Gibouin M. 2010.** Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of Experimental Botany* **61**: 3827–3831.
- Driouich A, Follet-Gueye M-L, Vicro-Gibouin M, Hawes M. 2013.** Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 489–495.
- Drisch RC, Stahl Y. 2015.** Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science* **6**: 505.
- Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2012.** Which specificity in cooperation between phyto stimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology* **163**: 500–510.
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E. 2008.** Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8790–8794.
- Durand C, Vicro-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A. 2009.** The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* is dependent on Cell Wall Homogalacturonan. *Plant Physiology* **150**: 1411–1421.
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010.** Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? *PLANT PHYSIOLOGY* **153**: 403–419.
- Endo I, Tange T, Osawa H. 2011.** A cell-type-specific defect in border cell formation in the *Acacia mangium* root cap developing an extraordinary sheath of sloughed-off cells. *Annals of Botany* **108**: 279–290.
- Eyog Matig O, Ndoye O, Kengue J, Awono A. 2006.** *Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun*. International Plant Genetic Resources Institute.
- Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Mett A, Belausov E, Gidoni D, Lers A. 2011.** Localization of the *Arabidopsis* Senescence- and Cell Death-Associated BFN1 Nuclease: From the ER to Fragmented Nuclei. *Molecular Plant* **4**: 1062–1073.
- Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Perl-Treves R, Lers A. 2008.** Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3247–3258.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**: 185–212.

Fendrych M, Van Hautegeem T, Van Durme M, Olvera-Carrillo Y, Huysmans M, Karimi M, Lippens S, Guérin CJ, Krebs M, Schumacher K, et al. 2014. Programmed Cell Death Controlled by ANAC033/SOMBRERO Determines Root Cap Organ Size in *Arabidopsis*. *Current Biology* **24**: 931–940.

Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* **326**: 99–108.

Fisher AP, Sozzani R. 2016. Uncovering the networks involved in stem cell maintenance and asymmetric cell division in the *Arabidopsis* root. *Current Opinion in Plant Biology* **29**: 38–43.

Floc'h ÉL, Grouzis M. 2013. *Acacia raddiana*, un arbre des zones arides à usages multiples. In: Grouzis M, Le Floc'h É, eds. Hors collection. Un arbre au désert : *Acacia raddiana*. Marseille: IRD Éditions, 21–58.

Forzani C, Aichinger E, Sornay E, Willemsen V, Laux T, Dewitte W, Murray JAH. 2014. WOX5 Suppresses CYCLIN D Activity to Establish Quiescence at the Center of the Root Stem Cell Niche. *Current Biology* **24**: 1939–1944.

Francoz E, Ranocha P, Nguyen-Kim H, Jamet E, Burlat V, Dunand C. 2015. Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry* **112**: 15–21.

Fujinami R, Yamada T, Nakajima A, Takagi S, Idogawa A, Kawakami E, Tsutsumi M, Imaichi R. 2017. Root apical meristem diversity in extant lycophytes and implications for root origins. *New Phytologist* **215**: 1210–1220.

Gadjev I, Stone JM, Gechev TS. 2008. Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants. In: International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier, 87–144.

Gaillochot C, Lohmann JU. 2015. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* **142**: 2237–2249.

Gall H, Philippe F, Domon J-M, Gillet F, Pelloux J, Rayon C. 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* **4**: 112–166.

García JE, Maroniche G, Creus C, Suárez-Rodríguez R, Ramirez-Trujillo JA, Groppa MD. 2017. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research* **202**: 21–29.

Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109–117.

Glick BR. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* **251**: 1–7.

- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. 2007.** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 329–339.
- Gochnauer MB, Sealey LJ, McCully ME. 1990.** Do detached root-cap cells influence bacteria associated with maize roots? *Plant, Cell & Environment* **13**: 793–801.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin H-S, Patra JK. 2018.** Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research* **206**: 131–140.
- Gowda VRP, Henry A, Yamauchi A, Shashidhar HE, Serraj R. 2011.** Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Research* **122**: 1–13.
- Gramss G, Rudeschko O. 1998.** Activities of oxidoreductase enzymes in tissue extracts and sterile root exudates of three crop plants, and some properties of the peroxidase component. *New Phytologist* **138**: 401–409.
- Gray EJ, Smith DL. 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 395–412.
- Grayston SJ, Campbell CD. 1996.** Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology* **16**: 1031–1038.
- Gribaa A, Dardelle F, Lehner A, Rihouey C, Burel C, Ferchichi A, Driouich A, Mollet J-C. 2013.** Effect of water deficit on the cell wall of the date palm (*Phoenix dactylifera* ‘Deglet nour’, Arecales) fruit during development. *Plant, Cell & Environment* **36**: 1056–1070.
- Groot EP, Doyle JA, Nichol SA, Rost TL. 2004.** Phylogenetic distribution and evolution of root apical meristem organization in dicotyledonous angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* **165**: 97–105.
- Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL. 2006.** The Production and Release of Living Root Cap Border Cells is a Function of Root Apical Meristem Type in Dicotyledonous Angiosperm Plants. *Annals of Botany* **97**: 917–923.
- Han B, Fu L, Zhang D, He X, Chen Q, Peng M, Zhang J. 2016.** Interspecies and Intraspecies Analysis of Trehalose Contents and the Biosynthesis Pathway Gene Family Reveals Crucial Roles of Trehalose in Osmotic-Stress Tolerance in Cassava. *International Journal of Molecular Sciences* **17**.
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. 2008.** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* **312**: 7–14.
- Hawes MC, Allen C, Turgeon BG, Curlango-Rivera G, Minh Tran T, Huskey DA, Xiong Z. 2016.** Root Border Cells and Their Role in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 143–161.

- Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G. 2002.** Root Caps and Rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 352–367.
- Hawes MC, Brigham LA, Wen F, Woo HH, Zhu Y. 1998.** Function of root border cells in plant health: Pioneers 1 in the rhizosphere. *Annual review of phytopathology* **36**: 311–327.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000.** The role of root border cells in plant defense. *Trends in plant science* **5**: 128–133.
- Hawes MC, Lin H-J. 1990.** Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology* **94**: 1855–1859.
- Hawes MC, Pueppke SG. 1986.** Sloughed Peripheral Root Cap Cells: Yield from Different Species and Callus Formation from Single Cells. *American Journal of Botany* **73**: 1466.
- Heimsch C, Seago JL. 2008.** Organization of the root apical meristem in angiosperms. *American Journal of Botany* **95**: 1–21.
- Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, Heyndrickx KS, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoele K, De Jaeger G, Van Der Straeten D, et al. 2013.** ERF115 Controls Root Quiescent Center Cell Division and Stem Cell Replenishment. *Science* **342**: 860–863.
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM. 2009.** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**: 117–152.
- Hopkins WG, Hüner NPA. 2008.** *Introduction to plant physiology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM. 2014.** Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities ¹. *Botany* **92**: 267–275.
- Iijima M, Morita S, Barlow PW. 2008.** Structure and Function of the Root Cap. *Plant Production Science* **11**: 17–27.
- Iino M. 1995.** Gravitropism and phototropism of maize coleoptiles: evaluation of the Cholodny-Went theory through effects of auxin application and decapitation. *Plant and cell physiology* **36**: 361–367.
- Ishikawa H, Evans ML. 1992.** Induction of curvature in maize roots by calcium or by thigmostimulation role of the postmitotic isodiametric growth zone. *Plant physiology* **100**: 762–768.
- Jin K, White PJ, Whalley WR, Shen J, Shi L. 2017.** Shaping an Optimal Soil by Root–Soil Interaction. *Trends in Plant Science* **22**: 823–829.
- Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME. 2010.** Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* **345**: 2583–2595.

Juniper BE, Barlow PW. 1969. The distribution of plasmodesmata in the root tip of maize. *Planta* **89**: 352–360.

Juniper BE, Clowes FAL. 1965. Cytoplasmic organelles and cell growth in root caps. *Nature* **208**: 864–865.

Kamiya M, Higashio S-Y, Isomoto A, Kim J-M, Seki M, Miyashima S, Nakajima K. 2016. Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in *Arabidopsis*. *Development* **143**: 4063–4072.

Karve R, Suárez-Román F, Iyer-Pascuzzi AS. 2016. The Transcription Factor NIN-LIKE PROTEIN7 Controls Border-Like Cell Release1[OPEN]. *Plant Physiology* **171**: 2101–2111.

Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, et al. 2013. β -Galactosyl Yariv Reagent Binds to the β -1,3-Galactan of Arabinogalactan Proteins1[W][OA]. *Plant Physiology* **161**: 1117–1126.

Kong X, Lu S, Tian H, Ding Z. 2015. WOX5 is Shining in the Root Stem Cell Niche. *Trends in Plant Science* **20**: 601–603.

Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vicré-Gibouin M. 2016. Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**: 797–808.

Kumar Bhateja P, Singh R. 2014. Antidiabetic Activity of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. raddiana Polysaccharide on Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. *BioMed Research International* **2014**.

Kwon T, Sparks JA, Nakashima J, Allen SN, Tang Y, Blancaflor EB. 2015. Transcriptional response of *Arabidopsis* seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development. *American Journal of Botany* **102**: 21–35.

Lamport DTA, Kieliszewski MJ, Showalter AM. 2006. Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function*. *New Phytologist* **169**: 479–492.

Lamport DTA, Várnai P. 2013. Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytologist* **197**: 58–64.

Leroux C, Bouton S, Kiefer-Meyer M-C, Fabrice TN, Mareck A, Guénin S, Fournet F, Ringli C, Pelloux J, Driouich A, et al. 2015. PECTIN METHYLESTERASE48 Is Involved in *Arabidopsis* Pollen Grain Germination. *Plant Physiology* **167**: 367–380.

Leucci MR, Lenucci MS, Piro G, Dalessandro G. 2008. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1168–1180.

Liu T-T, Li F, Zhang X, Shi J, Chen Y-X. 2012. *The number and survival rate of corn root border cells under the stress of copper ions.*

Logbo J, Diouf M, Ngaryo F, Ameglio T, Akpo L. 2013. Effet du stress hydrique sur l'architecture racinaire de jeunes plants d'*Acacia tortilis* (Forsk.), de *Balanites aegyptiaca* (L) Del., et de *Zizyphus mauritiana* Lam. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 7: 1011.

Lynch J. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant physiology* 109: 7–13.

Lynch JM, Whipps JM. 1991. Substrate flow in the rhizosphere. In: Beltsville Symposia in Agricultural Research. The Rhizosphere and Plant Growth. 15–24.

Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. 2016. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management* 174: 14–25.

Maia J, Voigt E, Ferreira-Silva S, de V. Fontenele A, Macêdo C, Silveira J. 2012. Differences in Cowpea Root Growth Triggered by Salinity and Dehydration are Associated with Oxidative Modulation Involving Types I and III Peroxidases and Apoplastic Ascorbate.

Manrique GD, Lajolo FM. 2002. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25: 99–107.

Maroyi A. 2017. *Acacia karroo* Hayne: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of an important medicinal plant in southern Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10: 351–360.

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* 17: 458–466.

McFarlane HE, Döring A, Persson S. 2014. The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annual Review of Plant Biology* 65: 69–94.

Meena VS, Meena SK, Verma JP, Kumar A, Aeron A, Mishra PK, Bisht JK, Pattanayak A, Naveed M, Dotaniya ML. 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering* 107: 8–32.

Minic Z, Jouanin L. 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 435–449.

Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 266–277.

Moller I, Marcus SE, Haeger A, Verherbruggen Y, Verhoef R, Schols H, Ulvskov P, Mikkelsen JD, Knox JP, Willats W. 2008. High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconjugate Journal* 25: 37–48.

- Morsy AMA, Ahmad IA, Kamel AM. 2010.** Some biomedical applications of *Balanites aegyptiaca* grown naturally in radioactive area, Southeastern Desert, Egypt. *Journal of Hazardous Materials* **178**: 725–728.
- Moubayidin L, Di Mambro R, Sozzani R, Pacifici E, Salvi E, Terpstra I, Bao D, van Dijken A, Dello Ioio R, Perilli S, et al. 2013.** Spatial Coordination between Stem Cell Activity and Cell Differentiation in the Root Meristem. *Developmental Cell* **26**: 405–415.
- Mravec J, Guo X, Hansen AR, Schükel J, Kracun SK, Mikkelsen MD, Mouille G, Johansen IE, Ulvskov P, Domozych D, et al. 2017a.** Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics. *Plant Physiology*: pp.00097.2017.
- Mravec J, Kracun SK, Rydahl MG, Westereng B, Miart F, Clausen MH, Fangel JU, Daugaard M, Van Cutsem P, De Fine Licht HH, et al. 2014.** Tracking developmentally regulated post-synthetic processing of homogalacturonan and chitin using reciprocal oligosaccharide probes. *Development* **141**: 4841–4850.
- Mravec J, Kracun SK, Rydahl MG, Westereng B, Pontiggia D, De Lorenzo G, Domozych DS, Willats WGT. 2017b.** An oligogalacturonide-derived molecular probe demonstrates the dynamics of calcium-mediated pectin complexation in cell walls of tip-growing structures. *The Plant Journal* **91**: 534–546.
- Nabors M, Sallé G. 2008.** *Biologie végétale structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies*. Pearson.
- Nagy NE, Fossdal CG, Dalen LS, Lonneborg A, Haldal I, Johnsen O. 2004.** Effects of Rhizoctonia infection and drought on peroxidase and chitinase activity in Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* **120**: 465–473.
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN. 2001.** Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**: 307–311.
- Nakamura M, Grebe M. 2018.** Outer, inner and planar polarity in the *Arabidopsis* root. *Current Opinion in Plant Biology* **41**: 46–53.
- Neves GYS, Marchiosi R, Ferrarese MLL, Siqueira-Soares RC, Ferrarese-Filho O. 2010.** Root Growth Inhibition and Lignification Induced by Salt Stress in Soybean: Soybean Root Lignification Induced by Salt Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* **196**: 467–473.
- Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A. 2013.** Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**: 440–449.
- Olmos E, García De La Garma J, Gomez-Jimenez MC, Fernandez-Garcia N. 2017.** Arabinogalactan Proteins Are Involved in Salt-Adaptation and Vesicle Trafficking in Tobacco by-2 Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. 2010.** Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a001537–a001537.

- Pagnussat LA, Salcedo F, Maroniche G, Keel C, Valverde C, Creus CM. 2016.** Interspecific cooperation: enhanced growth, attachment and strain-specific distribution in biofilms through *Azospirillum brasilense*-*Pseudomonas protegens* co-cultivation. *FEMS microbiology letters* **363**: fnw238.
- Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz E. 2007.** New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**: 267–277.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ. 2009.** *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**: 399–408.
- Phillips HL, Torrey JG. 1974.** The Ultrastructure of the Quiescent Center in the Apex of Cultured Roots of *Convolvulus arvensis* L. *American Journal of Botany* **61**: 871.
- Pi L, Aichinger E, van der Graaff E, Llavata-Peris CI, Weijers D, Hennig L, Groot E, Laux T. 2015.** Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Developmental Cell* **33**: 576–588.
- Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vicre-Gibouin M. 2013.** Deciphering the Responses of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* and Flax to Pathogen-Derived Elicitors. *PLANT PHYSIOLOGY* **163**: 1584–1597.
- Radwan UAA. 2007.** Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of the drought-resistant *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. seedlings. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*: 680–688.
- Rahni R, Efroni I, Birnbaum KD. 2016.** A Case for Distributed Control of Local Stem Cell Behavior in Plants. *Developmental Cell* **38**: 635–642.
- Ranjan A, Pandey N, Lakhwani D, Kumar Dubey N, V Pathre U, Sawant S. 2012.** *Comparative transcriptomic analysis of roots of contrasting Gossypium herbaceum genotypes revealing adaptation to drought.*
- Raven P, Evert R, Eichhorn S, Bouharmont J. 2007.** *Biologie végétale*. De Boeck.
- Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB, Campbell NA. 2014.** *Campbell biology*. Boston: Pearson.
- Richards S, Wink RH, Simon R. 2015.** Mathematical modelling of WOX5-and CLE40-mediated columella stem cell homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **66**: 5375–5384.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001.** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929–967.
- Rodríguez-Salazar J, Suárez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G. 2009.** Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiology Letters* **296**: 52–59.

- Rose JK, 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 and Cell Physiology* **43**: 1421–1435.
- Rost TL. 2011.** The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of Botany* **107**: 1213–1222.
- Rougier M. 1981.** Secretory Activity of the Root Cap. In: Tanner W, Loewus FA, eds. *Plant Carbohydrates II: Extracellular Carbohydrates*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 542–574.
- Rougier M, Kieda C, Monsigny M. 1979.** Use of lectin to detect the sugar components of maize root cap slime. *The journal of histochemistry and cytochemistry* **27**: 878–881.
- Rovira AD. 1969.** Plant root exudates. *The botanical review* **35**: 35–57.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. 2003.** SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & development* **17**: 354–358.
- Sandhya V, Ali SZ, Grover M, Reddy G, Venkateswarlu B. 2010.** Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* **62**: 21–30.
- Sarig S, Blum A, Okon Y. 1988.** Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *The Journal of Agricultural Science* **110**: 271–277.
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T. 2007.** Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811–814.
- Satbhai SB, Ristova D, Busch W. 2015.** Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1099–1112.
- Scheller HV, Ulvskov P. 2010.** Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 263–289.
- Scheres B, Benfey P, Dolan L. 2002.** Root Development. *The Arabidopsis Book* **1**: e0101.
- Schnall JA, Quatrano RS. 1992.** Abscisic acid elicits the water-stress response in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* **100**: 216–218.
- Sebastian J, Ryu KH, Zhou J, Tarkowská D, Tarkowski P, Cho Y-H, Yoo S-D, Kim E-S, Lee J-Y. 2015.** PHABULOSA controls the quiescent center-independent root meristem activities in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **11**: e1004973.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT. 2004.** Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2343–2351.

- Shi Y, Zhang Y, Yao H, Wu J, Sun H, Gong H. 2014.** Silicon improves seed germination and alleviates oxidative stress of bud seedlings in tomato under water deficit stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **78**: 27–36.
- 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 PHYSIOLOGY* **153**: 485–513.
- Skamnioti P, Ridout CJ. 2005.** Microbial avirulence determinants: guided missiles or antigenic flak? *Molecular Plant Pathology* **6**: 551–559.
- Sofa A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A. 2004.** Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum* **121**: 58–65.
- Somssich M, Khan GA, Persson S. 2016.** Cell Wall Heterogeneity in Root Development of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, Kühnemuth R, Weidtkamp-Peters S, Pinto KG, Kirschner GK, Schmid JB, Wink RH, Hülsewede A, et al. 2013.** Moderation of *Arabidopsis* Root Stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 Receptor Kinase Complexes. *Current Biology* **23**: 362–371.
- Stahl Y, Simon R. 2010.** Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 53–58.
- Sun L, Song J, Peng C, Xu C, Yuan X, Shi J. 2015.** Mechanistic study of programmed cell death of root border cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) induced by copper. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**: 412–419.
- Swinburne TR (Ed.). 1986.** *Iron, Siderophores, and Plant Diseases*. Boston, MA: Springer US.
- Tabuchi A, Mori H, Kamisaka S, Hoson T. 2001.** A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant and Cell Physiology* **42**: 154–161.
- Tenhaken R. 2015.** Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Tian H, Wabnik K, Niu T, Li H, Yu Q, Pollmann S, Vanneste S, Govaerts W, Rolčík J, Geisler M, et al. 2014.** WOX5–IAA17 Feedback Circuit-Mediated Cellular Auxin Response Is Crucial for the Patterning of Root Stem Cell Niches in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **7**: 277–289.
- Tsugeki R, Fedoroff NV. 1999.** Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 12941–12946.
- Tsunoda T, van Dam NM. 2017.** Root chemical traits and their roles in belowground biotic interactions. *Pedobiologia* **65**: 58–67.

- Van Bastelaere E, Lambrecht M, Vermeiren H, Van Dommelen A, Keijers V, Proost P, Vanderleyden J. 1999.** Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Molecular microbiology* **32**: 703–714.
- Van Den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. 1997.** Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**: 287.
- Vanstockem M, Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool AP. 1987.** Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 410–415.
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. 2016.** Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* **21**: 573.
- Verbon EH, Liberman LM. 2016.** Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science* **21**: 218–229.
- Vessey J. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil* **255**: 571–586.
- Vicré M, Santaella, C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005.** Root Border-Like Cells of *Arabidopsis*. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *PLANT PHYSIOLOGY* **138**: 998–1008.
- Wade TI, Ndiaye O, Mauclaire M, Mbaye B, Sagna M, Guissé A, Goffner D. 2017.** Biodiversity field trials to inform reforestation and natural resource management strategies along the African Great Green Wall in Senegal. *New Forests*.
- Wang J-W. 2005.** Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **17**: 2204–2216.
- Wang P, Chen X, Goldbeck C, Chung E, Kang B-H. 2017a.** A distinct class of vesicles derived from the trans-Golgi mediates secretion of xylogalacturonan in the root border cell. *The Plant Journal* **92**: 596–610.
- Wang D, Xu A, Elmerich C, Ma LZ. 2017b.** Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME Journal* **11**: 1602–1613.
- Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. 2007.** Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular Microbiology* **9**: 1162–1171.
- Weiller F, Moore JP, Young P, Driouich A, Vivier MA. 2016.** The Brassicaceae species *Heliophila coronopifolia* produces root border-like cells that protect the root tip and secrete defensin peptides. *Annals of Botany*: mcw141.
- Wen F, Curlango-Rivera G, Huskey DA, Xiong Z, Hawes MC. 2017.** Visualization of extracellular DNA released during border cell separation from the root cap. *American Journal of Botany* **104**: 970–978.

- Wen F, VanEtten HD, Tsaprailis G, Hawes MC. 2007.** Extracellular Proteins in Pea Root Tip and Border Cell Exudates. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**: 773–783.
- Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. 2009.** Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. *Plant Physiology* **151**: 820–829.
- Wen F, Zhu Y, Hawes MC. 1999.** Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *The Plant Cell* **11**: 1129–1140.
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Blilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruissem W, Scheres B. 2005.** The RETINOBLASTOMA-RELATED Gene Regulates Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Roots. *Cell* **123**: 1337–1349.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001.** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. In: Carpita NC, Campbell M, Tierney M, eds. *Plant Cell Walls*. Dordrecht: Springer Netherlands, 9–27.
- Willemsen V, Bauch M, Bennett T, Campilho A, Wolkenfelt H, Xu J, Haseloff J, Scheres B. 2008.** The NAC Domain Transcription Factors FEZ and SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in *Arabidopsis* Root Stem Cells. *Developmental Cell* **15**: 913–922.
- Wilson RH, Smith AC, Kačuráková M, Saunders PK, Wellner N, Waldron KW. 2000.** The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiology* **124**: 397–406.
- Xiao C, Barnes WJ, Zamil MS, Yi H, Puri VM, Anderson CT. 2017.** Activation tagging of *Arabidopsis* *POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2* promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. *The Plant Journal* **89**: 1159–1173.
- Xiao C, Somerville C, Anderson CT. 2014.** *POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION1* Functions in Cell Elongation and Flower Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**: 1018–1035.
- Xing C, Zhu M, Cai M, Liu P, Xu G, Wu S. 2008.** Developmental characteristics and response to iron toxicity of root border cells in rice seedlings. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **9**: 261–264.
- Xiong L, Wang R-G, Mao G, Koczan JM. 2006.** Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology* **142**: 1065–1074.
- Xu P, Cai X-T, Wang Y, Xing L, Chen Q, Xiang C-B. 2014.** HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4285–4295.
- Yadav SR, Helariutta Y. 2014.** Programmed Cell Death: New Role in Trimming the Root Tips. *Current Biology* **24**: R374–R376.

- Yang Z-B, Eticha D, Rao IM, Horst WJ. 2010.** Alteration of cell-wall porosity is involved in osmotic stress-induced enhancement of aluminium resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany* **61**: 3245–3258.
- Yang J, Qu M, Fang J, Shen RF, Feng YM, Liu JY, Bian JF, Wu LS, He YM, Yu M. 2016.** Alkali-Soluble Pectin Is the Primary Target of Aluminum Immobilization in Root Border Cells of Pea (*Pisum sativum*). *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Yang H, Yan R, Chen H, Lee DH, Zheng C. 2007.** Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* **86**: 1781–1788.
- Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967.** Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* **105**: 1C.
- Yates EA, Valdor J-F, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP. 1996.** Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6**: 131–139.
- Yu JQ, Ye SF, Zhang MF, Hu WH. 2003.** Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 129–139.
- Zhang Y, Jiao Y, Liu Z, Zhu Y-X. 2015.** ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nature Communications* **6**: 6003.
- Zhao C, Avci U, Grant EH, Haigler CH, Beers EP. 2007.** XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem: XND1 blocks tracheary element differentiation. *The Plant Journal* **53**: 425–436.
- Zurcher E, Tavor-Deslex D, Lituiev D, Enkerli K, Tarr PT, Muller B. 2013.** A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in Planta. *PLANT PHYSIOLOGY* **161**: 1066–1075.

II-Webographie

Web1 : <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617>

Web2 : <http://www.grandemurailleverte.org>

Web3 : <http://www.fao.org/home/fr/>

Web4 : <https://www.jardinetmaison.fr/encyclopedie-plante/tamarindus-indica>

Web5 : <http://echangetv.levantin.free.fr/Cours/Agronomie/index.php>

Annexes

Annexe 1 : Revue scientifique sur les Extensines

Parallèlement à mes travaux de recherche, j'ai eu l'opportunité de participer à la rédaction d'une revue portant sur l'implication des extensines pariétales dans la défense racinaire.

Cell wall extensins in root-microbe interactions and root secretions

Romain Castilleux¹, Barbara Plancot¹, Marc Ropitiaux¹, Alexis Carreras¹, Jérôme Leprince², Isabelle Boulogne¹, Marie-Laure Follet-Gueye¹, Zoë Popper³, Azeddine Driouich^{1*} and Maïté Vicré^{1*}

¹Normandie Université, UNIROUEN, Laboratoire Glyco-MEV EA 4358, Fédération de Recherche "Normandie Végétal" FED 4277, 76000 Rouen, France

²INSERM U1239, Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Normandie Université, 76000 Rouen, France

³Botany and Plant Science and The Ryan Institute for Environmental, Marine and Energy Research, School of Natural Sciences, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland.

*Equal contribution of the senior authors.

Corresponding author:

maite.vicre@univ-rouen.fr

+33 235 146 768

Abstract:

Extensins are cell wall glycoproteins belonging to the Hydroxyproline-Rich GlycoProtein (HRGP) family and are involved in many biological functions, including plant defence. Several reviews have described the implication of HRGPs in plant immunity, but little focus has been given specifically to cell wall extensins. Yet, a large set of recently published data indicates that extensins play an important role in plant protection, especially in root-microbe interactions. Here, we summarize the current knowledge on this topic and discuss the importance of extensins in root defence. We first provide an overview of the distribution of extensin epitopes recognized by different monoclonal antibodies among plants, and discuss the importance of some of these epitopes as markers of the root defence response. We also highlight the implication of extensins in different types of plant interactions elicited by either pathogenic or beneficial microorganisms. We then describe the specific importance of extensins in root secretions as these glycoproteins are not only found within the cell wall but are also released into root mucilage. We therefore propose a model to illustrate the impact of extensins on the cell wall network and on root secretions.

Keywords: Cell wall, plant defence, cell wall epitope, extensins, monoclonal antibodies, pectins, root secretions

Introduction

Extensins are cell wall glycoproteins belonging to the Hydroxyproline-Rich GlycoProtein (HRGP) family as well as the ArabinoGalactan Proteins (AGPs) and the Proline/hydroxyproline-Rich Proteins (PRP). They are *O*-glycosylated on specific Serine-(Hydroxyproline)₄₋₅ motifs of the protein core (see glycan structure in Fig. S1); *O*-glycosylation is carried out in the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus. In the ER, the proline residues are first hydroxylated by Prolyl-4-Hydroxylases (P4Hs) (Velasquez *et al.*, 2011; Fragkostefanakis *et al.*, 2014) before a transfer of a galactose residue to the serine residue by the Serine-GalactosylTransferase 1 (SGT1) (Saito *et al.*, 2014). Then, in the Golgi, several arabinoses are added successively to the hydroxyproline residues. The first arabinose is added by HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3 (HPAT1-3) (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2013), the second by the Reduced Residual Arabinose 1 to 3 (RRA1-3) (Egelund *et al.*, 2007), the third by the XyloEndoGlucanase 113 (XEG113) (Gille *et al.*, 2009) and the fourth by the Extensin Arabinose Deficient transferase (ExAD) (Velasquez *et al.*, 2012; Møller *et al.*, 2017). To date, the glycosyltransferase that transfers the fifth arabinose has not been determined.

O-glycosylation is required for the intra- and/or inter-molecular cross-linking of extensin through isodityrosine, pulcherosine or di-isodityrosine linkages (Smith *et al.*, 1986; Held *et al.*, 2004; Lampion *et al.*, 2011), by providing the correct conformation to the glycoprotein (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). This cross-linking is catalyzed by specific extensin peroxidases. However, to date only a few have been identified and characterized (Brownleader *et al.*, 1995; Schnabelrauch *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2015). Extensins can be associated with other cell wall components such as pectins (MacDougall *et al.*, 2001; Nuñez *et al.*, 2009; Valentin *et al.*, 2010; Leroux *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Neumetzler *et al.*, 2012; Chormova and Fry, 2016) and hemicelluloses (Gille *et al.*, 2009), thus significantly impacting wall architecture and structural organization.

It is well known that extensins display significant structural variation, and there are additionally hybrid-extensins and extensin-motif containing proteins, as comprehensively reviewed by Borassi *et al.* in 2016. Furthermore, the diversity of extensins is related to some extent to the diversity of organisms among the Plant Kingdom as shown by an interesting

bioinformatics study performed by Liu *et al.* in 2016. In this study, the authors analysed and classified extensins from sequenced genomes of algae, bryophytes, lycophytes, gymnosperms, monocots and various eudicots. They showed that extensin structure differs among different major taxonomic groups, suggesting that structural modifications may be associated with major evolutionary events such as plant vascularization and terrestrialization (Liu *et al.*, 2016).

Using immunocytochemical techniques together with genetic approaches, the presence of extensin, extensin genes and/or extensin epitopes has been reported to occur throughout the Plant Kingdom (Table 1). Extensins are involved in a wide range of processes such as embryo development (Hall and Cannon, 2002; Zhang *et al.*, 2008), root hair growth (Ringli, 2010; Velasquez *et al.*, 2011, 2015), cell wall assembly and structure (Cannon *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011; Lamport *et al.*, 2011; Chormova and Fry, 2016) and biotic and abiotic stress responses (Merkouropoulos and Shirsat, 2003; Deepak *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014; Zhang *et al.*, 2016). In the past years, many of these biological functions, especially the structural role of extensins in plant cell wall, have been extensively investigated and reviewed (Lamport *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2012; Hijazi *et al.*, 2014). In contrast, the involvement of extensins in plant defence has been relatively much less well documented (Deepak *et al.*, 2010; Rashid, 2016) although recent reports have revealed the importance of extensins in plant protection against pathogens. In this review, we summarize the current knowledge on extensin involvement in biotic stress, focusing specifically on root-microbe interactions, and propose a model to explain the effect of extensins in root secretions.

Extensin epitopes as potential defence markers

Extensin epitopes have been detected in a large spectrum of plants using commercially available specific monoclonal antibodies (mAbs) including LM1, JIM11, JIM12, JIM19 and JIM20 (Smallwood *et al.*, 1994; Knox *et al.*, 1995; Smallwood *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). These mAbs are powerful tools to detect and localize extensin epitopes although to date the recognized structure (known as the epitope) remains largely unknown. Recently, a novel anti-extensin antibody, LM3, was used in several studies. The epitopes recognised by LM3 were

detected in *Pisum sativum* (pea) roots, exhibiting a stronger signal compared to immunolabelling with the monoclonal antibody LM1 (Mravec *et al.*, 2017). The epitope recognised by LM3 has also been reported to occur, using immuno-glycan microarray analysis, in extracts from *Buxus sempervirens* (box), *Viscum album* (mistletoe), *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* (tomato) and *Taiwania cryptomerioides* (Feng *et al.*, 2014). In these extracts, the LM3 signal pattern was similar to that obtained with JIM20 but differed from the pattern for JIM11 and JIM12. Currently, little information is available for LM3 compared to the other mAbs known to recognise epitopes present in extensins. In Fig. 1, we propose an overview of the epitope distribution for each antibody according to the current literature. LM1, JIM11, JIM12 and JIM20 epitopes appear to be widespread in different plant tissues. However, it is worth noting that differences at the organ level are observed between plant species. For instance, although JIM12 and LM1 epitopes are detected in roots of *A. thaliana* (Velasquez *et al.*, 2011; Plancot *et al.*, 2013; Castilleux *et al.*, submitted), these epitopes are absent in the roots of *Benincasa hispida* (wax gourd) (Xie *et al.*, 2011) and *Musa* spp. AAA (banana) (Wu *et al.*, 2017). A few studies have used the JIM19 monoclonal antibody and the associated epitopes have been reported only in a few cases including in rice callus extracts (Desikan *et al.*, 1999) and roots of carrot (*Daucus carota*), pea (*Pisum sativum*) and onion (*Allium cepa*) (Casero *et al.*, 1998). Interestingly, the signal intensity and/or epitopes distribution of LM1, JIM11 and JIM20 were reported to differ following enzyme treatment that may result on a release of Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP), elicitation, wounding, or pathogen inoculation of plants (Fig. 1). These results suggest that extensin epitope exposure can be modified following different treatments, implying a remodelling of extensin structure and/or interaction within the cell wall. This emphasizes the importance of extensins in plant defence and suggests that epitopes recognized by the mAbs LM1, JIM11 and JIM20 could be used as markers of plant defence response as previously proposed for JIM11 in the banana - *Fusarium oxysporum* pathosystem (Wu *et al.*, 2017). However, epitopes recognized by the mAbs JIM12 and JIM19 currently appear to be less promising markers of such a response, although a few data are available.

Extensins in plant defence

Extensins were found to be involved in various plant interactions (Table 2) such as plant parasitism, symbiosis or pathogenic attacks by bacteria, fungi, oomycetes and nematodes. In many cases, extensin epitope distribution and extensin gene expression were indeed modified. In the case of plant parasitism, epitopes associated with extensins were detected in both the host plant, *Pelargonium zonale*, and the parasite haustoria of *Cuscuta reflexa* (Striberny and Krause, 2015). Labelling with the mAbs JIM11, JIM12 and JIM20 was observed predominantly within the infection site but was not observed, or only weakly, in uninfected areas, suggesting a potential importance of extensins for both the host and the parasite in this type of interaction. Extensins might also be involved in response to physical stresses (*e.g.*, wounding). Indeed, upregulation of extensin gene transcripts has been reported for wounded soybean (*Glycine max*) root (Ahn *et al.*, 1998), potato (*Solanum tuberosum*) tubers (Neubauer *et al.*, 2012) and banana roots (Wu *et al.*, 2017). In the latter, this was coupled with an increase in fluorescence intensity when immunolabelled with JIM11 and JIM20. Similarly, removal of *Brassica campestris* leaves led to the induction of JIM12 and JIM20 signals in petioles (Davies *et al.*, 1997). In *Arabidopsis thaliana*, GUS analysis showed increased expression of the *ext3* gene specifically at the wound sites of leaves (Hall and Cannon, 2002), whereas the *ext1* gene expression was induced in localized areas where stems and leaves were wounded (Merkouropoulos and Shirsat, 2003). Thus, overexpression of extensins in response to physical stress could help to rebuild and/or strengthen the cell wall to limit the induced damage.

In plants, defence responses can be induced through the application of molecules acting as elicitors including MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), DAMPs and hormones (Table 2). When *A. thaliana* seedlings were treated with either salicylic acid or methyl jasmonate, two hormones involved in plant defence, GUS analysis revealed the induction of the *ext1* gene throughout the plant (Merkouropoulos and Shirsat, 2003). Similar results were reported for *Nicotiana tabacum* (tobacco) leaves treated with various hormones including salicylic acid, abscisic acid and ethylene, in which microarray analysis indicated induction of an extensin-like gene (Zhang *et al.*, 2016). Interestingly, Jackson *et al.* (2001) showed that, following a treatment of grapevine (*Vitis vinifera*) callus cultures with a mycelium

extract enriched in wall glucans from the oomycete *Phytophthora megasperma*, a strengthening of the cell wall occurred through insolubilization of the extensin GvP1. In contrast, this effect was not observed when the callus cultures were treated with salicylic acid (Jackson *et al.*, 2001).

The role of extensins in pathogen attacks was also investigated in a range of plant species (Table 2). In the seventies, Esquerré-Tugayé *et al.* assayed hydroxyproline tetra- and tri-arabinosides, features of extensin glycosylation, in the cell wall of *Cucumis melo* infected with *Colletotrichum lagenarium*. An increase of these fragments was reported in the cell wall of infected plants in comparison to uninfected plants (Esquerré-Tugayé and Mazau, 1974). They also found a correlation between hydroxyproline accumulation in the cell wall and symptom development (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1979). In addition, application of ethylene on *C. melo* seedlings was found to lead to a rise in HRGP content and reduced susceptibility to the disease. More recently, tissue printing techniques revealed that JIM11 epitopes were induced in *Brassica campestris* petioles inoculated with *Xanthomonas campestris* (Davies *et al.*, 1997). Induction was stronger when *X. campestris* strains that present an incompatible interaction were used. This pathogen was also employed by Merkouropoulos and Shirsat (2003) on *A. thaliana* seedlings. GUS and Northern blot analyses revealed higher expression of the *ext1* gene in inoculated seedlings, specifically in the infection sites. When this same gene was overexpressed in *A. thaliana*, infection by *Pseudomonas syringae* DC3000 resulted in fewer symptoms (Wei and Shirsat, 2006). The authors pointed out that although plants overexpressing the *ext1* gene were infected, the spread of the pathogen was limited. Likewise, overexpression of an extensin-like gene in *Solanum lycopersicum* (tomato) resulted in a reduction of symptoms induced by *Clavibacter michiganensis* inoculation (Balaji and Smart, 2012).

Taken together, these studies emphasize that extensins play an important role in plant defence through strengthening the cell wall, facilitating attachment of symbiotic organisms, preventing tissue damage or limiting pathogen invasion. Nevertheless, most of these studies were conducted on aerial parts of plants whereas recent works highlight that the immune response can differ in roots (Attard *et al.*, 2010; Balmer *et al.*, 2013). In addition, the RNA-seq data from *A. thaliana* grown under normal conditions (*i.e.* without biotic or abiotic stresses)

reported by Widman *et al.* (2014) show that a significant number (2424) of genes differ in their expression between shoots and roots. Interestingly, the authors observed that among the root overexpressed genes, at least 9 of them encode extensin proteins. This could imply a specific role for extensins in roots.

Extensins in root-microbe interactions

A few studies depicted the role of extensins in root symbiotic interactions. A potential involvement of extensins was reported in the *P. sativum*–*R. leguminosarum* symbiotic interactions that occur in root nodules (Reguera *et al.*, 2010; Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014). In 2010, Reguera *et al.* used the monoclonal antibody MAC265, which recognizes chimeric AGP-Extensins (AGPEs) (VandenBosch *et al.*, 1989; Pattathil *et al.*, 2010), to perform Western blots on *Pisum sativum* nodules (Reguera *et al.*, 2010). Stronger intensity and a specific band were detected in nodule fractions infected with *Rhizobium leguminosarum* compared to fractions from non-infected nodules. Moreover, immunolabelling with the MAC265 antibody was weaker in the absence of boron, a central element for the dimerization of the RhamnoGalacturonan II (RG-II) in the cell wall (O'Neill *et al.*, 2001). The authors proposed that AGPEs could interact with RG-II thereby reinforcing the cell wall within the infection thread. Interestingly, extensins were recently hypothesized to act as a chaperone of RG-II, enabling the dimerization of the latter through boron (Chormova and Fry, 2016). This supports further the hypothesis that extensins may be used as a template for pectin assembly, essential for cell wall structure and function. Extensins in the symbiotic interaction pea–*R. leguminosarum* have been investigated by immunolabeling with the LM1 antibody, indicating the presence of epitopes associated with extensins in infected nodules (Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014). This suggests that extensins might be involved in *Rhizobium* attachment to nodules.

Other published research also gives evidence suggestive of the involvement of extensins in root-pathogen interactions. Firstly, it is important to note that the *ext1* gene described earlier as involved in plant defence response, is predominantly expressed in roots (Merkouropoulos and Shirsat, 2003). In 1993, Niebel *et al.* performed RNA gel blot analysis on *N. tabacum* infected by the root knot nematode *Meloidogyne javanica* for 1 and 2 weeks and

found that an extensin gene named *Pext8*, was strongly induced. Moreover, immunostaining with an anti-extensin antibody on root cross-sections displayed a stronger signal in the infected tissue (Niebel *et al.*, 1993). These analyses were completed by electron microscopy observations showing that extensin epitopes are mostly localized within the cell wall and the intercellular space of cells in contact or close to the pathogen (Niebel *et al.*, 1993). This suggests a possible reinforcement of the cell wall through a cross-linking of extensins in response to the pathogen in order to limit its propagation. Immunolabelling techniques carried out on banana and *Benincasa hispida* roots revealed the presence of epitopes, recognised by the mAbs JIM11 and JIM20, associated with extensins (Xie *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017). In banana roots, the JIM11 fluorescence intensity was enhanced following inoculation with *Fusarium oxysporum* (Wu *et al.*, 2017), whereas in *Benincasa hispida* roots the majority of the signal vanished after treatment with fusaric acid or infection by *Fusarium oxysporum* (Xie *et al.*, 2011). In addition, this treatment and inoculation triggered respectively a stronger signal in the phloem and appearance of signal localised to the rhizodermis (Xie *et al.*, 2011). These unexpected results were subsequently corroborated by the immunolabelling observations on *A. thaliana* and *Linum usitatissimum* (flax) roots made by Plancot *et al.* (2013). Specifically, LM1 epitopes were detected localised to flax and Arabidopsis root Border-Like Cells (BLCs) (Plancot *et al.*, 2013). BLCs are living cells derived from root caps that are released into the rhizosphere to protect roots from pathogen attacks (Hawes *et al.*, 2003; Vicré *et al.*, 2005; Driouich *et al.*, 2010). After treatment of the roots with the bacterial elicitor flagellin 22, LM1 labelling almost completely disappeared (Plancot *et al.*, 2013). The authors hypothesised that elicitation led to reorganisation of the polymers containing the LM1 epitopes such that the epitopes become inaccessible to the mAb. Such reorganisation could include extensin network insolubilization and/or interaction with other molecules within the cell wall. This is in agreement with the results obtained by Jackson *et al.* (2001) for grapevine callus and supports the idea of a role for extensins in strengthening the cell wall to limit pathogen invasion.

Extensins in root secretions

Several reports have shown that extensins are also found in the extracellular medium outside the wall. In 1989, Kawasaki detected extensins in the culture medium of *N. tabacum* suspension cells suggesting that these HRGPs might be secreted. Extensins and extensin-like molecules were also found to be a constituent of the oleogum resins secreted by *Boswellia serrata* and *B. carteri* roots (Herrmann *et al.*, 2012). Recently, immunolocalization with anti-extensin antibodies performed in our laboratory indicates the presence of extensin epitopes in root mucilage of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Zygophyllaceae), pea (*P. sativum*, Fabaceae) and soybean (*Glycine max*, Fabaceae) (Fig. 2). A protein recognized by the anti-extensin antibody JIM12 was found by Western blot analysis in the culture medium of salt-stressed *Dactylis glomerata* embryogenic cultures but not in non-stressed cultures (Zagorchev and Odjakova, 2011). The authors speculated that extensins might be secreted as a response and adaptation to the stress. Similar results were found in the case of pathogen attack simulation on *Solanum tuberosum* (Koroney *et al.*, 2016). Whereas epitopes associated with extensins were detected at the root surface and in mucilage, Western blot of exudates including the mucilage gave a much stronger signal with the LM1 antibody after treatment with an elicitor derived from *Pectobacterium atrosepticum* (Koroney *et al.*, 2016). This suggests that the root immune response includes an increased secretion of extensins into the extracellular mucilage.

Localization of extensins in root secretions, and not only within cell walls, is of particular interest, suggesting that these glycoproteins may have other functions in plant defence besides reinforcement of the cell wall to limit pathogen penetration. Future research will be required to assess the role(s) of secreted extensins in root defence. It is tempting to hypothesize that these extensins could have a structural role, enabling reinforcement of the mucilage network by interacting with other cell wall components such as pectins (complex polysaccharides consisting of the four major classes homogalacturonan, RhamnoGalacturonan-I (RG-I), RhamnoGalacturonan-II (RG-II) and xylogalacturonan) or AGPs (proteoglycans from the HRGP family). They may also play a role as a scaffolding component within the mucilage. Association between pectins and AGPs, glycoproteins of the HRGP family,

has indeed already been demonstrated (Oosterveld *et al.*, 2002; Immerzeel *et al.*, 2006; Cannesan *et al.*, 2012). Furthermore, several studies showed that extensins could also interact with pectins (MacDougall *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2008; Nuñez *et al.*, 2009; Valentin *et al.*, 2010; Reguera *et al.*, 2010; Leroux *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Neumetzler *et al.*, 2012; Chormova and Fry, 2016). This is supported by the data of immunolocalization of pectin epitopes performed on *A. thaliana* mutants, *xeg113* and *rra2*, that are affected in extensin arabinosylation (Fig. 3). Using the anti-pectin monoclonal antibody LM19, a signal was observed along the wild-type root surrounded by a thin mucilage. However, the intensity was enhanced and a very thick halo of labelled mucilage was detected in the two mutants, especially in *xeg113*. It has been demonstrated that complete arabinosylation of extensins is required for a correct conformation of these glycoproteins allowing the formation of the cross-links essential for cell wall assembly and organization (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Velasquez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). In the model proposed in Fig. 4, we hypothesize that incorrect arabinosylation of extensins in the *rra2* and *xeg113* mutants alters their conformation resulting in a modified cell wall architecture, leading to a “leak” of pectins into the mucilage. However, the possibility of higher secretions of pectins in response to the alteration of cell wall organization in the mutants cannot be excluded.

Further work will be required to establish precisely how associations occur between extensins and other cell wall components including pectins. We could also speculate that secreted extensins might play a direct role in microbe interaction, either by attracting or repelling them, as has been shown for AGPs (Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). This would take place in the Root Extracellular Trap (RET), a protective network proposed by Driouich *et al.* in 2013, by analogy with the Neutrophil Extracellular Trap (NET) occurring in mammals. The RET would thus contain extensins in addition to border cells or border-like cells and all their secretions including AGPs and extracellular DNA.

Conclusion

The contribution of extensins to plant defence is becoming well established but many challenging questions remain to be solved. These include: How extensins are incorporated within the cell wall and what are the other cell wall polymers associated with? How do they

coordinate the assembly of the cell wall? Does the diversity of extensin structure have a specific purpose in plant defence? Why extensins also occur in root mucilage, and what are their function? Do they have specific roles in roots, especially in root-microbe interactions? Clearly, further work is required to better understand the impact of extensins on the structure and function of the cell wall and mucilage in relation with root defence.

Acknowledgments

This work was supported by La Région de Haute Normandie, la Structure Fédérative de Recherche « Normandie végétal » (FED 4277), the University of Rouen Normandie and le groupe CMI-Roullier. Microscopy images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, Faculty of Sciences, University of Rouen Normandie, 76821 Mont Saint Aignan.

Table 1: Overview of the occurrence of extensins and/or extensin epitopes amongst different plant species.

Species	Tissues	Antibodies/GUS	Biochemistry	Molecular biology	References
<i>Allium cepa</i>	Roots	JIM11, JIM12, JIM20			(Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2-, 4-week-old rosette leaves, mature roots			Northern blot	(Merkouropoulos <i>et al.</i> , 1999)
	Roots, stem, leaves			Northern blot	(Yoshida <i>et al.</i> , 2001)
	Root tip, border-like cells	LM1			(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
	Roots	GUS analysis		Northern blot	(Baumberger <i>et al.</i> , 2001, 2003)
	Embryos, roots, nodes, siliques	GUS analysis, GFP construct		Northern blot	(Hall and Cannon, 2002)
	Whole plant	JIM11, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Benincasa hispida</i>	Roots	JIM11, JIM20			(Xie <i>et al.</i> , 2011)
<i>Boswellia</i> spp.	Root oleogum		Proteoglycan purification and characterization		(Herrmann <i>et al.</i> , 2012)
<i>Brachypodium distachyon</i>	Embryogenic callus	JIM11, JIM12			(Betekhtin <i>et al.</i> , 2016)
<i>Buxus sempervirens</i>	Whole plant	JIM11, JIM12, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Catharanthus roseus</i>	Leaves			qRT-PCR	(Nejat <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cuscuta reflexa</i>	Haustorium	JIM11, JIM12, JIM20			(Striberny and Krause, 2015)
<i>Daucus carota</i>	Roots	JIM11, JIM12, JIM19, JIM20			(Smallwood <i>et al.</i> , 1994; Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Equisetum ramosissimum</i>	Internodes	LM1, JIM20			(Leroux <i>et al.</i> , 2011)
<i>Glycine max</i>	Hypocotyls, roots			RNA slot blot	(Ahn <i>et al.</i> , 1996)
	Seed coats		Hydroxyproline-arabinosides detection		(Cassab <i>et al.</i> , 1985)
<i>Hordeum vulgare</i>	Roots			Sequencing, homology analyses and qRT-PCR	(Kwasniewski <i>et al.</i> , 2010)
<i>Linum usitatissimum</i>	Border-like cells	LM1			(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
<i>Musa</i> spp. AAA	Embryogenic cells	JIM11, JIM20			(Xu <i>et al.</i> , 2011)
	Roots				(Wu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Roots	11D2		RNA gel blot analysis	(Niebel <i>et al.</i> , 1993)
	Roots	GUS		Microarray	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)

	Embryos	JIM11, JIM20			(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
	Stigma, style ovary	JIM11, JIM12, JIM20			(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Panax ginseng</i>	Roots	LM1, JIM20			(Yu <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pelargonium zonale</i>	Stem	JIM11, JIM12, JIM20			(Striberny and Krause, 2015)
<i>Pinus thunbergii</i>	Stem tissue			Sequencing, homology analyses and qRT-PCR	(Hirao <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pisum sativum</i>	Nodules	LM1			(Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014)
	Roots, border cells	LM1, LM3, JIM20			(Mravec <i>et al.</i> , 2017)
	Roots	JIM11, JIM12, JIM19, JIM20			(Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Populus trichocarpa</i>				Bioinformatics approach	(Showalter <i>et al.</i> , 2016)
<i>Oryza sativa</i>	Roots, stem, leaves			Microarray analysis	(Fan <i>et al.</i> , 2017)
	Callus	JIM19, JIM20			(Desikan <i>et al.</i> , 1999)
<i>Raphanus sativus</i>	Roots	JIM11, JIM12, JIM19, JIM20			(Casero <i>et al.</i> , 1998)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Root hair			RNA blot	(Bucher <i>et al.</i> , 1997)
	Shoots, roots	JIM11			(Fragkostefanakis <i>et al.</i> , 2014)
	Whole plant	JIM11, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Solanum tuberosum</i>	Exudates from tubers			qRT-PCR	(Neubauer <i>et al.</i> , 2012)
	Root exudates	JIM11			(Koroney <i>et al.</i> , 2016)
<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Whole plant	JIM11, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Triticum aestivum</i>	Leaves	LM1			(Shetty <i>et al.</i> , 2009)
<i>Viscum album</i>	Whole plant	JIM11, JIM12, JIM20, LM3			(Feng <i>et al.</i> , 2014)
<i>Vitis vinifera</i>	Callus cells and culture media		Extraction of extensin-enriched fraction and purification		(Jackson <i>et al.</i> , 2001)
	Callus cells	JIM11, JIM12	Extensin quantification		(Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)
	Callus, epicotyls, roots	JIM11			(Pereira <i>et al.</i> , 2011)
	Internodes	LM1			(Fernandes <i>et al.</i> , 2016)

Table 2: Involvement of extensins in plant interactions.

Interaction	Host plant	Interacting organism/elicitor	Extensin involvement	References
Plant parasitism	<i>Pelargonium zonale</i>	<i>Cuscuta reflexa</i>	JIM11, JIM12 and JIM20 epitopes within the infection area	(Striberny and Krause, 2015)
Symbiosis	<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	LM1 epitopes in nodules	(Sujkowska-Rybkowska and Borucki, 2014)
			Stronger label with MAC265 in infected nodules	(Reguera <i>et al.</i> , 2010)
Pathogen (bacteria)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Overexpressed extensin gene limits the spread of the pathogen	(Wei and Shirsat, 2006)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Induction of extensin gene expression	(Merkouropoulos and Shirsat, 2003)
	<i>Brassica campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Induction of JIM11 epitopes	(Davies <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Spiroplasma citri</i>	Increase of extensin transcripts	(Nejat <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Increase of extensin transcripts	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Reduction of symptoms after overexpression of an extensin-like protein	(Balaji and Smart, 2012)
Pathogen (fungi)	<i>Benincasa hispida</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Redistribution of JIM11 and JIM20 epitopes	(Xie <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Cucumis melo</i>	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Increase of hydroxyproline tetra- and tri-arabinosides	(Esquerré-Tugayé and Mazau, 1974)
	<i>Musa</i> spp. AAA	<i>Fusarium oxysporum</i>	Redistribution of JIM11 and JIM20 epitopes	(Wu <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Increase of likely-extensin HRGP transcript	(Showalter <i>et al.</i> , 1985)
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Septoria tritici</i>	Stronger label with LM1	(Shetty <i>et al.</i> , 2009)
Pathogen (nematode)	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	Increase of extensin transcripts	(Niebel <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Pinus thunbergii</i>	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Increase of extensin transcripts	(Hirao <i>et al.</i> , 2012)
Pathogen (oomycete)	<i>Penissetum glaucum</i>	<i>Sclerospora graminicola</i>	Stronger label with MAC265 and increase of isodityrosine cross-linking	(Shailasree <i>et al.</i> , 2004; Deepak <i>et al.</i> , 2007)
Elicitor (bacteria)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flagellin 22	Redistribution of LM1 epitopes	(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Linum usitatissimum</i>	Flagellin 22	Redistribution of LM1 epitopes	(Plancot <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Solanum tuberosum</i>	Preparation from <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Induction of LM1 epitopes	(Koroney <i>et al.</i> , 2016)
Elicitor (fungi)	<i>Benincasa hispida</i>	Fusaric acid	Redistribution of JIM11 and JIM20 epitopes	(Xie <i>et al.</i> , 2011)
Elicitor (bacteria, fungi)	<i>Pennisetum glaucum</i>	UOMSAR 14, chitosan	Stronger label with MAC265	(Sujeeth <i>et al.</i> , 2010)
Elicitor (fungi, yeast, oomycete)	<i>Vitis vinifera</i>	Chitin, yeast extract, glucan from <i>Phytophthora megasperma</i> mycelial walls	Insolubilization of extensins	(Jackson <i>et al.</i> , 2001)

Fig. 1: Localization of epitopes recognized by the anti-extensin monoclonal antibodies LM1, JIM11, JIM12, JIM19 and JIM20.

A **Presence of LM1 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Leaves	<i>Triticum aestivum</i>	Shetty <i>et al.</i> , 2009
Internodes	<i>Vitis vinifera</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2016
	<i>Equisetum ramosissimum</i>	Leroux <i>et al.</i> , 2011
Root	<i>Pisum sativum</i>	Mravec <i>et al.</i> , 2017
		Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014
Border cells	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plancot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Linum usitatissimum</i>	Plancot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pisum sativum</i>	Mravec <i>et al.</i> , 2017
Root mucilage	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016
Root exudates	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016

Absence of LM1 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Callus	<i>Brachypodium distachyon</i>	Betekhtin <i>et al.</i> , 2016
Secondary xylem	<i>Acer</i> sp.	Klepsch <i>et al.</i> , 2016
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Panax ginseng</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017

Modification after treatment/stress/infection

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Leaves	<i>Triticum aestivum</i>	Infection with <i>Septoria tritici</i>	Slight increase of signal	Shetty <i>et al.</i> , 2009
Root	<i>Pisum sativum</i>	Aluminium stress	Increase of signal	Sujkowska-Rybkowska & Borucki, 2014
	<i>Panax ginseng</i>	Polygalacturonase treatment (release of DAMPs?)	Appearance of signal	Yu <i>et al.</i> , 2011
Border cells	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Flagellin 22 elicitation	Loss of signal	Plancot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Linum usitatissimum</i>	Flagellin 22 elicitation	Loss of signal	Plancot <i>et al.</i> , 2013
		Peptidoglycan elicitation	Increase of signal	Plancot <i>et al.</i> , 2013
Root exudates	<i>Solanum tuberosum</i>	Elicitation with <i>Pectobacterium atrosepticum</i> extract	Increase of signal	Koroney <i>et al.</i> , 2016

B

Presence of JIM11 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole plant	<i>Buxus sempervirens</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Viscum album</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Davies <i>et al.</i> , 1997
Shoot	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fragkostefanakis <i>et al.</i> , 2014
Epicotyl	<i>Vitis vinifera</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2011
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Root	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fragkostefanakis <i>et al.</i> , 2014
	<i>Vitis vinifera</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2011
	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Daucus carota</i>	Smallwood <i>et al.</i> , 1994, Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998	
Root exudates	<i>Solanum tuberosum</i>	Koroney <i>et al.</i> , 2016
Embryogenic cells	<i>Musa</i> spp. AAA	Xu <i>et al.</i> , 2011
Stigma, style	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Callus	<i>Brachypodium distachyon</i>	Betekhtin <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vitis vinifera</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2011, Ribeiro <i>et al.</i> , 2006

Absence of JIM11 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole Plant	<i>Ginkgo biloba</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014

Modification after treatment/stress/infection

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Infection with <i>Xanthomonas campestris</i>	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
		Abiotic stress	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
		Inoculation with <i>Escherichia coli</i>	Slight increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Infection with <i>Fusarium oxysporum</i>	Change of signal pattern	Xie <i>et al.</i> , 2011
		Fusaric acid elicitation	Change of signal pattern	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wounding	Increase of signal	Wu <i>et al.</i> , 2017
		Infection with <i>Fusarium oxysporum</i>	Increase of signal	Wu <i>et al.</i> , 2017
Callus	<i>Vitis vinifera</i>	H ₂ O ₂ treatment	Increase of signal	Ribeiro <i>et al.</i> , 2006

C

Presence of JIM12 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole plant	<i>Buxus sempervirens</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Viscum album</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Davies <i>et al.</i> , 1997
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Roots	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Velasquez <i>et al.</i> , 2011
	<i>Daucus carota</i>	Smallwood <i>et al.</i> , 1994, Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Stigma, style	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Callus	<i>Brachypodium distachyon</i>	Betekhtin <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vitis vinifera</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2006

Absence of JIM12 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole Plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Gingko biloba</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
Embryogenic cells	<i>Dactylis glomerata</i>	Zagorchev & Odjakova 2011
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008

Modification after treatment/stress/infection

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Abiotic stress	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
Embryogenic cells	<i>Dactylis glomerata</i>	Salt stress	Appearance of signal in secretions	Zagorchev & Odjakova 2011

D**Presence of JIM19 epitopes**

Organ/cell type	Plant species	Reference
Root	<i>Daucus carota</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Callus	<i>Oryza sativa</i>	Desikan <i>et al.</i> , 1999

Absence of JIM19 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008

Modification after treatment/stress/infection

No data available

E

Presence of JIM20 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole plant	<i>Buxus sempervirens</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Viscum album</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Davies <i>et al.</i> , 1997
Rosette leaf	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Draeger <i>et al.</i> , 2015
Intrernodes	<i>Equisetum ramosissimum</i>	Leroux <i>et al.</i> , 2011
Stem	<i>Pelargonium zonale</i>	Striberny & Krause 2015
	<i>Cuscuta reflexa</i>	Striberny & Krause 2015
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Panax ginseng</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pisum sativum</i>	Mravec <i>et al.</i> , 2017
	<i>Daucus carota</i>	Smallwood <i>et al.</i> , 1994, Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Raphanus sativus</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pisum sativum</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
	<i>Allium cepa</i>	Casero <i>et al.</i> , 1998
Embryogenic cells	<i>Musa</i> spp. AAA	Xu <i>et al.</i> , 2011
Stigma, style	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Ovule	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Callus	<i>Oryza sativa</i>	Desikan <i>et al.</i> , 1999

Absence of JIM20 epitopes

Organ/cell type	Plant species	Reference
Whole Plant	<i>Gingko biloba</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
Secondary xylem	<i>Acer</i> sp.	Klepsch <i>et al.</i> , 2016

Modification after treatment/stress/infection

Organ/cell type	Plant species	Treatment	Epitope response	Reference
Petioles	<i>Brassica campestris</i>	Abiotic stress	Increase of signal	Davies <i>et al.</i> , 1997
Root	<i>Benincasa hispida</i>	Infection with <i>Fusarium oxysporum</i>	Loss of signal	Xie <i>et al.</i> , 2011
		Fusaric acid elicitation	Loss of signal	Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>Panax ginseng</i>	Polygalacturonase treatment (release of DAMPs?)	Increase of signal	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Musa</i> spp. AAA	Wounding	Increase of signal	Wu <i>et al.</i> , 2017

Fig. 2: Immunolocalization of extensin epitopes in root mucilage.

Labelling was found in root mucilage using the anti-extensin monoclonal antibody JIM12 in *Glycine max* (A and B) and *Pisum sativum* (C and D), and LM1 in *Balanites aegyptiaca* (E and F). Observations were made with confocal laser scanning microscope Leica SP2 and SP5 ($\lambda_{\text{excitation}}$: 488 nm; $\lambda_{\text{emission}}$: 500 – 535 nm). A, C and E: Bright-field microscopy. B: Maximum intensity Z-projection of several focal planes taken in fluorescence. D and F: Fluorescence. Scale bars: 100 μm (A and B), 25 μm (C–F).

BC: Border cells. M: Mucilage.

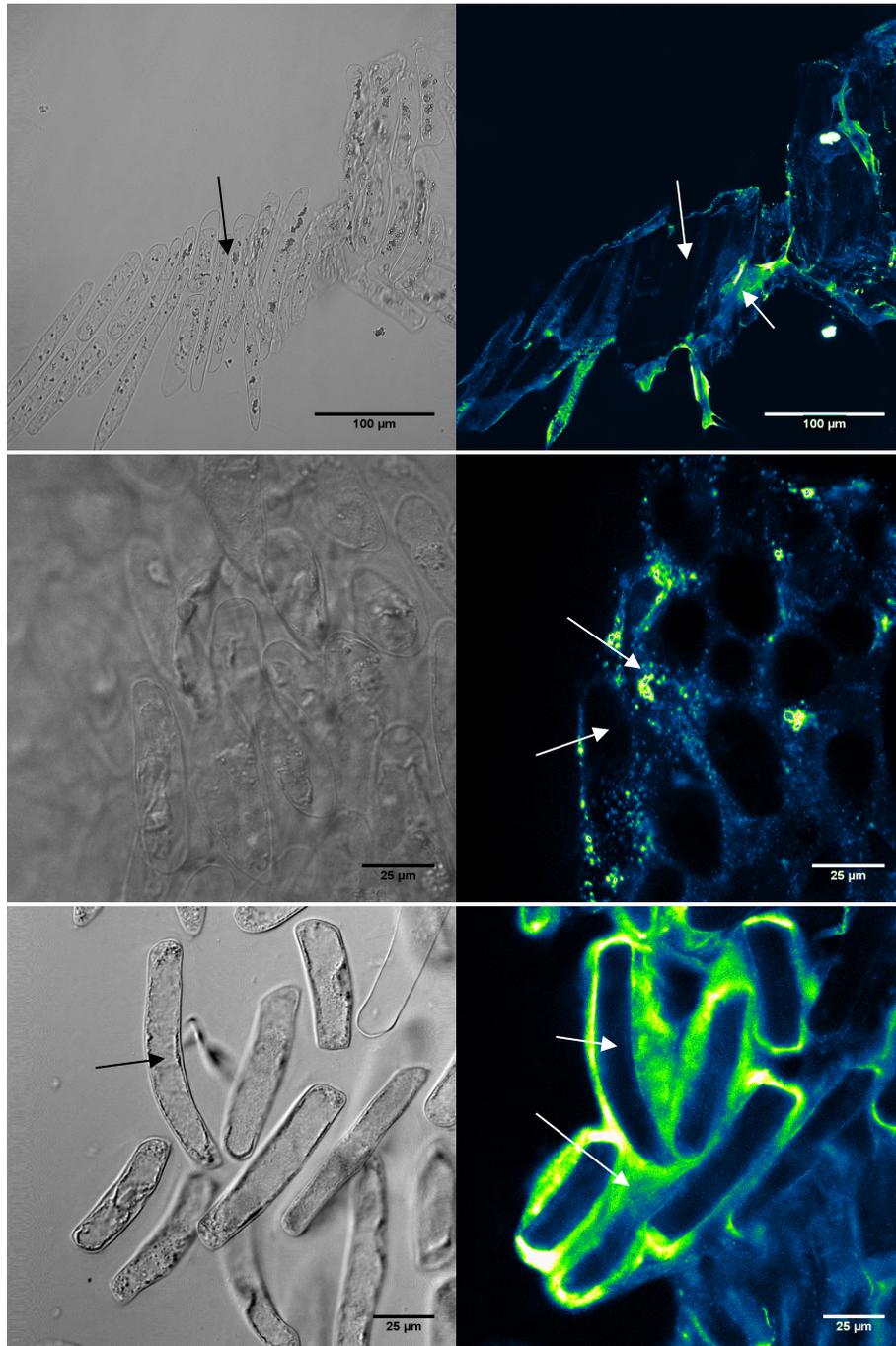


Fig. 3: Immunolocalization of pectin LM19 epitopes in root mucilage of *A. thaliana* mutants affected in extensin arabinosylation.

Fluorescence was detected with the LM19 anti-pectin monoclonal antibody along the root of the wild-type (A) and the mutants affected in extensin arabinosylation: *rra2* (B) and *xeg113* (C). The signal is more intense in both mutants, especially in *xeg113*. A halo of mucilage is labelled very slightly around the root in the wild-type whereas it is much more clearly discerned in *rra2* mutant and is strongly immunostained in *xeg113* mutant. Images are 3D-reconstructions of 1 μm section stacks and were obtained with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ($\lambda_{\text{excitation}}$: 488 nm; $\lambda_{\text{emission}}$: 507 – 550 nm). Scale bars: 100 μm .

RA: Root apex. BLC: Border-like cells. M: Mucilage

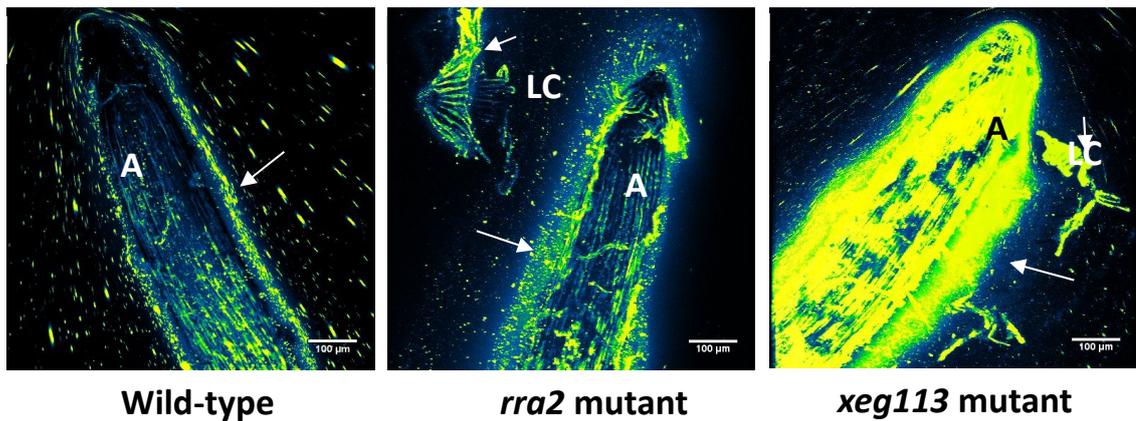


Fig. 4: Model illustrating the impact of extensin arabinosylation in cell wall organization and root secretions.

(A) Extensins and pectins are both secreted into the mucilage where they interact as in the cell wall.
 (B) Abnormal arabinosylation of extensins modifies their conformation and alters the cell wall organization, leading to higher secretions and/or a “leak” of pectins into the mucilage. However, it is unsure whether more extensins are secreted into the mucilage under these conditions.

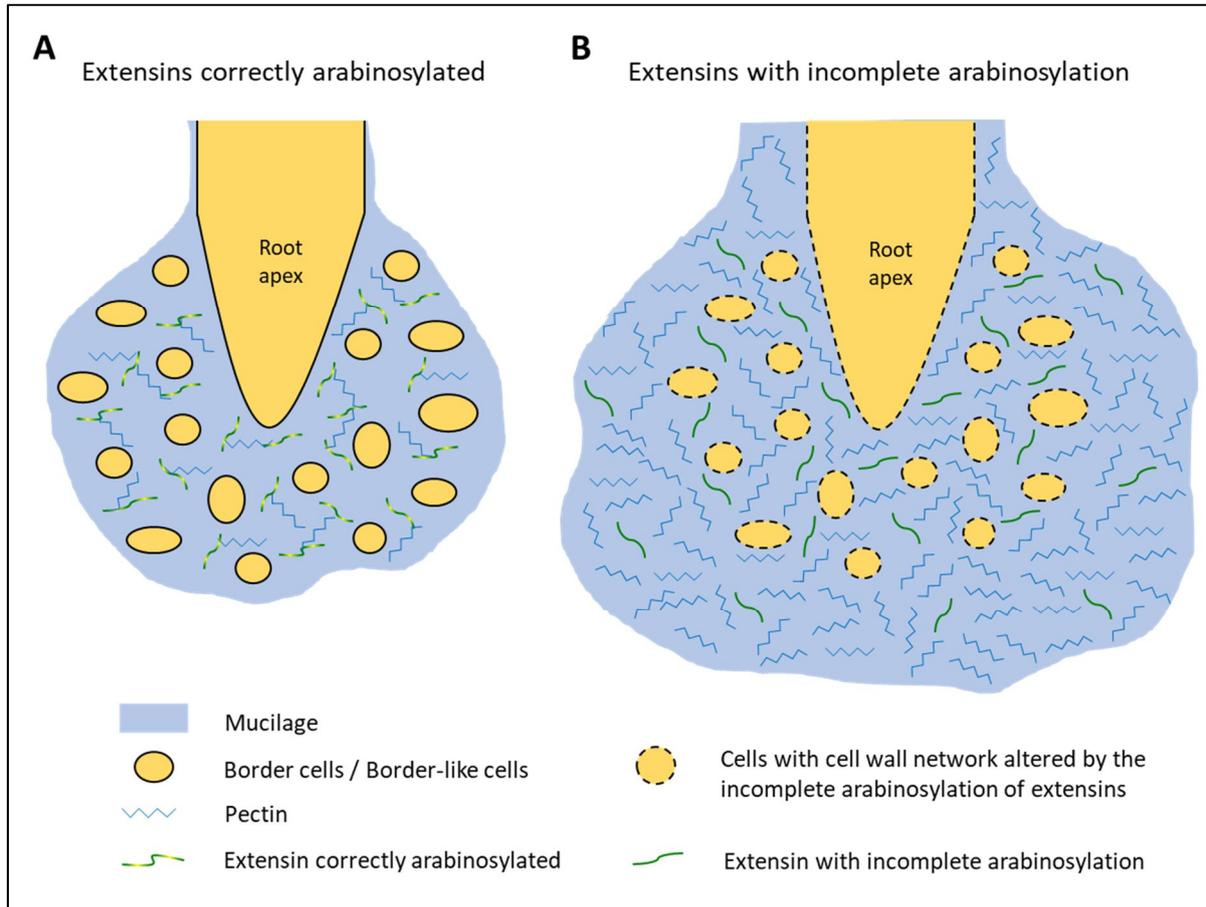
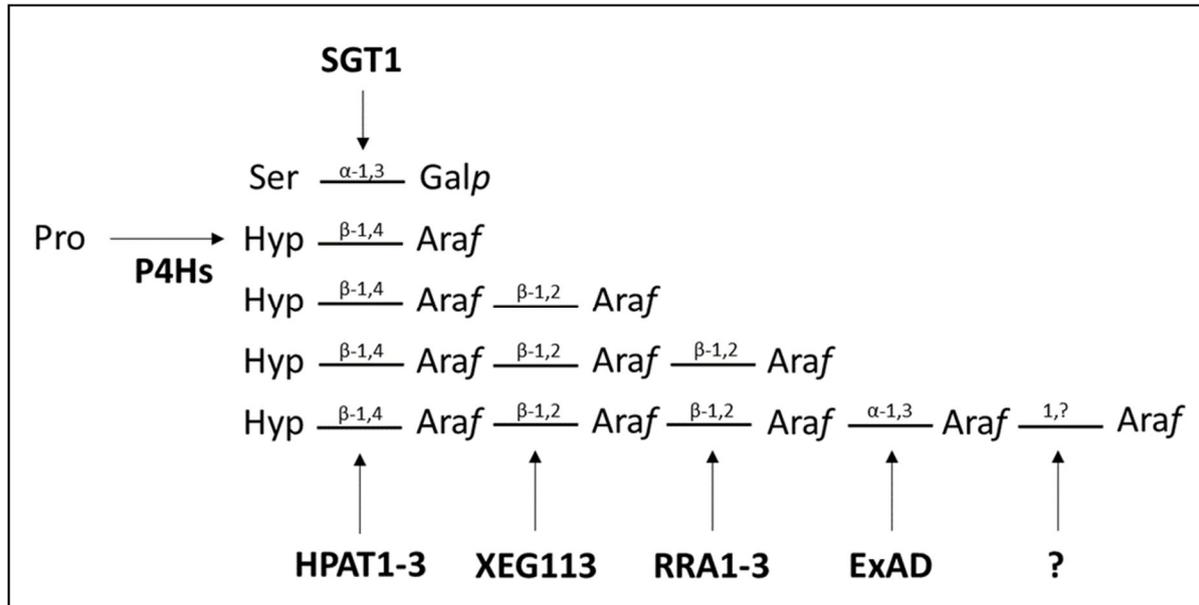


Figure S1: Extensin glycosylation.

Proline (Pro) residues are first hydroxylated into hydroxyprolines (Hyp). One galactopyranose (Galp) is then transferred on the serine (Ser) residue and several arabinofuranose (Araf) residues are transferred onto the hydroxyproline residues. The type of linkage and the enzymes involved in extensin glycosylation are indicated. P4Hs: Prolyl-4-Hydroxylases ; SGT1: Serine-GalactosylTransferase 1 ; HPAT1-3: HydroxyProline ArabinosylTransferase 1 to 3 ; XEG113: XyloEndoGlucanase 113 ; ExAD: Extensin Arabinose Deficient transferase.

This figure is adapted with permission from Velasquez *et al.*, 2012.



References

- Ahn JH, Choi Y, Kim S-G, Kwon YM, Choi YD, Lee JS.** 1998. Expression of a soybean hydroxyproline-rich glycoprotein gene is correlated with maturation of roots. *Plant physiology* **116**, 671–679.
- Ahn JH, Choi Y, Kwon YM, Kim S-G, Choi YD, Lee JS.** 1996. A novel extensin gene encoding a hydroxyproline-rich glycoprotein requires sucrose for its wound-inducible expression in transgenic plants. *The Plant Cell* **8**, 1477–1490.
- Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, Keller H.** 2010. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytologist* **187**, 449–460.
- Balaji V, Smart CD.** 2012. Over-expression of *snakin-2* and *extensin-like* protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Research* **21**, 23–37.
- Balmer D, de Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B.** 2013. Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *The Plant Journal* **74**, 213–225.
- Baumberger N, Ringli C, Keller B.** 2001. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development* **15**, 1128–1139.
- Baumberger N, Steiner M, Ryser U, Keller B, Ringli C.** 2003. Synergistic interaction of the two paralogous *Arabidopsis* genes *LRX1* and *LRX2* in cell wall formation during root hair development. *The Plant Journal* **35**, 71–81.
- Betekhtin A, Rojek M, Milewska-Hendel A, Gawecki R, Karcz J, Kurczynska E, Hasterok R.** 2016. Spatial distribution of selected chemical cell wall components in the embryogenic callus of *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* **11**, e0167426.
- Borassi C, Sede AR, Mecchia MA, Salgado Salter JD, Marzol E, Muschietti JP, Estevez JM.** 2016. An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *Journal of Experimental Botany* **67**, 477–487.
- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF, Dey PM.** 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiology* **109**, 1115–1123.
- Bucher M, Schroeer B, Willmitzer L, Riesmeier JW.** 1997. Two genes encoding extensin-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant molecular biology* **35**, 497–508.
- Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vire-Gibouin M.** 2012. Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiology* **159**, 1658–1670.
- Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lampport DT, Chen Y, Kieliszewski MJ.** 2008. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 2226–2231.

- Casero PJ, Casimiro I, Knox JP.** 1998. Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species. *Planta* **204**, 252–259.
- Cassab GI, Nieto-Sotelo J, Cooper JB, van Holst G-J, Varner JE.** 1985. A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant physiology* **77**, 532–535.
- Castilleux R, Plancot B, Gügi B, et al.** Submitted. Glycosylation of cell wall extensin is important in root defence and impacts the interaction between *Phytophthora parasitica* and *Arabidopsis thaliana*.
- Chen Y, Dong W, Tan L, Held M, Kieliszewski M.** 2015. Arabinosylation plays a crucial role in extensin cross-linking *in vitro*. *Biochemistry Insights* **8(S2)**, 1–13.
- Chormova D, Fry SC.** 2016. Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted *in vitro* by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. *New Phytologist* **209**, 241–251.
- Davies HA, Daniels MJ, Dow JM.** 1997. Induction of extracellular matrix glycoproteins in Brassica petioles by wounding and in response to *Xanthomonas campestris*. *Molecular plant-microbe interactions* **10**, 812–820.
- 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**, 323–333.
- Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, Shetty SH.** 2010. Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *Journal of Phytopathology* **158**, 585–593.
- Desikan R, Hagenbeek D, Neill SJ, Rock CD.** 1999. Flow cytometry and surface plasmon resonance analyses demonstrate that the monoclonal antibody JIM19 interacts with a rice cell surface component involved in abscisic acid signalling in protoplasts. *FEBS letters* **456**, 257–262.
- Dong W, Kieliszewski M, Held MA.** 2015. Identification of the pl 4.6 extensin peroxidase from *Lycopersicon esculentum* using proteomics and reverse-genomics. *Phytochemistry* **112**, 151–159.
- Driouich A, Durand C, Cannesan M-A, Percoco G, Vicro-Gibouin M.** 2010. Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of Experimental Botany* **61**, 3827–3831.
- Driouich A, Follet-Gueye M-L, Vicro-Gibouin M, Hawes M.** 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 489–495.
- Egelund J, Obel N, Ulvskov P, Geshi N, Pauly M, Bacic A, Petersen BL.** 2007. Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, *rra1* and *rra2*, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Molecular Biology* **64**, 439–451.
- Esquerré-Tugayé M-T, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touzé A.** 1979. Cell surfaces in plant-microorganism interactions II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiology* **64**, 320–326.

- Esquerré-Tugayé M-T, Mazau D.** 1974. Effect of a fungal disease on extensin, the plant cell wall glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* **25**, 509–513.
- Fan C, Li Y, Hu Z, et al.** 2017. Ectopic expression of a novel *OsExtensin-like* gene consistently enhances plant lodging resistance by regulating cell elongation and cell wall thickening in rice. *Plant Biotechnology Journal*.
- Feng T, Nyffenegger C, Højrup P, Vidal-Melgosa S, Yan K-P, Fangel JU, Meyer AS, Kirpekar F, Willats WG, Mikkelsen JD.** 2014. Characterization of an extensin-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* Prt1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 10077–10089.
- Fernandes JC, Goulao LF, Amâncio S.** 2016. Immunolocalization of cell wall polymers in grapevine (*Vitis vinifera*) internodes under nitrogen, phosphorus or sulfur deficiency. *Journal of Plant Research* **129**, 1151–1163.
- Fragkostefanakis S, Sedeek KEM, Raad M, Zaki MS, Kalaitzis P.** 2014. Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Molecular Biology* **85**, 459–471.
- Gille S, Hänsel U, Ziemann M, Pauly M.** 2009. Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 14699–14704.
- Hall Q, Cannon MC.** 2002. The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**, 1161–1172.
- Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G.** 2003. Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**, 352–367.
- Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E, Kieliszewski MJ.** 2004. Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 55474–55482.
- Herrmann A, König S, Lechtenberg M, Sehlbach M, Vakhrushev SY, Peter-Katalinic J, Hensel A.** 2012. Proteoglycans from *Boswellia serrata* Roxb. and *B. carteri* Birdw. and identification of a proteolytic plant basic secretory protein. *Glycobiology* **22**, 1424–1439.
- Hijazi M, Velasquez SM, Jamet E, Estevez JM, Albenne C.** 2014. An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Frontiers in Plant Science* **5**, 395.
- Hirao T, Fukatsu E, Watanabe A.** 2012. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. *BMC plant biology* **12**, 1.
- Immerzeel P, Eppink MM, de Vries SC, Schols HA, Voragen AGJ.** 2006. Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiologia Plantarum* **128**, 18–28.
- Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amancio SBQ, Ricardo CPP.** 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiology* **127**, 1065–1076.

Kawasaki S. 1989. Extensin secreted into the culture medium by tobacco cells I. Purification and some properties. *Plant and cell physiology* **30**, 259–265.

Knox JP, Peart J, Neill SJ. 1995. Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal strip assay system. *Planta* **196**, 266–270.

Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vitré-Gibouin M. 2016. Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**, 797–808.

Kwasniewski M, Janiak A, Mueller-Roeber B, Szarejko I. 2010. Global analysis of the root hair morphogenesis transcriptome reveals new candidate genes involved in root hair formation in barley. *Journal of Plant Physiology* **167**, 1076–1083.

Lampart DTA, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC. 2011. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiology* **156**, 11–19.

Leroux O, Knox JP, Masschaele B, Bagniewska-Zadworna A, Marcus SE, Claeys M, van Hoorebeke L, Viane RLL. 2011. An extensin-rich matrix lines the carinal canals in *Equisetum ramosissimum*, which may function as water-conducting channels. *Annals of Botany* **108**, 307–319.

Liu X, Wolfe R, Welch LR, Domozych DS, Popper ZA, Showalter AM. 2016. Bioinformatic identification and analysis of extensins in the Plant Kingdom. *PLoS ONE* **11**, e0150177.

MacDougall AJ, Brett GM, Morris VJ, Rigby NM, Ridout MJ, Ring SG. 2001. The effect of peptide–pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. *Carbohydrate Research* **335**, 115–126.

Merkouropoulos G, Barnett DC, Shirsat AH. 1999. The Arabidopsis extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs. *Planta* **208**, 212–219.

Merkouropoulos G, Shirsat AH. 2003. The unusual Arabidopsis extensin gene *atExt1* is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* **217**, 356–366.

Møller SR, Yi X, Velásquez SM, et al. 2017. Identification and evolution of a plant cell wall specific glycoprotein glycosyl transferase, ExAD. *Scientific Reports* **7**, 45341.

Mravec J, Guo X, Hansen AR, et al. 2017. Pea border cell maturation and release involve complex cell wall structural dynamics. *Plant Physiology* **174**, 1051–1066.

Nejat N, Vadamalai G, Dickinson M. 2012. Expression patterns of genes involved in the defense and stress response of *Spiroplasma citri* infected Madagascar periwinkle *Catharanthus roseus*. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 2301–2313.

Neubauer JD, Lulai EC, Thompson AL, Suttle JC, Bolton MD. 2012. Wounding coordinately induces cell wall protein, cell cycle and pectin methyl esterase genes involved in tuber closing layer and wound periderm development. *Journal of Plant Physiology* **169**, 586–595.

- Neumetzler L, Humphrey T, Lumba S, et al.** 2012. The *FRIABLE1* gene product affects cell adhesion in Arabidopsis. *PLoS ONE* **7**, e42914.
- Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A.** 2013. Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**, 440–449.
- Niebel A, Engler JDA, Tire C, Engler G, Van Montagu M, Gheysen G.** 1993. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *The Plant Cell* **5**, 1697–1710.
- Nuñez A, Fishman ML, Fortis LL, Cooke PH, Hotchkiss AT.** 2009. Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 10951–10958.
- Ogawa-Ohnishi M, Matsushita W, Matsubayashi Y.** 2013. Identification of three hydroxyproline O-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology* **9**, 726–730.
- 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**, 846–849.
- Oosterveld A, Voragen AG, Schols HA.** 2002. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers* **49**, 407–413.
- Pattathil S, Avci U, Baldwin D, et al.** 2010. A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiology* **153**, 514–525.
- Pereira CS, Ribeiro JM, Vatulescu AD, Findlay K, MacDougall AJ, Jackson PA.** 2011. Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H₂O₂-induced reduction in primary cell wall hydration. *BMC plant biology* **11**, 1.
- Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vitré-Gibouin M.** 2013. Deciphering the responses of root border-like cells of Arabidopsis and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology* **163**, 1584–1597.
- Price NJ, Pinheiro C, Soares CM, Ashford DA, Ricardo CP, Jackson PA.** 2003. A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from Lupin. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41389–41399.
- Rashid A.** 2016. Defense responses of plant cell wall non-catalytic proteins against pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **94**, 38–46.
- Reguera M, Abreu I, Brewin NJ, Bonilla I, Bolaños L.** 2010. Borate promotes the formation of a complex between legume AGP-extensin and Rhamnogalacturonan II and enhances production of Rhizobium capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum sativum* symbiotic root nodules: Boron mediated legume-Rhizobium cell surface interactions. *Plant, Cell & Environment* **33**, 2112–2120.
- Ribeiro JM, Pereira CS, Soares NC, Vieira AM, Feijó JA, Jackson PA.** 2006. The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2025–2035.
- Ringli C.** 2010. The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the Arabidopsis LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall. *The Plant Journal* **63**, 662–669.

- Saito F, Suyama A, Oka T, Yoko-o T, Matsuoka K, Jigami Y, Shimma Y.** 2014. identification of novel peptidyl serine α -galactosyltransferase gene family in plants. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 20405–20420.
- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport D.** 1996. Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val—Tyr—Lys as putative intermolecular cross-link site. *The Plant Journal* **9**, 477–489.
- Shailasree S, Kini KR, Deepak S, Kumudini BS, Shetty HS.** 2004. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in pearl millet seedlings in response to *Sclerospora graminicola* infection. *Plant Science* **167**, 1227–1234.
- Shetty NP, Jensen JD, Knudsen A, Finnie C, Geshi N, Blennow A, Collinge DB, Jorgensen HJL.** 2009. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4287–4300.
- Showalter AM, Bell JN, Cramer CL, Bailey JA, Varner JE, Lamb CJ.** 1985. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 6551–6555.
- Showalter AM, Keppler BD, Liu X, Lichtenberg J, Welch LR.** 2016. Bioinformatic identification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* **16**, 229.
- Smallwood M, Beven A, Donovan N, Neill SJ, Peart J, Roberts K, Knox JP.** 1994. Localization of cell wall proteins in relation to developmental anatomy of the carrot root apex. *The Plant Journal* **5**, 237–246.
- Smallwood M, Martin H, Knox JP.** 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* **196**, 510–522.
- Smith JJ, Muldoon EP, Willard JJ, Lamport DT.** 1986. Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures. *Phytochemistry* **25**, 1021–1030.
- Striberny B, Krause K.** 2015. Cell wall glycoproteins at interaction sites between parasitic giant dodder (*Cuscuta reflexa*) and its host *Pelargonium zonale*. *Plant Signaling & Behavior* **10**, e1086858.
- Sujeeth N, Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Shetty SH, Hille J.** 2010. Hydroxyproline-rich glycoproteins accumulate in pearl millet after seed treatment with elicitors of defense responses against *Sclerospora graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**, 230–237.
- Sujkowska-Rybkowska M, Borucki W.** 2014. Accumulation and localization of extensin protein in apoplast of pea root nodule under aluminum stress. *Micron* **67**, 10–19.
- Valentin R, Cerclier C, Geneix N, Aguié-Béghin V, Gaillard C, Ralet M-C, Cathala B.** 2010. Elaboration of extensin-pectin thin film model of primary plant cell wall. *Langmuir* **26**, 9891–9898.
- VandenBosch KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW, Brewin NJ.** 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *The EMBO Journal* **8**, 335–341.

- Velasquez SM, Marzol E, Borassi C, et al.** 2015. Low sugar is not always good: impact of specific O-glycan defects on tip growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **168**, 808–813.
- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, et al.** 2011. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science* **332**, 1401–1403.
- Velasquez M, Salter JS, Dorosz JG, Petersen BL, Estevez JM.** 2012. Recent advances on the posttranslational modifications of EXTs and their roles in plant cell walls. *Frontiers in plant science* **3**, 93.
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A.** 2005. Root border-like cells of Arabidopsis. microscopical characterization and role in the interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiology* **138**, 998–1008.
- Wang M, Heimovaara-Dijkstra S, Meulen RM, Knox JP, Neill SJ.** 1995. The monoclonal antibody JIM19 modulates abscisic acid action in barley aleurone protoplasts. *Planta* **196**, 271–276.
- Wei G, Shirsat AH.** 2006. Extensin over-expression in Arabidopsis limits pathogen invasiveness. *Molecular Plant Pathology* **7**, 579–592.
- Widman N, Feng S, Jacobsen SE, Pellegrini M.** 2014. Epigenetic differences between shoots and roots in Arabidopsis reveals tissue-specific regulation. *Epigenetics* **9**, 236–242.
- Wu Y, Fan W, Li X, et al.** 2017. Expression and distribution of extensins and AGPs in susceptible and resistant banana cultivars in response to wounding and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* **7**, 42400.
- Xie D, Ma L, Šamaj J, Xu C.** 2011. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae* infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Reports* **30**, 1555–1569.
- Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA.** 2012. A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 250–258.
- Xu C, Takáč T, Burbach C, Menzel D, Šamaj J.** 2011. Developmental localization and the role of hydroxyproline rich glycoproteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA). *BMC plant biology* **11**.
- Yoshida Y, Aoki C, Iuchi S, Nanjo T, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2001. Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA research* **8**, 115–122.
- Yu L, Zhou Y, Knox JP.** 2011. Ginseng root water-extracted pectic polysaccharides originate from secretory cavities. *Planta* **234**, 487–499.
- Zagorchev L, Odjakova M.** 2011. Hydroxyproline rich proteins in salt adapted embryogenic suspension cultures of *Dactylis Glomerata* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **25**, 2321–2328.
- Zhang X, Ma H, Qi H, Zhao J.** 2014. Roles of hydroxyproline-rich glycoproteins in the pollen tube and style cell growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Physiology* **171**, 1036–1045.

Zhang C, Pan S, Chen H, Cai T, Zhuang C, Deng Y, Zhuang Y, Zeng Y, Chen S, Zhuang W. 2016. Characterization of *NtREL1*, a novel root-specific gene from tobacco, and upstream promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. *Plant Cell Reports* **35**, 757–769.

Zhang X, Ren Y, Zhao J. 2008. Roles of extensins in cotyledon primordium formation and shoot apical meristem activity in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany* **59**, 4045–4058.

Annexe 2 : Étude préliminaire en mésocosme

Dans cette partie, des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec le laboratoire Morphodynamique Continentale et Côtière (M2C) UMR6143 de l'Université de Rouen sont présentés. Cette partie du travail a été menée suite à la participation de Mlle Justine Gevrey, stagiaire de L3 sous la direction de Mme Valerie Mesnage maître de conférences à l'Université de Rouen. Nous avons entrepris ici d'explorer la faisabilité d'une étude non plus *in vitro* mais en terre, contenant du sol natif de la GMV. Des analyses physicochimiques du sol ont été réalisées. L'analyse de la composition monosaccharidique par GC-FID après hydrolyse des polysaccharides libérés par les plantes après plusieurs semaines de culture dans le sol a également été envisagée. Les résultats concernant l'étude physicochimique du sol de la GMV sont issus des travaux réalisés par Mlle Justine Gevrey lors de son stage de L3.

1-Matériel et méthodes

1-1- Étude physicochimique du sol de la GMV

1-1-1 Granulométrie

L'analyse de la granulométrie (mesure de la taille des grains) permet de classer les sédiments en fonction de la taille de leurs particules. Le tamisage est la séparation de particules solides d'après leurs grosseurs, grâce à un jeu de tamis.

- 1- Peser chaque tamis ainsi que le fond récepteur sur une balance, noter le poids (M1).
- 2- Peser 100 g de sol, noter le poids (PE).
- 3- Procéder au tamisage pendant 10 minutes sous agitation mécanique.
- 4- Peser de nouveau les tamis contenant les fractions de sols (M2).
- 5- Nettoyer chaque tamis à sec.

La masse de sol retenu dans un tamis, correspondant à une taille de grains précise est calculée selon la relation suivante :

$$\% \text{ de sols retenu} = ((M2 - M1) \times 100) / PE$$

De plus, une analyse complémentaire de la granulométrie par un Microgranulomètre laser (Beckman Coulter LS 13330) a été réalisée.

1-1-2 Porosité

Entre les éléments structuraux subsistent des pores qui assurent le stockage et la circulation de l'air, de l'eau et des racines. Les pores du sol de forme et de dimension variables forment un réseau plus ou moins interconnecté qui constitue l'espace poral. La porosité

correspond au volume des vides, exprimé en pourcentage du volume total, comprenant les capacités en eau et en air. Il est la meilleure expression de la structure en donnant des indications concernant les propriétés physico-chimiques, assurant à la plante son alimentation en eau et la respiration des racines.

Par différence de volume :

- 1- Dans une éprouvette, ajouter du l'échantillon de sol et noter son volume (V_{total}).
- 2- Remplir une autre éprouvette avec un volume d'eau précis (V_{eau}).
- 3- Verser l'eau dans l'éprouvette contenant le sol jusqu'à saturation.
- 4- Lire la valeur de volume d'eau restant ($V_{restant}$).

La porosité est obtenue *via* le calcul suivant :

$$Porosité (\%) = ((V_{eau} - V_{restant}) / V_{total}) \times 100$$

1-1-3 Teneur en eau

L'eau du sol constitue un élément indispensable à la vie des plantes : elle assure le transport des substances nutritives dans le végétal et est source d'oxygène et d'hydrogène.

Par la méthode de la perte de poids après passage à l'étuve :

- 1- Le creuset est pesé, ce poids correspond au poids de la tare (P_{tare}).
- 2- Le sable frais est ajouté avec une cuillère, le poids est noté (poids du creuset et du sol humide : P_f).
- 3- Le creuset est placé dans une étuve à 105°C pendant 24 heures.
- 4- Après avoir refroidi au dessiccateur, le creuset est pesé (poids du creuset et du sol sec : P_{105}).

La teneur en eau est calculée *via* la relation suivante :

$$La\ teneur\ en\ eau\ (\%) = (P_f - P_{105} / P_f - P_{tare}) \times 100$$

1-1-4 Matière organique

La matière organique a de nombreux rôles dans le sol, elle assure le stockage et la mise à disposition pour la plante, par minéralisation, des éléments nutritifs dont elle a besoin. Elle a un rôle important dans la structuration du sol et participe à la stabilité vis-à-vis des agressions extérieures (pluie, tassement) et en limitant l'érosion hydrique. De plus, elle assure la perméabilité, l'aération du sol ainsi que la capacité de rétention en eau en outre.

La mesure de la perte au feu donne une indication sur le taux de matière organique du sol. L'échantillon de sol est brûlé : le matériel organique est détruit et dégagé sous forme de

sous forme de divers produits volatils dont CO₂, H₂O et N₂. Il ne reste que la fraction minérale du sol.

- 1- Le creuset est pesé, ce poids correspond au poids de la tare (Ptare).
- 2- Le sable préalablement séché à 105°C en étuve est ajouté avec une cuillère, le poids est noté (P105).
- 3- Le creuset contenant du sable séché à 105°C est placé dans un four à moufle à 525°C pendant 4 heures.
- 4- Laisser refroidir pendant une nuit au dessiccateur.
- 5- Peser le creuset contenant le sable calcinée (P525) sur une balance de précision.

La teneur en matière organique est obtenue à l'aide de la formule suivante :

$$\text{La teneur matière organique (\%)} = (P105 - P550 / P105 - Ptare) \times 100$$

1-1-5 Analyses des sels nutritifs : anions et cations

Les sels nutritifs présents dans le sol sont indispensables au développement d'une plante. C'est là qu'elle y puise notamment de l'azote, du phosphore, potassium, calcium, magnésium, soufre et chlore. Une étude sur la composition en anions et cations a été entreprise sur le sol nu de la GMV par chromatographie liquide au laboratoire M2C UMR6143 de l'Université de Rouen par M. David Moussa.

Une pesée de 19 g de sol nu de la GMV a été mélangée avec 37 mL d'eau ultrapure, puis une homogénéisation par vortex, suivi d'une centrifugation à 700 g pendant 10 min a été réalisé.

Le surnageant est filtré (0,2 µm) et il est injecté en chromatographie liquide.

1-2 Mise en place d'un mésocosme

La mise en place du mésocosme [Fig 45], s'est effectuée dans un premier temps par la culture *in vitro* stérile de plantule de *B. aegyptiaca*, puis, une fois que les plantules avaient une longueur racinaire comprise entre 2 et 4 cm, un repiquage stérile et une culture en semi-hydroponie (forte humidité relative) dans un sol natif de la GMV stérilisé a été réalisée pendant 2 mois dans une armoire de culture avec un cycle 16 h jour à 25°C et 8 h nuit à 20°C.

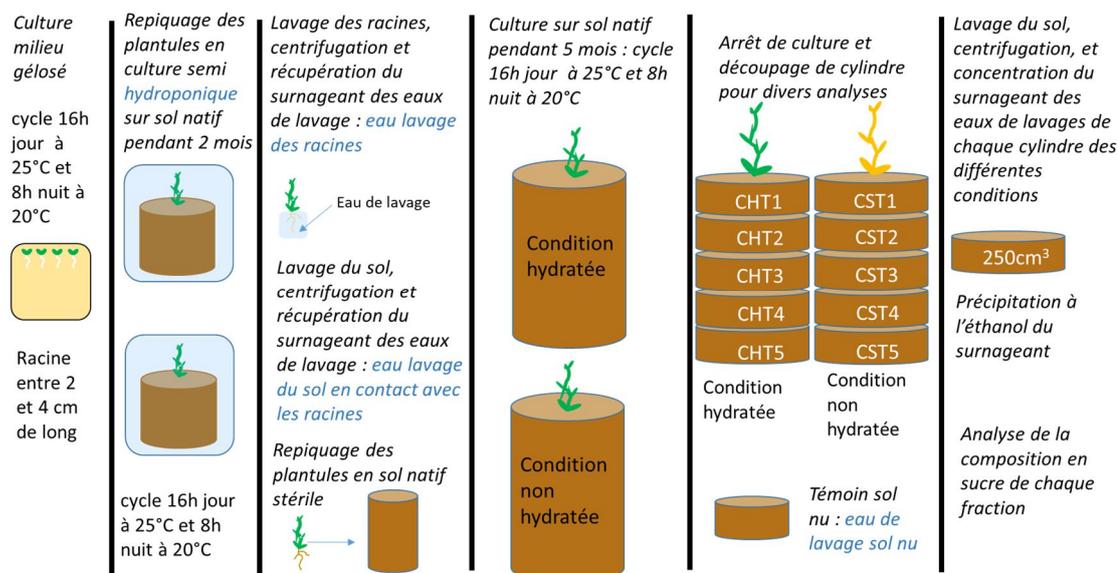


Figure 45 : Schéma de mise en place du mésocosme de *B. aegyptiaca* dans du sol natif de la GMV.

CHT1 : Condition Hydratée Tranche 1, CST1 : Condition Sèche Tranche 1.

Après 2 mois de culture les racines ont été récupérées et lavées. Les eaux de lavage des racines sont récupérées, centrifugées (700 g 10 min), et le surnageant a été lyophilisé, puis réhydraté afin de réaliser une précipitation à l'éthanol (1v eau : 5v éthanol) à -20°C sur la nuit. Puis, une centrifugation à 4000 g pendant 15 min à 4°C a été réalisée. Le culot est conservé, séché et pesé afin de réaliser un AIR des eaux de lavage des racines.

Le même procédé a été réalisé sur le sol en contact avec les racines. Trois lavages à l'eau ultrapure du sol, suivi d'une centrifugation 700 g 10min, récupération du surnageant qui a été lyophilisé, puis réhydraté afin de réaliser une précipitation à l'éthanol (1v eau : 5v éthanol) à -20°C sur la nuit. Puis, une centrifugation à 4000 g pendant 15 min à 4°C a été réalisée. Le culot est conservé, séché et pesé afin de réaliser un AIR des eaux de lavage du sol en contact avec la racine.

Les plantules ont été repiquées [Fig 46] dans 1200 cm³ de sol natif de la GMV, et mises en culture pendant 5 mois avec un cycle 16 h jour à 25°C et 8 h nuit à 20°C.



Figure 46 : Mise en culture en phytotron de *B. aegyptiaca* en sol natif.

Les 2 pots ont été arrosés avec 100 mL d'eau adoucie, puis deux conditions ont été choisies : une condition avec une hydratation hebdomadaire de 100 mL d'eau adoucie pendant 5 mois et une autre condition avec absence d'hydratation pendant 5 mois.

Après 5 mois de culture, les pots ont été découpés en 2 [Fig 47]. Le sol a été divisé en tranche cylindrique de 4 cm pour représenter chacun un volume de 250 cm³, avec comme nomenclature CHT1 : *Condition Hydratée Tranche 1*, CST1 : *Condition Sèche Tranche 1*.

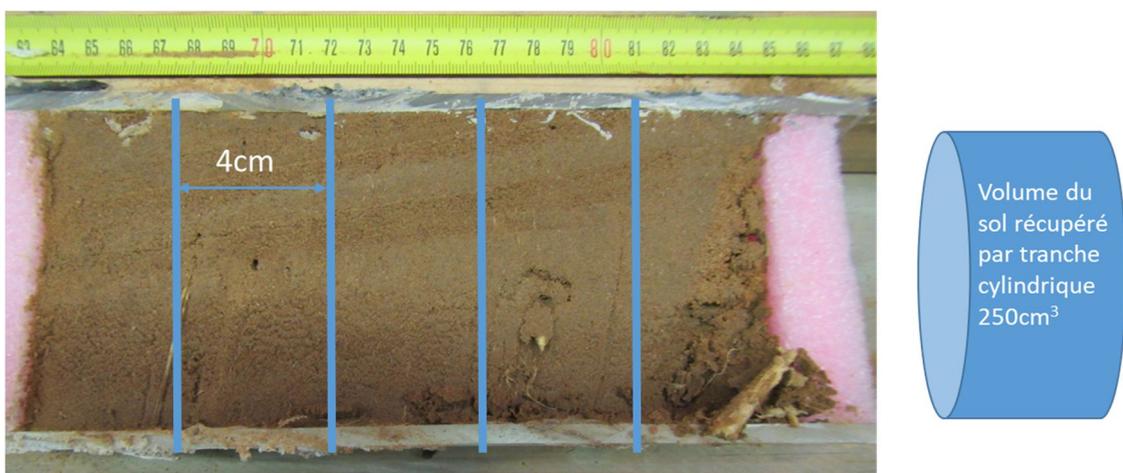


Figure 47 : Coupe du pot de culture de *B. aegyptiaca* après 5 mois.

Trois lavages à l'eau ultrapure des tranches de sol de 250 cm³ des différentes conditions et profondeurs ont été réalisés. Ces lavages sont suivis d'une centrifugation 700 g 10 min, puis une récupération du surnageant [Fig 48] qui a été lyophilisé.

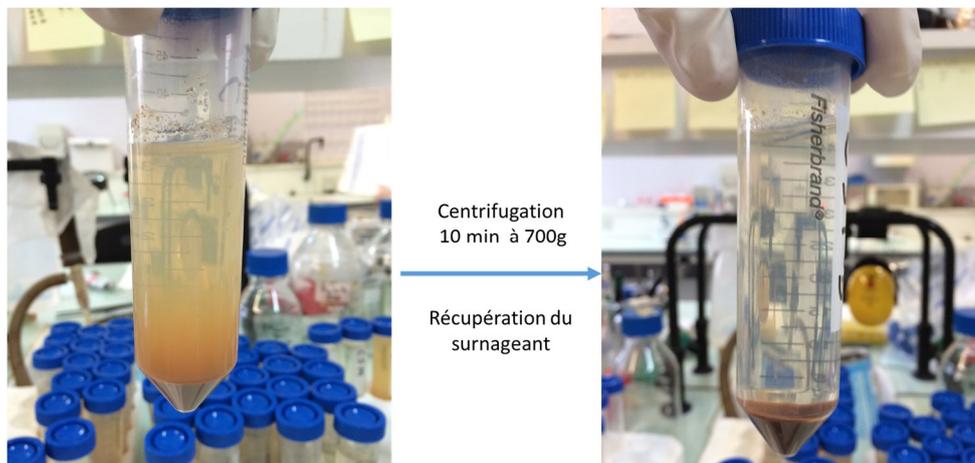


Figure 48 : Lavage du sol et récupération du surnageant.

Le surnageant est réhydraté afin d'être précipité à l'éthanol (1v eau : 5v éthanol) à -20°C sur la nuit. Puis, une centrifugation à 4000 g pendant 15 min à 4°C a été réalisée. Le culot est conservé, séché et pesé afin de réaliser un AIR des eaux de lavage du sol en contact avec la racine. Un témoin de sol nu de la GMV de 250 cm³ a été réalisé en parallèle, afin d'affranchir la part de sucre présente nativement dans le sol nu.

1-3 Étude des polysaccharides libérés dans le sol.

À partir de 5 mg d'AIR issus des différentes conditions une analyse de la composition monosaccharidique a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur ionique de flamme.

Expérience 1 : l'eau de lavage des racines, l'eau de lavage du sol en contact avec les racines, et l'eau de lavage du sol nu, sont les 3 conditions qui sont comparées après 2 mois de culture en semi-hydroponie.

Expérience 2 : l'eau de lavage de 250 cm³ de sol nu et l'eau de lavage de 250 cm³ des différentes tranches des conditions hydratées et non hydratées après 5 mois de culture.

2-Résultats et discussions

2-1 Etude physicochimique du sol de la GMV

2-1-1 Granulométrie

La granulométrie nous apprend que l'échantillon de sols est constitué à 93,61 % de sable principalement, de 5,29 % d'élément grossier et de 1,00% de limons et d'argile. La proportion la plus importante dans l'échantillon est du sable moyenne qui représente 56,19 %. La texture du sol qui nous renseignera sur certaine propriété physique comme le drainage, la capacité de rétention, l'aération et la structure.

D'après les résultats obtenus grâce au microgranulomètre, la taille moyenne des particules est de 244,7 μm , ce qui correspond est concorde avec les résultats de la granulométrie par tamisage. La répartition des particules est homogène. L'écart-type est de 207,6 μm , les particules vont de 37,1 (0,5% du volume) μm à 452,3 μm (3,5 % du volume), ce qui comprend les sables très fins à moyens. Le sol provenant de la GMV (parcelle expérimentale su Ferlo) à une texture sableuse, ce qui correspond à un sol bien aéré, facile à travailler.

2-1-1 Porosité et teneur en eau

La porosité calculée correspond plus précisément à la porosité totale, elle est en moyenne égale à 35 %, est correspond donc à la porosité du sable fin. La texture étant sableuse, les sables dominant et laisse des vides entre eux, induisant une porosité texturale importante. Ceci contribue à une bonne circulation de l'air et de l'eau dans le sol. Mais l'absence de colloïdes (argile et humus) limite la rétention d'eau. Le sol est donc filtrant et perméable. Par ailleurs, la teneur en eau du sol est de 0,1734 % en moyenne, il est donc très sec.

2-1-1 Matière organique

La teneur en matière organique ou la Perte au feu (PAF) en pourcentage du poids sec, correspond à la disparition de la matière organique provoquée par le passage au four. Elle est de 0,8342 % du poids sec en moyenne, le sol GMV est pauvre en matière organique et cela peut contribuer à limiter le développement des plantes.

2-1-1 Composition ionique du sol

La composition ionique du sol de la GMV a été réalisée en partenariat avec le laboratoire M2C de Rouen. Du sol provenant de la parcelle expérimentale au Sénégal a été analysé pour déterminer sa composition ionique [Tableau 3].

Tableau 3 : Composition ionique du sol nu de la GMV.

Composition cation, anion en mg.kg ⁻¹ de sol GMV					
Sol nu GMV	Cl ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
	700	0	180	0	700
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ²⁺
	500	100	2000	1500	600

On peut voir une faible quantité de cation et anion disponible, après un lessivage avec de l'eau distillée dans le sol, avec notamment l'absence d'ions phosphate (non détecté) lors du dosage. Le sol de la GMV semble présenter une faible proportion ionique par rapport à un sol « classique » (Web 5) ce qui pourrait expliquer entre autres les difficultés supplémentaires au manque d'eau, que les plantes au sein de la GMV rencontrent à savoir les faibles teneurs en nutriments indispensables à la croissance.

2-2 Polysaccharides libérés dans le sol

Lors de croissance et développement racinaire, les plantes libèrent *via* leurs racines et cellules frontières des molécules dans la rhizosphère. Une chromatographie par GC-FID après hydrolyse acide des polymères renseigne sur la composition en polysaccharides des eaux de lavage du sol nu ou en contact avec les plants de *B. aegyptiaca*. Ces analyses sont également réalisées sur les eaux de lavages des racines après culture sur sol natif [Fig 49].

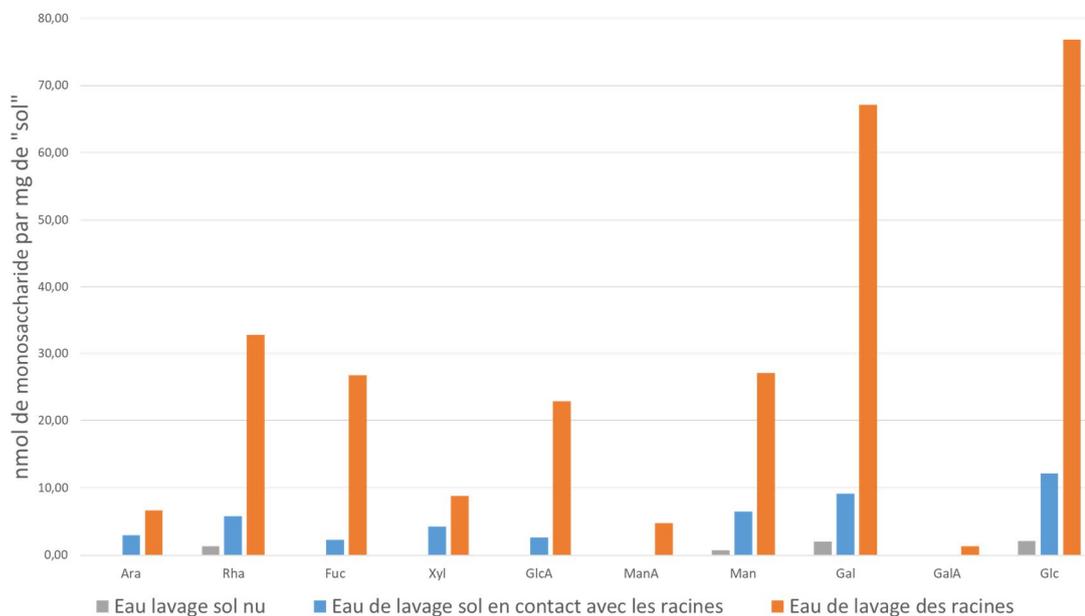


Figure 49 : Composition monosaccharidique en mol.mg⁻¹ de sol des différentes conditions d'eaux de lavage après 2 mois culture en pot.

Il est intéressant de remarquer que les eaux de lavage du sol nu de la GMV présentent que très peu de monosaccharides (rhamnose, mannose, glucose, et galactose) et en très faible quantité. Cependant les eaux de lavage du sol qui ont été en contact avec des racines de *B. aegyptiaca* pendant 2 mois, sembleraient présenter une composition monosaccharidique plus diverse en monosaccharides mais aussi plus grande quantité par rapport aux eaux de lavage du sol nu. Toutefois il est important de noter que c'est bien les eaux de lavage des racines qui semblent présenter la plus grande diversité et quantité de monosaccharides. L'origine de monosaccharides ne semble pouvoir venir que de la plante par rapport aux deux autres conditions testées en parallèle. De plus, *via* son RET riche en glycomolécules qui entoure la racine, il est possible que *B. aegyptiaca* les ait conservés pour protéger son méristème subapical de racine lors de sa croissance, jusqu'aux divers lavages que ses racines ont subi. Les glycomolécules alors entraînées se retrouvent dans les eaux de lavage et sont détectées lors de l'analyse. Il semblerait donc qu'il soit possible de détecter par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de flamme les monomères issus de polysaccharides précipités à l'éthanol après lavages du sol et des racines. Il serait intéressant d'analyser la fraction soluble à l'éthanol afin de déterminer si le glucose y est toujours le sucre majoritaire.

La seconde expérience est aussi consacrée au dosage des monomères issus de polysaccharides libérés après 5 mois de culture en pot en condition hydratée à différentes profondeurs a été entrepris qui ont été précipités à l'éthanol avant leur dérivation [Fig 50].

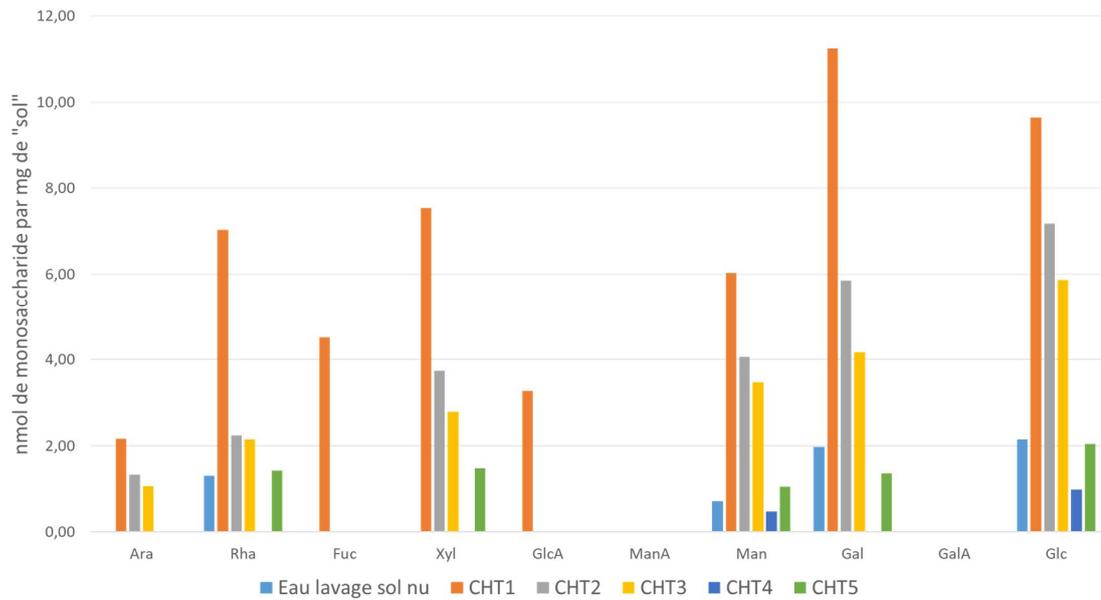


Figure 50 : Composition monosaccharidique en mol.mg⁻¹ de sol des eaux de lavage des différentes tranches en condition hydratées après 5 mois culture en pot.

Chacune des différentes tranches de sol fait 250 cm³ de volume. La composition monosaccharidique a été comparée à un sol nu de la GMV lui aussi d'un volume de 250 cm³.

La première tranche qui représente les 4 premiers cm de profondeur, semblerait contenir la plus grande diversité et quantité en monosaccharides. Tandis que plus la tranche est profonde, moins il y a de diversité et quantité en monosaccharides. Il semblerait qu'un gradient qualitatif et quantitatif se crée après 5 mois de culture en pot de sol natif GMV de *B. aegyptiaca*.

A contrario avec la condition de culture hydratée, la condition non hydratée pendant 5 mois [Fig 51] ne semble pas avoir de différence quel que soit la profondeur du sol. Toutefois, le plan expérimental ne semble pas être judicieux car, sûrement trop drastique pour la plante. Il est donc très difficile d'interpréter ces résultats qui déjà par leur nature préliminaire l'étaient fortement.

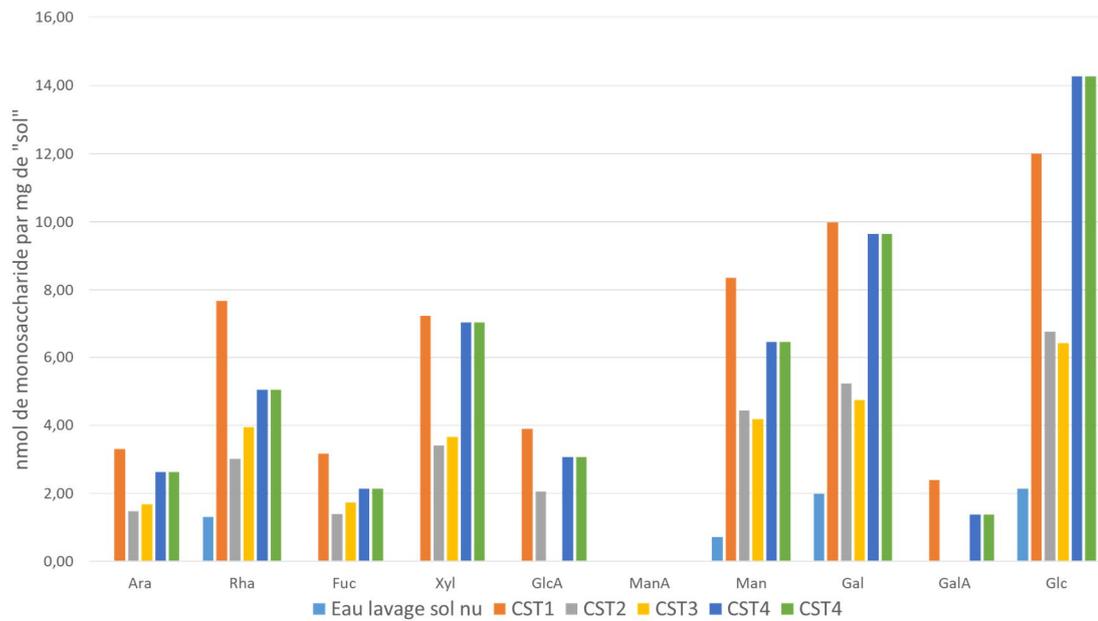


Figure 51 : Composition monosaccharidique en mol.mg⁻¹ de sol des eaux de lavage des différentes tranches en condition non hydratées après 5 mois culture en pot.

3-Conclusion et perspectives

Il est très important de rappeler encore une fois que ces résultats sont très préliminaires. Toutefois, ils ouvrent des perspectives d'études qui ne seraient plus *in vitro* mais *in situ*.

La caractérisation physicochimique du sol provenant de la GMV (Sénégal) indique une texture sableuse, bien aérée mais pauvre en eau, sels minéraux et matières organiques notamment en glucide. Or ces éléments sont indispensables à la survie et au développement des plantes. De plus, l'absence de colloïdes dans ce sol, doit limiter sa capacité à retenir l'eau lors de la saison des pluies. Il est donc probable pour une plante qui vit naturellement au sein de ce sol de s'y être adaptée. En effet, la plante doit avoir des diverses stratégies pour garder l'eau et protéger son méristème subapical de racine pour maintenir son développement.

Il serait intéressant dans un premier temps de confirmer ces résultats avec néanmoins un gradient d'hydratation apporté par différents degrés d'arrosage, afin d'éviter la mort prématurée de la plante par déshydratation. De plus, il serait intéressant de voir la possibilité de doser et caractériser des protéines et des activités enzymatiques après lavage du sol qui pourraient être impliquées dans des mécanismes de défenses contre un stress hydrique. Par ailleurs, l'ajout d'une souche bactérienne bénéfique pour la croissance des plantes dans

différents conditions de stress hydrique pourrait être testé. Une caractérisation plus fine de l'architecture racinaire devrait, elle aussi être envisagée.

Alexis CARRERAS

07.86.97.63.33

alexis.carreras@hotmail.com

1 rue Marché Lanselles 80000 Amiens

Doctorant en Biochimie et Biologie Cellulaire Végétale

Situation Actuelle

Depuis décembre 2013 (soutenance le 28 mars 2017) : **Doctorant**, laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (GlycoMEV)- UPRES EA 4358 - Université de Rouen Normandie, sous la direction du Dr. Marie-Laure FOLLET-GUEYE et du Dr. Deborah GOFFNER

Sujet : Développement de jeunes arbres en milieu aride : caractérisation du piège extracellulaire de racine d'essences ligneuses de la grande muraille verte.

Activités de recherche :

2015 : Séjour scientifique (2 semaines) Université de Lyon, Laboratoire d'Écologie microbienne UMR 5557

Sujet : Interaction entre 2 souches PGPRs (*Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescense*) et l'apex racinaire de *Balanites aegyptiaca*.

2012 : Stage M2 (6 mois) Indiana State University, Indiana, USA, Plant Physiology Laboratory.

Sujet : Étude du gravitropisme par approche physiologique et protéomique (2D-Electrophoresis) d'apex racinaires de maïs et de riz. *Dr. Timothy J MULKEY*.

2011 : Stage M1 (2 mois) Université de Reims Champagne Ardenne - Laboratoire SEBIO UMR1-02

Sujet : Étude de l'impact de *Cryptosporidium parvum* sur l'expression relative de gènes et l'activité d'enzymes digestives (α -amylase et cellulases) chez *Dreissena polymorpha*. *Dr. A. BIGOT* et *Dr. O. DEDOURGE-GEFFARD*.

2008 : Stage BTS (4 mois) Université de Reims Champagne Ardenne - Laboratoire SEBIO UMR1-02

Sujet : Mise au point d'une technique de dosage pour l'étude de l'activité catalasique hépatique sur différentes espèces de poissons. *Dr. S. PARIS-PALACIOS*.

Cursus universitaire

2012 : Master végétale : Amélioration et Production des Agro-Ressources (protection et amélioration des plantes par des biotechnologies) à l'Université de Reims Champagne Ardenne.

2010 : Licence : Mention Biologie, Biochimie, Terre et Environnement, parcours Biochimie à l'Université de Reims Champagne Ardenne.

2009 : BTS : Bioanalyses et contrôles, au lycée Hugues Libergier, Reims.

Domaines de compétences

Cultures de plantes *in vitro*

B. aegyptiaca, *A. raddiana*, *T. indica*, *Z. mays*, *O. sativa* et *A. thaliana*.

Techniques d'imagerie

Microscopie Optique et Confocale à Balayage Laser : Colorations histochimiques et immunocytochimiques des composés pariétaux / Utilisation de sondes fluorescentes.

Techniques de biologie moléculaire

Extraction et analyse d'acides nucléiques (ADN, ARN) : Dosage au Nanodrop, séparation électrophorétique sur gel d'agarose, RT-PCR, q-PCR. Analyses bioinformatiques : conception d'amorces, alignement de séquences, clonage bactérien.

Techniques de biochimie :

Extraction et analyse de glycoprotéines : Dosage des protéines, séparation par chromatographie d'affinité, d'exclusion et sur SDS-PAGE, Western blot et Slot blot.

Extraction et analyses structurales des polysaccharides : GC-FID (chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme) et GC-MS (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).

Dosage d'activité enzymatique avec ou sans inhibiteur.

Techniques de microbiologie

Culture et identification de bactéries.

Suivi de croissance et dénombrement microbiens.

Clonage microbiens (levures et bactéries)

Transgénése de plante par *A. tumefaciens*.

Informatique : Microsoft Office, analyse d'image (LAS AF Lite, ImageJ), traitement statistique (GraphPad Prism, Statistica et R).

Langues :

Français : langue maternelle.

Anglais scientifique : compréhension et expression écrite et orale.

Organisation des journées de rencontres scientifiques (la fête de la science et les journées de l'EdNBISE).

Collaboration scientifique (Université de Rouen et l'Université de Lyon).

Publications et communications

Paris-Palacios S, Delahaut L, **Carreras A**, Thomas M, Biagianti-Risbourg S. *Catalasic activity in fish liver: improvement of the UV to visible analytic method*. Fish Physiol Biochem. 2013 Aug;39(4):957-66. doi: 10.1007/s10695-012-9754-6. Epub 2012 Dec 7.

Alexis Carreras, Sophie Bernard, Gaëlle Durambur, Corinne Loutelier, Barbara Pawlak, Maite Vicré, Azeddine Driouich, Deborah Goffner and Marie-Laure Follet-Gueye. *Root tip characterization of three woody seedlings from sub-saharan region* (En préparation)

Communications orales :

Alexis Carreras, Geneviève Grundmann, Claire Pringent-Combaret, Maite Vicré, Azeddine Driouich, Deborah Goffner et Marie-Laure Follet-Gueye. *Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de Balanites aegyptiaca, essence ligneuse de la Grande Muraille Verte* à l'UMR5557 à Lyon en mars 2015

Alexis Carreras, Deborah Goffner et Marie-Laure Follet-Gueye. *Interactions biotiques au sein de la rhizosphère de Balanites aegyptiaca, essence ligneuse de la Grande Muraille Verte* au 2^{ème} séminaire annuel du Labex DRIIHM à Montpellier en juin 2014

Poster :

Alexis Carreras, Sophie Bernard, Gaëlle Durambur, Corinne Loutelier, Barbara Pawlak, Geneviève Grundmann, Claire Pringent-Combaret, Maite Vicré, Azeddine Driouich, Deborah Goffner and Marie-Laure Follet-Gueye. *Root tip characterization of three woody seedlings from sub-saharan region*. Rooting 2017: 8th International Symposium on Root Development, Umeå, Sweden.

Activités d'enseignement

Encadrement de stagiaires : 2 étudiants de L3 (1 mois), 1 étudiante de M1 (3 mois)

½ ATER en **Microbiologie** : niveau L2, TP et TD

Centres d'intérêt

Créations pâtisseries, voyages, et biostatistiques.

Référents

Dr. Marie-Laure FOLLET-GUEYE : marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

Dr. Deborah GOFFNER : deborah.goffner@gmail.com

Résumé

Caractérisation biochimique et microscopiques du piège extracellulaire de racine et des exsudats racinaires de trois essences ligneuses sahélienne : *Balanites aegyptiaca* D., *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* S. and *Tamarundus indica* L.

La coiffe racinaire est cruciale à la croissance et survie du méristème subapical de racine. Elle libère des cellules frontières (CFs) qui assurent la protection de l'apex racinaire. Les CFs associées à leur mucilage forment le piège extracellulaire de racine (RET). La caractérisation du RET et des exsudats racinaires de trois essences ligneuses sahéliennes à partir de plantules cultivées *in vitro* a été réalisée. *B. aegyptiaca* et *A. raddiana* prospèrent dans les zones semi-arides, à l'opposé de *T. indica*. La morphologie des CFs et l'organisation du RET ont été déterminées par microscopie. La composition en glycopolymères et la détection des arabinogalactanes protéines (AGPs) dans le RET et les exsudats racinaires ont été déterminées par des analyses biochimiques. L'effet des exsudats racinaires sur la croissance d'*Azospirillum brasilense*, une bactérie bénéfique pour la plante a été évalué. *B. aegyptiaca* produit des CFs de type border cells (BCs) alors que les autres *Fabaceae* produisent des BCs et des border-like cells. Les BCs sont entourées d'un dense mucilage riche en polymères de paroi. Le RET et les exsudats racinaires issus de *B. aegyptiaca* et *A. raddiana* sont plus riches en AGPs que ceux provenant *T. indica*. Les AGPs pourraient contribuer à la survie des plantules dans un contexte semi-aride. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives de recherche concernant l'implication du RET dans la survie des plantes à l'aridité.

Mots clés : arabinogalactanes protéines (AGPs), *Balanites aegyptiaca*, *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, *Tamarindus indica*, *Azospirillum brasilense*, piège extracellulaire de racine (RET), exsudats racinaires, cellules frontières (CFs), ligneux.

Biochemical and microscopic characterization of the root extracellular root trap and root exudates of three Sahelian woody seedlings: *Balanites aegyptiaca* D., *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* S. and *Tamarundus indica* L.

The root cap is primordial for seedling growth and supports root apical meristem integrity. The root cap releases root border cells (RBCs) that surround the root tip and ensure seedling protection against numerous stresses. RBCs and their associated mucilage form the root extracellular trap (RET). Here, RET and root exudate characterization of three Sahelian woody seedlings are performed. In contrast to *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* which thrive in semi-arid areas, *T. indica* is more sensitive to drought. *B. aegyptiaca*, *A. raddiana* and *T. indica* seedlings were sub-cultured *in vitro*. RBC morphologies and RET organization were determined using microscopic approaches. The polysaccharide composition and arabinogalactan protein (AGP) content were determined by biochemical approaches in the RET and the root exudates. Moreover, the effect of root exudates on the growth of *Azospirillum brasilense* a plant beneficial bacteria has been performed. While *B. aegyptiaca* produces only border cell (BC) type, the two *Fabaceae* seedlings release both BCs and border-like cells (BLCs). BCs are enclosed in a dense mucilage enriched in cell wall polymers. Compared to *T. indica*, RET and root exudates of *B. aegyptiaca* and *A. raddiana* include more abundant AGPs. In this context, AGPs could contribute to woody seedling survival. This work opens new research perspectives regarding involvement of RET in plant survival to aridity.

Key words: arabinogalactan proteins (AGPs), *Balanites aegyptiaca*, *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, *Tamarindus indica*, *Azospirillum brasilense*, root extracellular trap (RET), root exudates, root border cells (RBCs), woody plants.