



**HAL**  
open science

**Influence de l'aluminium et des sols acides sur la  
croissance du sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*,  
Mirb.) : rôle de la paroi dans les réponses au stress  
aluminique**

Holm Amara

► **To cite this version:**

Holm Amara. Influence de l'aluminium et des sols acides sur la croissance du sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*, Mirb.) : rôle de la paroi dans les réponses au stress aluminique. Biologie végétale. Université de Limoges, 2020. Français. NNT : 2020LIMO0054 . tel-03298896

**HAL Id: tel-03298896**

**<https://theses.hal.science/tel-03298896v1>**

Submitted on 25 Jul 2021

**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.

**Université de Limoges**  
**ED 614 - Chimie , Environnement, Géosciences, Agrosciences**  
**(CEGA)**  
**Laboratoire PEIRENE EA 7500**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Sciences du végétal

Présentée par  
**Holm AMARA**

Soutenue le **24 juillet 2020**

**Influence de l'Aluminium et des sols acides sur la croissance du  
sapin de Douglas**  
**Rôle de la paroi cellulaire dans la réponse au stress aluminique**

Thèse dirigée par **Mme. Céline Faugeron-Girard**, MC-HDR, Université de Limoges  
**M. Vincent Gloaguen**, Professeur, Université de Limoges

JURY :

Président de jury

**M. Gilles Guibaud**, Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs

**M. Stanley Lutts**, Professeur, Université Catholique de Louvain-la-Neuve (B)

**M. Jean-Claude Mollet**, Professeur, Université de Normandie

Examineurs

**Mme. Marie-Anne Lelu-Walter**, Directrice de Recherches INRAE, INRAE-ONF Orléans

**Mme. Céline Faugeron-Girard**, MC-HDR, Université de Limoges

**M. Vincent Gloaguen**, Professeur, Université de Limoges



# *Dédicace*

*À la mémoire de mon père, Mustapha...*

*À ma mère, Sabah...*

*Que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et le fruit de vos  
innombrables sacrifices...*

*Bien que je ne vous en acquitterai jamais assez...*



*Beaucoup d'hommes ayant échoué ne savent pas à quel point ils étaient proches du succès  
quand ils ont abandonné.*  
**Thomas Edison**



## Remerciements

---

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Tout d'abord, je tiens à adresser mes remerciements à Mr Stanley Lutts, Professeur de l'Université de Louvain la Neuve, à Mr Jean Claude Mollet, Professeur à l'Université de Rouen, à Mr Gilles Guibaud, Professeur à l'Université de Limoges ainsi qu'à Mme Marie-Anne Lelu-Walter, Directrice de recherche INRAE, INRAE-ONF Orléans qui me font l'honneur d'examiner et de juger ce mémoire.

Je tiens également à remercier Professeur Vincent Sol, Directeur du laboratoire PEIRENE, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

J'adresse mes chaleureux remerciements à ma Directrice de Thèse, Mme Céline Faugeron Girard, pour son investissement total, pour savoir toujours trouver le temps de m'accompagner dans ce travail, pour sa patience et sa disponibilité. Tout au long de ce projet, vous m'avez apporté vos compétences scientifiques, votre aide et vos critiques constructives qui m'ont aidée précieusement à me construire.

Un grand merci au Professeur Vincent Gloaguen, co-Directeur de cette Thèse, pour ses relectures enrichissantes, ses suggestions toujours avisées, et surtout pour sa bonne humeur, son grand optimisme sans faille, et pour savoir trouver les bons mots dans les moments difficiles.

Je remercie encore Marie-Anne Lelu-Walter, pour son implication tout au long de ces travaux. Merci de m'avoir apporté de vos connaissances, et de m'avoir préparé et fourni en continu les lots d'embryons somatiques sans lesquels la première partie des résultats n'aurait jamais existé.

Mes remerciements s'adressent également au personnel de la pépinière de Peyrat-le-Château, particulièrement Sébastien Guerinet et Clément Morlon qui m'ont permis d'avoir accès aux échantillons de sols et aux jeunes arbres de Douglas, et m'ont aidé à mettre au point les procédés de stratifications et de germination des graines de Douglas ! La deuxième partie des résultats est à vous !

Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire PEIRENE avec qui j'ai passé toutes ces trois années de doctorat, particulièrement Guy Costa, Gaëlle Saladín, Florian Gautier, Veronica Ambrosini (et ses vernis à ongles), Marc-Arthur Ndong Ntoutoume (i Visca el Barça !), Rromir Koçi et Jérémy Godard!

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'a témoigné Patrice Fondanèche, avec le nombre interminable d'échantillons à minéraliser et à passer à la MP-AES ! « Patrice, je suis désolée mais... je pense qu'on n'a pas encore fini les séries de dosage... ».

Merci à Christelle Gady pour m'avoir aidée dans mes premières stratifications de graines et les longues journées à tamiser les kilos de sols, et à Dorothée Moine pour m'avoir accompagnée dans mes premiers essais de préparation de pastilles IR ! Merci à Lisa Fortune pour son aide dans tout ce qui programmation R ! Merci à Odile Duval pour sa gentillesse et son sourire !

Je souhaite notamment remercier Yann Launay pour les longues heures passées à optimiser les observations en microscopie électronique. Je remercie également Fabienne Baraige pour m'avoir appris que « le cryomicrotome, quand il ne veut pas couper, il ne va tout simplement pas le faire ! Il faut



revenir le lendemain en espérant qu'il est de meilleure humeur pour m'accueillir ». Merci aussi à Claire Carrion pour le temps consacré à m'initier à la microscopie confocale.

Je remercie en particulier Mohamad Issaoui (ou Mohammad Issawi ? Tu dois décider ! Bref...) pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. « C'était un pur plaisir de partager le bureau avec toi ! Merci de supporter mes râleries ! Tu es magnifiquement magnifique Momo, je ne t'en remercierai jamais assez (sauf que tu dois arrêter avec ton Real Madrid là...) ! Vivement AgroDynaLux ! A suivre... »

Une pensée toute particulière pour « ma famille » libanaise, avec qui, j'ai partagé ma nouvelle vie à Limoges, j'ai fêté mes anniversaires, j'ai rigolé, j'ai perfectionné mon accent libanais ! « Vous m'avez vraiment fait senti comme si j'étais chez moi, entourée de ma famille ! Je vous aime ! »

Au terme de ce parcours, je suis surtout redevable à ma mère, qui n'a jamais arrêté de me demander « quand est-ce que tu la soutiens cette Thèse ? ». Cette question bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final. « Maman, ta présence et tes encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. »

Ma reconnaissance va aussi à tous ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif tout au long de ces années de Thèse : ma famille, ma belle-famille et mes amis, que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever ce travail. « Je vous aime ! Merci ! »

*Bubalus bubalis* ! MERCI ! »

Je remercie la Région Nouvelle Aquitaine pour le financement de mes 3 premières années de Thèse. Et encore, Céline et Vincent pour leur soutien matériel et moral surtout au cours de ma 4<sup>ème</sup> année, et pour me permettre de continuer à travailler dans de bonnes conditions jusqu'à la soutenance.

Merci au confinement, qui m'a permis de rédiger une bonne partie de mon mémoire de Thèse tranquillement, chez moi !

Enfin, mes remerciements ne vont surtout pas à Mark Zuckerberg, qui n'a pas hésité une seconde à me faire perdre beaucoup de temps (Comme si Facebook ne suffisait pas, il a racheté Instagram et Whatsapp...).

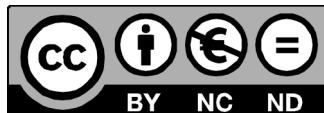
## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





## Table des matières

---

Introduction .....	22
Chapitre I. Synthèse bibliographique .....	24
I.1. Présentation du modèle biologique : Le sapin de Douglas .....	24
I.1.1. Taxonomie, origine géographique, diffusion en Europe .....	24
I.1.2. Caractéristiques phénotypiques.....	25
I.1.3. Caractéristiques génétiques .....	26
I.1.4. La ressource et la production de bois de Douglas.....	27
I.1.4.1. En France.....	27
I.1.4.2. En limousin.....	28
I.1.5. Caractéristiques d'intérêt et usages du bois de Douglas.....	29
I.1.6. Les techniques de multiplication végétative chez le sapin de Douglas .....	30
I.1.6.1. Le bouturage horticole.....	30
I.1.6.2. Le greffage horticole.....	30
I.1.6.3. L'embryogenèse somatique du sapin de Douglas .....	31
I.1.6.4. Avantages et limites de l'embryogenèse somatique .....	32
I.2. Le stress aluminique.....	32
I.2.1. L'acidité des sols.....	32
I.2.2. Effet de la végétation sur le pH du sol .....	34
I.2.3. Propriétés physicochimiques de l'aluminium .....	35
I.2.4. Origines de l'Al dans l'environnement.....	36
I.2.4.1. Origine naturelle .....	36
I.2.4.2. Origine anthropique.....	36
I.2.5. Formes toxiques de l'Al dans les sols.....	36
I.2.6. Symptômes de la toxicité de l'Al chez les plantes .....	37
I.2.6.1. Effet sur les mécanismes physiologiques de la plante.....	38
I.2.6.1.1. Inhibition de la croissance racinaire.....	38
I.2.6.1.2. Effets sur la morphologie de la partie aérienne .....	40
I.2.6.1.3. Perturbation de la machinerie photosynthétique .....	40
I.2.6.1.4. Inhibition de l'absorption en eau et en minéraux .....	41
I.2.6.2. Effet à l'échelle moléculaire et cellulaire .....	41
I.2.6.2.1. Induction d'un stress oxydatif .....	41
I.2.6.2.2. Modification du cytosquelette .....	43
I.2.6.2.3. Modification des propriétés de la paroi cellulaire.....	43
I.2.6.2.4. Inhibition de la division cellulaire .....	44
I.3. Formes de résistance / tolérance des plantes vis-à-vis du stress aluminique.....	44
I.3.1. Mécanismes d'exclusion .....	45
I.3.1.1. Excrétion des acides organiques .....	45
I.3.1.2. Modification du pH de la rhizosphère .....	49
I.3.1.3. La paroi cellulaire : site de fixation de l'Al <sup>3+</sup> .....	49
I.3.1.4. Constituants et structure de la paroi cellulaire .....	50
I.3.1.4.1. Les constituants de la paroi cellulaire.....	51
I.3.1.4.1.1. La cellulose .....	52
I.3.1.4.1.2. Les hémicelluloses.....	52
I.3.1.4.1.3. Les pectines .....	55
I.3.1.4.1.4. La lignine.....	59

I.3.1.4.1.5. Les extractibles .....	60
I.3.1.4.1.6. Les protéines pariétales .....	60
I.3.1.4.2. Les polysaccharides caractéristiques de la paroi cellulaire chez le sapin de Douglas.....	62
I.3.1.4.3. Modification des sites de fixation de l'Al <sup>3+</sup> au niveau de la paroi des cellules racinaires .....	63
I.3.2. Mécanismes de détoxification intracellulaire.....	64
I.3.2.1. Chélation de l'Al <sup>3+</sup> dans le cytoplasme .....	64
I.3.2.2. Séquestration et compartimentation de l'Al <sup>3+</sup> au niveau des organites cytoplasmiques.....	66
I.3.2.3. Activation des voies métaboliques impliquées dans la tolérance au stress aluminique .....	67
I.3.2.3.1. Régulation des voies de biosynthèse des enzymes anti-oxydantes.....	67
I.3.2.3.2. Régulation de l'expression des gènes codant pour des transporteurs membranaires .....	68
I.3.2.3.3. Régulation de l'expression des gènes codant pour la sécrétion des acides organiques .....	69
I.3.2.3.4. Action sur la régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines pariétales .....	69
I.4. Objectifs du travail et modèles d'études.....	70
Chapitre II. Matériels et méthodes .....	71
II.1. Matériel végétal .....	71
II.1.1. Modèle des plantules issues de l'embryogenèse somatique du sapin de Douglas .....	71
II.1.1.1. Origine des embryons somatiques de sapin de Douglas .....	71
II.1.1.2. La germination des ES de sapin de Douglas <i>in vitro</i> .....	71
II.1.2. Culture des sapins de Douglas sous serre .....	73
II.1.2.1. Choix des substrats de culture .....	73
II.1.2.2. Obtention de plantules à partir de germination des graines de Douglas sous serre .....	75
II.1.2.3. Culture de jeunes arbres de Douglas de 3 ans .....	75
II.1.2.3.1. Origine des jeunes arbres.....	75
II.1.2.3.2. Conditions de culture des arbres de Douglas de 3 ans sous serre .....	75
II.2. Caractérisation des substrats de culture .....	76
II.2.1. Mesure de l'acidité des substrats de culture.....	76
II.2.2. Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC).....	76
II.2.3. Détermination de la teneur en azote total des sols.....	77
II.3. Détermination de la teneur en éléments minéraux.....	77
II.3.1. Préparation des échantillons.....	77
II.3.1.1. Préparation et minéralisation du matériel végétal .....	77
II.3.1.2. Préparation et minéralisation des fractions polysaccharidiques de la paroi cellulaire .....	78
II.3.1.3. Préparation en vue de l'analyse des sols ou substrats de culture .....	78
II.3.1.3.1. Obtention des différentes fractions du sol et de substrats de culture .....	78
II.3.1.3.2. Minéralisation des extraits de sols et de substrats de culture .....	79
II.3.2. Dosage de l'Al et des minéraux par spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES).....	79

II.4. Méthodes d'extraction et d'analyses des constituants pariétaux.....	79
II.4.1. Extraction séquentielle des constituants pariétaux.....	79
II.4.1.1. Extraction des matières extractibles par l'éthanol à 80%.....	80
II.4.1.2. Elimination de l'amidon .....	80
II.4.1.3. Extraction des pectines .....	81
II.4.1.4. Elimination de la lignine.....	81
II.4.1.5. Extraction des hémicelluloses .....	81
II.4.1.6. Obtention du résidu cellulosique .....	81
II.4.2. Analyse quantitative des composés glucidiques dans les différentes fractions extraites de la paroi cellulaire .....	82
II.4.2.1. Dosage des oses neutres au phénol sulfurique (Dubois <i>et al.</i> , 1956).....	82
II.4.2.2. Dosage des acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).....	82
II.4.2.3. Méthode de correction pour quantifier les oses neutres (ON) et les acides uroniques (AU) .....	82
II.4.3. Détermination de la composition monosaccharidique des fractions extraites de la paroi cellulaire par chromatographie en phase gazeuse .....	83
II.4.3.1. Méthanolyse .....	83
II.4.3.2. Délipidation.....	84
II.4.3.3. Triméthylsilylation.....	84
II.4.3.4. Identification et quantification par CPG des méthylglycosides triméthylsilylés .....	84
II.4.4. Analyse biochimique des constituants de la paroi cellulaire .....	85
II.4.4.1. Extraction des protéines.....	85
II.4.4.1.1. Extraction préalable des protéines intracellulaires .....	85
II.4.4.1.2. Extraction des protéines pariétales.....	85
II.4.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	86
II.4.4.3. Dosage de l'activité Pectine Méthylestérase (PME).....	86
II.4.4.3.1. Réaction enzymatique .....	86
II.4.4.3.2. Dosage du méthanol.....	87
II.4.4.4. Évaluation du degré de méthylestérification des pectines par infrarouge .....	87
II.5. Dosage de molécules intracellulaires impliquées dans la réponse au stress aluminique .....	88
II.5.1. Extraction des composés intracellulaires.....	88
II.5.2. Détermination de la teneur en proline.....	88
II.5.3. Détermination de la teneur en thiols non protéiques .....	89
II.5.4. Dosage des pigments de type chlorophylles et caroténoïdes.....	89
II.5.5. Dosage de l'activité gaïacol peroxydase (GPox) .....	90
II.6. Analyses des tissus végétaux par microscopie .....	90
II.6.1. Localisation de l'Al dans les tissus végétaux par microscopie confocale .....	90
II.6.1.1. Analyse après marquage au Calcofluor White .....	90
II.6.1.2. Analyse après marquage au Morin .....	91
II.6.1.3. Conservation des coupes pour la microscopie confocale .....	91
II.6.2. Microscopie électronique à balayage en mode environnemental .....	91
Chapitre III. Résultats.....	92
III.1. Modèle d'étude <i>in vitro</i> .....	92
III.1.1. Effet de l'Aluminium sur l'élongation racinaire et la croissance de la partie aérienne des plantules cultivées <i>in vitro</i> .....	92

III.1.1.1. Mesures biométriques et effet sur la masse sèche des plantules .....	92
III.1.1.2. Aspect de la pointe racinaire .....	99
III.1.2. Distribution de l'aluminium dans les plantules de sapin de Douglas .....	100
III.1.2.1. Distribution de l'Al dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas .....	100
III.1.2.2. Localisation tissulaire de l'Aluminium .....	101
III.1.3. Effet de l'Aluminium sur la nutrition minérale .....	104
III.1.4. Etude de la réponse pariétale au stress aluminique .....	105
III.1.4.1. Analyse de la fraction polysaccharidique de la paroi cellulaire .....	106
III.1.4.1.1. Quantification des polysaccharides pariétaux extraits des plantules de sapin de Douglas .....	106
III.1.4.1.2. Analyse qualitative des fractions extraites de paroi .....	109
III.1.4.1.2.1. Détermination de la composition monosaccharidique .....	109
III.1.4.1.2.2. Détermination du degré de méthylestérification des fractions pectiques .....	114
III.1.4.1.2.3. Evaluation de la rétention de l'Aluminium par les différentes fractions de la paroi cellulaire .....	116
III.1.4.2. Evaluation de l'effet du stress aluminique sur l'activité Pectine Méthyl Estérase des plantules de sapin de Douglas .....	118
III.1.5. Etude des réponses intracellulaires au stress aluminique .....	121
III.1.5.1. Evaluation de l'effet du stress aluminique sur l'activité Gaïacol peroxydase (GPox) chez les plantules de sapin de Douglas .....	121
III.1.5.2. Evaluation de l'effet de l'exposition à l'Al sur les teneurs en proline des plantules de sapin de Douglas .....	121
III.1.5.3. Evaluation de l'effet de l'exposition à l'Al sur les teneurs en thiols non protéiques des plantules de sapin de Douglas .....	122
III.1.5.4. Evaluation de l'effet de l'exposition à l'Al sur les teneurs en pigments photosynthétiques chez les plantules de sapin de Douglas .....	123
III.1.6. Bilan .....	124
III.2. Réponses de sapin de Douglas en conditions de culture sur sols forestiers naturellement riches en Al biodisponible .....	126
III.2.1. Caractérisation des propriétés physicochimiques des sols forestiers et évolution suite à la culture de sapin de Douglas .....	127
III.2.1.1. Composition minérale .....	127
III.2.1.2. Mesure du pH de la solution du sol .....	129
III.2.1.3. Caractéristiques supplémentaires .....	130
III.2.1.4. Evolution des caractéristiques des sols après cultures de sapin de Douglas .....	131
III.2.2. Effet de l'Aluminium sur les jeunes plantules et les jeunes arbres de Douglas cultivés sur sols forestiers .....	132
III.2.2.1. Effet de l'Aluminium sur la morphologie et la croissance des plantules .....	133
III.2.2.1.1. Mesures biométriques .....	133
III.2.2.1.2. Aspect de la pointe racinaire .....	135
III.2.2.1.3. Effet de l'Aluminium sur la nutrition minérale des plantes cultivées sur sols forestiers ou substrat de culture .....	138
III.2.2.2. Localisation racinaire de l'Aluminium .....	139
III.2.2.3. Analyse de la fraction polysaccharidique de la paroi cellulaire .....	145
III.2.3. Bilan .....	163

Chapitre IV. Discussion .....	165
IV.1. Seuil de tolérance du sapin de Douglas à l'aluminium et symptômes de toxicité ....	165
IV.1.1. Inhibition de la croissance et du développement des plantules et des jeunes arbres de sapin de Douglas .....	165
IV.1.2. Perturbation de la nutrition minérale.....	169
IV.2. Distribution de l'aluminium : du milieu à la plante .....	171
IV.2.1. Répartition de l'aluminium dans le milieu (synthétique ou sol forestier).....	171
IV.2.2. Distribution de l'aluminium dans les plantes de sapin de Douglas.....	173
IV.3. Réponses physiologiques à l'exposition à l'aluminium : stratégies mises en place pour tolérer le stress aluminique .....	176
IV.3.1. Stratégies mises en place au niveau pariétal .....	176
IV.3.1.1. Modification des polysaccharides de la paroi en réponse au stress aluminique .....	176
IV.3.1.2. Régulation enzymatique de la modification des polysaccharides de la paroi en réponse au stress aluminique .....	184
IV.3.2. Stratégies mises en place au niveau intracellulaire.....	185
Conclusion .....	188
Références bibliographiques.....	192
Annexe 1: Valorisation des travaux.....	213
Annexe 2: Publication scientifique.....	214





## Table des illustrations

---

<b>Figure 1:</b> Aires de répartition respectives sur le continent américain des 2 sous-espèces de sapin de Douglas .....	24
<b>Figure 2:</b> Distribution de <i>Pseudotsuga menziesii</i> en Europe.....	25
<b>Figure 3:</b> Photographies illustrant la morphologie des sapins de Douglas.....	26
<b>Figure 4:</b> Répartition de la ressource en sapin de Douglas en France, .....	27
<b>Figure 5:</b> Répartition des peuplements de sapin Douglas par classes d'âge.....	28
<b>Figure 6:</b> Volume de bois en forêt de production inventoriée par essence en Limousin.....	29
<b>Figure 7:</b> Différentes étapes de l'embryogenèse somatique du sapin de Douglas .....	31
<b>Figure 8:</b> Classification des sols dans le monde selon leur pH .....	33
<b>Figure 9:</b> Classification des sols en France selon leur pH .....	34
<b>Figure 10:</b> Facteurs à l'origine de l'acidité des sols et effets de celle-ci sur leur composition minérale et sur la biodisponibilité et l'activité des éléments constitutifs du sol (minéraux, métaux...) .....	35
<b>Figure 11:</b> Abondance et spéciation de l'Al dans la croûte terrestre .....	37
<b>Figure 12:</b> Les effets de l'exposition des plantes Solanaceae au stress dû à l'aluminium....	38
<b>Figure 13:</b> Effet de la toxicité Al <sup>3+</sup> sur les racines de deux lignées de blé.....	39
<b>Figure 14:</b> Effets des différentes concentrations en Al sur la croissance de <i>Pinus massoniana</i> . .....	40
<b>Figure 15:</b> Mécanisme de la réaction de Fenton impliquant l'aluminium dans la production des ROS .....	43
<b>Figure 16:</b> Modèles de la sécrétion d'acides organiques (OA) stimulée par l'aluminium (Al) à partir des racines de la plante .....	46
<b>Figure 17:</b> Implication des acides organiques dans la détoxification de l'Al.....	47
<b>Figure 18:</b> Images de microscopie confocale de coupes longitudinales de racines de la plante de thé marquées au Morin. ....	49
<b>Figure 19:</b> Structure et composition de la paroi cellulaire primaire et secondaire des plantes .....	51
<b>Figure 20:</b> Structure de la cellulose.....	52
<b>Figure 21:</b> Schéma de la structure des xyloglucanes.....	54
<b>Figure 22:</b> Structure des glucoronoarabinoxylanes.....	54
<b>Figure 23:</b> Structure du $\beta$ -1,3-1,4-glucane .....	55
<b>Figure 24:</b> Structure des différents mannanes .....	55
<b>Figure 25:</b> Représentation schématique des trois domaines (HG, RG-I et RG-II) constitutifs des pectines et de leurs agencements possibles au sein de la paroi. ....	56

<b>Figure 26:</b> Le modèle en « egg box » de la complexation du calcium dans les polysaccharides homogalacturonanes.....	57
<b>Figure 27:</b> Structure des pectines .....	57
<b>Figure 28:</b> Schéma de la structure de la chaîne principale du rhamnogalacturonanes de type I.....	58
<b>Figure 29:</b> Schéma représentatif de la structure polysaccharidique d'un RG-II.....	58
<b>Figure 30:</b> Motifs précurseurs de la synthèse des lignines .....	59
<b>Figure 31:</b> Structure hypothétique d'une lignine extraite à partir de sciure de bois de peuplier .....	59
<b>Figure 32:</b> Mécanisme d'action de la pectine méthylestérase.....	61
<b>Figure 33:</b> Représentation schématique de l'activité de transglycosylation XET.....	62
<b>Figure 34:</b> Absorption et distribution de diverses formes d'Al s'accumulant dans la plante de sarrasin ( <i>Fagopyrum esculentum</i> ).....	65
<b>Figure 35:</b> Mécanismes proposés pour l'atténuation de la toxicité aluminique provoquée par le flux de Mg <sup>+2</sup> dans le riz.....	68
<b>Figure 36:</b> Localisation de la pépinière du Fond Forestier Nation à Peyrat-le-Château.....	73
<b>Figure 37:</b> Plan de la pépinière de Peyrat-le-Château avec les différentes parcelles de différentes végétations.....	74
<b>Figure 38:</b> Schéma de l'extraction séquentielle des constituants pariétaux des poudres végétales.....	80
<b>Figure 39:</b> Etapes de la réaction de méthanolyse permettant d'aboutir à la formation de O-méthylglycosides.....	84
<b>Figure 40:</b> Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides.....	84
<b>Figure 41:</b> Principe du dosage indirect du méthanol.....	86
<b>Figure 42:</b> Schéma de la réaction entre le DTNB et les fonctions thiols .....	89
<b>Figure 43:</b> Evolution des ES entre la phase de maturation et la première semaine de germination à l'obscurité.....	92
<b>Figure 44:</b> Différents phénotypes observés sur les plantules obtenues après 8 semaines de croissance des plantules de sapin de Douglas des deux lignées TD 15-1 en conditions témoins (sans apport d'AlCl <sub>3</sub> dans le milieu).....	93
<b>Figure 45:</b> Symptômes du phénomène d'hyperhydricité des plantules de sapin de Douglas <i>in vitro</i> .....	94
<b>Figure 46:</b> Effet de la concentration en AlCl <sub>3</sub> dans le milieu de culture (gamme 0-100 µM AlCl <sub>3</sub> ) sur la croissance des plantules issues des ES TD 15-1 de sapin de Douglas <i>in vitro</i> .....	95
<b>Figure 47:</b> Effet de la concentration en AlCl <sub>3</sub> (gamme 0-100 µM) dans le milieu de culture sur la masse sèche des différents organes des plantules issues des ES de sapin de Douglas TD 15-1 R++.....	96
<b>Figure 48:</b> Effet de la concentration en AlCl <sub>3</sub> dans le milieu de culture (gamme 0-1 mM) sur la croissance des plantules issues des ES de sapin de Douglas TD 15-1 R++ <i>in vitro</i> .....	97

<b>Figure 49:</b> Effet de la concentration en aluminium sur la morphologie des plantules de sapins de Douglas âgées de 8 semaines.....	98
<b>Figure 50:</b> Effet de la concentration en $AlCl_3$ (gamme 0-1 mM) dans le milieu de culture sur la masse sèche des différents organes des plantules de sapin de Douglas R++.....	99
<b>Figure 51:</b> Observations au MEB des pointes racinaires des plantules de sapin de Douglas âgées de 8 semaines cultivées en absence ou en présence d' $AlCl_3$ dans le milieu de culture. ....	99
<b>Figure 52:</b> Teneurs en Al (en $\mu g\ Al\ .g^{-1}\ MS$ ) dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> pendant 8 semaines dans un milieu de germination de concentration variable en $AlCl_3$ .....	100
<b>Figure 53:</b> Images d'observation par microscopie confocale de coupes transversales des racines de plantules de sapin de Douglas, réalisées à 10 mm de l'extrémité des racines et marquées au Calcofluor.....	102
<b>Figure 54:</b> Images d'observation par microscopie confocale de coupes transversales des racines de plantules de sapin de Douglas, réalisées à 10 mm de l'extrémité des racines et marquées au Morin. ....	103
<b>Figure 55:</b> Teneur en certains minéraux dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> dans des milieux de germination de concentrations variables en $AlCl_3$ . ....	105
<b>Figure 56:</b> Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des fractions extraites à l'éthanol (S1) des plantules de sapin de Douglas cultivées pendant 2 mois <i>in vitro</i> dans des milieux de germination Témoin, ou additionnés de concentrations variables en $AlCl_3$ .....	107
<b>Figure 57:</b> Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions polysaccharidiques dans les plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> pendant 2 mois dans des milieux de concentrations variables en $AlCl_3$ 0 – 1 mM.....	108
<b>Figure 58:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH dans les racines des plantules de sapin de Douglas cultivées huit semaines <i>in vitro</i> sur des milieux de concentrations variables en $AlCl_3$ .....	110
<b>Figure 59:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH dans les tiges des plantules de sapin de Douglas cultivées huit semaines <i>in vitro</i> sur des milieux de concentrations variables en $AlCl_3$ .....	111
<b>Figure 60:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH dans les épines des plantules de sapin de Douglas cultivées huit semaines <i>in vitro</i> sur des milieux de concentrations variables en $AlCl_3$ .....	112
<b>Figure 61:</b> Spectres IR à transformée de Fourier des 3 échantillons étalons .....	114
<b>Figure 62:</b> Courbe d'étalonnage préparée afin d'estimer le DME des échantillons à analyser. ....	115
<b>Figure 63:</b> Evolution du degré de méthyl estérification dans les racines des plantules de Douglas cultivées <i>in vitro</i> pendant 2 mois dans des milieux de concentrations variables en $AlCl_3$ 0 – 1 mM. ....	116

<b>Figure 64:</b> Proportion d'Al détecté dans les différentes fractions polysaccharidiques exprimée en % par rapport à la quantité d'Al présent dans chaque organe (racines, tiges ou épines) des plantules de sapins de Douglas cultivées pendant 2 mois dans des milieux de différentes concentrations en $AlCl_3$ .	117
<b>Figure 65:</b> Teneurs moyennes en protéines pariétales dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas exprimées en $\mu g.g^{-1}$ MF en fonction de la concentration du milieu de germination en $AlCl_3$ .	119
<b>Figure 66:</b> Evolution de l'activité PME dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> dans des milieux de culture de concentrations différentes en $AlCl_3$ .	120
<b>Figure 67:</b> Evolution de l'activité GPox dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> dans des milieux de culture de concentrations différentes en $AlCl_3$ .	121
<b>Figure 68:</b> Evolution des teneurs en proline dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> dans des milieux de culture de concentrations différentes en $AlCl_3$ .	122
<b>Figure 69:</b> Effet de l'Al sur la teneur en thiols non protéiques totaux dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> dans des milieux de culture de concentrations différentes en $AlCl_3$ .	123
<b>Figure 70:</b> Effet de l'Al sur les teneurs en pigments photosynthétiques dans les épines des plantules de sapin de Douglas cultivées <i>in vitro</i> dans des milieux de culture de concentrations différentes en $AlCl_3$ .	124
<b>Figure 71:</b> Photos des deux modèles de sapins de Douglas cultivés sous serre.	126
<b>Figure 72:</b> Teneurs en éléments minéraux et Al dans les fractions extraites par le Rhizo A des différents sols forestiers ou substrats de culture.	128
<b>Figure 73:</b> Mesures des pH des différents sols forestiers.	129
<b>Figure 74:</b> Mesures de la CEC et du rapport C/N.	130
<b>Figure 75:</b> Evolution du pH et de la CEC des sols forestiers ou substrat de culture après culture de plantules de sapin de Douglas pendant 8 semaines sur ces mêmes substrats.	131
<b>Figure 76:</b> Evolution du pH et de la CEC des substrats de culture après 11 mois de culture des jeunes arbres de Douglas de 4 ans sur ces substrats.	132
<b>Figure 77:</b> Les points de découpe et de mesures sur les jeunes arbres de sapin de Douglas.	133
<b>Figure 78:</b> Effet de la nature du sol ou du substrat de culture sur la croissance des plantules de sapin de Douglas issues de germination de graines après 2 mois de culture et sur la masse sèche des différents compartiments à la récolte.	134
<b>Figure 79:</b> Effet de la nature des substrats de culture sur la croissance des jeunes arbres de sapin de Douglas.	135
<b>Figure 80:</b> Photographies d'observations au MEBE des pointes racinaires des plantules de sapin de Douglas après 8 semaines de culture sur différents substrats de culture.	136

<b>Figure 81:</b> Photographies d'observations au MEB des pointes racinaires des jeunes arbres de sapin de Douglas après 1 mois de culture sur différents substrats de culture.....	137
<b>Figure 82:</b> Teneurs en minéraux essentiels dans les racines, tiges et épines des plantules cultivées pendant 8 semaines sur terreau commercial, S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub> . .....	139
<b>Figure 83:</b> Teneurs en Al dans les racines, tiges et épines des plantules cultivées pendant 8 semaines sur terreau commercial, S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub> .....	140
<b>Figure 84:</b> Observations en microscopie confocale de coupes transversales des racines de plantules de sapin de Douglas âgées de 2 mois cultivées sur terreau commercial; S <sub>D</sub> et sur S <sub>PS</sub> .....	142
<b>Figure 85:</b> Observations en microscopie confocale des coupes transversales des racines des jeunes arbres de sapin de Douglas de 4 ans cultivés sur substrat commercial ; S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub> pendant 11 mois.....	144
<b>Figure 86:</b> Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des fractions S1 dans les plantules de sapin de Douglas de 2 mois cultivées sur les 3 substrats sélectionnés.....	146
<b>Figure 87:</b> Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions polysaccharidiques dans les plantules de sapin de Douglas de 2 mois cultivées sur les 3 substrats sélectionnés.....	147
<b>Figure 88:</b> Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des fractions S1 dans les jeunes arbres de sapin de Douglas cultivées sur les 3 substrats sélectionnés.....	149
<b>Figure 89:</b> Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions polysaccharidiques dans les jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans cultivés pendant 11 mois sur les 3 substrats sélectionnés. ....	150
<b>Figure 90:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites <b>des racines</b> des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction des conditions des substrats de culture.....	152
<b>Figure 91:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites <b>des tiges</b> des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction des conditions des substrats de culture.....	153
<b>Figure 92:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites <b>des épines</b> des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction des conditions des substrats de culture.....	154
<b>Figure 93:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites <b>des racines</b> des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans en fonction des conditions des substrats de culture.....	157
<b>Figure 94:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites <b>des tiges</b> des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans en fonction des conditions des substrats de culture.....	158
<b>Figure 95:</b> Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites <b>des épines</b> des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans en fonction des conditions des substrats de culture.....	159

**Figure 96:** Proportion d'Al retenu par les différentes fractions polysaccharidiques exprimée en % par rapport à la quantité d'Al présent dans chaque organe (racines, tiges ou épines) des plantules de sapin de Douglas de 2 mois. .... 161

**Figure 97:** Moyenne des teneurs en protéines totales pariétales dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction du substrat de culture. .... 162

**Figure 98:** Evolution de l'activité PME chez les plantules de sapin de Douglas sous serre en fonction des conditions des sols. .... 163

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1:</b> Excrétion racinaire d'acides organiques chez <i>Cryptomeria japonica</i> , <i>Pinus thunbergii</i> et <i>Populus tremula</i> après une exposition à des concentrations croissantes en $Al^{3+}$ .....	48
<b>Tableau 2:</b> Proportion des différents types d'hémicelluloses dans les parois cellulaires végétales .....	53
<b>Tableau 3:</b> Composition du bois et de l'écorce du sapin de Douglas .....	62
<b>Tableau 4 :</b> Origine génétique des lignées embryogènes du sapin de Douglas ( <i>Pseudotsuga menziesii</i> ) .....	71
<b>Tableau 5 :</b> Croisements contrôlés <i>in vitro</i> pour l'obtention des lignées embryogènes primaires de sapin de Douglas ( <i>Pseudotsuga menziesii</i> ) : TD 1 TD15 et SD4. ....	71
<b>Tableau 6:</b> Composition du milieu de germination des ES de sapin de Douglas .....	72
<b>Tableau 7:</b> Paramètres de dosage des éléments minéraux par MP-AES .....	79
<b>Tableau 8:</b> Variation du rapport GalA/Rha dans les fractions pectiques de la paroi cellulaire dans les différents organes des plantules de sapins de Douglas .....	113
<b>Tableau 9:</b> Le rapport (Ca+K+Mg) / Al dans les sols ou les substrats de culture analysés	129
<b>Tableau 10:</b> Caractéristiques physicochimiques des sols / substrats de culture sélectionnés .....	131
<b>Tableau 11:</b> Les taux d'accumulation de l'Al par les plantules de Douglas.....	140
<b>Tableau 12:</b> Le rapport GalA/Rha dans les fractions pectiques des PI2 .....	155
<b>Tableau 13:</b> Le rapport GalA/Rha dans les fractions pectiques des Arb11 .....	160
<b>Tableau 14 :</b> Translocation de l'Al dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas <i>in vitro</i> et sous serre en fonction de la concentration en Al dans le milieu de culture. ....	175
<b>Tableau 15 :</b> Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les PHM et PFM issues des 3 organes des 3 modèles de sapin de Douglas suite à une exposition à l'Al <i>in vitro</i> ou sous serre sur sol forestier .....	178
<b>Tableau 16 :</b> Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les HC KOH et HC NaOH issues des 3 organes des 3 modèles de sapin de Douglas suite à une exposition à l'Al <i>in vitro</i> ou sous serre sur sol forestier .....	178
<b>Tableau 17 :</b> Pourcentage d'Al retenu par les différentes fractions polysaccharidiques par rapport à la quantité accumulée par chaque organe des plantules de sapin de Douglas <i>in vitro</i> exposées au milieu témoin et au milieu à 1 mM $AlCl_3$ .....	183
<b>Tableau 18 :</b> Pourcentage d'Al retenu par les différentes fractions polysaccharidiques par rapport à la quantité accumulée par chaque organe des plantules de sapin de Douglas sous serre exposées au terreau commercial et au $S_{PS}$ .....	183





## Liste des abréviations

---

<b>ABA</b>	Acide abscissique
<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette
<b>AF</b>	Autofluorescence
<b>AIB</b>	Acide indole butyrique
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>Arb11</b>	Jeunes arbres de Douglas âgés de 4 ans
<b>As</b>	Activité spécifique
<b>AsA</b>	Acide ascorbique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AU</b>	Acide uronique
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin
<b>BSTFA</b>	N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide
<b>CEC</b>	Capacité d'échange cationique
<b>Cit</b>	Citrate
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>Dha</b>	Acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique
<b>DME</b>	Degré de méthylestérification
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTNB</b>	Acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque
<b>DTPA</b>	Acide diéthylène triamine penta-acétique
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tetra acetic acid
<b>EE</b>	Extrait enzymatique
<b>ES</b>	Embryon somatique
<b>ET</b>	Ecart-type
<b>ETP</b>	EvapoTranspiration Potentielle
<b>EZ</b>	Embryon zygotique
<b>FID</b>	Détecteur à ionisation de flamme
<b>Fuc</b>	Fucose
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GalA</b>	Acide Galacturonique
<b>Glc</b>	Glucose
<b>GlcA</b>	Acide glucuronique

<b>GPox</b>	Guaïacol peroxydase
<b>GPX</b>	Gglutathion peroxydase
<b>GRPs</b>	Protéines riches en glycine
<b>HC KOH</b>	Hémicelluloses extraites à la potasse
<b>HC NaOH</b>	Hémicelluloses extraites à la soude
<b>HC</b>	Hémicelluloses
<b>HGs</b>	Homogalacturonanes
<b>HRGPs</b>	Protéines riches en hydroxyproline
<b>IR</b>	Infra-rouge
<b>Kdo</b>	Acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique
<b>Man</b>	Mannose
<b>MATE :</b>	Multidrug and toxic compound extrusion
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>ME</b>	Masse embryogène
<b>MEBe</b>	Microscope électronique à balayage en mode environnemental
<b>MF</b>	Matière fraîche
<b>m-HDP</b>	Méta-hydroxydiphényle
<b>MP-AES</b>	Spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>OA</b>	Acide organique
<b>ON</b>	Oses neutres
<b>ONF</b>	Office national des forêts
<b>Ox</b>	Oxalate
<b>PFM</b>	Pectine faiblement méthylestérifiée
<b>PHM</b>	Pectine hautement méthylestérifiée
<b>PI2</b>	Plantules de Douglas cultivées âgées de 2 mois
<b>PM</b>	Membrane plasmique
<b>PME</b>	Pectine méthylestérase
<b>PRPs</b>	Protéines riches en proline
<b>PVPP</b>	Polyvinylpolypyrrolidone
<b>RG I</b>	Rhamnogalacturonanes de type I
<b>RG II</b>	Rhamnogalacturonanes de type II
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>Rhizo A</b>	Mélange d'acides organiques simulant les exsudats racinaires

<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>S<sub>D</sub></b>	Sol de plantation de Douglas
<b>SE</b>	Erreur standard
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>S<sub>PS</sub></b>	Sol de plantation de Pin sylvestre
<b>ST</b>	Sucres totaux
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>TMCS</b>	Triméthylchlorosilane
<b>TNP</b>	Thiols non protéiques
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>XET</b>	Xyloglucane-endotransglucosylase
<b>XHT</b>	Xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase
<b>Xyl</b>	Xylose



## Introduction

---

L'aluminium est le métal le plus répandu sur Terre et le troisième élément le plus abondant après l'oxygène et le silicium. Cependant, dans des conditions de pH neutres ou basiques, il n'est présent qu'à de faibles concentrations dans la solution du sol à cause de sa faible solubilité. Toutefois il s'avère que, par-delà le caractère acide naturel de certains sols (en particulier granitique), des phénomènes d'acidification des sols peuvent survenir. Certains sont d'origine anthropique, comme par exemple, des épisodes de pluies acides ou encore en fonction du type de végétation implantée sur ces milieux. Ainsi, dans certains espaces ruraux, par souci de rentabilité économique, une stratégie de remplacement progressif des espèces de feuillus à croissance lente par des résineux à développement plus rapide a pu modifier les caractéristiques des sols forestiers, notamment en raison de la lenteur de la décomposition de la litière végétale issue d'arbres résineux. Le phénomène d'acidification des sols est alors devenu de plus en plus prononcé dans ces forêts constituées de plantation de résineux. La diminution du pH du sol à des valeurs inférieures à 5,5 est à l'origine d'une solubilisation de l'aluminium du sol qui se trouve alors sous une forme mobile ( $Al^{3+}$ ), très réactive, et biodisponible pour les plantes. Cet élément trace métallique peut alors entrer au contact du système racinaire et développer une toxicité lorsque les concentrations en  $Al^{3+}$  dans la rhizosphère atteignent quelques micromolaires.

En Europe, les plantations de résineux comme les bois d'épicéa (*Picea abies*), de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et de sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) sont très répandues. Plus particulièrement, l'importance des forêts de sapin de Douglas ne cesse de croître du fait de leur productivité élevée, des propriétés mécaniques intéressantes du bois et de l'adaptabilité physiologique de cette essence. L'intérêt économique du sapin de Douglas est expliqué par sa durabilité naturelle élevée. Il représente une essence d'avenir sur laquelle s'appuie une filière économique qui valorise le bois et les co-produits issus de son exploitation. Au sein du laboratoire PEIRENE dont l'objectif est d'étudier et de valoriser les ressources naturelles notamment végétales, les travaux de l'équipe SylvaLIM visent à évaluer l'adaptation de la ressource forestière, aux changements environnementaux, et notamment aux facteurs édaphiques. Etant donné l'importance du massif forestier de sapin de Douglas en France (la France est le premier pays producteur de sapin de Douglas en Europe) et sa très grande productivité sur le territoire Limousin, le sapin de Douglas a été choisi comme modèle d'étude. Ainsi, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans la thématique de SylvaLIM et visent à appréhender l'impact de l'acidité du sol et de l'exposition à l'aluminium soluble sur la croissance du sapin de Douglas.

Une approche phénotypique et une approche biochimique ont été mises en place afin de définir les seuils de toxicité de l'aluminium et de caractériser les réponses du sapin de Douglas au stress aluminique. Pour ce faire, l'effet de l'exposition à l'aluminium sur la croissance et la nutrition minérale des plantes a été étudié dans un premier temps. Ensuite, la distribution de l'Al dans la plante, et les réponses au niveau cellulaire, et notamment pariétal ont été évaluées, la paroi cellulaire étant la première barrière contre l'entrée de l'Al dans les cellules.

Différents modèles d'études dans différentes conditions de culture et stades de développement ont été utilisés afin de mettre en place ces deux approches :

- Des plantules issues de la culture *in vitro*, ces conditions de culture étant contrôlées essentiellement en termes de concentration d'Al dans le milieu, ce qui permet d'estimer le seuil de tolérance des plantules face au stress aluminique,

- Des plantules issues de germination de graines et de jeunes arbres âgés de 3 ans cultivés pendant 2 et 11 mois respectivement sous serre sur sols forestiers prélevés en région Limousin et caractérisés par leur acidité et leur richesse en aluminium soluble.

L'introduction bibliographique qui suit s'intéresse dans une première partie à la présentation du sapin de Douglas, modèle biologique de notre étude. La seconde partie explique les conséquences de l'acidification des sols sur la biodisponibilité de l'aluminium et, finalement, sur l'expression de sa toxicité sur les plantes. La dernière partie détaille les différents mécanismes de réponse des plantes vis-à-vis du stress aluminique.

## Chapitre I. Synthèse bibliographique

### I.1. Présentation du modèle biologique : Le sapin de Douglas

#### I.1.1. Taxonomie, origine géographique, diffusion en Europe

Le sapin de Douglas ou *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco est un résineux appartenant à l'ordre des Pinales, à la famille des *Pinaceae* (Pinopsida) et à la sous-famille des *Laricoideae*. C'est un conifère originaire de l'Amérique du nord qui a été importé en Europe au XIXe siècle par le botaniste écossais David Douglas. L'espèce *menziesii* compte deux sous-espèces : le sapin de Douglas vert (subsp. *menziesii*) trouvé essentiellement dans les forêts pluviales des côtes pacifiques et le sapin de Douglas bleu (subsp. *glauca*) présent en région montagneuse et des zones plus sèches, il est caractérisé par ses aiguilles bleuâtres.

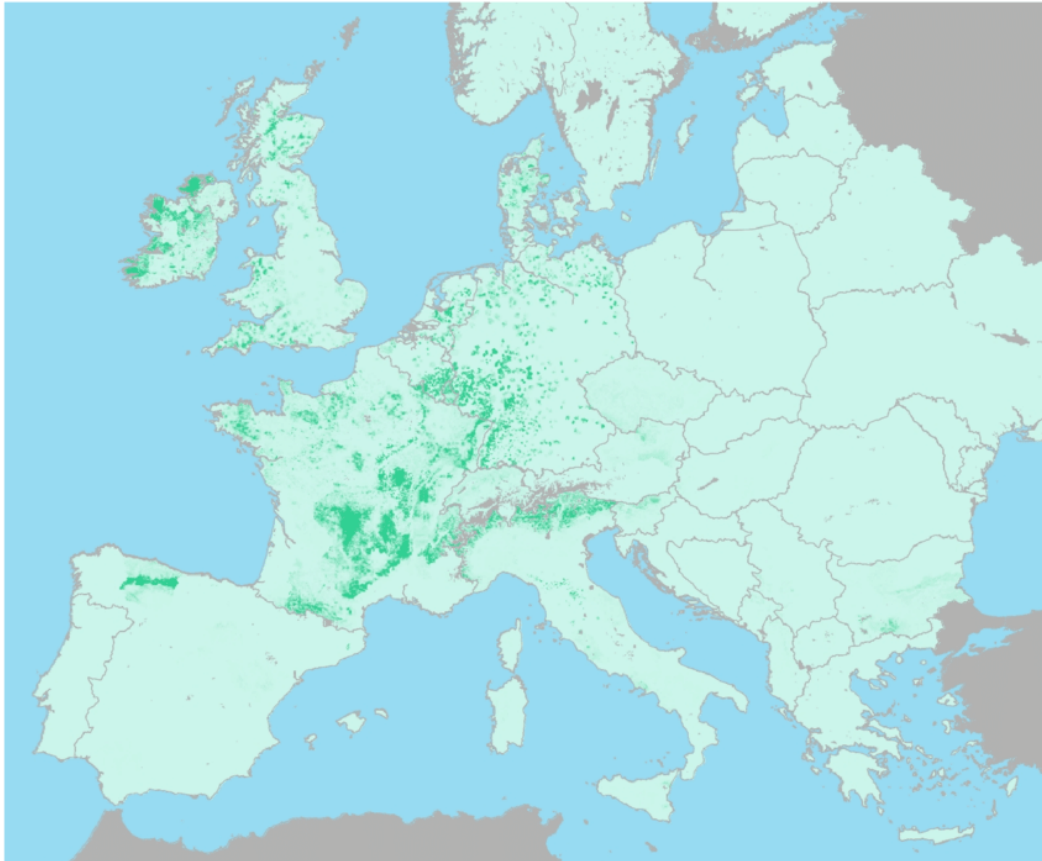
En Amérique du Nord, l'aire de répartition de *P. menziesii* s'étend de la Colombie Britannique au nord de la Californie pour le sapin de Douglas vert et jusqu'au Mexique pour le sapin de Douglas bleu (Claire, 2010) (Figure 1).



**Figure 1:** Aires de répartition respectives sur le continent américain des 2 sous-espèces de sapin de Douglas : *P. menziesii* var. *menziesii* (vert) et *P. menziesii* var. *glauca* (bleu) (Müller, 2015)



En Europe, le sapin Douglas bleu est moins largement répandu que le sapin de Douglas vert vu que ce dernier présente des taux de croissance beaucoup plus importants, bien qu'il soit moins résistant à la sécheresse et plus sensible aux gelées tardives (Hermann et Lavender, 1999; Reyer *et al.*, 2010). En Europe, 80% des surfaces couvertes par le sapin de Douglas se trouvent dans 3 pays : la France, l'Allemagne et Royaume-Uni (Figure 2).



**Figure 2:** Distribution de *Pseudotsuga menziesii* en Europe (Schmid *et al.*, 2014)

### **I.1.2. Caractéristiques phénotypiques**

Le sapin de Douglas adulte mesure en moyenne entre 50 et 80 m de haut et peut exceptionnellement dépasser les 100 m de haut pour un âge souvent supérieur à 300 ans. Le sapin de Douglas vert possédant des branches longues et disposées en verticilles, doit son nom à la couleur verte plus ou moins foncée de ses aiguilles molles qui mesurent de 1,5 à 3 cm de long (Aljos, 2010). Il pousse à des altitudes variant de 0 à 1500 m sous des climats océaniques à montagnards. Ses aiguilles à odeur de citronnelle, contiennent deux bandes de stomates abaxiales, gris blanc, et un apex acuminé ou obtus. Son écorce lisse est vert noirâtre ou gris brun foncé avec la présence de cloques de résines. En vieillissant, elle se transforme en rhytidome d'épaisseur variable et elle devient écailleuse et rugueuse avec des fissures longitudinales profondes (Figure, 3A). Les rameaux sont initialement jaunes clairs puis deviennent rouges bruns et légèrement pubescents lorsqu'ils sont secs. Les cônes sont bruns, brillants et ont une forme ellipsoïde-ovoïde. Ils mesurent de 5 à 10 cm de long avec des bractées trifides saillantes (Figure, 3B et 3C) (Claire, 2010).

Le sapin de Douglas mesure en moyenne 30 à 35 m en hauteur pour des sites favorables, avec un diamètre allant de 0,4 à 1 m pour un climat continental et montagnard. Il doit son nom à la couleur bleutée de ses aiguilles. Il possède des cônes plus petits que ceux du sapin Douglas vert qui présentent également des bractées trifides saillantes (Claire, 2010).

Le bois du sapin de Douglas se distingue des autres gymnospermes d'Europe par la différence de coloration de ses deux grandes zones : l'aubier qui est plus clair et bien différencié et le duramen ayant une couleur rose-saumon à brun-rougeâtre (Figure, 3D) (Dellus *et al.*, 1997). Le bois initial et le bois final étant très démarqués, les cernes se distinguent facilement. Les bonnes caractéristiques mécaniques du bois sont dues à la stabilité du rapport entre la largeur du bois final et la largeur totale de cerne quelle que soit la vitesse de croissance de l'arbre. Au niveau du bois final, le bois possède des canaux résinifères fins à moyens, qui ne sont pas visibles à l'œil nu (France Douglas, 2012).



**Figure 3:** Photographies illustrant la morphologie des sapins de Douglas. A : Douglas vert de 120 ans, B : Rameaux et cônes de Douglas vert, C : Rameaux et cônes de Douglas bleu (“Schede di botanica”), D : Section transversale de tronc de Douglas vert

### I.1.3. Caractéristiques génétiques

Le sapin de Douglas constitue une exception à la famille des *Pinaceae* en possédant un nombre de chromosomes diploïde de 26. Les autres espèces de *Pinaceae* dont d'autres *Pseudotsuga* en ont 24 (Doerksen et Ching, 1972). Comme dans la plupart des conifères, son génome nucléaire est vaste et complexe ( $3,7 \cdot 10^{10}$  pb) (Howe *et al.*, 2006). L'héritage des chloroplastes est principalement paternel (Neale *et al.*, 1986). En revanche, l'héritage mitochondrial est maternel (Marshall et Neale, 1992; O'Brien *et al.*, 1996). La floraison et la

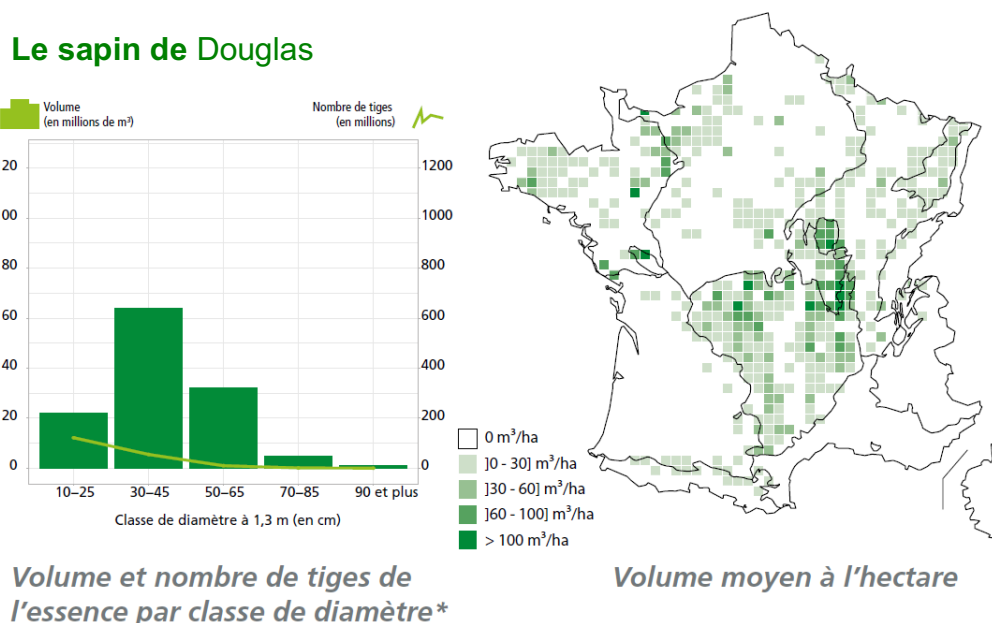
production de semences commencent à l'âge de 7 à 10 ans pour le sapin de Douglas vert (Stein et Owston, 2002). Dans les peuplements matures, de bonnes cultures de semences sont produites tous les 2 à 11 ans (Stein et Owston, 2002). Le sapin de Douglas ne se reproduit pas naturellement par multiplication végétative. La pollinisation a lieu au printemps, et les graines mûres sont déposées à la fin de l'été ou au début de l'automne de la même année.

Le sapin de Douglas est une espèce monoïque et possède un système mixte d'accouplement. Cependant, la reproduction se fait essentiellement par fécondation croisée (allogamie) plutôt que par autofécondation. La fécondation spontanée au stade des semences matures est habituellement inférieure à 10% en raison de la mortalité élevée des embryons autofécondés (Sorensen, 1999). Les graines sont facilement dispersées sur plusieurs centaines de mètres ou plus (Bever, 1954; Isaac, 1930) et comme le sapin de Douglas est pollinisé par le vent (anémophile), la dispersion du pollen est très large (Adams, 1992).

#### I.1.4. La ressource et la production de bois de Douglas

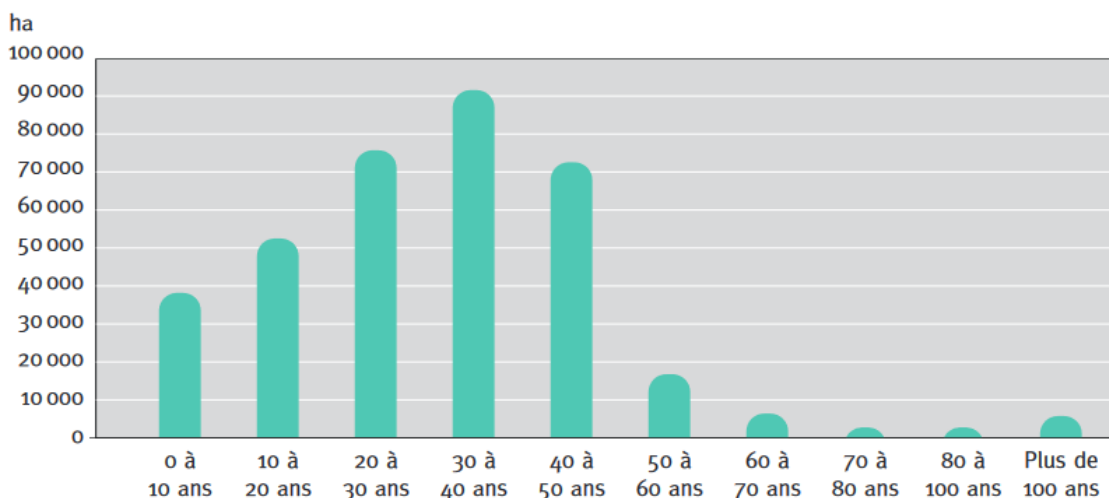
##### I.1.4.1. En France

La France est le premier pays européen producteur de sapin de Douglas, avec plus de la moitié de la production européenne devant l'Allemagne, la Grande-Bretagne et l'Espagne. La Douglassaie française s'étend aujourd'hui sur une surface d'environ 400000 ha en tant qu'essence principale, dont 68 % de cette superficie sous forme de peuplement monospécifique (IGN, 2014). C'est une essence très exigeante du point de vue de la pluviométrie (700 mm de précipitations au moins) et par conséquent ne se plaît vraiment que dans les régions à climat océanique, dans les collines et les montagnes moyennes françaises (Claire, 2010). Près de 80 % de la surface totale se situe au sein des six régions présentes sur le massif central : Bourgogne et Limousin (75000 ha chacune), Rhône-Alpes et Auvergne (55000 ha chacune), Midi-Pyrénées (40000 ha) et Languedoc-Roussillon (20000 ha). Le reste des régions françaises comptabilisent toutefois ensemble de l'ordre de 80 à 100000 ha de peuplements (Figure 4).



**Figure 4:** Répartition de la ressource en sapin de Douglas en France, exprimée en volume sur hectare (IGN, 2018)

C'est un massif relativement jeune (la classe d'âge médiane est comprise entre 30 et 40 ans) qui stocke un volume sur pied de l'ordre de 100 millions de m<sup>3</sup> et dont l'accroissement biologique est estimé à 5,3 millions de m<sup>3</sup>/an, soit une productivité moyenne supérieure à 13 m<sup>3</sup>/ha/an (Figure 5) (IGN, 2018).



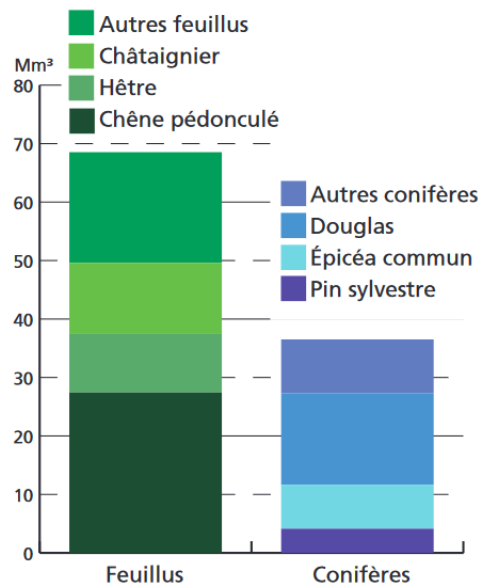
**Figure 5:** Répartition des peuplements de sapin Douglas par classes d'âge (en hectares) (France Douglas, 2012)

C'est un massif au sein duquel la récolte augmente toutefois régulièrement et à un rythme soutenu depuis une vingtaine d'années. Ainsi la récolte de bois d'œuvre est passée de 604000 m<sup>3</sup> en 1990 à 1060000 m<sup>3</sup> en 1999, pour atteindre 2 millions de m<sup>3</sup> en 2012 (AGRESTE, 2012).

L'augmentation en surface est très nette chez le sapin de Douglas dont la superficie a presque doublé en 25 ans. Cette hausse résulte du fort engouement pour cette essence comme essence de reboisement en Bourgogne, dans le Limousin et en Auvergne.

#### 1.1.4.2. En limousin

La forêt limousine représente un taux de boisement de 33 % du territoire régional ce qui est supérieur à la moyenne nationale (29,2%). Ceci représente environ 570 000 ha de forêts avec 90 Mm<sup>3</sup> de bois sur pied (Draaf, 2014). Avec 62 Mm<sup>3</sup>, les peuplements feuillus représentent plus des deux tiers de la superficie forestière régionale. Au sein des essences feuillues, le chêne pédonculé (27 Mm<sup>3</sup>) domine largement car il représente près de 40 % de la ressource régionale. Les peuplements résineux quant à eux, correspondent à une ressource deux fois moins importante avec une superficie forestière de 37 Mm<sup>3</sup> soit 35 % de la ressource forestière régionale. Le sapin de Douglas est la première essence résineuse avec 16 Mm<sup>3</sup> (70 000 ha) et représente près de la moitié de la ressource résineuse de la région et la deuxième essence régionale après le chêne pédonculé (Figure 6) (IFN, 2010). Près de 8 Mm<sup>3</sup> de la ressource en sapin de Douglas se situe sur le Plateau Limousin et 5 Mm<sup>3</sup> sur le Plateau de Millevaches (IFN, 2010).



**Figure 6:** Volume de bois en forêt de production inventoriée par essence en Limousin (campagne d'inventaire 2005-2009) (IFN, 2009)

### I.1.5. Caractéristiques d'intérêt et usages du bois de Douglas

Le sapin de Douglas fait partie des conifères qui possèdent les meilleures propriétés mécaniques (compression, traction, flexion) en comparaison avec la plupart des résineux présents en France (Epicéa et Sapin) et équivalentes à celles du pin. Les caractéristiques de durabilité naturelle du sapin de Douglas constituent un autre atout majeur. Le duramen (partie centrale du tronc de l'arbre, tout à fait lignifiée, c'est le « bois de cœur » ou « bois parfait », dur, compact, dense, sec et imputrescible) possède une excellente résistance naturelle aux attaques de champignons et d'insectes (hors termites), ainsi qu'un niveau de durabilité naturelle suffisant pour lui permettre d'être prescrit en extérieur au même titre que les résineux réputés les plus durables (Western Red Cedar, mélèzes...).

Le sapin de Douglas se caractérise par une densité et une stabilité au séchage supérieures à la plupart des autres essences résineuses présentes sur le sol européen. Il possède également un module de rupture plus élevé que celui des autres résineux (caractère peu cassant).

Du fait de ses caractéristiques et de sa durabilité, mais également ses caractéristiques esthétiques, le bois de sapin de Douglas est l'un des plus polyvalents du marché. Le principal débouché de ce bois est la construction. Grâce à ses fortes sections, grandes longueurs et nombreuses finitions, le bois de sapin de Douglas est idéal pour les charpentes traditionnelles mais il est aussi largement utilisé en petites sections, notamment pour les murs à ossature bois (Henri, 2017). Il est également utilisé en architecture extérieure (ouvrages d'art, bardage, platelages, etc.) ou bien dans des ambiances supportant une hygrométrie élevée (piscines, bateaux...) pour lesquelles ses qualités de résistances mécaniques et de durabilité s'additionnent. Le bois de sapin de Douglas est également employé pour la construction navale (mâts, pontons, traverses) et pour des usages moins nobles tels que la fabrication de caisses, d'emballages, de palettes ou en trituration (Angelier, 2007).

### **I.1.6. Les techniques de multiplication végétative chez le sapin de Douglas**

La population mondiale et les niveaux de vie ne cessent de croître, ceci entraîne une demande croissante de bois et de produits dérivés et par suite une pression continue sur les ressources forestières. De plus, des programmes d'amélioration des bois d'intérêt, comme le sapin de Douglas, ont été mis en place en France afin de subvenir aux besoins français tout en améliorant la qualité et la stabilité de ce matériel végétal. Les objectifs étaient tout d'abord d'adapter la ressource aux changements climatiques et de réduire la ramification, en maintenant un bon taux de croissance et une bonne densité de bois. Pour accroître la productivité de la forêt, la multiplication végétative de variétés améliorées s'avère être actuellement un des moyens les plus explorés.

À la différence de la multiplication par semis qui donne de nouveaux spécimens avec un nouveau patrimoine génétique, la multiplication végétative génère des individus identiquement dupliqués. Chez les conifères, la multiplication végétative reste limitée à la multiplication d'individus dans des conditions environnementales extrêmes. La multiplication végétative est de ce fait bien adaptée pour stabiliser le matériel amélioré et identifier des marqueurs moléculaires de sélection.

Plusieurs techniques de multiplication végétative peuvent être utilisées pour la multiplication conforme du sapin de Douglas : le bouturage horticole, le greffage et l'embryogenèse somatique *in vitro*.

Dans le monde, près de 692 millions d'arbres ont été produits par des techniques de multiplication végétative en 2007, dont 60 % sont des eucalyptus et 25 % des pins. Le bouturage reste de loin la technique la plus utilisée pour la production des plants de haute valeur génétique. Mais l'embryogenèse somatique commence à être utilisée dans la sélection et la diffusion des clones. Au Québec, le bouturage est combiné à l'embryogenèse somatique en utilisant les clones somatiques comme pieds-mères.

#### **I.1.6.1. Le bouturage horticole**

La rhizogenèse est initiée en plongeant la base des boutures (des rameaux d'arbres, des tailles de pousses) dans de l'acide indole butyrique (AIB). L'apparition des racines est observée après 40 jours. Plusieurs facteurs contrôlent la réussite de cette technique comme la qualité et l'origine génétique du matériel. Pour le sapin de Douglas, cette technique semble être facilement réalisable quand le matériel biologique est âgé de moins de 6 ans.

Cependant, le faible taux de multiplication par bouturage ainsi que le faible nombre de copies par individu (maximum 65) restent les deux limites majeures de cette technique (Bastien *et al.*, 2013). Une perte des capacités organogénétiques peut avoir lieu selon le clone et de l'année de prélèvement des boutures (de la Goublaye et Franclet, 1978). Le bouturage ne semble donc pas être une méthode de choix pour multiplier le sapin de Douglas.

#### **I.1.6.2. Le greffage horticole**

Le principe du greffage est de récolter un greffon et de l'apposer sur un porte greffe (un jeune plant de 2 ans). Après un mois, commence le développement du greffon avec un taux de reprise généralement très élevé. Cette technique n'est souvent utilisée que pour la création de banques de clones ou des vergers à graines étant est une opération minutieuse, longue et coûteuse.

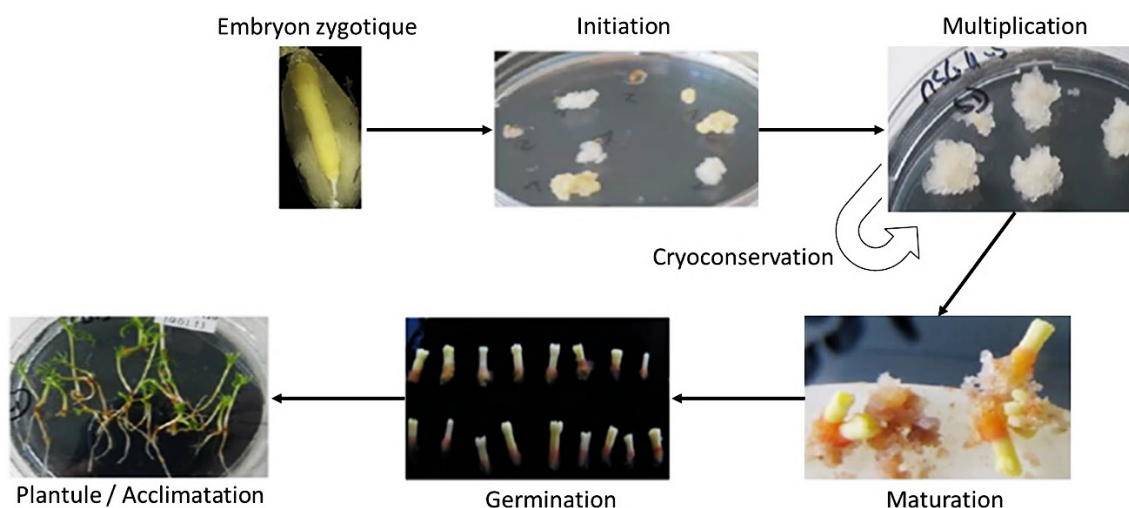
### I.1.6.3. L'embryogenèse somatique du sapin de Douglas

La multiplication végétative par bouturage ou greffage de cette espèce reste un moyen pas suffisamment développé à grande échelle à cause de ses facteurs limitants : pourcentage d'enracinement faible, un nombre limité de boutures par arbre et un vieillissement très rapide des pieds mères. L'embryogenèse somatique semble être plus adaptée pour multiplier le sapin de Douglas.

La reprogrammation cellulaire des cellules somatiques différenciées pour recouvrir leur capacité embryogène est rendue possible par la totipotence des cellules végétales. La formation de l'embryon somatique est, comme chez l'embryon zygotique, contrôlée par des facteurs génétiques et environnementaux. Les facteurs conditionnant l'efficacité de l'embryogenèse somatique sont : le type de tissu mis en culture (la préparation de la plante sur laquelle le tissu à cultiver sera prélevé et sa jeunesse), les sucres étant la source d'énergie et de carbone, la lumière, mais surtout les facteurs de stress (blessure, exposition aux métaux lourds, choc osmotique) et les régulateurs de croissance (auxines, cytokinines).

Ce processus permet de produire *in fine* des embryons somatiques (ES), à partir de cellules du soma au lieu des cellules germinales, suivant un processus ressemblant à l'embryogenèse zygotique. Depuis les premiers ES obtenus chez la carotte *Daucus carota* (Steward *et al.*, 1958), les techniques liées à l'embryogenèse somatique chez les angiospermes n'ont fait que progresser (Helal, 2011; Rai et Harish, 2011; Yang *et al.*, 2010). Pour les gymnospermes, cette technique a été initiée chez l'épicéa commun *Picea abies* (Hakman et Arnold, 1985) et chez *Pseudotsuga menziesii* (Durzan et Gupta, 1987) à partir d'un embryon zygotique (EZ) immature. Ensuite, les études sur le développement des ES des conifères ont été optimisées (Cairney *et al.*, 2007; Klimaszewska *et al.*, 2016; Lelu-Walter *et al.*, 2018; Reeves *et al.*, 2018).

L'embryogenèse somatique se déroule en plusieurs étapes : initiation des masses embryogènes (ME) multiplication des ME, puis maturation pour obtenir des ES cotylédonaires (Figure 7). Dans des conditions favorables, ces ES cotylédonaires germent, se développent en plantules qui pourront être acclimatées et transférées sur le terrain.



**Figure 7:** Différentes étapes de l'embryogenèse somatique du sapin de Douglas: initiation, multiplication des masses embryogènes (cryoconservation possible), maturation des embryons somatiques (ES). Les ES cotylédonaires mis en germination, se développent en plantes qui sont ensuite acclimatées (Crédits photos : Marie-Anne Lelu-Walter ; Florian Gautier).

#### **I.1.6.4. Avantages et limites de l'embryogenèse somatique**

L'embryogenèse somatique a pour avantage la capacité de s'affranchir des nombreux problèmes des autres techniques de multiplication végétative. Elle permet une production théoriquement illimitée d'embryons et un grand potentiel pour la multiplication massive des clones sélectionnés ce qui permet d'introduire les produits de l'amélioration génétique au reboisement. La possibilité de cryoconservation qui permet de stocker les ME à un état juvénile, et d'y revenir ultérieurement sur des lignées d'intérêts est aussi un avantage très important.

Pour notre étude, les plus grands avantages qu'apporte cette technique sont :

- Contrôler la variabilité génétique du matériel pour évaluer l'impact de l'aluminium.
- Courtes durées du processus pour obtenir de grandes quantités d'embryons, et donc de plantules.

Cependant, en plus des variations somaclonales qui peuvent avoir lieu, et qui sont considérées comme l'un des obstacles à la production de plants génétiquement conformes, cette technique présente certaines limites comme le coût élevé, la qualité du tissu de départ, le génotype, et l'état de juvénilité du matériel biologique. Le rendement d'obtention de plantes entières à partir des embryons somatiques pourrait également être affecté suite à des symptômes d'hyperhydricité (anciennement connue sous le nom de vitrification). Il s'agit, d'un trouble physiologique affectant fréquemment les parties aériennes. Par exemple, les feuilles des plantes présentant des symptômes d'hyperhydricité se caractérisent par un aspect translucide dû à une carence en chlorophylle, une paroi cellulaire peu développée et une forte teneur en eau (Franck et al., 2004).

De plus, pour faire une étude sur le matériel obtenu, il est à considérer que les conditions de la culture *in vitro* restent loin des conditions naturelles dans le sol, le sol étant un milieu plus complexe en composition et en propriétés.

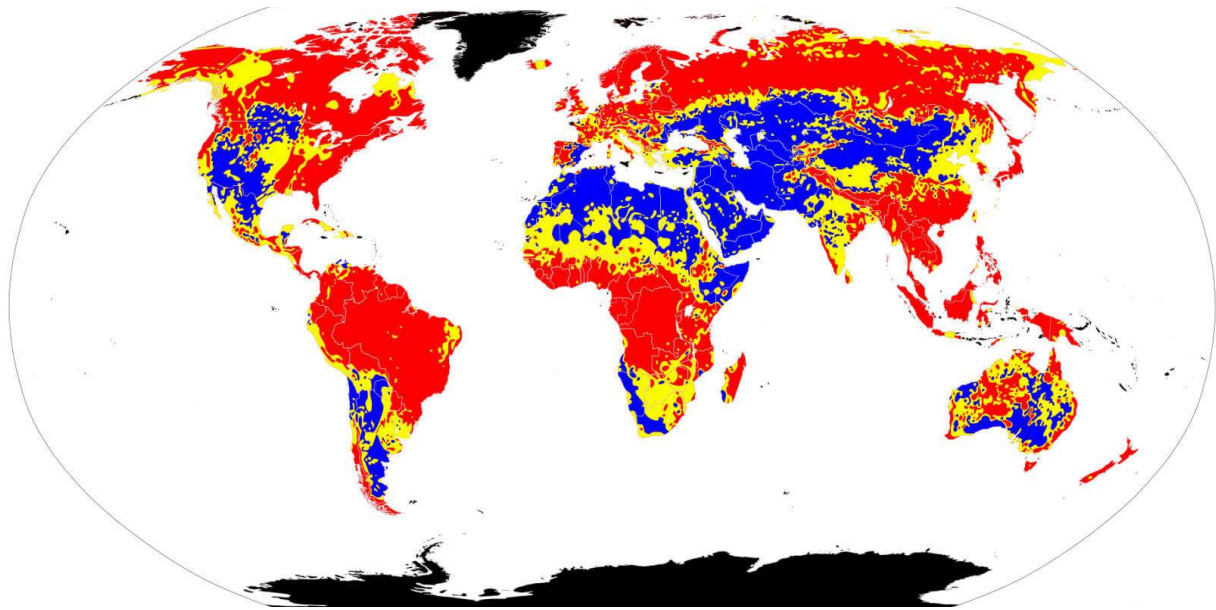
Le sapin de Douglas, étant un résineux typiquement qualifié d'essence de sols acides développé sur roche-mère cristalline, de basse et moyenne altitude est potentiellement exposé à la toxicité de l'aluminium, principal facteur toxique pour les plantes cultivées dans ces conditions. Pour la suite, les mécanismes de stress aluminique ainsi que les mécanismes de défense mis en place par la plante exposée à ce stress sont développés.

## **I.2. Le stress aluminique**

### **I.2.1. L'acidité des sols**

Le phénomène d'acidité des sols est défini par un pH de la solution du sol inférieur à 6,5 (von Uexküll et Mutert, 1995). Un recensement réalisé en 2007 a montré que les sols acides représentent environ 40% des terres dans le monde (FAO, 2007). Ils sont observés dans deux ceintures sur le globe où ils se sont développés sous des régimes d'humidité importante (régimes udiques ou ustiques selon la classification climatique) (Figure 8).

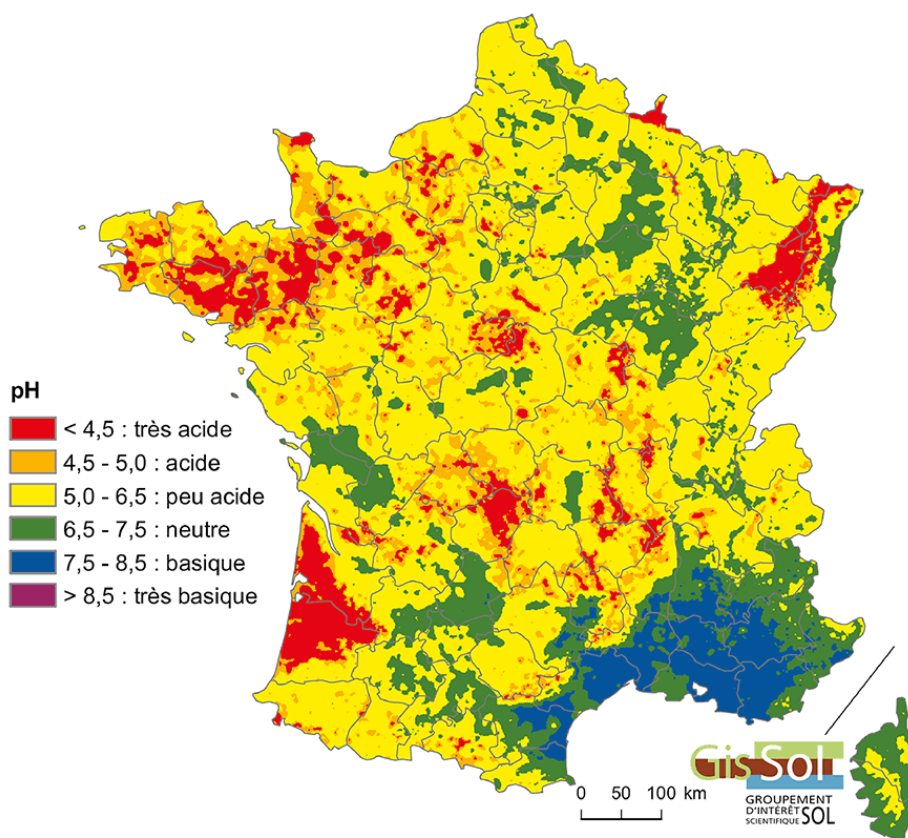




**Figure 8:** Classification des sols dans le monde selon leur pH : sols acides ( $\text{pH} \leq 6,5$  en rouge), au sols neutres ( $6,6 \leq \text{pH} \leq 7,3$  en jaune) puis au sols alcalins ( $\text{pH} \geq 7,4$  en bleu), zones sans données (en noir). (Aquaportal, 2019)

L'acidification des sols se produit dans les zones à forte pluviométrie, supérieure à l'EvapoTranspiration Potentielle (ETP) représentant le maximum d'eau (en mm) que peut évaporer le sol et transpirer la plante. Elle est donnée pour un sol dont la réserve en eau est pleine, et qui recouvert d'une façon homogène, de l'ordre de 1500 mm. La ceinture nordique, au nord de l'Europe sous climat froid et tempéré a produit des sols acides appelés Spodosols, Alfisols, Inceptisols et Histosols. La ceinture tropicale a produit des sols acides appelés Ultisols et Oxisols. Environ 67% des sols acides (2646 M ha) supportent des forêts et des régions boisées et approximativement 18% (711 M ha) sont couverts par une végétation de savane, de prairie ou de steppe. Seulement 4,5% (179 M ha) des sols acides sont en zone arable et employés pour des cultures. Les cultures tropicales pérennes (thé, café, kiwi...) occupent 33 M d'hectares de sols acides. Le pourcentage d'utilisation des sols acides pour des cultures varie selon les régions : il atteint 10,2% en Europe et 8,6% en Asie. Les problèmes d'acidité sont accentués lorsque la faible rentabilité des cultures empêche l'achat et l'utilisation de la chaux (Scott *et al.*, 2000).

En France, cinq grands types de milieux se distinguent selon leur pH, mais la majorité des terres agricoles sont acides (Figure 9) et alors moins fertiles, les rendements et la qualité des récoltes en sont affectés. Les roches mères de nature poreuse favorable à l'entraînement des cations et faiblement pourvus en minéraux sont celles correspondant à une acidification intense. C'est principalement le cas des sols sableux au niveau des Landes de Gascogne et des sols développés dans les grès des Vosges et certaines zones granitiques en limousin au niveau du Plateau de Millevaches (au nord-ouest du Massif Central). Dans le domaine du Massif armoricain et du Massif central, ainsi que l'ouest du piémont pyrénéen l'acidification reste modérée.



**Figure 9:** Classification des sols en France selon leur pH (AgroParisTech-ENGREF, 2008)

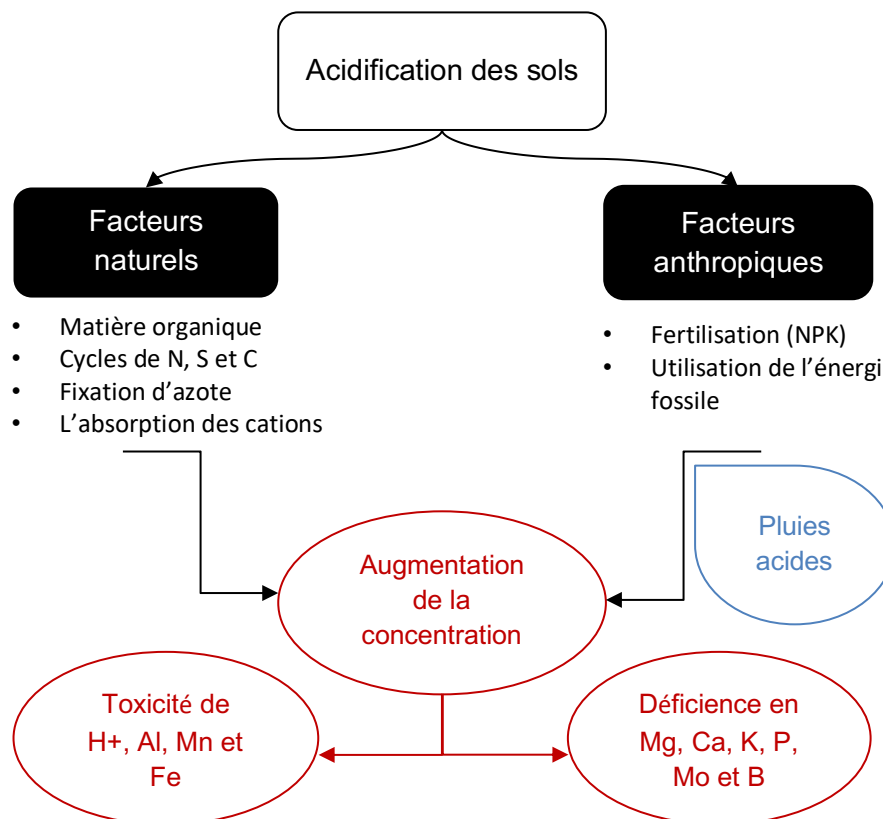
### I.2.2. Effet de la végétation sur le pH du sol

Les litières de résineux sont connues pour se décomposer plus lentement que celles de feuillus (Krishna et Mohan, 2017). Ce phénomène est dû au fait que les aiguilles ont un revêtement cireux qui rend difficile leur décomposition par les bactéries et les champignons. De plus, le pH acide des aiguilles (pH compris entre 3,2 à 3,8) inhibe l'activité des micro-organismes du sol et ralentit encore plus le processus de décomposition. Ce qui entraîne leur accumulation au cours du vieillissement des peuplements résineux, qui s'accompagne d'une acidification par libération d'acides organiques, de  $\text{HNO}_3$  et de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Waters et Jenkins, 1992). Les acides libérés par la décomposition des litières des arbres et de la végétation herbacée provoquent un lessivage en profondeur des cations.

Il a été montré que la culture du sapin de Douglas entraîne des modifications du sol telles que son acidification, son appauvrissement en éléments nutritifs, une augmentation de la concentration de matière organique et de la mobilité de l'aluminium (Guibaud et al., 2000, 1996a). Ces études ont été réalisées sur des échantillons de sols acides du Limousin. Cependant le sapin de Douglas reste moins acidifiant que les autres espèces de conifères comme l'épinette de Norvège (Augusto *et al.*, 1998).

L'effet de la végétation comprend aussi l'absorption excessive de cations par les plantes ainsi que la fixation d'azote par les légumineuses, ce qui augmente la concentration de  $\text{H}^+$  et réduisent le pH du sol.

En plus de la végétation, les facteurs influençant le pH et les propriétés du sol ainsi que les conséquences du phénomène de l'acidification des sols sont multiples ; ils sont résumés dans la figure 10:



**Figure 10:** Facteurs à l'origine de l'acidité des sols et effets de celle-ci sur leur composition minérale et sur la biodisponibilité et l'activité des éléments constitutifs du sol (minéraux, métaux...) (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017).

La plupart des sols acides dans le monde se situent dans les régions tropicales et subtropicales, où l'acidification est due à des facteurs naturels : la matière organique en décomposition et le déséquilibre dans les cycles de N, de S et de C. Cette situation peut être aggravée par la contamination de l'environnement par l'utilisation d'engrais et de substances acidifiantes, ainsi que par l'utilisation de sources d'énergie fossile qui engendre un rejet de  $\text{NO}_2$  et de  $\text{SO}_2$  dans l'atmosphère et qui, en présence d'agents oxydants, donnent naissance à l'acide nitrique et à l'acide sulfurique, augmentant ainsi la précipitation des pluies acides et l'acidification des eaux et des sols. Les sols acides sont généralement caractérisés par une carence en nutriments et plus exposés aux toxicités métalliques (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017).

### I.2.3. Propriétés physicochimiques de l'aluminium

L'aluminium est un élément chimique de symbole Al et de numéro atomique 13. C'est un métal blanc gris, malléable et ductile, de masse atomique 26,98. L'Al élémentaire est un métal léger ayant une forte conductivité électrique (2/3 de celle du cuivre), et une faible densité de  $2,70 \text{ g.cm}^{-3}$ . Son point de fusion est de  $660 \text{ °C}$  et son point d'ébullition de  $2467 \text{ °C}$ . Il est également très résistant à la traction ainsi qu'à la corrosion de l'air et de l'eau. L'Al a une configuration électronique  $ns2np1$  montrant qu'il possède trois électrons sur sa couche périphérique et leur perte donne naissance au cation  $\text{Al}^{3+}$ . Le degré d'oxydation (+III) est le seul que possède l'Al

en solution. L'Al attire fortement les anions à cause de son petit rayon ionique (0,5 Å) et son potentiel d'oxydation élevé (+1,706 V). Du fait de sa grande réactivité, il n'est jamais retrouvé l'aluminium sous sa forme simple à l'état naturel. Il est retrouvé plutôt sous la forme de combinaisons très stables avec d'autres composés pour former des oxydes d'aluminium  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , des hydroxydes d'aluminium  $\text{Al}(\text{OH})_3$  et des silicates d'aluminium  $\text{Al}_2\text{SiO}_5$ .

#### **I.2.4. Origines de l'Al dans l'environnement**

##### **I.2.4.1. Origine naturelle**

L'Al est le métal le plus abondant de l'écorce terrestre et son troisième élément constitutif avec 8% de la composition de la lithosphère après l'oxygène (42 %) et le silicium (28 %) (Panda *et al.*, 2009). Ce métal est rarement rencontré à l'état libre dans la nature. Etant très réactif, l'Al se lie à d'autres éléments du sol. D'où, dans des conditions de pH plus ou moins neutre, les organismes ne sont généralement pas exposés à des concentrations élevées d'Al libre dans le sol, car il se trouve principalement lié aux oxydes (alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) et les hydroxydes provenant essentiellement de la bauxite, mais aussi sous forme d'aluminosilicates comme dans l'argile et les micas. On peut également le trouver sous des formes hydrosolubles complexées aux nitrates, sulfates ou chlorures dans les matières organiques dissoutes.

L'émission par les sols ou les roches de particules contenant de l'Al constitue la principale source naturelle d'exposition à l'Al. Cet Al naturel se transforme en un élément toxique quand les roches, les sols et les sédiments contenant de l'Al sont altérés et érodés (Moldan et Cerny, 1994). L'Al est donc rejeté dans les sols et les cours d'eau, en partie sous forme d' $\text{Al}^{3+}$  selon le pH et la disponibilité d'ions de complexation (Driscoll et Schecher, 1990).

D'autre part, étant donné que l'abaissement du pH augmente la solubilité de l'Al principalement en  $\text{Al}^{3+}$ , les précipitations acides sont aussi responsables de la dissolution, de la mobilisation et du lessivage de l'Al du milieu terrestre.

##### **I.2.4.2. Origine anthropique**

La principale origine anthropique de pollution aluminique des sols est la production et l'utilisation de l'Al et de ses composés. Le rejet des déchets industriels, particulièrement ceux des alumineries, contribue à la pollution des sols et des eaux par l'Al. L'industrie minière, la combustion du charbon, les fonderies et les échappements des automobiles sont également source de la contamination de l'environnement par l'Al.

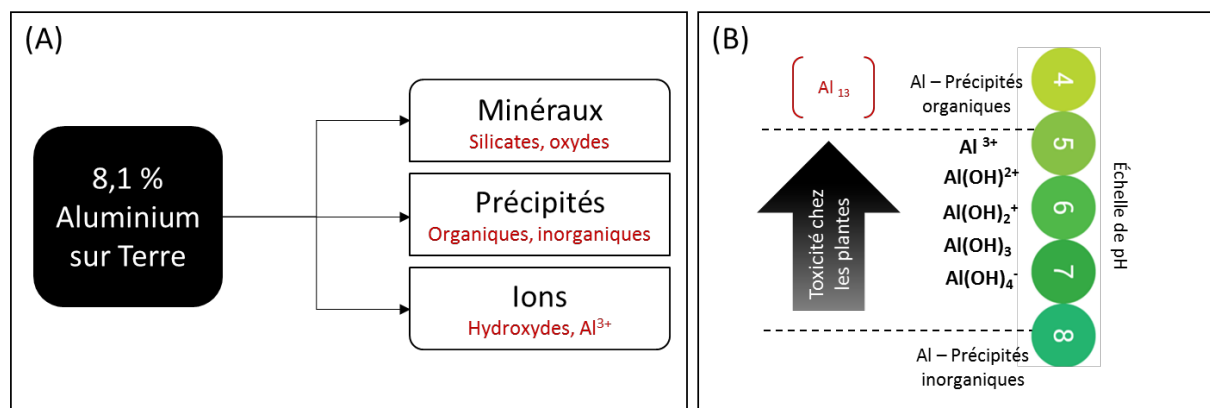
Également, quelques pratiques agricoles sont à l'origine de la pénétration de l'Al dans les milieux naturels, comme l'utilisation de boues d'alun pour l'amendement des sols, l'Al étant contenu essentiellement dans des produits utilisés pour la fabrication des engrais minéraux comme le  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  et le  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  (Germain *et al.*, 1999).

#### **I.2.5. Formes toxiques de l'Al dans les sols**

Pour estimer la toxicité de l'Al, la connaissance de sa spéciation est un préalable nécessaire. En effet, la biodisponibilité de l'Al dépend de la forme sous laquelle il existe. L'aluminium se trouve principalement sous forme minérale (aluminosilicates et oxydes d'aluminium). De plus, on peut trouver de l'aluminium sous forme de précipités organique ou inorganique en fonction du pH du sol (Figure, 11A).

La solubilité de l'Al est faible à pH compris entre 6,5 – 7,5. À pH acide, (pH < 5,5) la spéciation dominante de l'Al correspond à  $Al^{3+}$ . L'ion métallique libre est donc la forme la plus biodisponible et sa toxicité est fonction de sa concentration sous cette forme (Mossor-Pietraszewska, 2001).

La spéciation de l'Al dans la solution de sol dépend du pH du sol et de l'environnement chimique (Figure, 11B). L'Al peut se trouver sous la forme  $Al_{13}$  ; cette forme polynucléaire est obtenue suite à une diminution de la charge des cations  $Al(OH)_2(H_2O)_4^+$  par déprotonation, ce qui permet leur rapprochement et condensation, et initie la formation de dimère ou de trimère, puis de hexamère et enfin la forme tridécamérique, constituée d'un double hexagone d'octaèdres autour d'un anion aluminate central (Bourrié, 2018). La présence de cette forme très toxique dépend de la concentration totale en Al dans le milieu (Bourrié, 1990). Pour ce qui concerne l'aluminium moléculaire (mononucléaire), il existe sous forme de hydroxy-aluminium  $Al / Al(H_2O)_6^{3+}$ ,  $AlOH^{2+}$ ,  $Al(OH)_2^+$ ,  $Al(OH)_3$  et  $Al(OH)_4^-$ . L'aluminium trivalent  $Al^{3+}$  est la forme la plus abondante et celle qui a l'impact le plus important sur la croissance des plantes à pH < 5. À pH > 5–6, les espèces dominantes sont  $AlOH^{2+}$  et  $Al(OH)_2^+$ , qui ne sont pas aussi toxiques pour les plantes que  $Al^{3+}$ . Lorsque le pH est neutre, il se forme de l' $Al(OH)_3$  ( gibbsite) qui est non toxique et relativement insoluble. L'aluminate,  $Al(OH)_4^-$  est l'espèce dominante lorsque le pH est alcalin (pH > 7). (Brautigan *et al.*, 2012; Delhaize et Ryan, 1995; Hagvall *et al.*, 2015; Kinraide, 1991; Kisnieriene et Lapeikaite, 2016).



**Figure 11:** Abondance et spéciation de l'Al dans la croûte terrestre (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017)

(A) Différentes formes d'Al dans le sol. (B) La spéciation de l'Al dans la solution de sol en fonction du pH du sol et de l'environnement chimique

### 1.2.6. Symptômes de la toxicité de l'Al chez les plantes

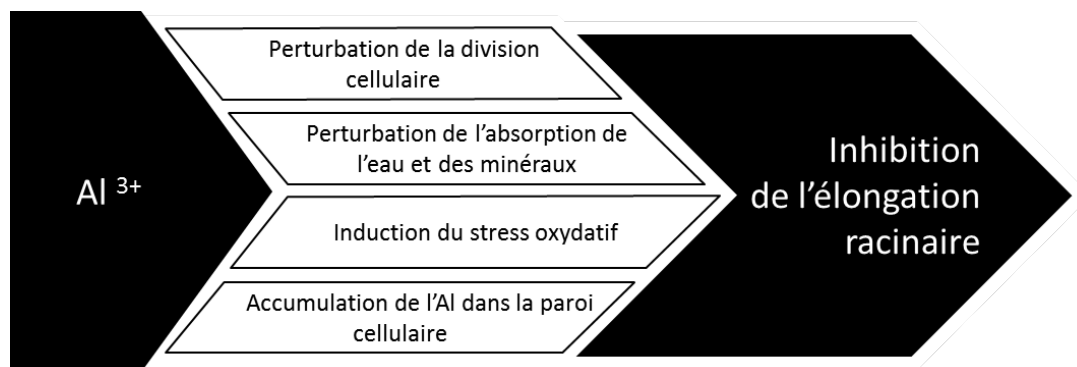
Malgré l'abondance de l'Al dans les sols, aucune preuve expérimentale d'un rôle biologique n'a été avancée (Poschenrieder *et al.*, 2008). Chez les plantes, l'Al peut avoir un effet bénéfique ou toxique en fonction de sa concentration dans le milieu, de sa forme chimique, des conditions de croissance et des espèces végétales (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017).

La mobilisation de l'Al est la conséquence directe de l'acidité des sols : l'Al dans sa forme mobile étant un élément potentiellement toxique vis-à-vis des communautés terrestres. Cependant, il est avéré qu'une exposition à  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  d'Al, peut stimuler la croissance chez le riz (*Oryza sativa*), une plante adaptée aux sols acides (Osaki *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que certains végétaux, comme le théier *Camellia sinensis*, sont capables d'absorber, sans symptômes des quantités très importantes d'Al (> 265 ppm) et que la croissance des racines est même stimulée en présence d'Al, tandis qu'en l'absence du métal, la croissance

de la racine et de la plante est retardée (Fung *et al.*, 2008). De même, il a été montré que l'Al est essentiel pour la croissance de l'arbuste de Rhododendron de Malabar (*Melastoma malabathricum*) (Watanabe *et al.*, 2006).

Mais, pour la plupart des modèles végétaux, le premier symptôme de toxicité aluminique est l'inhibition de l'élongation racinaire à la suite d'une perturbation de la division cellulaire (Delhaize et Ryan, 1995). Étant donné que l'Al est un élément hautement réactif, il va interagir directement au niveau de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique (Jones *et al.*, 2006; X. Zhang *et al.*, 2007), ce qui perturbe le transport des ions et entraîne un mauvais équilibre des éléments nutritifs comme le magnésium et le calcium (Bose *et al.*, 2011).

Les effets observés à l'échelle physiologique sont certainement le résultat de nombreux effets toxiques de l'Al à l'échelle cellulaire et moléculaire (Figure 12).



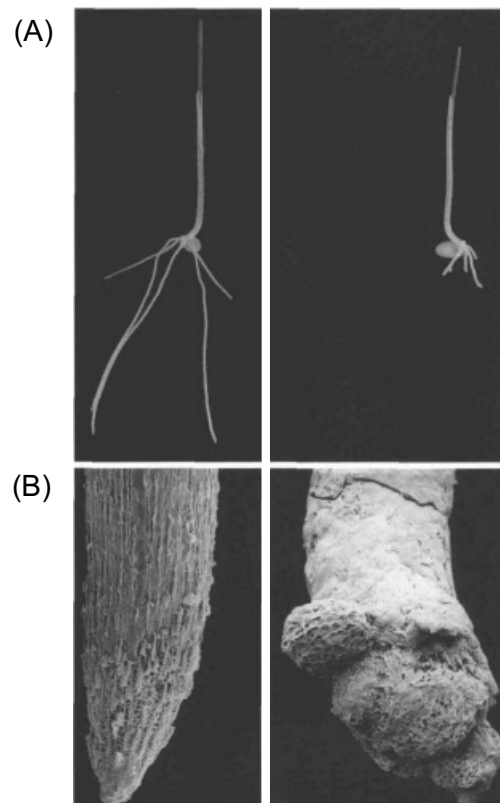
**Figure 12:** Les effets de l'exposition des plantes Solanaceae au stress dû à l'aluminium d'après (He *et al.*, 2019)

### I.2.6.1. Effet sur les mécanismes physiologiques de la plante

#### I.2.6.1.1. Inhibition de la croissance racinaire

Le premier symptôme de la toxicité aluminique observé chez les plantes est l'inhibition de la croissance racinaire, les racines étant en contact direct avec les fortes concentrations en Al<sup>3+</sup> dans le sol (Dipierro *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que l'exposition à l'Al induit un ralentissement et/ ou une inhibition de l'élongation racinaire. Cultivées en hydroponie, des plantules de blé (*Triticum aestivum* L.) montrent une inhibition de croissance des racines lorsque celles-ci sont exposées à des solutions minérales contenant de l'AlCl<sub>3</sub>, ceci en seulement quelques minutes (Figure 13A) (Ryan *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2011)

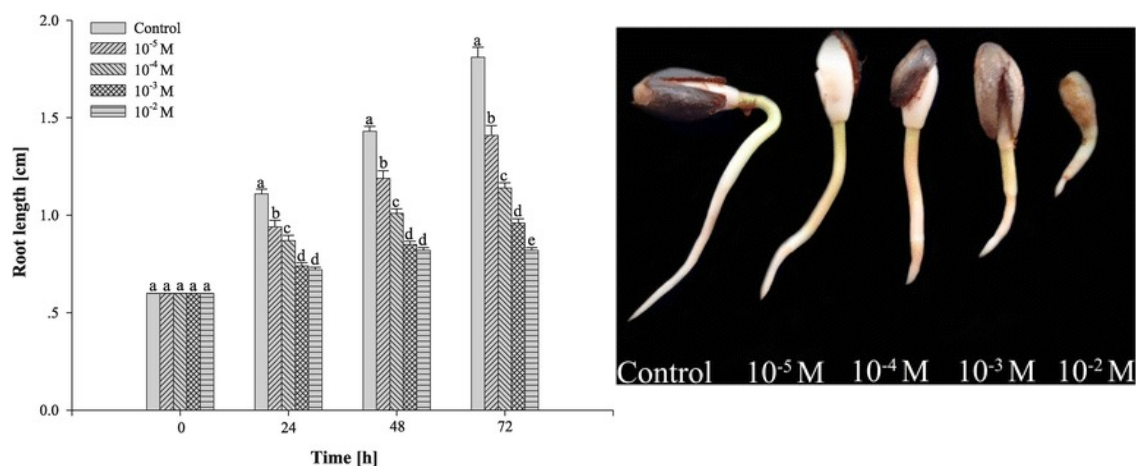
Des expositions plus longues ont entraîné un épaissement des racines, une coiffe radiculaire endommagée et des lésions dans les tissus épidermiques et corticaux dans la zone proche apicale (Figure 13B). Le système racinaire est réduit et endommagé comparé aux conditions témoins (sans Al), ce qui limite l'absorption de l'eau et de nutriments.



**Figure 13:** Effet de la toxicité  $Al^{3+}$  sur les racines de deux lignées de blé, ET8 et ES8, qui diffèrent par la résistance à  $Al^{3+}$ . **(A)** Effet sur la croissance des racines **(B)** Effet sur la structure de l'apex racinaire en Microscopie électronique à balayage. Les plantes ont été cultivées pendant 4 jours dans un milieu de culture à pH 4,3 contenant  $5 \mu M$  de  $AlCl_3$ . La lignée résistante (ET8, à gauche) n'est pas affectée par le traitement alors que la lignée sensible (ES8, à droite) montre une elongation moins importante au niveau des racines ainsi que des lésions considérables de leurs tissus et une déformation de leur pointe (Reproduit de Delhaize et Ryan, 1995).

La pointe racinaire, et plus précisément la zone méristématique située sous la coiffe, constitue le lieu privilégié de l'action de l'Al. L'exposition d'une racine entière de maïs à  $Al^{3+}$ , exceptée des 5 mm apicaux, n'a pas d'incidence sur la croissance à court terme (Ryan *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2011). Dans cette région, la zone située entre les zones méristématiques et d'elongation (zone de transition distale) semble être la partie la plus sensible de la racine (Sivaguru *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2011).

Les effets de l'Al sur la croissance des racines du conifère *Pinus massoniana* ont varié en fonction des concentrations de solutions de  $AlCl_3$  utilisées (Zhang *et al.*, 2014) (Figure 14). L'Al a eu un effet inhibiteur sur la croissance des racines à toutes les concentrations ( $10^{-5}$  -  $10^{-2}$  M) utilisées pendant toute la durée du traitement (72 h). À  $10^{-3}$  -  $10^{-2}$  M Al, la longueur de la racine était fortement diminuée après 24 h de traitement.



**Figure 14:** Effets des différentes concentrations en Al sur la croissance de *Pinus massoniana*. (A) Les effets sur la longueur des racines de *P. massoniana* stressés pendant 24, 48 et 72 h. (B) Les effets sur la croissance générale de *P. massoniana* durant le traitement à l' $\text{AlCl}_3$  pendant 72 h (Zhang *et al.*, 2014).

### I.2.6.1.2. Effets sur la morphologie de la partie aérienne

Bhalerao et Prabhu (2013) ont rapporté que la toxicité aluminique chez les plantes telles que le maïs (*Zea mays L.*) et le sorgho (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) peut entraîner des perturbations dans l'absorption et le transport de certains nutriments majeurs, dont le P, le K, Ca et Mg (Prabhu et Bhalerao, 2013). Les symptômes ne sont donc pas exclusivement racinaires. Les symptômes foliaires ressemblent à ceux d'une carence minérale (Emamverdian *et al.*, 2015), essentiellement une carence en calcium (Bian *et al.*, 2013) et une carence en phosphore (Panda, 2015) qui s'expriment par un retard de croissance des feuilles, une décoloration des tiges des feuilles et des nervures des feuilles, qui prennent une couleur violette, suivie du jaunissement de ces dernières ainsi que des extrémités mortes des feuilles (Raman et Zhou, 2006). Cette évolution de la couleur, du vert au violacée, serait associée à une déficience en P, cette déficience étant un facteur d'activation des gènes de biosynthèse des anthocyanes (Li *et al.*, 2014). De plus, il a été observé une apparition de petites taches nécrotiques au bord des jeunes feuilles et une chlorose au niveau des feuilles les plus âgées (Steiner *et al.*, 2012).

Enfin, le traitement à 1 mM d' $\text{AlCl}_3$  a engendré une perte significative de 50% de la biomasse des feuilles chez une espèce sensible de riz (*Oryza sativa L.*) (Júnior *et al.*, 2014).

### I.2.6.1.3. Perturbation de la machinerie photosynthétique

Une fois absorbé par les racines, l' $\text{Al}^{3+}$  est transporté vers les feuilles où il va être accumulé dans les cellules photosynthétiques et peut être ainsi localisé spécifiquement dans les chloroplastes causant des altérations de la machinerie photosynthétique (Li *et al.*, 2012). Ces altérations sont expliquées par une désorganisation structurale des chloroplastes incluant des dommages aux membranes thylakoïdales (Azmat et Hasan, 2008) une diminution de la teneur en chlorophylles (Chen *et al.*, 2005) et une fermeture des stomates. La conséquence ultime est une diminution de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  dans les feuilles (Silva, 2012).

L'exposition à une concentration d'Al supérieure à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  a diminué les concentrations de chlorophylle et de caroténoïdes dans les clones de pommes de terre sensibles à l'Al (Tabaldi



*et al.*, 2007). La réduction de la concentration de chlorophylle observée pour les clones de pomme de terre *Macaca*, *S. microdontum* et Dakota Rose indique un dommage oxydatif induit par l'exposition à l'Al, provoquant une l'inhibition de l'acide aminolévulinique déshydratase, une enzyme importante dans la biosynthèse de la chlorophylle (Pereira *et al.*, 2006).

Le rôle principal reconnu des caroténoïdes soit d'agir comme pigment photo-protecteur pour la photosynthèse (Larson, 1988). Les caroténoïdes contribuent à la dissipation de l'excès d'énergie de la chlorophylle excitée et l'élimination des ROS (Lawlor, 2001). La diminution de la concentration des caroténoïdes a été aussi montrée chez la myrtille arbustive (*Vaccinium corymbosum* L.), à la suite d'une exposition à 200  $\mu\text{M}$  d'Al (Cárcamo *et al.*, 2019). Cette diminution conduit donc à l'inhibition des mécanismes de dissipation de l'excès de l'énergie.

#### **I.2.6.1.4. Inhibition de l'absorption en eau et en minéraux**

L'exposition à l'Al affecte la croissance des plantes en perturbant l'absorption minérale et hydrique au niveau des racines. Ce métal n'agit pas uniquement sur l'absorption et des nutriments essentiels (Ca, Mg, K, P et Fe), mais aussi sur leur transport et leur utilisation (Tamfuh *et al.*, 2017). Il entraîne alors une moins bonne assimilation de ces derniers suite à l'effet de compétition et donc des carences (Steiner *et al.*, 2012).

Plusieurs symptômes de la toxicité aluminique sont liés à des carences en minéraux, ceci en limitant leur absorption par les racines, ou en s'y liant pour en limiter la disponibilité dans la plante.

L'Al inhibe nettement l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{NO}_3^-$  par les racines (Antonio *et al.*, 2013). Il est à noter que le  $\text{Ca}^{2+}$  est l'élément dont l'absorption est la plus inhibée par l' $\text{Al}^{3+}$ .

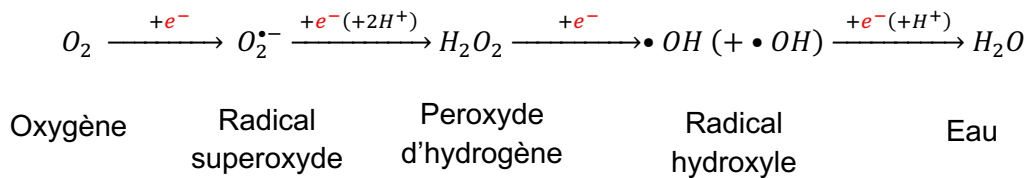
L'Al a tendance à se lier au phosphore (P) avec pour conséquence de le rendre moins disponible dans les solutions de sol et sur les surfaces des racines créant ainsi un déficit en P nécessaire pour la croissance des plantes (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Une carence en Fe a été précédemment décrite par Clark *et al.* (1981) suite aux symptômes observés au niveau des feuilles de sorgho. Cependant, le dosage de Fe dans les feuilles présentait des concentrations de Fe aussi élevées et parfois plus élevées que celles des plantes témoins. La présence des symptômes de carence en Fe malgré les concentrations en Fe équivalentes à celles de la condition témoin, suggère qu'il s'agit d'un problème de disponibilité de l'élément Fe et non pas de sa quantité (Clark *et al.*, 1981).

Le transport de l'eau dans la plante est assurée par le xylème, qui est le tissu central de l'architecture hydraulique (Solari *et al.*, 2006). Il a été montré que l'Al peut affecter la structure du xylème en réduisant la taille des vaisseaux conducteurs, leur densité ainsi que leur conductivité hydraulique, altérant ainsi le fonctionnement des mécanismes assurant la nutrition hydrique de la plante (Batista *et al.*, 2013).

#### **I.2.6.2. Effet à l'échelle moléculaire et cellulaire**

##### **I.2.6.2.1. Induction d'un stress oxydatif**

Les espèces réactives d'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) sont souvent des radicaux libres possédant un électron non apparié sur leur couche externe qui leur confère une haute réactivité. Au niveau des mitochondries, l'oxygène moléculaire peut subir un gain d'électrons aboutissant à la formation des ROS selon la réaction suivante :

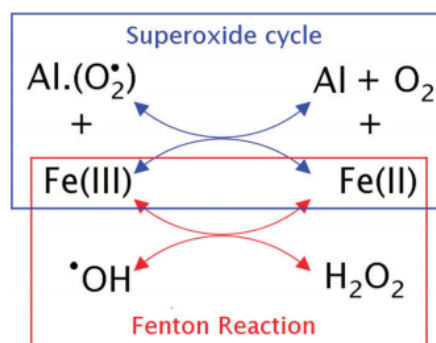


Parmi les ROS, figurent les radicaux superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), et hydroxyle ( $\bullet OH$ ) ainsi que des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Choudhury *et al.*, 2007).

Lors des procédés de génération d'énergie (respiration au niveau des mitochondries et photosynthèse au niveau des chloroplastes), une production normale d'espèces réactives d'oxygène peut avoir lieu quand les cytochromes de la chaîne respiratoire effectuent une réduction incomplète de l'oxygène (Navrot *et al.*, 2007).

La similitude de  $H_2O_2$  avec  $H_2O$  facilite son passage au travers des membranes *via* les aquaporines (Bienert *et al.*, 2007, 2006).  $H_2O_2$  conduit aussi à l'apparition du radical hydroxyle  $\bullet OH$  (Wardman et Candeias, 2013). Ce radical est un oxydant très puissant qui peut provoquer la dégradation des molécules organiques qui se trouvent à proximité du lieu de sa production comme c'est par exemple décrit dans le cas de l'ADN (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Il réagit également avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique (Montillet *et al.*, 2005). L'effet majeur de la production des ROS sur la structure et la fonction de la membrane plasmique est la peroxydation lipidique (Blokhina *et al.*, 2003). Il est largement rapporté que les ROS induisent une peroxydation des lipides de la membrane provoquant des dommages à sa structure et, finalement, à ses fonctions.

Une production excessive de radicaux libres est observée à la suite d'un traitement par l'Al et expliquée par des mécanismes relativement complexes. Dans les cellules de tabac BY-2, l'Al induit une production importante des ROS, qui à leur tour initient la peroxydation des lipides membranaires (Panda, 2015) ce qui entraîne une altération de la perméabilité de la membrane et finalement une mort cellulaire de type apoptose (Ono *et al.*, 1995) (Zhan *et al.*, 2013). Dans ce contexte, les effets nocifs de l'Al sont fortement renforcés par la présence de  $Fe^{2+}$  (Yamamoto, 2002; Yamamoto *et al.*, 1997). En effet, des mécanismes réactionnels de type Fenton ont lieu pour produire davantage de radicaux libres selon le mécanisme décrit par la figure 15. L'Al active la réaction de Fenton de façon complémentaire au Fe (Mujika *et al.*, 2011). Mujika et ses collaborateurs (2018) suggère que cette activité pro-oxydante conduit à la formation d'un complexe aluminium-superoxyde, qui augmente la durée de vie de l'espèce radicalaire superoxyde (Mujika et Torre, 2018).



**Figure 15:** Mécanisme de la réaction de Fenton impliquant l'aluminium dans la production des ROS selon (Mujika et Torre, 2018)

Dans de nombreuses études portant sur la peroxydation lipidique par Al, le dosage du malondialdéhyde (MDA), un produit de la peroxydation lipidique, a été utilisé comme indicateur de la peroxydation lipidique. Le suivi de la concentration en MDA peut en effet préciser l'intensité du stress oxydatif. La concentration de MDA dans les racines et les parties aériennes de plantules d'orge a considérablement augmenté après l'exposition des plantules à 100  $\mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$ , indiquant une augmentation de la peroxydation des lipides et, par conséquent, la présence toxique des ROS (Guo *et al.*, 2004).

Les sites actifs des protéines à fonction enzymatique peuvent aussi être altérés et finalement inactivés par les radicaux hydroxyle, en raison de la sensibilité des acides aminés à l'attaque par ces radicaux (Durand *et al.*, 2009).

#### 1.2.6.2.2. Modification du cytosquelette

Il a été suggéré que l'Al interagit directement et / ou indirectement avec les facteurs participant à l'organisation du cytosquelette, tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Jones *et al.*, 1998),  $\text{Mg}^{2+}$  et la calmoduline (Grabski *et al.*, 1998), le potentiel électrique de surface cellulaire (Takabatake et Shimmen, 1997), la formation de callose (Horst et Schmohl, 1997) et la composition lipidique de la membrane plasmique (Zhang *et al.*, 1997). L'Al est donc susceptible d'altérer le fonctionnement de certains processus métaboliques et physiologiques ayant lieu à la surface ou à travers la membrane plasmique.

Dans leurs travaux sur le soja, Grabski et Schindler suggèrent qu'une réaction majeure des cellules végétales à l'Al est une augmentation de la tension dans le réseau d'actine (Grabski et Schindler, 1995). Ce phénomène peut s'expliquer par le remplacement de  $\text{Mg}^{2+}$  par  $\text{Al}^{3+}$  dans les complexes [ions métalliques-ATP] (Martin, 1992).

#### 1.2.6.2.3. Modification des propriétés de la paroi cellulaire

L'Al a aussi pour effet d'augmenter la rigidité de la paroi cellulaire en réticulant les pectines. Ainsi l'inhibition du transport de certains cations ( $\text{Ca}^{2+}$  en particulier) résulte du blocage par l'Al des canaux spécifiques d'absorption de ces ions (Huang *et al.*, 1992). La diminution de l'influx de Ca et l'adsorption de l'Al sur les sites réactifs (sites spécifiques de Ca) de la calmoduline (CaM, calcium-modulated protein, une protéine dont la liaison avec le  $\text{Ca}^{2+}$  forme un complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM permettant l'activation, par changement de conformation, de nombreuses protéines) provoquent des changements de la conformation de cette protéine et une altération de son activité.

Une diminution de l'extensibilité pariétale peut aussi résulter de la diminution de la synthèse de constituants de la paroi cellulaire (Barceló et Poschenrieder, 1990). Certains auteurs estiment aussi que la chélation de l'Al par les molécules de la paroi pourrait contribuer à la diminution de l'extensibilité pariétale, affectant ainsi l'élongation cellulaire (Zheng *et al.*, 2014).

#### **I.2.6.2.4. Inhibition de la division cellulaire**

La croissance de la plante est expliquée par le développement des tissus, et donc par le processus de division puis d'élongation cellulaire. L'exposition à l'Al peut engendrer une inhibition de la division cellulaire, une diminution de l'élongation cellulaire ou les deux phénomènes à la fois (Mossor-Pietraszewska, 2001).

L'auxine agit en synergie avec la cytokinine pour contrôler les divisions cellulaires des parties aériennes, tandis que les deux hormones agissent de manière antagoniste pour maintenir le méristème de la racine (Yang *et al.*, 2017). Il a été aussi prouvé que l'exposition à des concentrations toxiques en Al diminue la synthèse et le transport des cytokinines, qui sont des phytohormones activatrices de la division cellulaire.

Certains travaux ont indiqué que chez les plantes sensibles, la division des cellules méristématiques de la racine a été rapidement inhibée par Al, ce qui affecte immédiatement l'élongation des racines (Zhang *et al.*, 2014). Il a été suggéré que l'Al interfère avec les filaments d'actine, ces filaments jouant un rôle précoce dans la fixation de la bande de pré-prophase pour les cellules prêtes à subir la division cellulaire et entrer dans le cycle cellulaire (Verma *et al.*, 2001). En raison de la toxicité de l'Al, l'élongation des racines est réduite suite à une réduction de l'activité mitotique (Roy *et al.*, 1988).

Chez *Arabidopsis thaliana*, une inhibition de l'élongation racinaire en présence de l'Al<sup>3+</sup> a été reportée (Sun *et al.*, 2010). Cette inhibition a été liée à une inhibition de l'élongation cellulaire par perturbation de la distribution de l'auxine en altérant l'expression des gènes *PIN* impliqués dans le transport de cette phytohormone contrôlant l'élongation cellulaire. En plus de l'auxine, la pression de turgescence est un autre facteur contrôlant l'élongation cellulaire. Il s'agit de la force exercée par l'eau sur les parois cellulaires, et elle est fonction de la différence entre les potentiels hydriques interne et externe (Hopkins, 2003). Il a été décrit que l'Al affecte l'absorption hydrique. L'Al diminue par conséquent la turgescence, ce qui entraîne une diminution de l'élongation cellulaire.

Pour faire face à la toxicité aluminique, les plantes mettent en place plusieurs mécanismes de résistance/tolérance qui seront détaillés dans la partie suivante.

### **I.3. Formes de résistance / tolérance des plantes vis-à-vis du stress aluminique**

Pour se défendre, et afin de détoxifier l'Al ou le rendre moins disponible, certaines plantes mettent en place des mécanismes spécifiques de résistance/tolérance. Selon Ryan et Delhaize, il est plus juste d'utiliser l'expression « résistance à l'Al » pour décrire la propriété des plantes capables de maintenir leur croissance en limitant les effets biologiques causés par un environnement riche en aluminium (Ryan et Delhaize, 2010).

On distingue essentiellement deux stratégies différentes :

- Des mécanismes d'exclusion localisés au niveau de l'apoplasme qui consistent à éviter ou diminuer l'absorption de l'aluminium.
- Des mécanismes qui permettent l'accumulation voire l'hyperaccumulation de l'Al à l'intérieur de la cellule grâce à des processus de compartimentation ou de complexation.

De plus, pour préserver les processus métaboliques de la photosynthèse, certaines plantes ont tendance à diminuer la vitesse de translocation du métal vers les parties aériennes.

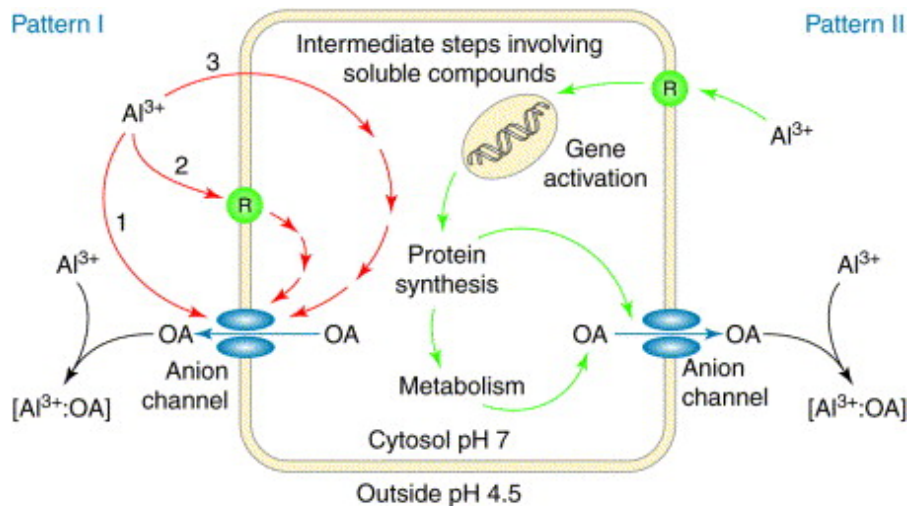
### **I.3.1. Mécanismes d'exclusion**

Les mécanismes d'exclusion permettent de limiter l'absorption de l'Al dans la cellule, l'excluant ainsi des tissus de la plante. Ces mécanismes se déroulent essentiellement au niveau racinaire et mettent en jeu plusieurs processus.

#### **I.3.1.1. Excrétion des acides organiques**

L'exclusion de l'Al dans les racines par l'excrétion d'acides organiques chélatant ce métal est le mécanisme de résistance / tolérance le plus étudié.

Ces acides organiques, dans les conditions du pH du cytoplasme, sont excrétés sous leur forme anionique. Ils peuvent alors se complexer à l' $Al^{3+}$  toxique présent au niveau de la rhizosphère, formant des complexes stables et non toxiques. Plusieurs études ont confirmé que l'exposition des plantes ligneuses à l' $Al^{3+}$  conduit à une excrétion plus importante des acides organiques selon l'espèce. Cette excrétion est le résultat de l'activation des canaux anioniques de la membrane plasmique par plusieurs mécanismes (Figure 16). L'Al peut se lier directement à la membrane pour activer les protéines membranaires ou les récepteurs associés, ou bien activer les canaux indirectement *via* des messagers secondaires (Ma *et al.*, 2001; Pineros *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2011). Les protéines membranaires les plus importantes dans ce mécanisme sont les canaux anioniques de chlorure et les transporteurs à *ATP Binding Cassette* dits transporteurs ABC (Panda *et al.*, 2009).

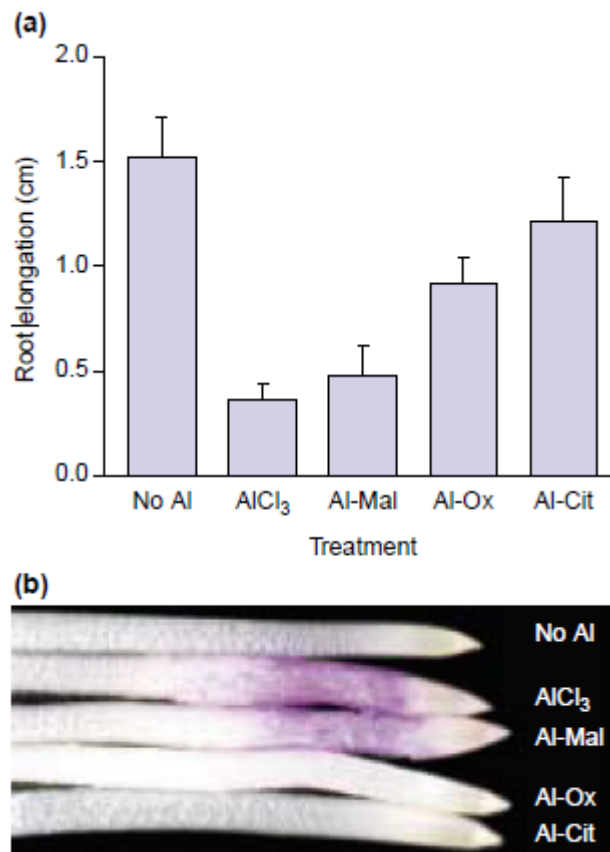


**Figure 16:** Modèles de la sécrétion d'acides organiques (OA) stimulée par l'aluminium (Al) à partir des racines de la plante (Ma *et al.*, 2001).

Pour les réponses de type *Pattern I*, l'Al active un canal anionique sur la membrane plasmique qui est perméable aux acides organiques anioniques. Cette stimulation peut se produire de trois manières : (1) l'Al<sup>3+</sup> interagit directement avec la protéine du canal pour déclencher son ouverture ; (2) l'Al<sup>3+</sup> interagit avec un récepteur spécifique (R) à la surface de la membrane ou avec la membrane elle-même pour déclencher une cascade de messagers secondaires qui active ensuite le canal ; ou (3) Al<sup>3+</sup> entre dans le cytoplasme et active le canal directement ou indirectement via des messagers secondaires. Dans la réponse de type *Pattern II*, l'Al interagit avec la cellule, peut-être *via* une protéine réceptrice (R) située sur la membrane plasmique, pour activer la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de biosynthèse d'acides organiques ou de leur transport à travers la membrane plasmique. Les acides organiques anioniques forment un complexe stable avec l'Al<sup>3+</sup>, détoxifiant ainsi Al<sup>3+</sup> dans la rhizosphère.

Cette capacité à sécréter des acides organiques, confère aux plantes une résistance au stress métallique. Par exemple, la tolérance d'*Arabidopsis thaliana* au stress aluminique a été améliorée par activation de la biosynthèse de citrate et de malate à travers une surexpression des gènes de citrate synthase et de malate déshydrogénase (Anoop *et al.*, 2003). Mais l'exemple le plus convaincant traite des génotypes de deux espèces de blé *Triticum aestivum L.* ayant deux niveaux de résistance différents vis-à-vis à l'Al exprimés par le locus (Alt1) (Delhaize *et al.*, 1993). Dans ces travaux, Delhaize et ses collaborateurs ont montré qu'après 15 minutes d'exposition à 200 µM Al, il y a sécrétion d'acide malique, que cette sécrétion croît d'une façon linéaire au cours des 24 h d'exposition, et que les génotypes tolérants à l'aluminium excrétaient 5 à 10 fois plus d'acide malique que les génotypes sensibles.

Les acides les plus couramment détectés sont le citrate, l'oxalate et le malate (Brunner et Sperisen, 2013). Cependant, l'implication de ces acides organiques dans le processus de chélation reste variable d'un acide organique à un autre. L'oxalate et le citrate semblent avoir un pouvoir chélatant de l'Al<sup>3+</sup> plus important que le malate, et donc plus impliqué dans les mécanismes d'exclusion dans le cas d'une exposition au stress aluminique (Ma *et al.*, 2001) (Figure 17).



**Figure 17:** Implication des acides organiques dans la détoxification de l'Al (Ma *et al.*, 2001). Une variété de blé sensible à l'Al, qui n'excrète que petites quantités de malate en présence d'Al a été exposée à une solution de CaCl<sub>2</sub> à 0,5 mM (pH 4,5) témoin ou la même solution contenant 10 µM d'AlCl<sub>3</sub>, Al-malate (Al-Mal), Al-oxalate (Al-Ox) ou Al -citrate (Al-Cit) à un ratio de 1:1, respectivement. **(a)** Allongement des racines pendant une exposition de 20 h. **(b)** accumulation d'aluminium (couleur rose) colorée par une solution à 0,1% d'Eriochrome cyanine R. L'absence de couleur indique que l'acide organique a chélaté l'Al et a empêché son accumulation dans les pointes racinaires. Les différentes capacités des acides organiques à détoxifier l'Al sont en corrélation avec leurs constantes de stabilité avec l'Al.

L'oxalate est un acide impliqué dans les mécanismes de régulation de Ca<sup>2+</sup>, de balance ionique et de détoxification des métaux. Le citrate et le malate sont quant à eux présents dans toutes les cellules de la plante, et sont impliqués dans le cycle de Krebs (Franceschi et Nakata, 2005; Rahman et Kawamura, 2011). Selon Hue et ses collaborateurs, le citrate est l'acide organique ayant la plus forte affinité à l'Al<sup>3+</sup>, suivi par le malate et le succinate (Hue *et al.*, 2010).

Les quantités d'acides organiques sécrétées suite à l'exposition à l'Al, varient selon la plante et selon l'espèce. Chez certaines espèces, la synthèse d'un seul acide organique est activée en réponse au stress aluminique. L'oxalate est par exemple l'acide organique essentiellement excrété par le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000). D'autres espèces excrètent plus qu'un acide organique à la fois, en combinant citrate, malate, oxalate et succinate comme dans le cas de *Populus tremuloides* (Naik *et al.*, 2009), ou citrate et malate comme chez le pamplemousse *Citrus grandis* (Yang *et al.*, 2011).

Dans les travaux de Qin et ses collaborateurs, l'exposition d'une espèce de peuplier (*Populus tremula*) *in vitro* à une gamme de concentration d'Al<sup>3+</sup> allant jusqu'à 1 mM induit une excrétion

de citrate et d'oxalate qui augmente avec l'élévation de la concentration en  $Al^{3+}$  dans le milieu de culture (Qin *et al.*, 2007). Dans les mêmes conditions, des résultats similaires ont été observés sur deux conifères *Cryptomeria japonica* et *Pinus thunbergii* (Hirano *et al.*, 2012). Pour le premier, l'excrétion d'oxalate est croissante, alors qu'aucune variation significative de l'excrétion de citrate n'est détectée. Dans le cas du deuxième, une augmentation de l'excrétion de citrate et d'oxalate a été signalée. (Tableau 1).

**Tableau 1:** Excrétion racinaire d'acides organiques chez *Cryptomeria japonica* ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}\text{MF}$ ), *Pinus thunbergii* ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}\text{MF}$ ), et *Populus tremula* ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ ) après une exposition à des concentrations croissantes en  $Al^{3+}$  (d'après Hirano *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2007).

Tree species	$Al^{3+}$ concentration ( $\mu\text{M}$ )	Citrate	Malate	Oxalate
<i>Cryptomeria japonica</i>	0	0.08 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>
	100	0.39	0.14	0.49
	500	0.41	0.14	0.75
	1000	0.38	0.13	0.70
	<i>P</i> value <sup>b</sup>	ns	ns	*
<i>Pinus thunbergii</i>	0	0.03 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.47
	100	0.10	0.03 <sup>a</sup>	1.08
	500	0.10	0.03 <sup>a</sup>	2.93
	1000	0.11	0.03 <sup>a</sup>	4.04
	<i>P</i> value	*	ns	**
<i>Populus tremula</i>	0	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.1
	50	0.8	0.0 <sup>a</sup>	4.5
	100	1.9	0.0 <sup>a</sup>	3.9
	200	18.4	0.0 <sup>a</sup>	5.6
	500	20.5	0.0 <sup>a</sup>	25.7
	1000	20.3	0.0 <sup>a</sup>	18.8
	<i>P</i> value	***	ns	***

<sup>a</sup> Below detection limit.

<sup>b</sup> ANOVA: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; ns, not significant.

Cependant, plusieurs études n'ont pas confirmé ce phénomène présentant l'excrétion d'acides organiques comme étant le mécanisme de résistance à l'Al par excellence. En effet, certains travaux montrent que des plantes peuvent résister à l'Al sans présenter d'excrétion accrue d'acides organiques comme pour une plante graminée herbacée, *Bracharia decumbens* (Wenzl *et al.*, 2001). D'autres, prouvent que certaines espèces ayant un fort pouvoir d'excrétion d'acides organiques face au stress aluminique sont malgré cela sensibles à l'Al (Kochian *et al.*, 2004). C'est le cas en particulier du riz et du soja (Nian *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004).

Ceci suggère que, évidemment, d'autres mécanismes de résistance sont mis en place par la plante.

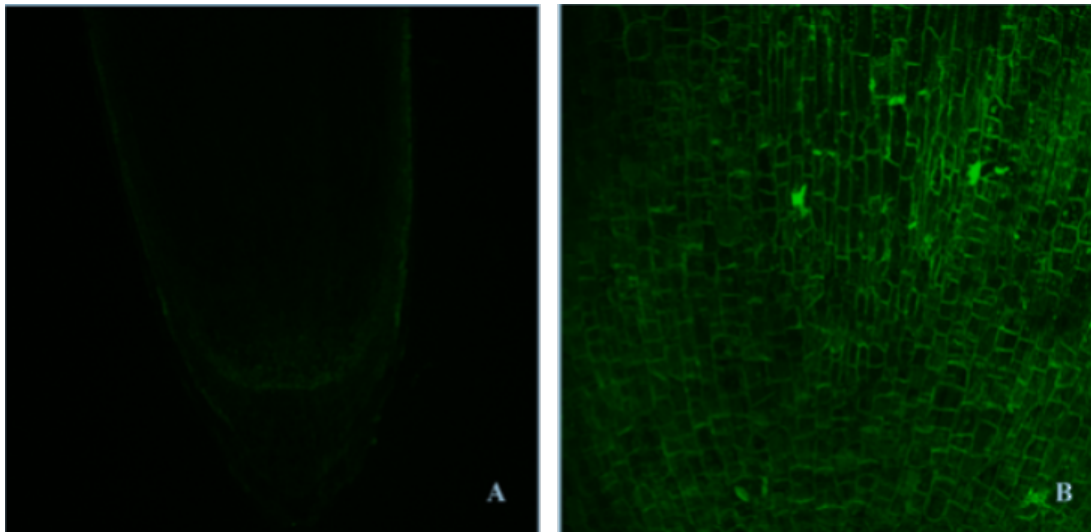


### I.3.1.2. Modification du pH de la rhizosphère

Peu d'études traitent de cette stratégie. Cette hypothèse repose sur l'augmentation du pH de la rhizosphère afin de diminuer l'activité de l'ion  $Al^{3+}$  autour de la pointe racinaire. Ce phénomène a été observé dans une étude sur le mutant *Arabidopsis alr-104*, là où un influx d'ions  $H^+$  vers la pointe racinaire a été observé (Bose *et al.*, 2010; Degenhardt *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont été aussi observés sur le blé (Miyasaka *et al.*, 1989). Cet influx permet d'aller vers des pH moins acides et de changer donc la spéciation d'Al dans la région racinaire afin de limiter la présence des formes libres absorbables par la plante et par suite limiter leur toxicité. La forme la plus toxique  $Al^{3+}$  a tendance à disparaître dans ces conditions au profit de la formation de  $AlOH^{2+}$ .

### I.3.1.3. La paroi cellulaire : site de fixation de l' $Al^{3+}$

Au niveau cellulaire, la paroi est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale et donc la première barrière contre les agressions extérieures (Wang *et al.*, 2008). Au niveau des racines, la paroi des cellules a été décrite en tant que site potentiel de l'accumulation de l'Al (Figure 18), et de l'exclusion de l'Al à la fois (Horst *et al.*, 2010). En termes de toxicité, Ryan *et al.* (1992) ont montré que seuls les 2 à 3 mm terminaux d'une racine de maïs, qui comprennent le méristème et la pointe racinaire, devaient être exposés à Al pour inhiber la croissance des racines, alors que si toute la racine, exceptée sa pointe, était exposée à des solutions contenant de l'Al, les taux d'élongation de la racine étaient normaux (Ryan *et al.*, 1992). Ce phénomène de rétention au niveau de la paroi a été estimé par Kochian qui observe que 90% de l' $Al^{3+}$  absorbé par les racines est localisé au niveau de l'apoplasme (Kochian, 2003). Cette barrière est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose, hémicelluloses et pectines, de protéines et éventuellement d'autres composés de nature phénolique comme la lignine selon l'âge et les tissus. Cette composition de la paroi cellulaire varie selon la phase de croissance et en fonction des espèces.



**Figure 18:** Images de microscopie confocale de coupes longitudinales de racines de la plante de thé marquées au Morin, un composé formant un complexe fluorescent avec l'Al. (A) Témoin, (B) Traités à 100  $\mu M$   $AlCl_3$  (excitation à 420 nm et émission à 510 nm) ( $\times 100$ ) (Hajibolet et Poschenrieder, 2015).

#### **I.3.1.4. Constituants et structure de la paroi cellulaire**

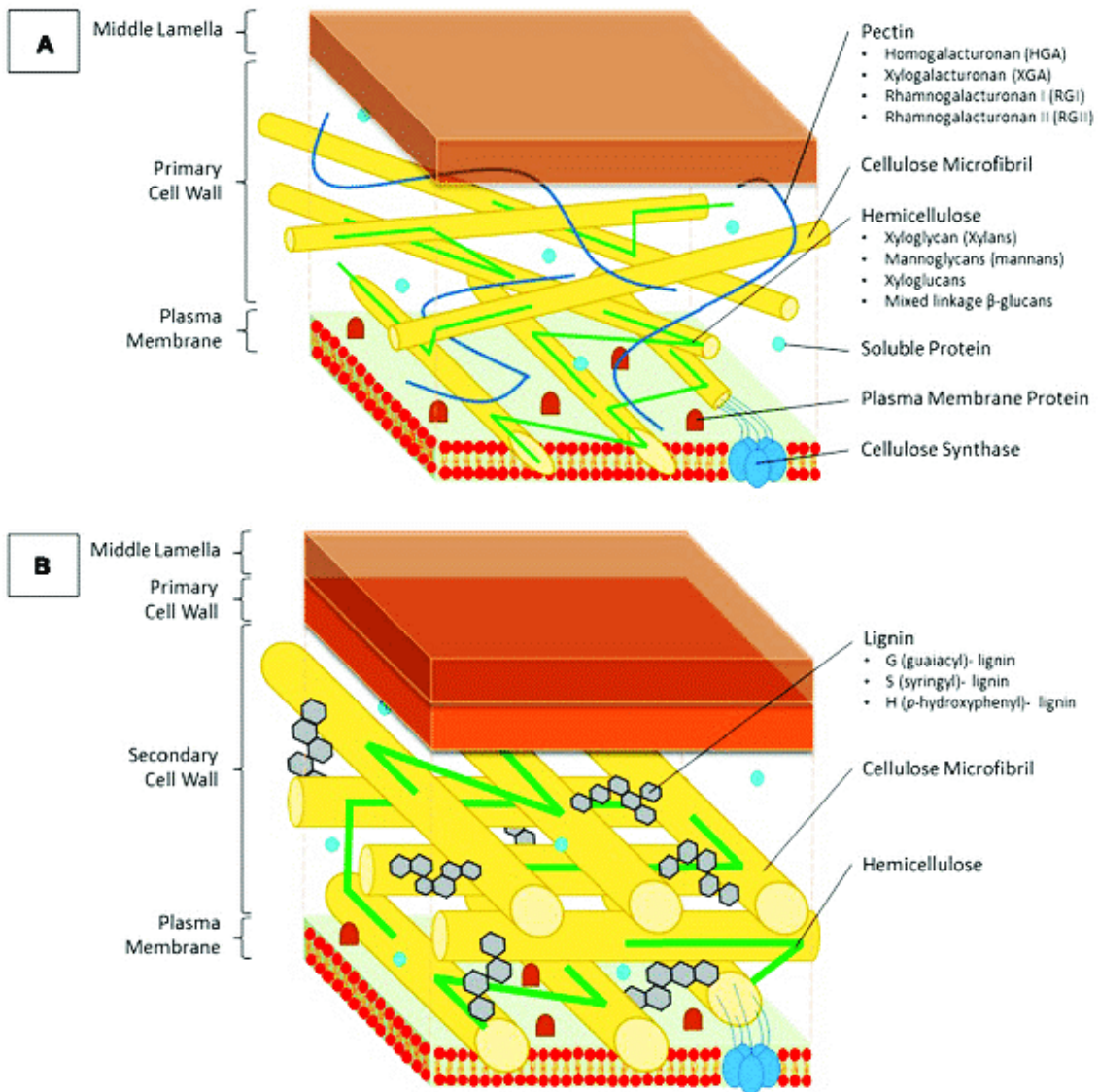
La paroi a pour rôle d'assurer le maintien et définir la taille et la forme de la cellule végétale. Elle est également impliquée dans la régulation des échanges avec les autres cellules et avec l'extérieur et au transport, à l'absorption, et à la sécrétion de multiples substances.

De manière générale, la paroi d'une cellule végétale est constituée de trois parties essentielles (Figure 19) :

La lamelle moyenne représente une cloison primitive s'édifiant lors de la division cellulaire juste après la mitose. Elle sépare deux cellules filles et elle reste commune à deux cellules contigües. La lamelle moyenne est essentiellement constituée de composés pectiques. De part et d'autre de cette lamelle moyenne qui persiste, se mettent ensuite en place la paroi primaire et la paroi secondaire.

La paroi primaire déposée au cours de l'élongation cellulaire est de nature pecto-cellulosique, n'existe seule que dans les cellules juvéniles. Elle permet la croissance et l'élongation cellulaire grâce à ses propriétés de plasticité et permet de réagir aux variations des conditions du milieu grâce à ses propriétés d'élasticité.

La paroi secondaire mise en place lors de la différenciation cellulaire observée pour les cellules conductrices de sève du xylème (le bois) et pour différents tissus de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège), elle est constituée de cellulose et d'hémicelluloses et est enrichie en composés phénoliques : lignine renforçant la rigidité et subérine pour assurer l'imperméabilité.



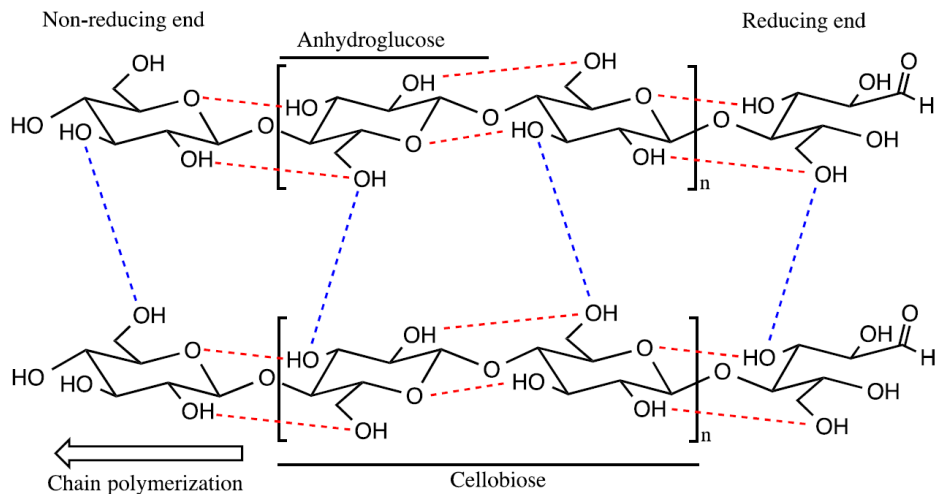
**Figure 19:** Structure et composition de la paroi cellulaire primaire et secondaire des plantes selon (Loix *et al.*, 2017). **(A)** La paroi cellulaire primaire est située côté extracellulaire de la membrane plasmique et se compose de microfibrilles de cellulose, des hémicelluloses, de pectines et des protéines solubles. Les hémicelluloses se lient à la surface des microfibrilles de cellulose et peuvent être divisées en quatre groupes; xyloglucanes (xylanes), mannoglycans (mannanes), xyloglucanes et  $\beta$ -glucanes à liaisons mixtes. Les pectines forment un gel hydraté entre le réseau cellulose-hémicellulose et se composent de quatre domaines de pectine: homogalacturonane (HGA), xylogalacturonane (XGA), rhamnogalacturonane I (RGI) et rhamnogalacturonane II (RGI). **(B)** La paroi cellulaire secondaire est construite entre la paroi cellulaire primaire et la membrane plasmique. Entre les microfibrilles de cellulose s'imprègnent des molécules de lignine remplaçant ainsi les molécules de pectine. La lignine est un polymère phénolique complexe composé de trois sous-unités de monolignol: G (guaiacyl) -, S (syringyl) -et H (*p*-hydroxyphényl) -lignine.

#### I.3.1.4.1. Les constituants de la paroi cellulaire

La paroi est donc une structure hétérogène composée essentiellement de cellulose sous forme de microfibrilles enrobées dans une matrice glycoprotéique, de pectines et d'hémicelluloses.

### I.3.1.4.1.1. La cellulose

La cellulose est la molécule organique la plus abondante sur Terre et reste le constituant le plus important de la paroi des cellules végétales (Joshi *et al.*, 2011; Lindeboom *et al.*, 2008). Elle représente environ 50 % de la masse végétale, 20% à 30% de la masse sèche de la plupart des parois cellulaires primaires. Il s'agit d'un polysaccharide de haut poids moléculaire (jusqu'à  $2,5 \cdot 10^6$  Da) de formule générale  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . La cellulose est un homopolymère dont l'unité de répétition est le cellobiose (deux molécules de  $\beta$ -D-glycopyranose liées par des liaisons glycosidiques 1 $\rightarrow$ 4). Les chaînes de cellulose sont liées par des liaisons hydrogène entre groupement hydroxyles (Figure 20).



**Figure 20:** Structure de la cellulose. Les liaisons hydrogènes intra-chaînes sont représentées en rouge et celles inter-chaînes sont représentées en bleu (Puspasari *et al.*, 2015)

Dans la paroi, la cellulose est organisée en une structure micro fibrillaire présentant des zones cristallines responsables de la rigidité de la cellulose. Les microfibrilles de cellulose sont partiellement reliées entre elles par une matrice homogène amorphe composée de pectines et d'hémicelluloses. Les microfibrilles de cellulose prennent naissance dans la membrane plasmique.

La cellulose est souvent caractérisée par son degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucidiques par chaîne de cellulose et qui varie entre 300 et 15 000 selon la localisation de la cellulose au sein de la paroi et selon l'espèce végétale.

Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques, la cellulose est hydrolysée par l'action enzymatique de cellulases spécifiques de la liaison  $\beta$  1-4 de la cellulose.

### I.3.1.4.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont parmi les composants principaux de la biomasse lignocellulosique. Elles représentent de 20 à 40 % de la biomasse (Saha, 2003) et jusqu'à 45% de la composition de la paroi végétale (Tableau 2).

**Tableau 2:** Proportion des différents types d'hémicelluloses dans les parois cellulaires végétales (Scheller et Ulvskov, 2010)

Quantité d'hémicelluloses (%)	Paroi primaire			Paroi secondaire		
	Herbes	Conifères	Dicots	Herbes	Conifères	Dicots
Xyloglucanes	1.5	10	<b>20-25</b>	Mineure	~0	Mineure
Glucuronoxylanes	~0	~0	~0	~0	~0	<b>20-30</b>
Glucuronoarabinoxylanes	<b>20-40</b>	2	5	<b>40-45</b>	5-15	~0
(Gluco)mannanes	2	~0	3-5	0-5	~0	2-5
Galactoglucomannanes	~0	Présence	~0	~0	<b>10-30</b>	0-3
$\beta$ -1,3;1,4-glucanes	<b>2-15</b>	0	0	Mineure	0	0

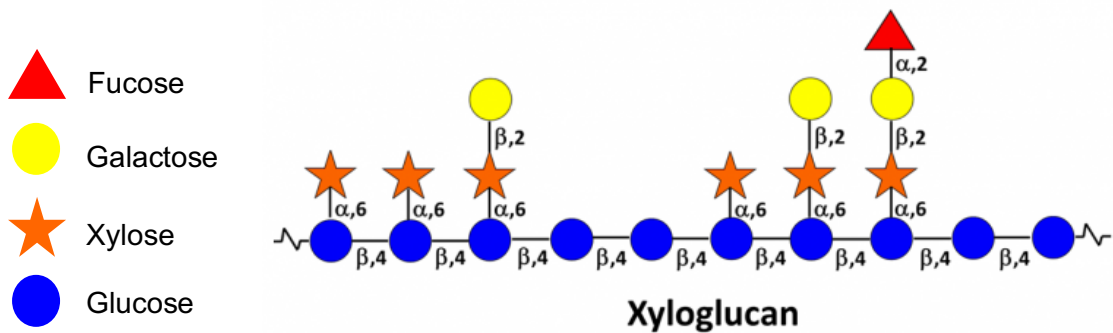
Elles regroupent tous les polysaccharides de la paroi qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques. Elles constituent un groupe de polysaccharides complexes extractibles par des solutions alcalines comme la soude.

Ces polysaccharides sont hétérogènes et plus ou moins ramifiés. Ils diffèrent par leurs unités osidiques variées qui sont reliées entre elles par des liaisons osidiques  $\alpha$  ou  $\beta$ . Parmi les hémicelluloses les plus décrites dans les parois des cellules végétales, les xylanes, les mannanes et les galactanes dont la chaîne principale linéaire est constituée de xylose, de mannose et de galactose respectivement. Ces chaînes peuvent être soit ramifiées par le greffage d'autres unités osidiques (mono- et oligosaccharides) ou substitués par exemple par des groupements acétyles, soit entrecoupées par l'incorporation d'autres monosaccharides dans la chaîne linéaire. Les hémicelluloses peuvent établir des liaisons chimiques entre eux ainsi qu'avec les autres polysaccharides tels que les microfibrilles de cellulose et les pectines.

Contrairement à la cellulose, la composition chimique des hémicelluloses est plus hétérogène. Elles contiennent plusieurs pentoses (arabinose, xylose), hexoses (glucose, galactose, mannose), désoxyhexoses (rhamnose, fucose) et acides uroniques (acide galacturonique, acide glucuronique) (Alén, 2000).

### **Les xyloglucanes (XGs)**

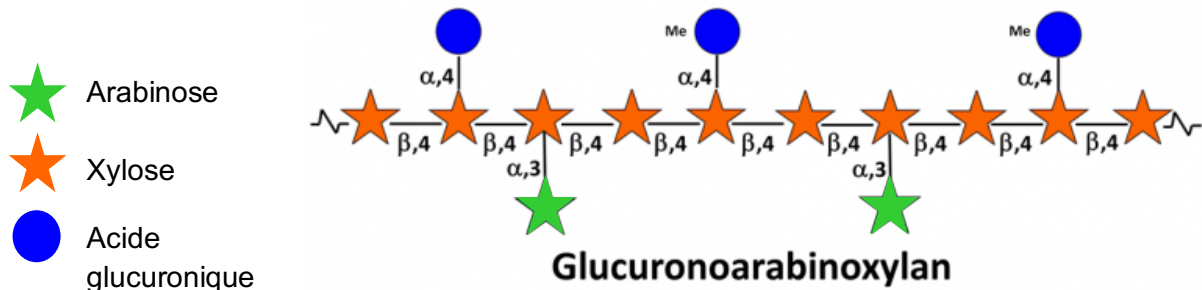
Ce sont les hémicelluloses prédominantes dans les parois primaires des dicotylédones et des monocotylédones non graminées où elles peuvent représenter environ 20-25 % du poids sec de la paroi primaire (Fry, 1989). Ces hémicelluloses ont un squelette de résidus glucose (Glc) sur lequel se greffent des chaînes latérales comprenant des résidus xylose (Xyl), galactose (Gal) et fucose (Fuc) (Figure 21). Ce sont les hémicelluloses majoritaires dans la paroi primaire des dicotylédones (Neill et York, 2003). Ces XGs peuvent se lier fortement à la surface des microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogènes et par des liaisons covalentes contribuant à la rigidité de la paroi (Park et Cosgrove, 2012). Elles se trouvent dans de nombreuses parois primaires.



**Figure 21:** Schéma de la structure des xyloglucanes (Joseleau et Perez)

### Les xylanes

Ce groupe est constitué d'une chaîne linéaire principale d'unités xylose reliés par une liaison  $\beta$  (1-4) (Figure 22). Les xylanes sont présents chez les gymnospermes à un taux de 7-12% et 25% dans les angiospermes (Kabel *et al.*, 2007). Ce sont les composants majoritaires de la paroi secondaire des plantes terrestres. Ils enrobent les microfibrilles de cellulose afin d'empêcher leur agrégation en macro-fibrilles (Gorshkova *et al.*, 2010).



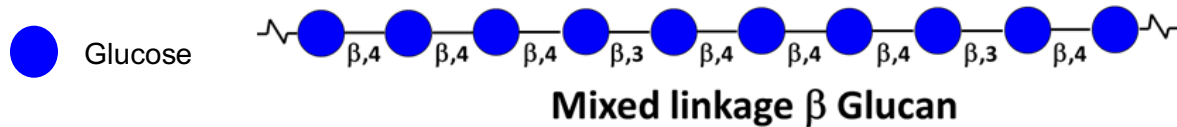
**Figure 22:** Structure des glucuronoarabinoxylanes : une chaîne linéaire de résidus xylose reliés par des liaisons  $\beta$  (1-4) sur lesquels se greffent des résidus arabinose et acide glucuronique

(Joseleau et Perez)

On distingue les hétéroxylanes qui sont majoritaires dans la paroi secondaire et les homoxylanes non substituées qui sont plus rares (York et Neill, 2008). Le squelette des hétéroxylanes est substitué à des degrés variables par des mono- ou disaccharides et sont souvent acétylés chez les plantes supérieures (Ebringerova et Heinze, 2000). Parmi les hétéroxylanes, on trouve les glucuronoarabinoxylanes (GAX) qui ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus arabinose et acide glucuronique, les glucuronoxyylanes (GX) qui ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus acide glucuronique (GlcA) ou son dérivé O-méthylé qu'on retrouve dans les parois secondaires des dicotylédones et les arabinoxylanes (AX) qui ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus arabinose.

### Les $\beta$ -glucanes à liaisons mixtes

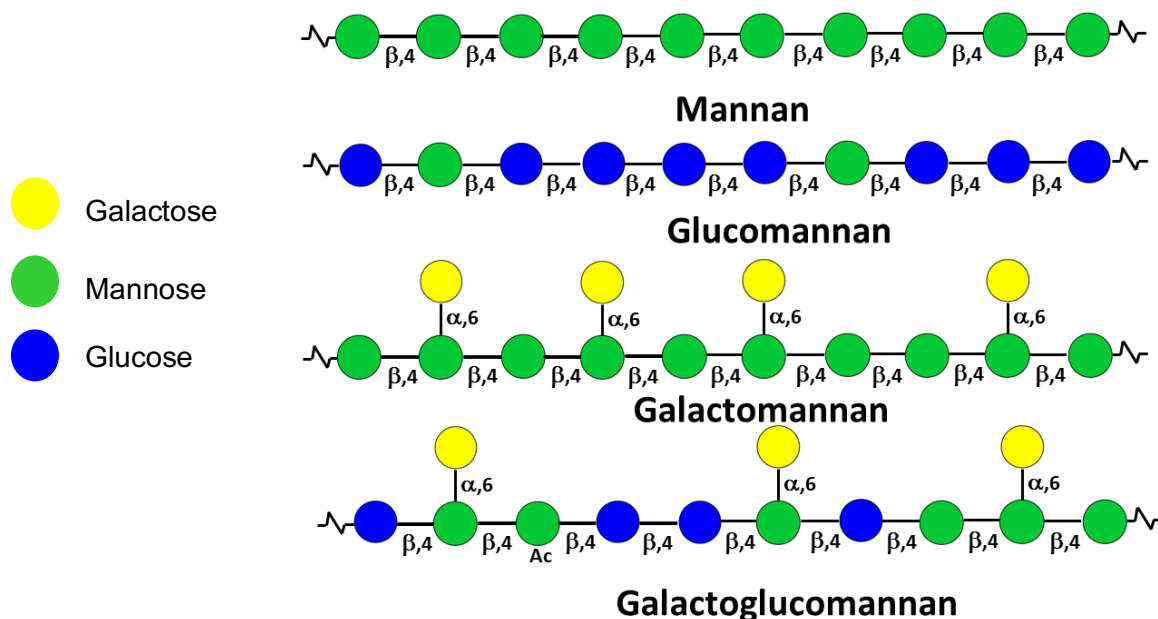
Ce sont les  $\beta$ -1,3;1,4-glucanes, qui sont très répandus chez les monocotylédones mais qui n'ont pas été caractérisés chez les dicotylédones. Ils sont composés de chaînes non ramifiées de résidus D-glucose liés par des liaisons qui peuvent être  $\beta$ -1,3, ou  $\beta$ -1,4 (Figure 23). Les glucanes à liaisons mixtes des parois primaires jouent un rôle significatif dans l'expansion de la cellule et leur teneur est très dépendante de l'état de croissance.



**Figure 23:** Structure du  $\beta$ -1,3-1,4-glucane (Joseleau et Perez)

### Les mannanes

Ils se composent d'une chaîne de  $\beta$ -1,4-mannose. Ils se trouvent sous forme de mannanes linéaires, de glucomannanes, de galactomannanes et de galactoglucomannanes (Figure 24) (Scheller et Ulvskov, 1871). Les mannanes linéaires sont des polysaccharides très compacts grâce à la présence d'abondants ponts hydrogène intramoléculaires et sont même capables d'occuper des positions entre les microfibrilles de cellulose comme le cas des xyloglucanes et des xylanes (Marcus *et al.*, 2010).



**Figure 24:** Structure des différents mannanes : (a) mannanes linéaires, (b) glucomannanes, (c) galactomannanes et (d) galactoglucomannanes

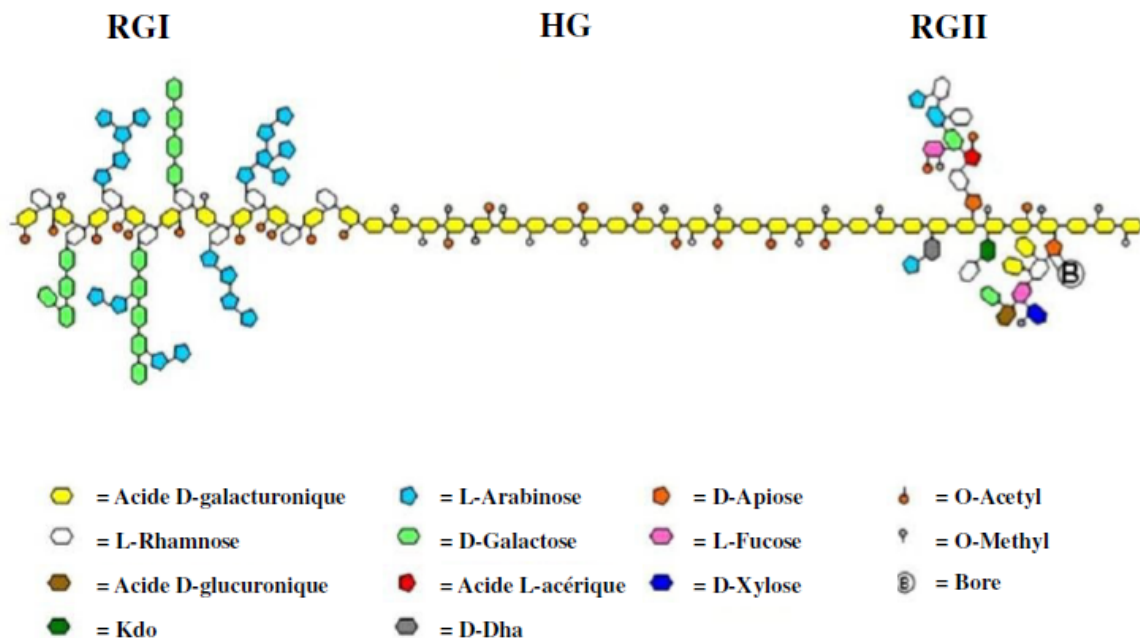
(Joseleau et Perez)

#### **I.3.1.4.1.3. Les pectines**

Elles constituent un groupe d'hétéropolysaccharides qui possèdent une structure polymérique dont la chaîne principale est formée par la liaison d'unités acide  $\alpha$ -D-galacturonique. Il a été

estimé qu'environ 90 % des acides uroniques de la paroi dérivent des résidus d'acides galacturoniques des pectines (Selvendran et Neill, 1987).

Les pectines ont la capacité de former une matrice très hydratée pouvant s'organiser en gel. Des chaînes latérales peuvent substituer cette structure. On distingue ainsi les homogalacturonanes constituant les zones lisses des pectines, les rhamnogalacturonanes (RGI) et les rhamnogalacturonanes (RGII) constituant les zones rugueuses (Figure 25).



**Figure 25:** Représentation schématique des trois domaines (HG, RG-I et RG-II) constitutifs des pectines et de leurs agencements possibles au sein de la paroi (Harholt *et al.*, 2010).

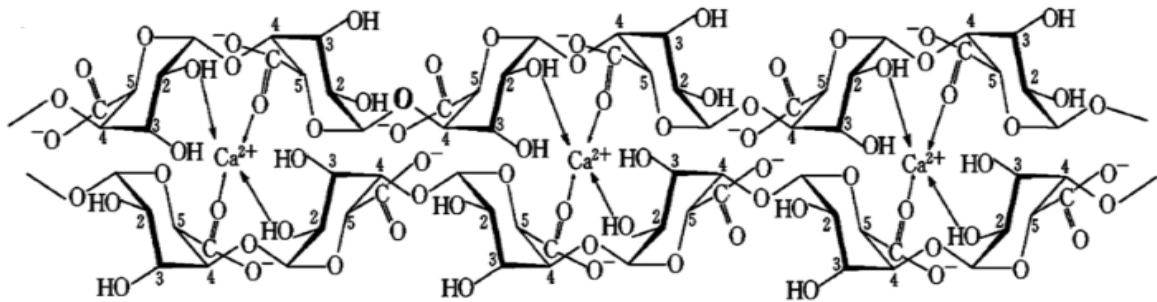
Les pectines représentent environ 30 % de la paroi primaire (Neill et York, 2003). Elles représentent les constituants essentiels de la lamelle moyenne, et sont synthétisés par l'intermédiaire d'enzymes de type glycosyl-transférases (Ridley *et al.*, 2001).

Chez les plantes, les pectines ont un rôle important dans la croissance, le développement, la morphogenèse, la porosité de la paroi et l'hydratation. Elles participent également au processus d'adhésion entre cellules et sont impliquées dans les mécanismes de défense et de signalisation cellulaire (Mohnen, 2008).

### **Les homogalacturonanes (HGs)**

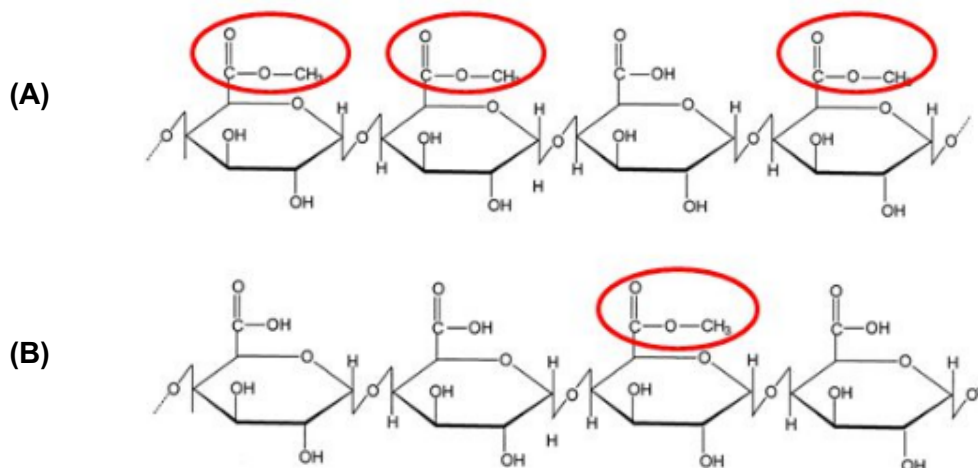
Ce sont des polymères de l'acide  $\alpha$ -1,4-D-galacturonique entre lesquels s'intercalent de façon marginale en  $\alpha$ -1,2 des résidus rhamnose (Rha) - à raison de 1 résidu Rha pour 25 à 100 résidus GalA - formant ainsi des « coudes » pectiques. Les HGs peuvent représenter plus de 60% des pectines de la paroi des cellules végétales. Le C6 non-méthylestérifié des résidus GalA est chargé négativement et peut interagir avec le cation  $Ca^{2+}$  permettant l'association de deux chaînes homogalacturonanes entre elles. Dans ce cas la structure est dite "boîte à œuf" ou "egg box" (Figure 26).





**Figure 26:** Le modèle en « egg box » de la complexation du calcium dans les polysaccharides homogalacturonanes (W. Wang *et al.*, 2006) Le cation divalent  $\text{Ca}^{2+}$  peut se lier à l'oxygène par l'intermédiaire de liaisons de coordination et assurer ainsi la liaison entre les molécules de pectine.

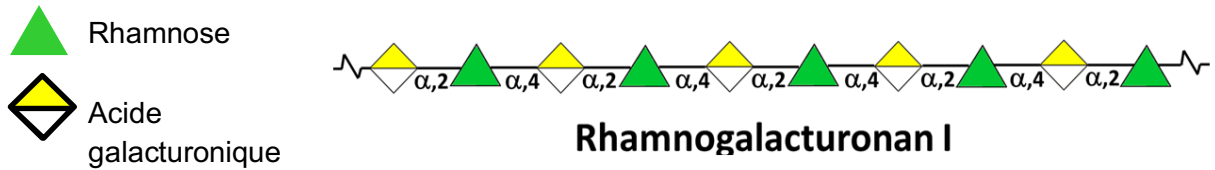
L'estérification des fonctions acide carboxylique des HGs par le méthanol permet de les classer en deux catégories en fonction de leur degré de méthylestérification (DM). Le DM représente le pourcentage d'acide galacturonique estérifié rapporté à la totalité de l'acide galacturonique ; on caractérise ainsi les pectines hautement méthylestérifiées, PHM de  $\text{DM} > 50$  (Figure 27A) et les pectines faiblement méthylestérifiées, PFM de  $\text{DM} < 50$  (Figure 27B).



**Figure 27:** Structure des pectines : (A) pectines hautement méthylestérifiées ; (B) pectines faiblement méthylestérifiées

### Les rhamnogalacturonanes de type I (RG I)

Les RG I sont composés de la répétition du motif  $\alpha$ -D-galactopyranosyles et -L-rhamnopyranosyles liés respectivement en O-4 et O-2. (Figure 28). La variété des RG I réside dans celle des chaînes latérales : environ 50% des unités L-rhamnose sont substituées en O-4 par des chaînes latérales variées d'arabinane, de galactane ou d'arabinogalactane (Figure 25) (Buchanan *et al.*, 2001). Les résidus GalA peuvent être méthylestérifiés et plus ou moins acétylés. D'une manière générale, le degré de polymérisation des RG-I peut atteindre 2000 et leur masse moléculaire semblerait varier entre 500 et 2000 kDa (Cosgrove, 1997).

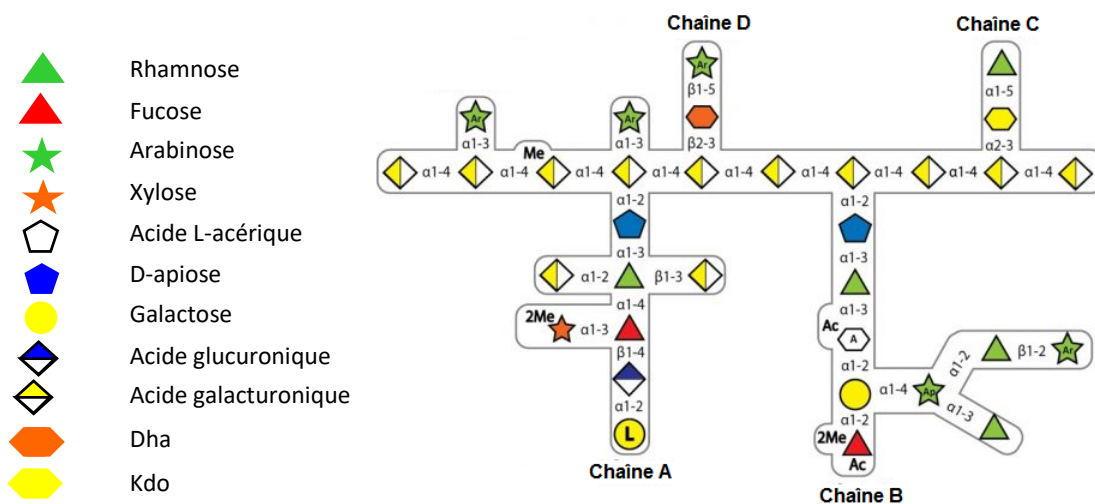


**Figure 28:** Schéma de la structure de la chaîne principale du rhamnogalacturonanes de type I : un polysaccharide pectique qui possède un squelette composé de l'unité de répétition disaccharide alternée : rhamnose et acide galacturonique

(Joseleau et Perez)

### Les rhamnogalacturonanes de type II (RG II)

Ce sont des polymères très ramifiés composés de nombreux oses rares. Le RG se fixe en O-3 de l'acide galacturonique de la chaîne pectique principale. Leur chaîne principale est formée d'au moins 9 résidus GalA liés en  $\alpha$ -(1-4) sur laquelle s'insèrent 4 chaînes latérales différentes (A, B, C et D) (Figure 29).



**Figure 29:** Schéma représentatif de la structure polysaccharidique d'un RG-II. Il se compose d'un squelette d'homogalacturonane, substitué par 4 oligosaccharides notés A, B, C et D. Des sucres rares se trouvent dans les chaînes latérales telles que le D-apiose, l'acide L-acérique (3-C-carboxy-5-désoxy-L-xylose), le 2-O-méthyl L-fucose, le 2-O-méthyl D-xylose, L-galactose, acide 2-kéto-3-désoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha) et acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octulosonique (Kdo). Une telle diversité de résidus de sucre inhabituels rend le RG II plutôt insensible à la dégradation par les enzymes liées aux parois et explique sa grande stabilité.

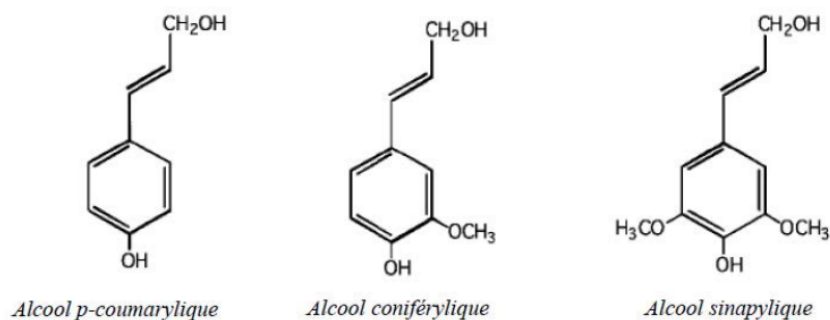
(Ndeh *et al.*, 2017)

Les chaînes de RGII sont rencontrés sous forme dimérisée par l'intermédiaire du bore reliant 2 chaînes A par l'intermédiaire de leur résidu d'apirose (Neill *et al.*, 1996). Ce phénomène de dimérisation des RG II serait impliqué dans le processus de la rigidification et la régulation de

la porosité pariétale (Fleischer *et al.*, 2015; Matsunaga *et al.*, 2004). Il contrôle aussi l'accès des enzymes à la paroi ou à leur substrat et intervient dans le transport des molécules (Ridley *et al.*, 2001).

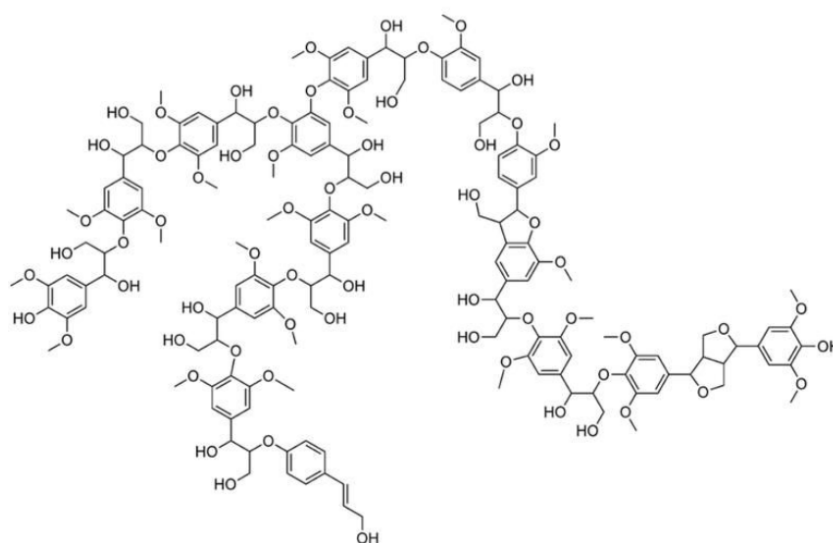
#### I.3.1.4.1.4. La lignine

La lignine est un polymère amorphe de nature phénolique issu de la polymérisation oxydative aléatoire de trois monolignols: les alcools coumaryliques, coniféryliques et sinapyliques (Figure 30). Cette polymérisation est accompagnée de liaisons covalentes avec la cellulose et les hémicelluloses, ce qui assure la bonne rigidité de la paroi à la fin du développement cellulaire.



**Figure 30:** Motifs précurseurs de la synthèse des lignines selon Fengel et Wegener (1984)

La lignine se caractérise par sa structure matricielle (Figure 31). Chez les résineux la lignine est formée principalement des unités guaiacyles dérivées de l'alcool coniférylique. Cependant, chez les feuillus, elle est constituée à la fois des unités guaiacyles et syringyles dérivées respectivement des alcools coniférylique et sinapylique. La structure exacte des lignines ne peut pas être clairement définie : les unités sont liées entre elles de façon multiple et différente en fonction de l'origine végétale. De plus, les monolignols peuvent être oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et peroxydases) au niveau de la paroi cellulaire, et ce, de façon aléatoire expliquant ainsi la grande diversité structurale des lignines (Fengel et G. Wegener, 1984).



**Figure 31:** Structure hypothétique d'une lignine extraite à partir de sciure de bois de peuplier (Barta *et al.*, 2010)

#### **I.3.1.4.1.5. Les extractibles**

Les extractibles sont des composés de faible poids moléculaire. Leur teneur et leur nature dépendent de l'espèce et de l'organe (Prida et Peuch, 2006). Ils sont solubles dans les solvants organiques et dans l'eau. Ces constituants sont de nature organique ou inorganique. Les principaux constituants organiques sont les tanins hydrolysables et condensés, les terpènes, les sucres circulants et des composés aliphatiques comme les cires et les acides gras. Ils confèrent au bois de nombreuses propriétés telles que la couleur, la durabilité et l'odeur (Fengel et Wegener, 1984).

#### **I.3.1.4.1.6. Les protéines pariétales**

La matrice pariétale des plantes renferme des protéines en quantités très variables entre 1 et 10 % de sa masse sèche. Certaines jouent un rôle structural, d'autres enzymatique (Cassab, 1998; Showalter, 2001, 1993). Ces protéines peuvent intervenir dans la structure de la paroi, la modification de composés pariétaux, la signalisation et les interactions avec la membrane plasmique. Elles participent ainsi à l'élaboration et au remodelage de la paroi ainsi qu'aux processus de défense (Albenne *et al.*, 2009).

#### **Les protéines structurales:**

Selon leur composition en acides aminés et leur degré de glycosylation, on distingue trois grandes familles : les protéines riches en hydroxyproline (HRGPs), les protéines riches en glycine (GRPs) et les protéines riches en proline (PRPs) (Jamet *et al.*, 2006).

##### - Les protéines riches en hydroxyproline (HRGPs)

Elles représentent la classe majeure des protéines structurales des parois des dicotylédones. Elle est subdivisée en deux classes principales : les extensines et les arabinogalactanes, protéines (AGPs). Leur teneur est fortement dépendante des tissus et du stade de développement.

- Les extensines regroupent les principales protéines des parois des angiospermes. Elles sont riches en hydroxyproline avec 33 à 42 % de la masse moléculaire de la fraction protéique et en sérine portant des ramifications arabinanes et galactanes.
- Les AGPs constituent un groupe hétérogène de protéines riches en hydroxyproline avec 20 à 30 % de la masse moléculaire protéique. Le plus souvent, les chaînes latérales des AGPs sont composées d'arabinogalactanes avec l'incorporation du rhamnose et de l'acide glucuronique.

##### - Les protéines riches en glycine (GRPs)

Elles ont été identifiées chez de nombreuses dicotylédones où elles interviendraient dans la résistance mécanique des parois. Ces protéines constituent un groupe très hétérogène et sont caractérisées par leur structure primaire composée d'environ 60 - 70 % de glycine. Il en existe au moins deux classes : une localisée dans la paroi et qui est régulée pendant le développement et l'autre localisée dans le cytoplasme.

##### - Les protéines riches en proline (PRPs)

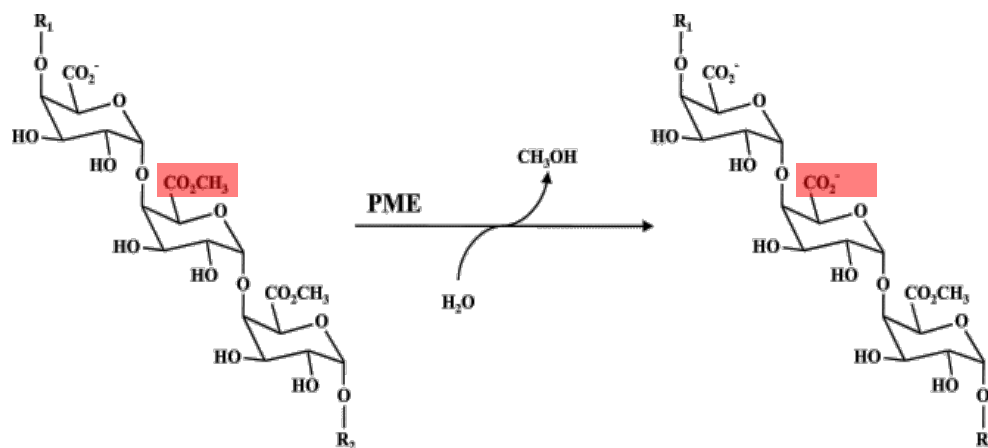
Ces protéines regroupent des protéines présentant un motif répétitif proline-proline dans leur structure primaire. La présence de résidus tyrosine dans les PRPs favorise la formation des

liaisons entre ces protéines et avec d'autres protéines structurales. Les PRPs possèderaient des fonctions semblables aux HRPGs.

### Les protéines enzymatiques

La paroi renferme également une grande diversité d'enzymes impliquées majoritairement dans le métabolisme cellulaire et dans les modifications de composants pariétaux dont :

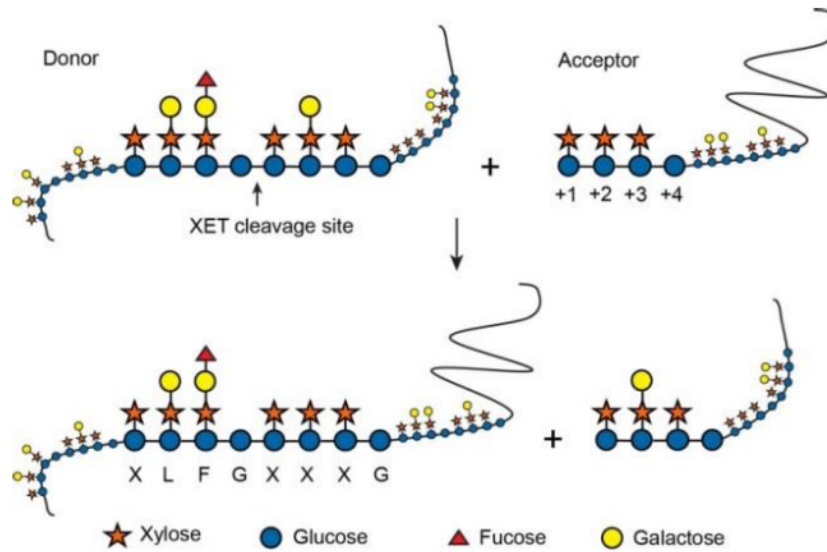
- La dégradation des composants pariétaux (glycanases, polygalacturonases, glucuronidases...);
  - La modification/réorganisation des composants pariétaux (peroxydases, pectine-méthylestérases PME, xyloglucane-endotransglucosylase XET...)
- Les pectines méthylestérases : Ce sont des enzymes pariétales de taille moyenne (masse molaire comprise entre 25 et 54 kDa) souvent liées à la paroi par des interactions ioniques. Les PME catalysent la déméthylestérification des monomères d'acide galacturonique méthylestérifié, en libérant du méthanol (figure 32). Il en résulte une acidification des pectines et donc une modification du pH de la paroi. Le pH optimal est de neutre à alcalin pour la plupart des PME végétales. Les PME sont impliquées dans les processus de développement importants, y compris l'adhésion cellulaire et l'élongation de la tige (Micheli, 2001). Elles hydrolysent la liaison C-O du groupe ester méthylique d'une même chaîne de pectines, puis se dissocient du substrat. De longues séquences d'acides galacturoniques déméthylestérifiés sont alors obtenues. Ainsi, en libérant des fonctions acides carboxylique non estérifiées capables d'interagir avec les  $Ca^{2+}$ , les PME peuvent contribuer à la rigidification de la paroi cellulaire. Cependant, la libération concomitante de protons stimulateurs de l'activité de pectinases de la paroi cellulaire peut contribuer au relâchement de celle-ci (Alebeek *et al.*, 2003; Moustacas *et al.*, 1991; Nari *et al.*, 1986).



**Figure 32:** Mécanisme d'action de la pectine méthylestérase (Jolie *et al.*, 2010)

- Les xyloglucane-endotransglucosylases (XET) : Il s'agit d'une enzyme apoplasmique catalysant la transglucosylation de deux polysaccharides de xyloglucane : elle agit par rupture et reformation des liaisons glucosidiques des hémicelluloses pariétales. Ainsi, la XET favorise l'expansion cellulaire, le relâchement ou le renforcement des parois cellulaires en rompant les liaisons  $\beta$  (1-4) dans le squelette des xyloglucanes et en transférant un segment de xyloglucane sur le O-4 du résidu de glucose terminal non

réducteur d'un accepteur, qui peut être un xyloglucane ou un oligosaccharide de xyloglucane (Figure 33).



**Figure 33:** Représentation schématique de l'activité de transglycosylation XET. L'enzyme hydrolyse au niveau du site de clivage indiqué et forme un intermédiaire glycosyl-enzyme. La molécule réceptrice attaque alors l'intermédiaire conduisant à la formation du produit polysaccharidique de la réaction de transglycosylation.

#### I.3.1.4.2. Les polysaccharides caractéristiques de la paroi cellulaire chez le sapin de Douglas

La composition de la paroi cellulaire varie selon l'espèce, l'âge de l'arbre et l'organe. Le sapin de Douglas, a aussi des composés pariétaux caractéristiques au niveau du bois. Le Tableau 3 représente la répartition des différents constituants au niveau du bois et écorces de sapin de Douglas. Le bois proprement dit et l'écorce étant composés de cellules mortes, composées essentiellement de cellulose, lignine et hémicelluloses. Les analyses ont révélé des différences significatives entre les deux compartiments. La teneur globale en polysaccharides de l'écorce est plus faible, avec moins de mannanes et environ la moitié du glucane par rapport au bois. Parmi les polysaccharides analysés, seuls les arabinanes ont été caractérisés à une concentration plus élevée dans l'écorce que dans le bois (Robinson *et al.*, 2003).

**Tableau 3:** Composition du bois et de l'écorce du sapin de Douglas (%) (Robinson *et al.*, 2003)

	Polysaccharides					Composés extractibles	Lignines
	Arabinanes	Galactanes	Glucanes (Cellulose comprise)	Mannanes	Xylanes		
<b>Bois</b>	1,1	2,6	47,8	12,9	3,8	1,7	27,3
<b>Ecorce</b>	3,4	1,6	27,7	3	2,3	25,9	34,5

Selon Thomas et ses collaborateurs (1987), environ 15% de la paroi cellulaire extraite sur une suspension cellulaire de sapin de Douglas a été isolé sous forme de pectines, 10 % sous forme de xyloglucanes et moins de 1 % sous forme de xylane. Les polysaccharides non cellulosiques représentent 26 % des parois cellulaires, la cellulose 23 %, les protéines 34 % et les minéraux 5 %. Les parois cellulaires du sapin de Douglas ressemblaient davantage aux parois cellulaires

des dicotylédones qu'à celles des monocotylédones graminées puisqu'ils possèdent des quantités relativement importantes de polysaccharides pectiques de type rhamnogalacturonanes (Thomas *et al.*, 1987).

Selon Astier et ses collaborateurs (2014), en raison de l'abondance des parois cellulaires secondaires chez les jeunes arbres de sapin de Douglas, la paroi cellulaire du bois et des écorces est principalement composée de lignine, environ 40% de la masse totale des polymères pariétaux, et 60% pour les racines. Les teneurs en pectines varient de moins de 5% pour les racines et le bois, à environ 20% pour l'écorce. Concernant les hémicelluloses et la cellulose, leurs quantités varient aussi selon l'organe (20% chacune dans l'écorce, 30% et 40% respectivement dans le bois, 10% et 25% respectivement dans les racines) (Astier *et al.*, 2014).

Il a été montré que les hémicelluloses caractéristiques du sapin de Douglas sont essentiellement les arabinoglucuronoxylanes et des glucogalactomannanes, respectivement construits sur des chaînes de xylose et de mannose (Winandy et Morrell, 1993).

#### **I.3.1.4.3. Modification des sites de fixation de l' $Al^{3+}$ au niveau de la paroi des cellules racinaires**

Les polysaccharides de la paroi cellulaire présentent des groupements fonctionnels, grâce à leurs caractéristiques anioniques, qui sont capables d'établir différentes interactions avec les cations comme  $Al^{3+}$  mettant en jeu différents phénomènes tels que l'échange d'ions ou la chélation. Le cation peut par exemple être attiré par les groupes carboxyle chargés négativement de pectines non méthylestérifiées suite à une régulation du taux de méthylestérification *via* l'enzyme pectine méthyl estérase (PME). De ce fait, la paroi peut être considérée comme un site potentiel d'immobilisation de  $Al^{3+}$ , empêchant sa pénétration dans le symplasme et permettant de maintenir les conditions du bon fonctionnement des activités physiologiques dans les cellules végétales (Yang *et al.*, 2008).

Il a été reporté que l'affinité des pectines pour l' $Al^{3+}$  est plus forte que pour l'affinité des pectines pour le  $Ca^{2+}$ . Contrairement à l' $Al^{3+}$ , le  $Ca^{2+}$  est un cation nécessaire à l'organisation spatiale de la paroi cellulaire (Franco *et al.*, 2002). En effet, plusieurs études ont suggéré que la liaison de l' $Al$  sous sa forme de cation trivalent à la paroi cellulaire se fait par substitution du  $Ca^{2+}$ , ce qui réduit l'extensibilité de la paroi par réticulation des pectines par  $Al^{3+}$  et affecte l'élongation cellulaire (Tabuchi et Matsumoto, 2001).

Des études sur l'épicéa (*Picea abies*) et sur le peuplier tremble (*Populus tremula*) ont montré que 88% de l' $Al$  a été accumulé au niveau de la paroi cellulaire de la pointe racinaire (Brunner *et al.*, 2008; Heim *et al.*, 1999). De plus, l'épicéa cultivé sous serre pendant 3 ans et demi, ensuite traité avec 0,5 mM  $AlCl_3$  à pH=4 a présenté des teneurs moins importantes en  $Ca^{2+}$  que les plantes non traitées, ce qui suggère que le  $Ca^{2+}$  a été substitué par l' $Al^{3+}$  sur les sites de fixation et d'échange au niveau de la paroi. Ces résultats ont été confirmés par les études menées sur le peuplier.

Chez des espèces résistantes de peuplier, l'accumulation de l' $Al^{3+}$  au niveau de l'apoplasme a été plus importante que celle des espèces sensibles (Smith *et al.*, 2011). Par contre, l'accumulation de l' $Al^{3+}$  au niveau du symplasme chez les espèces sensibles a été plus importante que chez les espèces résistantes. Cette répartition prouve le rôle de la paroi cellulaire dans l'évitement de l'entrée de l' $Al^{3+}$  à l'intérieur de la cellule au niveau racinaire.

La quantité d' $\text{Al}^{3+}$  qu'une paroi peut fixer dépend fortement de sa composition en pectines et du degré de méthylestérfication de ces pectines. En présence d'Al, un mécanisme de régulation des activités enzymatiques pariétales est mis en place. Par exemple, l'activité PME a tendance à augmenter, le contenu de la paroi en pectines méthylestérfifiées diminue, ce qui forme des groupements carboxyles chargés négativement capables de fixer l' $\text{Al}^{3+}$  rencontré (Eticha *et al.*, 2005).

Il a été démontré, qu'au niveau des pointes racinaires, des lignées de maïs et de riz sensibles à l'Al présentaient des pectines à faible degré de méthylestérfication et de grandes quantités d'Al liées à la paroi cellulaire en comparaison avec les lignées tolérantes à l'Al (Eticha *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Une expression plus importante de la PME a eu donc lieu chez les plantes sensibles afin d'essayer de chélater le maximum d'Al auquel elles sont exposées.

Une stratégie inverse a été repérée chez *Populus tremula* : L'expression du gène codant pour la PME est inhibée, ce qui peut servir à réduire les sites de liaison de l'Al au niveau de la matrice pectique et par conséquent, à limiter l'accumulation de Al dans l'apoplasme (Grisel *et al.*, 2010).

### **1.3.2. Mécanismes de détoxification intracellulaire**

Les mécanismes de détoxification intracellulaire, souvent appelés mécanismes de tolérance, sont mis en place par la plante une fois l' $\text{Al}^{3+}$  absorbé et présent dans le cytoplasme. Même à faibles concentrations (<nM), l' $\text{Al}^{3+}$  libre peut toujours être phytotoxique en raison de sa forte affinité pour les ligands oxygène (Martin, 1986). Par exemple,  $\text{Al}^{3+}$  se lie presque  $10^7$  fois plus fortement à l'ATP que  $\text{Mg}^{2+}$  (Ma *et al.*, 2001). Par conséquent, dans la cellule, l' $\text{Al}^{3+}$  pourrait éventuellement être le concurrent de  $\text{Mg}^{2+}$  pour les sites de liaison de l'ATP. Ceci suggère que les plantes accumulatrices d'Al doivent posséder des mécanismes efficaces pour détoxifier l' $\text{Al}^{3+}$  internalisé.

#### **1.3.2.1. Chélation de l' $\text{Al}^{3+}$ dans le cytoplasme**

Pour piéger l' $\text{Al}^{3+}$  absorbé par la cellule et afin d'empêcher tout dommage cellulaire, plusieurs ligands cytoplasmiques sont impliqués dans le processus. En effet, sous forme complexée, l'activité et la toxicité du cation métallique sont limitées, ce qui assure une protection de la plante.

Comme pour l'exclusion au niveau pariétal, des acides organiques sont synthétisés et sécrétés au niveau du cytoplasme afin de former des complexes avec l' $\text{Al}^{3+}$ . Parmi ces acides organiques se trouvent l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide citrique. Les complexes acides organiques - Al, outre qu'ils masquent la phytotoxicité de l'Al, permettent sa translocation de la racine vers les organes aériens où il s'accumule, ou alors vers les organites cytoplasmiques capables de le séquestrer comme c'est le cas pour la vacuole.

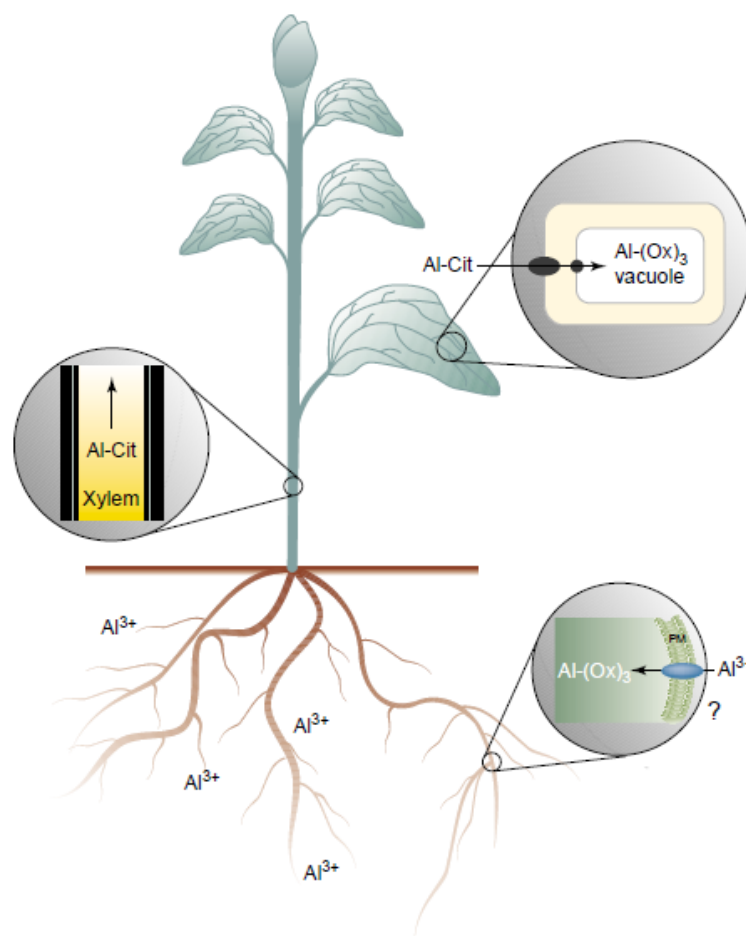
Chez *Melastoma malabathricum*, un arbuste capable d'accumuler plus que 10 mg d'Al.  $\text{g}^{-1}$  dans les feuilles matures, l' $\text{Al}^{3+}$  dans la cellule se lie au citrate pour former un complexe Al-citrate transporté vers les parties aériennes (Watanabe et Osaki, 2001). En effet, en présence d'Al, des concentrations plus élevées de citrate ont été repérées dans la sève brute de *Melastoma malabathricum* ce qui indique que la plante modifie son métabolisme de synthèse d'acides organiques en présence d'Al, et plus spécifiquement, qu'elle augmente la synthèse de citrate. Une fois formé, le complexe atteint la partie aérienne, il se transforme en un complexe Al-oxalate qui est potentiellement toxique pour la plante par rapport au complexe Al-citrate. Le citrate est connu pour prévenir l'activité pro-oxydante engendrée par l'aluminium



d'une part, par la diminution de l'affinité de l'aluminium au superoxyde et, d'autre part, par la liaison du fer au citrate. Dans ce cas, l'état d'oxydation du Fe (III) est donc fortement stabilisé et la réduction du fer n'est plus favorable thermodynamiquement ; la réaction de Fenton est freinée (Mujika et Torre, 2018).

Il est donc possible, chez *Melastoma malabathricum*, que ces complexes Al-oxalate soient stockés par la suite dans la vacuole.

Chez le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) exposé à 50  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , une fois l' $\text{Al}^{3+}$  absorbé par les racines, il est chélaté par l'oxalate pour former un complexe Al-oxalate (Ma *et al.*, 1998). Lorsque le complexe Al-oxalate passe dans le xylème, une réaction d'échange de ligand se produit pour former un complexe Al-citrate. Lorsque Al est déchargé du xylème dans les cellules de la feuille, une autre réaction d'échange de ligand se produit pour reformer le complexe Al-oxalate, qui est ensuite stocké dans la vacuole. Les raisons de ces variations des formes de complexes d'Al ne sont toujours pas claires (Ma et Syuntaro, 2000) (Figure 34).



**Figure 34:** Absorption et distribution de diverses formes d'Al s'accumulant dans la plante de sarrasin (*Fagopyrum esculentum*). Abréviations : Cit, citrate ; Ox, oxalate ; PM, membrane plasmique (Ma *et al.*, 2001).

La stabilité des complexes Al-citrate et Al-oxalate est significativement supérieure à celle du complexe Al-ATP. L'hypothèse actuelle est que cette chélation réduit efficacement l'activité de  $\text{Al}^{3+}$  dans le cytosol, empêchant ainsi la formation de complexes entre Al et des composants cellulaires sensibles (Ma *et al.*, 2001).

Des substances phénoliques sont aussi capables de chélater l' $\text{Al}^{3+}$  à l'intérieur de la cellule. Certains polyphénols ont longtemps été identifiés comme des agents chélateurs potentiels de l'Al en raison de leur forte affinité pour ce métal et de leur présence répandue dans les plantes (Zhang *et al.*, 2016). Les tanins, les flavonols (quercétine), les flavan-3-ols (catéchine) et les anthocyanidines (delphinidine) peuvent être impliqués dans la fixation de l'Al et son stockage vacuolaire (Barceló et Poschenrieder, 2002).

Plusieurs travaux ont reporté que le contenu cellulaire en phénols dans des racines exposées à l' $\text{Al}^{3+}$  augmente chez plusieurs espèces de plantes ligneuses (Ofei-Manu *et al.*, 2001) comme *Cryptomeria japonica*, *Picea abies* et *Populus tremuloides*.

Il a été récemment observé qu'*Eucalyptus camaldulensis* utilise l'oenothéin B, un polyphénol de haut poids moléculaire, pour séquestrer et précipiter l'Al dans la vacuole (Tahara *et al.*, 2014).

### **I.3.2.2. Séquestration et compartimentation de l' $\text{Al}^{3+}$ au niveau des organites cytoplasmiques**

L'absorption et le stockage de fortes concentrations d' $\text{Al}^{3+}$  dans les parties aériennes de la plante sont un trait commun à de nombreuses espèces de plantes des régions tropicales, où la nature des sols est acide, et la capacité de faire face au stress dû à la présence de l' $\text{Al}^{3+}$  dans les sols est une nécessité à la survie (Ryan et Delhaize, 2010).

Comme la paroi cellulaire, la vacuole est aussi un site potentiel d'accumulation de l'Al à l'intérieur de la cellule grâce à sa capacité de stockage (Panda, 2015). La vacuole a la particularité d'être moins sensible aux oxydations par rapport aux autres organites du cytoplasme, ce qui fait de la compartimentation vacuolaire de l' $\text{Al}^{3+}$  l'une des stratégies majeures de tolérance au stress aluminique (Dietz *et al.*, 2001). Afin de conduire l'Al vers la vacuole, plusieurs ligands et transporteurs situés au niveau du tonoplaste sont impliqués (Hall et Williams, 2003).

Récemment, certains transporteurs impliqués dans la distribution de l'aluminium dans les cellules ont été identifiés. Chez *Arabidopsis thaliana*, le transporteur ABC (ATP-Binding Cassette) situé dans le tonoplaste *Al sensitive1* (*ALS1*) est impliqué dans la tolérance à l'Al (Larsen *et al.*, 2007), alors que *ALS3* est responsable du mouvement de l'Al en dehors des tissus sensibles pour sa séquestration dans des tissus plus tolérants (Larsen *et al.*, 2007, 2005). Huang et ses collaborateurs ont identifié un transporteur d'Al localisé dans le tonoplaste du riz *Oryza sativa*, codé par *OsALS1*, qui est responsable de la séquestration de l'Al dans les vacuoles et qui contribue ainsi à la détoxification interne de l'aluminium dans le riz (Huang *et al.*, 2012).

En plus de la vacuole, les chloroplastes ont été signalés comme un compartiment de séquestration majeure d'Al chez deux plantes ligneuses hyper-accumulatrices d'Al : *Qualea grandiflora* et *Callisthene major* (de Andrade *et al.*, 2011). Dans les feuilles de *Corchorus olitorius*, l'Al a été surtout chélaté dans des cellules spécialisées ayant comme principale fonction le stockage, comme les idioblastes (Mazen, 2004).

La séquestration de l'Al dans les différents compartiments de la cellule implique aussi l'action des ligands qui peuvent être en plus des acides organiques, des acides aminés libres (Nicotiamine, histidine, proline), des oligopeptides riches en cystéine (Glutathion, phytochélatines, des molécules chaperonnes (Métallothionéines) selon les espèces, les organes et l'âge de la plante (Haydon et Cobbett, 2007; Salt *et al.*, 1999).

Les phytochélatines sont davantage associées à la formation de complexes avec  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$  et  $\text{Ag}^{+}$  pour ensuite séquestrer le complexe formé dans les vacuoles (Cobbett et Goldsbrough, 2002; Schmöger *et al.*, 2000). Bien que la production de phytochélatines confère une forte tolérance aux éléments traces métalliques chez les plantes, ces ligands ne contribuent pas réellement à la tolérance à l'Al selon Larsen *et al.* (1996), probablement en raison de leur faible affinité pour l'Al. L'aluminium a tendance à se lier aux groupes phosphate ou carboxyle plutôt qu'aux groupes thiols caractéristiques des chélatines (Gunsé *et al.*, 1997). Cependant, Ramos et ses collaborateurs (2008) ont montré que chez *Lotus japonicus*, l'exposition à 200  $\mu\text{M}$  a induit une forte activation de LjPCS3, en suggérant que ces phytochélatines pourraient jouer un rôle protecteur complémentaire dans des conditions où l'Al est largement mobilisé, comme dans les sols acides des régions tropicales (Ramos *et al.*, 2008).

La proline est essentiellement considérée comme un osmoprotectant (Yaish, 2015) contre le stress hydrique (sécheresse) et osmotique (salinité) et un piègeur d'espèces réactives de l'oxygène en excès pour protéger notamment les lipides (Ben Rejeb *et al.*, 2014; Zarei *et al.*, 2012). Cependant, elle peut aussi être impliquée dans la complexation des éléments traces métalliques. Selon (Bonet *et al.*, 2016b) l'accumulation de proline peut-être bénéfique à deux niveaux : à la fois pour développer une action anti-oxydante mais aussi pour former des complexes chélateurs d'éléments traces (Pb, As, et Sb).

Dans le cas de l'exposition à l'Al (220  $\mu\text{M}$  Al), des études ont montré des augmentations de synthèse de proline dans les racines des variétés tolérante de maïs, contrairement aux variétés sensibles. Ceci suggère que l'accumulation de proline pourrait être impliquée dans la tolérance à la toxicité aluminique (Khan *et al.*, 2000). Khan et ses collaborateurs (2000) ont suggéré dans le même contexte que l'accumulation accrue de proline dans les racines des plantes de maïs est réponse indirecte à la toxicité de Al, plutôt causée par un déséquilibre nutritionnel.

### **I.3.2.3. Activation des voies métaboliques impliquées dans la tolérance au stress aluminique**

#### **I.3.2.3.1. Régulation des voies de biosynthèse des enzymes anti-oxydantes**

Le stress oxydatif est généralement considéré comme un composant majeur de la toxicité aluminique.

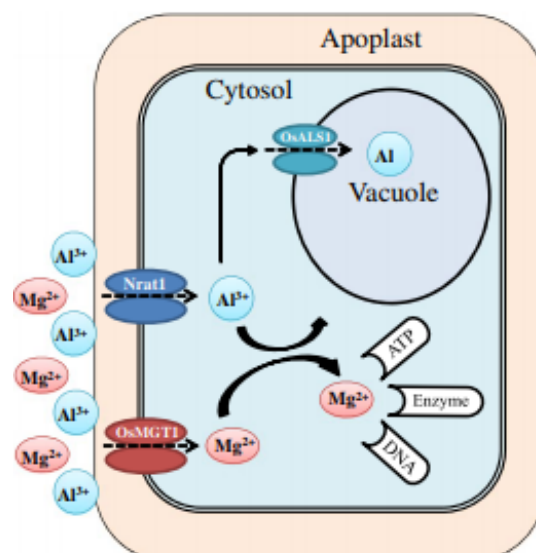
Dans des conditions environnementales défavorables, les plantes produisent davantage d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à l'oxydation des macromolécules biologiques : peroxydation des lipides, dommages à la membrane et inactivation des enzymes. Pour atténuer les dommages oxydatifs, les systèmes non enzymatiques tels que l'acide ascorbique (AsA), les caroténoïdes et les composés phénoliques et les systèmes enzymatiques tels que la superoxyde dismutase (SOD) sont activés (Ma *et al.*, 2012). À de faibles concentrations d'Al (jusqu'à 40  $\mu\text{M}$ ), un cultivar de riz tolérant à l'aluminium présente des taux plus élevés d'enzymes éliminant les ROS comme la superoxyde dismutase, la guaiacol peroxydase comparé aux cultivars sensibles à l'Al (Pandey *et al.*, 2013; Sharma et Dubey, 2007).

Certaines plantes peuvent avoir la capacité de se rétablir de la lésion induite par Al lorsque la concentration en Al n'est pas létale (Matsumoto et Motoda, 2012). Chez *Populus tremula* traité avec des concentrations croissantes d' $\text{Al}^{3+}$  jusqu'à 1 mM, les effets sur la croissance racinaire

comprennent deux phases : une inhibition rapide de la croissance induite par  $\text{Al}^{3+}$  (au bout de 6 heures à des concentrations en  $\text{Al}^{3+} > 250 \mu\text{M}$ ), et une phase ultérieure de récupération de la croissance (au bout de 2 jours à des concentrations en  $\text{Al}^{3+} \leq 500 \mu\text{M}$ ) (Grisel *et al.*, 2010). L'analyse de l'expression des gènes à trois temps différents de la cinétique a révélé une diminution marquée du nombre de gènes de sensibilité de 202 à 27 gènes entre 6 heures et 2 jours d'exposition à Al. Cette récupération de la croissance racinaire peut donc refléter la capacité des racines à activer des voies métaboliques pour surmonter les effets toxiques et restaurer le programme de transcriptome pré-stress. La récupération de la croissance des racines exposées à  $\text{Al}^{3+}$  a été associée à la réduction du stress oxydatif induit par  $\text{Al}^{3+}$  (Matsumoto et Motoda, 2012b). Deux gènes de la voie de régulation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) ont été fortement induits lors de l'exposition de *Populus tremula* à  $\text{Al}^{3+}$  pendant 6 heures, tandis que leur expression a diminué au bout de 2 jours pour rétablir le niveau du témoin (Grisel *et al.*, 2010). Ces deux gènes codent pour la superoxyde dismutase responsable du piégeage des ROS (Alscher *et al.*, 2002) et pour l'oxydase mitochondriale alternative réduisant la formation de ROS mitochondriales (Maxwell *et al.*, 1999).

### I.3.2.3.2. Régulation de l'expression des gènes codant pour des transporteurs membranaires

Chez *Populus tremula*, des gènes impliqués dans la récupération de la croissance racinaire codant pour les transporteurs *CorA-like Mg<sup>2+</sup>* (Grisel *et al.*, 2010) ont été induits jusqu'à cinq fois plus en présence  $\text{Al}^{3+}$ . Le transporteur de type *CorA*, *Mg<sup>2+</sup>*, lorsqu'il est surexprimé chez *Nicotiana benthamiana* atténue la toxicité de l' $\text{Al}^{3+}$  (Deng *et al.*, 2006). En effet, l'élément  $\text{Mg}^{2+}$  est capable d'atténuer la toxicité  $\text{Al}^{3+}$  chez un certain nombre de plantes cultivées comme le riz (Figure 35). En effet, l'augmentation de l'influx de  $\text{Mg}^{2+}$  dans les cellules, empêche la liaison de l'Al aux sites cellulaires critiques par compétition (Chen et Ma, 2013).



**Figure 35:** Mécanismes proposés pour l'atténuation de la toxicité aluminique provoquée par le flux de  $\text{Mg}^{2+}$  dans le riz. L' $\text{Al}^{3+}$  est absorbé *via* le transporteur membranaire *Nrat1* puis séquestré dans la vacuole par le transporteur vacuolaire *OsALS1*. La régulation à la hausse induite par *OsMG1* augmente l'influx de Mg dans les cellules, ce qui empêche la liaison de l'Al aux sites cellulaires critiques par compétition (Chen et Ma, 2013).

#### **I.3.2.3.3. Régulation de l'expression des gènes codant pour la sécrétion des acides organiques**

De nombreuses espèces végétales sont capables de sécréter des acides organiques en réponse aux ions toxiques d'aluminium (Al) présents dans la racine, ceci, soit en interne (séquestration et compartimentation de l'Al<sup>3+</sup> dans les organites cytoplasmiques) soit en externe (chélation de l'Al<sup>3+</sup> au niveau de la paroi cellulaire et libération du complexe Al-AO vers l'extérieur) (Pereira et Ryan, 2019)

Chez les espèces herbacées, la libération des acides organiques dans la rhizosphère en réponse à la toxicité aluminique est contrôlée par les gènes *ALMT* qui codent pour un canal anionique spécifiquement induit par Al, permettant ainsi un efflux de malate à partir des racines (Schroeder *et al.*, 2013). Ces gènes ont été caractérisés chez différentes espèces telles que : *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* etc. Chez le blé, le gène *ALMT1* est activé au niveau des pointes racinaires en présence d'Al (Delhaize *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004) et est responsable de l'excrétion de malate. L'expression de *ALMT1* est plus élevée dans les lignées résistantes à l'Al que dans celles sensibles à l'Al.

De plus, les gènes associés à la libération de citrate par les racines de *Sorghum bicolor* (*SbMATE*) et ceux de l'activation de sécrétion de citrate par Al dans *Hordeum vulgare* (*HvAACT1*), appartiennent à la famille de des protéines transmembranaires MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) (Delhaize *et al.*, 2012).

Cependant, il y a peu d'informations sur la régulation transcriptionnelle des gènes de résistance à l'Al chez les plantes ligneuses. Récemment, quatre gènes hautement homologues de la famille du *MATE* responsable du transport du citrate et des composés toxiques ont été isolés chez *Eucalyptus camaldulensis*. Parmi ces gènes, *EcMATE1*, a été exprimé plus fortement dans les racines que dans la partie aérienne en réponse à la toxicité aluminique et à faible pH (Sawaki *et al.*, 2013).

#### **I.3.2.3.4. Action sur la régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines pariétales**

Il a été prouvé qu'une grande partie de l'Al absorbé par les racines est localisée dans l'apoplasme. Plusieurs études indiquent que l'Al lié à la paroi cellulaire peut rendre la paroi cellulaire plus rigide, réduisant ainsi son extensibilité, cette dernière étant nécessaire pour une croissance normale de la cellule. Plusieurs mécanismes sont donc mis en place pour relâcher la paroi cellulaire afin d'assurer son extension.

Les protéines (qu'elles soient enzymatiques ou non enzymatiques) qui sont impliquées dans le relâchement de la paroi cellulaire comprennent parmi les plus citées les expansines, la xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (XHT) et l'endo-1,4-β-glucanase (EGase) (Cosgrove, 2005). Il semble donc probable que la régulation des gènes codant pour les XHT et les endo-1,4-β-glucanases par exemple jouent un rôle dans la réduction des effets toxiques de Al sur la paroi cellulaire. Récemment, il a été prouvé que des gènes impliqués dans le métabolisme des xyloglucanes au niveau de la paroi cellulaire seraient impliqués dans la tolérance à l'Al chez *Arabidopsis*. Par exemple, l'inactivation du gène *XTH31* a entraîné une tolérance accrue à l'aluminium (Zhu *et al.*, 2012). *XTH31* code pour une endotransglucosylase / hydrolases (XTH), qui clive et relie les xyloglucanes lors de l'expansion cellulaire. Il semble que la réduction du phénomène de clivage des xyloglucanes dans la paroi cellulaire augmente

la tolérance à l'Al. Ceci est rendu possible grâce à une diminution des sites de liaison de Al<sup>3+</sup> sur les xyloglucanes, ce qui permet de conserver la capacité de relâchement de la paroi dans la zone d'élongation (Zhu *et al.*, 2014).

Un autre gène susceptible de jouer un rôle dans la tolérance à l'Al est celui codant pour la PME chez *Populus tremula*. L'expression de ce gène diminue lors de la réponse précoce de *Populus tremula* à l'Al (Grisel *et al.*, 2010). Comme il a été précédemment décrit, le degré de méthylestérification des pectines détermine en grande partie le caractère acide de la matrice pariétale et donc la quantité d'Al<sup>3+</sup> pouvant s'y lier (Eticha *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). La diminution de l'expression du gène de la pectine méthylestérase peut donc permettre de réduire le nombre de sites de liaison au niveau des pectines et, par conséquent, de limiter l'accumulation d'Al dans l'apoplasme.

#### **I.4. Objectifs du travail et modèles d'études**

Pour caractériser les réponses du sapin de Douglas au stress aluminique, deux approches ont été développées : une approche phénotypique et une approche biochimique. La première approche a été mise en place dans le but de caractériser l'effet de l'exposition à l'aluminium sur la croissance racinaire et le développement de la partie aérienne du sapin de Douglas, l'inhibition de l'élongation racinaire étant le symptôme le plus décrit dans la littérature concernant le stress aluminique. Nous avons également étudié l'effet de cette exposition sur la nutrition minérale des plantes en termes de minéraux essentiels (Ca, Mg, K et Na) et procédé à une localisation de l'aluminium à l'échelle de la plante entière puis plus finement, au niveau cellulaire par microscopie confocale. L'approche biochimique vise, quant à elle, à caractériser les réponses au niveau intracellulaire ainsi qu'au niveau de la paroi cellulaire car la position périphérique de la paroi en fait un compartiment de choix pour la rétention des éléments trace métalliques. Cette dernière sera caractérisée en termes de composition chimique (notamment polysaccharidique) et de modification par des enzymes susceptibles d'intervenir sur leurs capacités de rétention.

Les résultats obtenus sont présentés en deux parties, selon le modèle d'étude :

- La 1<sup>ère</sup> partie présente les résultats issus de la culture *in vitro*. Elle s'intéresse à la réponse de plantules de sapin de Douglas préalablement obtenues par embryogénèse somatique puis exposées à différentes doses d'aluminium. Outre qu'elles facilitent l'accès à la partie racinaire pour évaluer les conséquences du stress aluminique, ces conditions de culture permettent également d'estimer le seuil de tolérance des plantules exposées à un tel stress.
- La 2<sup>ème</sup> partie présente les résultats issus de cultures sous serre. Plus proche des conditions naturelles, cette partie présente la réponse du sapin de Douglas cultivé sous serre sur des sols forestiers prélevés en région Limousin et caractérisés par leur acidité et leur richesse en aluminium soluble. Dans de telles conditions, des sapins de Douglas ont été cultivés à deux stades de développement : d'une part des plantules issues de germination et cultivées pendant 8 semaines sous serre et, d'autre part, de jeunes arbres âgés de 3 ans cultivés dans les mêmes conditions mais sur une durée d'un an.

Une discussion générale comparera ces différents modèles d'étude et mettra en exergue les faits marquants qui caractérisent les réponses du sapin de Douglas au stress aluminique.

Enfin, la conclusion permettra de dresser le bilan sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail et d'ouvrir des perspectives.

## Chapitre II. Matériels et méthodes

### II.1. Matériel végétal

#### II.1.1. Modèle des plantules issues de l'embryogenèse somatique du sapin de Douglas

##### II.1.1.1. Origine des embryons somatiques de sapin de Douglas

Parmi les modèles utilisés pour cette étude, des embryons somatiques de Douglas ont été mis en germination *in vitro*. Les sapin de Douglas utilisés sont issus des croisements contrôlés d'arbres issus de deux provenances nord-américaines de l'état de Washington, comme indiqué dans le tableau 4 (Lelu-walter *et al.*, 2018).

**Tableau 4** : Origine génétique des lignées embryogènes du sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*)

Population Washington	Famille	Clone
North Bend	F0454	4440
North Bend	F0481	4456
Enumclaw	F0584	4474
Enumclaw	F0585	4477

Ces croisements ont été réalisés à BioForA de INRA d'Orléans (France) et ont permis d'obtenir des embryons zygotiques utilisés pour la création des lignées TD 1, TD 15 et SD 4 (Tableau 5).

**Tableau 5** : Croisements contrôlés pour l'obtention des lignées embryogènes primaires de sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) : TD 1 TD15 et SD4.

♀	♂	N° lignée primaire
4474	4440	TD 1
4474	4440	TD 15
4456	4477	SD 4

Un second cycle d'initiation à partir d'ES cotylédonaire issus des masses embryogènes primaires a été réalisé sur milieu d'induction à l'INRA pour obtenir des lignées secondaires TD 1-2, TD 15-1 et SD 4-8.

Pour cette étude, les lignées secondaires apparentées TD 1-2 et 15-1 ainsi que SD 4-8, une lignée non apparentée avec ces dernières ont été utilisées afin de voir les éventuelles différences de comportement des différentes lignées d'ES de sapin de Douglas à la germination et vis-à-vis du stress aluminique *in vitro*.

##### II.1.1.2. La germination des ES de sapin de Douglas *in vitro*

Les ES sont fournis par le laboratoire BioForA après 8 semaines de maturation sur un milieu appelé milieu de maturation correspondant au milieu de Glitz additionné de 0,2 M de saccharose, 60  $\mu\text{M}$  acide abscissique (ABA) et 10  $\text{g.L}^{-1}$  de phytigel (Lelu-walter *et al.*, 2018). Le milieu de germination est à pH 4,3 et sa composition est indiquée dans le tableau 6.

Les ES ont été isolés sous loupe binoculaire au sein des masses pro-embryogènes, et ensuite transférés sur un milieu de germination sans phytohormone (ABA). Environ 50 embryons somatiques matures sont introduits par boîte de germination. Les boîtes sont ensuite placées à 24° C à l'obscurité pendant 7 à 10 jours, il s'agit d'une phase de transition entre la maturation et la germination proprement dite.

**Tableau 6:** Composition du milieu de germination des ES de sapin de Douglas adapté de (Lelu-walter *et al.*, 2018)

Catégories	Constituants	Concentration massique	
<b>Macroéléments</b>	Nitrate d'ammonium	825	mg/L
	Nitrate de potassium	950	mg/L
	Magnésium sulfate heptahydraté	925	mg/L
	Phosphate de monopotassium	170	mg/L
	Calcium chlorure dihydraté	11	mg/L
	Myo-inositol	100	mg/L
	Fer-EDTA	28	mg/L
<b>Microéléments</b>	Iodure de potassium	4,2	mg/L
	Acide borique	31	mg/L
	Sulfate de manganese (II) monohydraté	21	mg/L
	Molybdate de sodium dihydraté	1,25	mg/L
	Sulfate de cuivre (II) pentahydraté	0,5	mg/L
	Chlorure de cobalt (II) hexahydraté	0,13	mg/L
	Sulfate de zinc heptahydraté	43	mg/L
<b>Substrats carbonés</b>	Saccharose	20	g/L
	Hydrolysats de caséine	1	g/L
	L-glutamine	500	mg/L
<b>Vitamines</b>	Acide nicotinique	2,5	mg/L
	Chlorhydrate de pyridoxine	0,25	mg/L
	Chlorhydrate de thiamine	2,5	mg/L
<b>Gélifiant</b>	Gelrite	3	g/L

Les embryons somatiques sont ensuite transférés dans des boîtes de milieu de germination contenant ou pas de l' $\text{AlCl}_3$  selon la gamme suivante : 0, 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ou 200  $\mu\text{M}$ . Les expériences préliminaires ayant montré que cette gamme était insuffisante pour atteindre des concentrations toxiques pour les plantules, la gamme a été alors élargie à 500  $\mu\text{M}$  et 1 mM. Pour favoriser la croissance et le développement des plantules post-germination, les boîtes sont placées à la lumière sous une photopériode de 16 h à 24°C et à une intensité de lumière de 95  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Lelu-walter *et al.*, 2018).

Les racines commencent à se développer au bout de 1 à 2 semaines, caractérisant la germination des ES. Après 7 à 8 semaines, les plantules issues de germination d'ES présentant une racine et une partie aérienne sont récoltées. Les mesures biométriques sont réalisées : longueur de la racine, longueur de la tige, nombre d'épines, masse fraîche de chaque compartiment. Puis, les échantillons sont congelés à - 20 °C pour la suite des analyses.



## II.1.2. Culture des sapins de Douglas sous serre

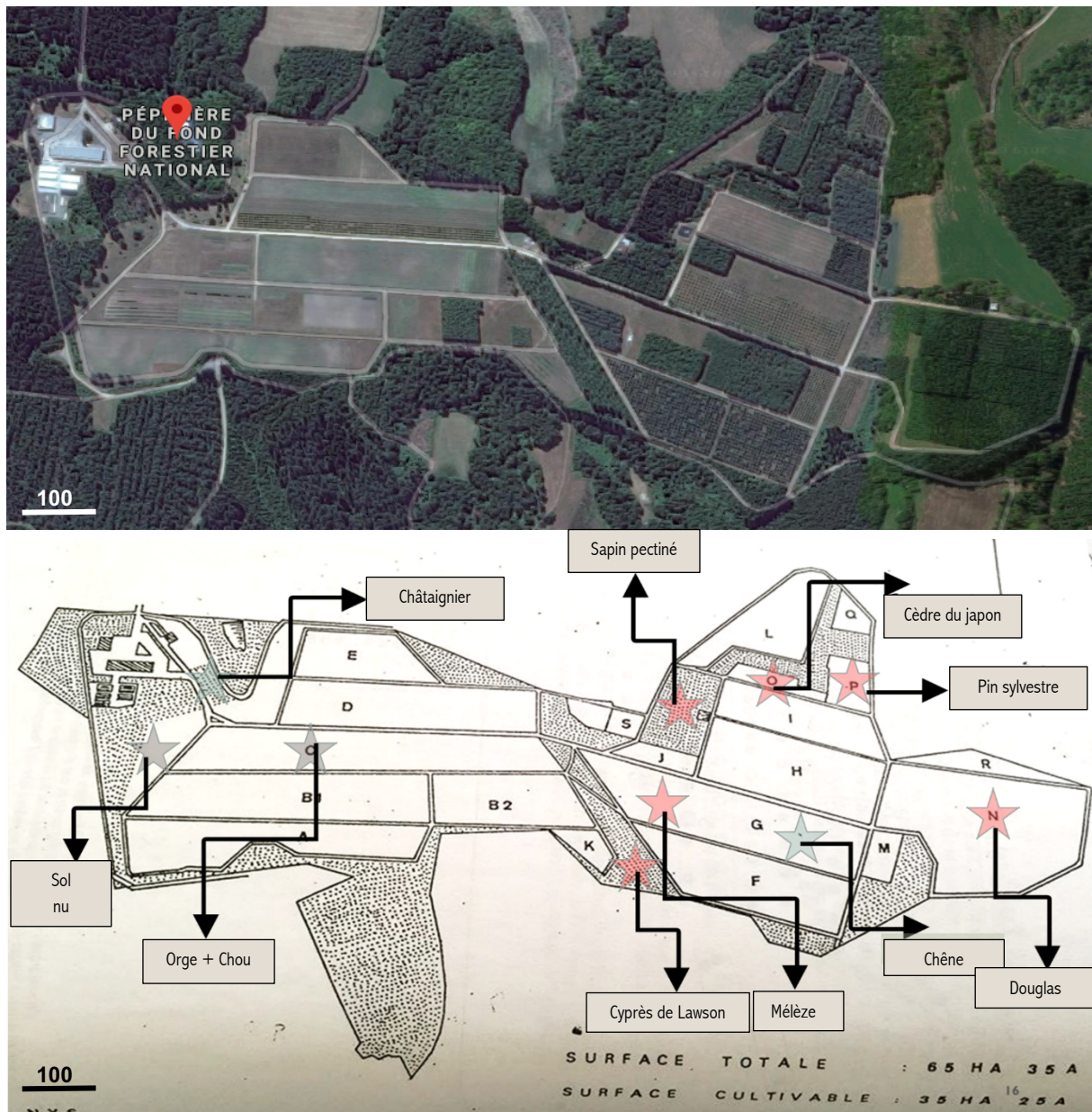
### II.1.2.1. Choix des substrats de culture

Des sols forestiers ont été prélevés sur le site de la pépinière de l'Office national des Forêts situé à Peyrat-le Château (23). Cette pépinière est située aux confins de la Haute-Vienne, Creuse, et Corrèze (Figure 36).



**Figure 36:** Localisation de la pépinière du Fond Forestier Nation à Peyrat-le-Château (Carte de Google Maps)

Elle s'étend sur un domaine de 65 hectares, dont environ 30 sont effectivement consacrés à la production, et est située à une altitude moyenne de 570 m sur la bordure Ouest du Massif Central. Les sols utilisés pour cette étude correspondent à plusieurs parcelles sur lesquelles ont été réalisées différents types de plantation (Figure 37).



**Figure 37:** Plan de la pépinière de Peyrat-le-Château avec les différentes parcelles de différentes végétations.  
(Première photo : Vue par Google Maps. Deuxième photo : Plan du site (Rossignol, 1996))

Les sols ont été prélevés après avoir enlevé la couche de surface à une profondeur maximale de 50 cm. Puis, ils ont été tamisés à une granulométrie de 2 mm et stockés dans des seaux en plastique à la serre.

D'autres substrats de cultures ont été aussi utilisés en parallèle des sols forestiers :

- L'un préparé pour les germinations de l'ONF à base de tourbe noire et de broyat d'écorces,
- Et l'autre substrat : du terreau commercial polyvalent constitué de 40 % de tourbe noire et 60 % de tourbe blonde (GO-PP7, Vertys, Fontenay Le Comte)

La sélection des substrats à utiliser pour la mise en culture a été faite selon leur pH, leur concentration en Al, leur composition en minéraux majeurs et leur capacité d'échange cationique.

### **II.1.2.2. Obtention de plantules à partir de germination des graines de Douglas sous serre**

Les graines de sapin de Douglas de la variété Washington 2 issues de la « Sécherie de la Joux » (ONF) ont été mises en culture sous serre dans les substrats de cultures sélectionnés.

Avant la mise en germination, un processus de stratification des graines est nécessaire. Pour ce faire, environ 2 g de graines ont été mélangées à la tourbe blonde humidifiée à 10 %, la tourbe et l'eau ayant été préalablement autoclavées séparément. Ensuite, le mélange a été enveloppé par deux couches de compresses de gaze stériles. Ces paquets de graines sont ensuite stockés dans des sacs de congélation contenant le même mélange de tourbe humidifiée et sont placés à l'obscurité à 4° C pendant 6 à 8 semaines.

Ensuite, les graines stratifiées ont été semées à la serre dans ces conditions de température et d'humidité contrôlées (La température varie entre 10 °C et 30 °C selon la saison, et l'humidité relative varie de 50 à 70%.) dans des pots contenant le substrat de culture (sols forestiers ou substrats de culture) et arrosées tous les deux jours jusqu'à germination au bout de 2 semaines. Une fois graines germées, la culture s'est poursuivie pendant 2 mois.

Au bout des deux mois, les plantules ont été récoltées. Racines, tiges et épines ont été séparées et les racines ont été lavées à l'eau distillée et séchées sur papier absorbant. Les masses fraîches des trois compartiments ont été pesées et ensuite conservées à -20° C jusqu'à leur utilisation pour les différentes analyses.

### **II.1.2.3. Culture de jeunes arbres de Douglas de 3 ans**

#### **II.1.2.3.1. Origine des jeunes arbres**

De jeunes arbres de Douglas âgés de 3 ans ont été fournis par la pépinière de l'ONF (Peyrat le Château). Ces arbres sont obtenus par germination sous serre des graines de la variété Washington 2 issues de « La Sécherie de la Joux » sur le substrat de culture composé d'un mélange de tourbe noire et de broyat d'écorces. Les graines ont au préalable subi un processus de stratification comme décrit au paragraphe II.1.2.2.

#### **II.1.2.3.2. Conditions de culture des arbres de Douglas de 3 ans sous serre**

Dans un premier temps, la longueur du tronc et le diamètre au collet ont été mesurés sur chaque arbre et une sélection selon ces critères a été faite afin d'obtenir un groupe homogène d'arbres. En décembre 2017, les arbres sélectionnés ont été déterrés et replantés dans des pots contenant un nouveau substrat parmi les substrats de culture sélectionnés. Trois lots de 11 arbres ont été constitués : un lot sur terreau commercial (GO27, Vertys), et deux lots sur deux sols forestiers issus de la pépinière. Les cultures ont été arrosées régulièrement à l'eau déminéralisée pendant toute la période de culture jusqu'à récolte en décembre 2018.

Pour la récolte, les arbres ont été séparés de leur substrat, les racines ont été bien rincées à l'eau déminéralisée pour enlever les particules de sol qui y sont collées. Ensuite, une nouvelle mesure de la longueur de la tige et de son diamètre a été faite pour déterminer le niveau de croissance depuis leur transplantation. Les derniers 20 cm des racines ont été séparés du

reste de l'appareil racinaire. Sur la pousse de l'année, la tige, les épines, les rameaux et les bourgeons ont été aussi séparés. Chaque compartiment a été pesé à part, et ensuite stocké à -20° C.

## II.2. Caractérisation des substrats de culture

En plus de la quantité d'Al et la composition minérale des substrats de culture, le pH et la capacité d'échange cationique font partie des critères de sélection des substrats utilisés pour cette étude.

Préalablement à toute analyse, les substrats ont été séchés à l'étuve ventilée à 40° C jusqu'à obtention d'une masse constante. Les substrats sont ensuite homogénéisés et tamisés à une granulométrie de 2 mm.

### II.2.1. Mesure de l'acidité des substrats de culture

D'une part, l'**acidité active** appelée aussi  $pH_{eau}$  a été mesurée. Cette mesure représente le pH de la solution du sol, lié aux ions  $H^+$  dissous et est considéré comme le pH de la rhizosphère.

Selon une méthode normalisée (*ISO 10390 - Qualité du sol – Détermination du pH eau.*, 2005), une quantité de sol équivalente à 5 mL et représentative de l'échantillon a été prélevée, et 5 fois le volume en eau déminéralisée ont été ajoutées. Le mélange est mis sous agitation magnétique pendant 60 min. Une fois agitation terminée, le mélange est laissé reposer au moins 1 h en recouvrant l'échantillon. Le pH est ensuite mesuré par pH-mètre dans le surnageant après une légère agitation permettant de faire la mesure dans une suspension homogène.

D'autre part, l'**acidité échangeable** traduite par le  $pH_{KCl}$  a été mesurée. Cette mesure se fait de la même façon que le  $pH_{eau}$ , mais en remplaçant l'eau déminéralisée par une solution KCl 1 M (*ISO 10390 - Qualité du sol – Détermination du pH KCl.*, 2005). Les ions  $H^+$  déjà présents dans la solution du sol sont alors dosés ainsi que les ions  $H^+$  expulsés du fait que le potassium s'est échangé contre les cations présents sur le complexe argilo-humique. Le  $pH_{KCl}$  est donc toujours plus acide que le  $pH_{eau}$ .

### II.2.2. Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC)

La capacité d'échange cationique est une mesure du pouvoir d'un sol à retenir et échanger des cations. Il s'agit d'un indicateur relatif du potentiel de fertilité d'un sol.

Les cations qui sont le plus souvent considérés sont le potassium ( $K^+$ ), le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et le calcium ( $Ca^{2+}$ ). L'hydrogène ( $H^+$ ) et le sodium ( $Na^+$ ) sont considérés moins couramment. Les cations sont retenus sur des sites chargés négativement que l'on retrouve à la surface de particules de matière organique et d'argile. Ces surfaces réalimentent constamment la solution de sol en cations à mesure que ces derniers sont prélevés par les plantes.

La CEC a été évaluée selon une méthode colorimétrique selon (Aran *et al.*, 2008). Le principe est de mesurer la quantité de cations du sol échangeables par la cobalthexamine ( $Co(NH_3)_6^{3+}$ ). Cette quantité est dosée par spectrophotométrie UV-visible : une mesure de la densité optique à  $\lambda=472$  nm d'une solution de chlorure de cobalthexamine est réalisée avant et après échange entre le sol et les ions  $Co(NH_3)_6^{3+}$ . Cette mesure permet de déterminer la concentration restante en ions cobalthexamine, elle est déterminée par dosage colorimétrique permet de calculer la CEC.

Pour ce faire, 2 g de sol sont mis en suspension dans 40 mL d'une solution de  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ,  $\text{Cl}^-$  à 0.01 M. La suspension est maintenue sous agitation magnétique pendant 1 h. A la fin de l'agitation, la suspension est filtrée sur verre fritté de porosité 3 et ensuite centrifugée à 12000 g pendant 15 min. La densité optique des surnageants a été mesurée par spectrophotomètre UV-visible à  $\lambda = 472$  nm.

En même temps, une gamme étalon de chlorure de cobaltihexamine 0 – 0.01 M a été réalisée afin de pouvoir déterminer la concentration résiduelle en  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

La CEC est calculée selon la formule suivante :

$$CEC_{472} = \left[ \frac{DO_{472,0,01M} - DO_{472,Echantillon}}{DO_{472,0,01M}} \right] \times 10 \times \frac{V}{m} \times 100 \quad \text{en meq. } 100 \text{ g}^{-1} ;$$

Avec :

- $DO_{472, 0.01 M}$  : la densité optique à  $\lambda = 472$  nm de la solution de chlorure de cobaltihexamine à 0.01 M ( $10 \text{ meq.L}^{-1}$ ) ;
- $DO_{472}$  Echantillon : la densité optique à  $\lambda = 472$  nm du surnageant de l'échantillon ;
- V : le volume en L de la solution de chlorure de cobaltihexamine ajouté à l'échantillon (0.04 L) ;
- m : masse sèche utilisée de l'échantillon (2 g).

### II.2.3. Détermination de la teneur en azote total des sols

Le dosage de l'azote total (N) a été effectué par un analyseur élémentaire fonctionnant sur le principe d'une combustion catalytique suivie d'une séparation des gaz libérés lors de cette combustion selon la norme (NBN EN 15104, 2012).

Une masse d'environ 1 à 2 mg de sol sec et tamisé à une granulométrie de 2 mm est introduit dans une nacelle en étain et ensuite introduit dans l'analyseur en plusieurs répliques selon les instructions opératoires de l'instrument. L'échantillon est pyrolysé sous excès d'oxygène à plus de 960 °C. L'azote est ensuite recombinaison pour donner du diazote ( $\text{N}_2$ ) par un enchaînement de réactions de réduction et d'oxydation. Ces gaz sont ensuite séparés sur une colonne chromatographique, détectés par un catharomètre, puis quantifiés par intégration d'un pic. Le logiciel de l'analyseur élémentaire calcule les quantités de gaz de combustion sous forme de pourcentage de la masse de l'échantillon initial. L'analyse a été effectuée en 6 répliques pour chaque échantillon de sol.

## II.3. Détermination de la teneur en éléments minéraux

### II.3.1. Préparation des échantillons

#### II.3.1.1. Préparation et minéralisation du matériel végétal

Pour pouvoir doser l'Al et les éléments minéraux majeurs dans un échantillon de plante, les échantillons à doser doivent d'abord subir une étape de séchage, broyage (au mortier) puis de minéralisation. Ceci est appliqué sur les racines, les tiges et les épines des plantules *in vitro*, comme pour les plantules et les arbres sous serre.

Le protocole de minéralisation a été effectué selon (Astier et al., 2014). Tout d'abord, le matériel végétal préalablement conservé à  $-20^\circ \text{C}$  a été lyophilisé afin d'obtenir la matière sèche. Celle-ci est ensuite broyée dans un mortier, puis soumise à une minéralisation acide.

Pour les différents compartiments, 0,2 g de poudre sont introduits dans un réacteur auxquels sont ajoutés 5 mL d'acide nitrique (68%, Normapur ) et 2 mL d'acide chlorhydrique (37%, Normapur) . Le réacteur est alors placé au minéralisateur micro-ondes (Mars One, CEM) pour subir un programme adapté pour les matières végétales en trois phases :

- Phase 1 : de 0 à 200° C en 20 min ;
- Phase 2 : un palier de 10 min à 200° C ;
- Phase 3 : refroidissement.

En fin de réaction, les minéralisats sont récupérés dans des fioles jaugées et ajustés à 10 mL avec de l'eau ultra pure, puis la quantité d'Al et de minéraux présents en solution est dosée par spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES) selon le protocole présenté au paragraphe **II.3.2**.

### **II.3.1.2. Préparation et minéralisation des fractions polysaccharidiques de la paroi cellulaire**

Un dosage d'Al a été aussi effectué dans les fractions polysaccharidiques de la paroi cellulaire extraites selon le protocole décrit dans le paragraphe **II.4.1**.

Pour ce faire, 3 mL de chaque fraction ont été mis en pré-minéralisation avec 6 mL d'acide nitrique, 3 mL d'acide chlorhydrique et 1 mL de peroxyde d'hydrogène pendant 16h. Le mélange est ensuite minéralisé selon le même programme précédemment décrit. Les minéralisats sont récupérés dans 50 mL d'eau ultrapure, et analysés par MP-AES.

### **II.3.1.3. Préparation en vue de l'analyse des sols ou substrats de culture**

Le dosage de l'Al et des minéraux dans les substrats de culture a été effectué sur trois fractions du sol, obtenues par deux extractions différentes :

- Par l'eau ultra pure pour extraire l'Al<sup>3+</sup> mobile dans la solution du sol ;
- Par un mélange d'acides organiques simulant les exsudats racinaires - dit Rhizo A - pour extraire l'Al rendu disponible par la plante après libération de ces exsudats racinaires.

#### **II.3.1.3.1. Obtention des différentes fractions du sol et de substrats de culture**

- Extraction à l'eau ultra pure

Une masse de 10 g de sol sec est mélangée à 25 mL d'eau ultra pure. La suspension est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 5 h, puis filtrée sur verre fritté de porosité 3, et les filtrats sont centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes pour éliminer les particules en suspension.

- Extraction au Rhizo A selon (Feng *et al.*, 2005)

La solution de Rhizo A est un mélange d'acides organiques à 0,1 M composé d'acide acétique, acide lactique, acide citrique, acide malique, acide formique dans un ratio de concentrations 4/2/1/1/1.

Une masse de 2 g de sol sec est introduite dans 20 mL de la solution de Rhizo A. La suspension est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 16 h.

Après filtration sur verre fritté de porosité 3, les filtrats sont centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les particules en suspension.

### II.3.1.3.2. Minéralisation des extraits de sols et de substrats de culture

Pour les sols, 5 mL des extraits préparés ont été mélangés avec 5 mL d'acide nitrique (68 %, Normapur) 2 mL d'acide chlorhydrique (37 %, Normapur) dans un réacteur, puis minéralisés et récupérés selon le protocole décrit au paragraphe II.3.1.1.

### II.3.2. Dosage de l'Al et des minéraux par spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES)

Tout d'abord, les solutions d'étalonnage ont été préparées à partir de solutions commerciales standardisées à 1000 ppm et diluées par l'acide nitrique 3 % permettant d'atteindre un pH proche de celui des échantillons à doser.

Les concentrations en Al et en minéraux dans les minéralisats sont estimées par un dosage en spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (4100 MP-AES, Agilent) selon les paramètres présentés dans le tableau 7. L'appareil utilise un plasma d'azote pour désolvater, atomiser et exciter les atomes dans l'échantillon liquide préalablement nébulisé. Le plasma d'azote est considérablement chaud (jusqu'à 5 000 °K).

**Tableau 7:** Paramètres de dosage des éléments minéraux par MP-AES

Élément à doser	Gamme de concentration (ppm)	Longueur d'onde (nm)
Ca	0 – 10	422,67
K	0 – 10	769,90
Mg	0 – 10	285,21
Na	0 – 10	598,59
Al	0 – 1	369,3

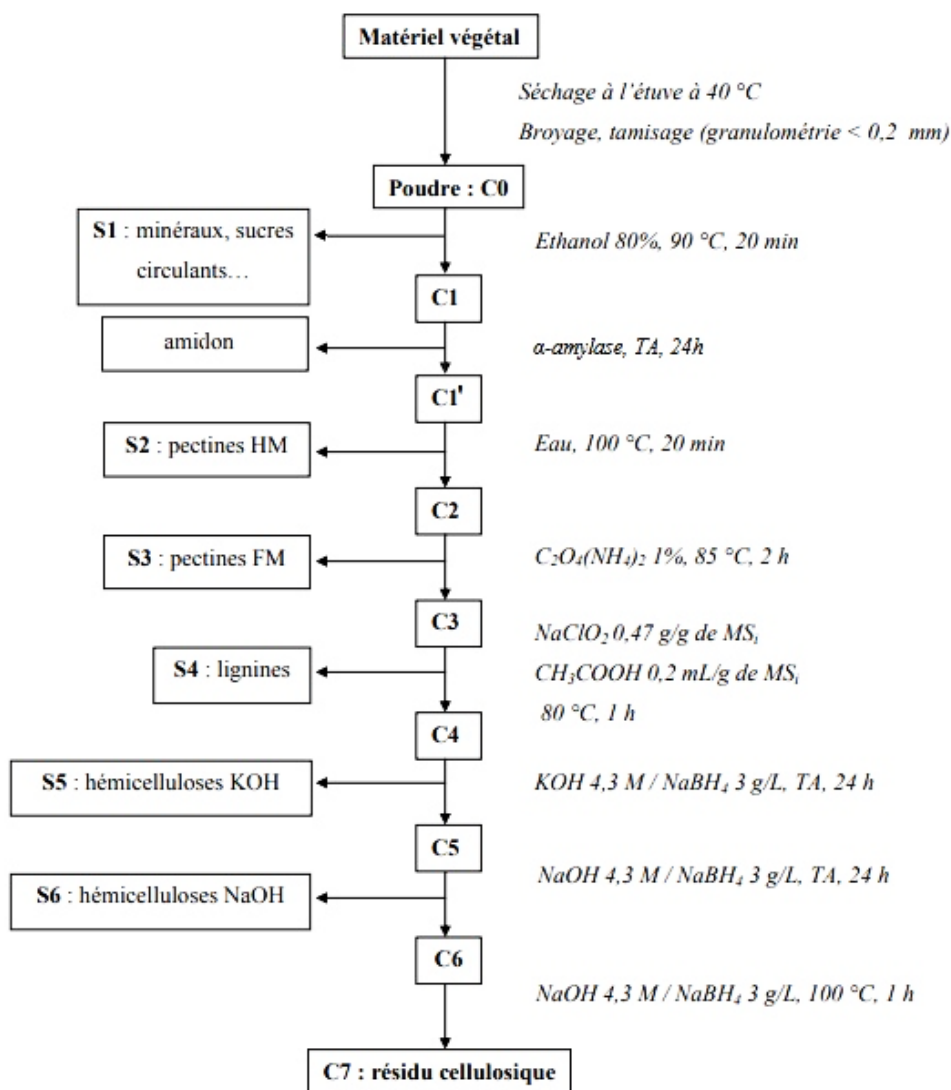
Les résultats de teneurs sont exprimés en mg. g<sup>-1</sup> MS pour les minéraux essentiels et en µg. g<sup>-1</sup> MS pour l'Al.

## II.4. Méthodes d'extraction et d'analyses des constituants pariétaux

### II.4.1. Extraction séquentielle des constituants pariétaux

L'analyse chimique des constituants pariétaux des différents modèles biologiques de sapin de Douglas utilisés lors de cette étude repose sur l'extraction sélective et séquentielle des molécules caractéristiques qui les composent comme le décrit la figure 38:

Les échantillons congelés après récolte ont été lyophilisés, broyés et tamisés à une granulométrie inférieure à 0,2 mm. Une masse de 0,1 g de poudre végétale a été mise en jeu lors de la première étape. Les volumes des solutions lors des différentes étapes sont systématiquement de 40 mL.



**Figure 38:** Schéma de l'extraction séquentielle des constituants pariétaux des poudres végétales (Astier, 2010)

#### II.4.1.1. Extraction des matières extractibles par l'éthanol à 80%

Une quantité de 0,1 g de poudre (C0) est maintenue en suspension dans de l'éthanol 80 % pendant 20 min à 90 °C. Le mélange est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante et le culot (résidu C1) est récupéré puis rincé 3 fois par 40 mL d'éthanol à 80 %. Le surnageant (S1) est concentré sous pression réduite jusqu'à un volume de 10 ml. Une partie de S1 est séchée par lyophilisation afin de déterminer la masse de composés extractibles totale. Ils correspondent essentiellement aux composés minéraux, aux sucres circulants, ou encore aux tanins. Le reste de la fraction est conservé à 4 °C pour le reste des analyses.

#### II.4.1.2. Elimination de l'amidon

Afin d'éliminer l'amidon éventuellement présent dans l'échantillon et qui pourrait fausser l'analyse de la composition monosaccharidique des pectines (notamment la composition réelle en glucose), le résidu C1 est mélangé avec 5 mL d'une solution d' $\alpha$ -amylase ( $\alpha$ -amylase issue



de *Bacillus licheniformis*, 12143U/ml, Sigma) à une concentration de 100 U / mL. Puis, le mélange est agité pendant 24 h à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante et le culot C1' est récupéré puis rincé 3 fois par 40 mL d'eau distillée.

#### **II.4.1.3. Extraction des pectines**

Les pectines hautement méthylestérifiés (PHM) sont extraites à l'eau à 100 °C pendant 20 min. Après centrifugation à 1500 g pendant 10 min à température ambiante, la fraction PHM (S2) est obtenue dans le surnageant et le résidu C2 est obtenu après 3 rinçages du culot par 40 mL d'eau distillée.

Le résidu C2 fait l'objet d'une extraction des pectines faiblement méthylestérifiées (PFM) par une solution d'oxalate d'ammonium à 1 % à 85 °C pendant 2 h. Après centrifugation à 1500 g pendant 10 min à température ambiante, la fraction PFM (S3) est obtenue dans le surnageant et le résidu C3 est obtenu après 3 rinçages du culot par 40 mL d'eau distillée.

Les fractions S2 et S3 sont dialysées (seuil de coupure 6-8000 Da, membrane SpectraPor) contre de l'eau déminéralisée pendant 48 h afin d'éliminer les sels résiduels et ensuite concentrés sous pression réduite jusqu'à un volume de 10 mL.

La masse sèche des fractions S2 et S3 est obtenue après lyophilisation d'une partie de ces fractions. Le reste est conservé à 4 °C pour la suite des analyses.

#### **II.4.1.4. Elimination de la lignine**

Le résidu C3 est délignifié en utilisant une solution de chlorite de sodium à raison de 0,047 g.g<sup>-1</sup> de MS initiale en milieu acide (0,2 mL d'acide acétique glacial par gramme de Matière Sèche initiale), le mélange est incubé à 80 °C pendant 1 h. Après une centrifugation à 1500 g pendant 10 min à température ambiante, la fraction S4, surnageant de la centrifugation est prélevé. Le culot constituant le résidu C4 est obtenu après 3 rinçages du culot par 40 mL d'eau distillée.

#### **II.4.1.5. Extraction des hémicelluloses**

Les hémicelluloses sont extraites à partir du résidu C4 en deux étapes.

D'abord, une extraction de 24 h à température ambiante par une solution KOH 4,3 M contenant 3 g.L<sup>-1</sup> borohydrure de sodium ; elle est suivie d'une centrifugation du mélange à 1500 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot est rincé 3 fois par 40 mL d'eau distillée et constitue le résidu C5. Puis, le résidu C5 subit une extraction par une solution NaOH 4,3 M en présence de 3 g.L<sup>-1</sup> borohydrure de sodium pendant 24 h à température ambiante. Le résidu C6 est obtenu comme précédemment à partir du culot de centrifugation.

Les surnageants S5 et S6 sont neutralisés de l'acide acétique puis dialysés contre de l'eau déminéralisée (seuil de coupure 6-8000 Da) pendant 48 h afin d'éliminer les sels résiduels. Leurs masses sèches sont obtenues après lyophilisation d'une partie de ces fractions. Le reste est conservé à 4 °C pour la suite des analyses.

#### **II.4.1.6. Obtention du résidu cellulosique**

La dernière étape d'extraction des hémicelluloses est effectuée une nouvelle fois à reflux pendant 1 h afin d'éliminer les dernières impuretés et le résidu cellulosique est obtenu après

centrifugation du mélange à 1500 g pendant 10 min à température ambiante puis lyophilisation. La masse finale du résidu est pesée.

#### **II.4.2. Analyse quantitative des composés glucidiques dans les différentes fractions extraites de la paroi cellulaire**

La quantification des oses totaux dans les différentes fractions extraites de la paroi cellulaire associe le dosage des oses neutres par la méthode au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956) et le dosage des acides uroniques par la méthode au méta-hydroxydiphényl (m-HDP) (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).

##### **II.4.2.1. Dosage des oses neutres au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956)**

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de phénol à 5 % (v/v) est ajouté à un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de solution étalon de galactose (0 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et d'acide galacturonique (0 à 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Le mélange est agité puis 1 mL d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit dans le milieu réactionnel puis agité de nouveau. Les tubes sont chauffés au bain-marie à 100°C pendant 5 min avant d'être refroidis dans un bain d'eau glacée puis laissés à l'obscurité pendant 30 min. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) à  $\lambda=492$  nm. Toutes les mesures ont été réalisées en trois exemplaires.

##### **II.4.2.2. Dosage des acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973)**

Un volume de 1250  $\mu\text{L}$  d'une solution de tétraborate de sodium à 0,0125 M préparée dans de l'acide sulfurique concentré est ajouté à un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de solution étalon de galactose (0 à 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et d'acide galacturonique (0 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Le mélange est agité puis porté à 100°C au bain-marie pendant 5 min. Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de métagydroxydiphényl (à 0,15 % (m/v) dans une solution de soude à 0,5 % (m/v)) sont ajoutés. Les tubes sont agités puis placés à l'obscurité pendant 30 min. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) à  $\lambda=520$  nm.

##### **II.4.2.3. Méthode de correction pour quantifier les oses neutres (ON) et les acides uroniques (AU)**

La méthode de correction proposée par (Montreuil *et al.*, 1963) permet de corriger les interférences liées à la présence d'acides uroniques et d'établir les quantités relatives d'oses neutres et d'acides uroniques par combinaison des résultats obtenus lors des deux précédents dosages selon les équations suivantes :

$$\begin{aligned} DO_{492} &= \alpha \times [ON] + \beta [AU] & [ON] &= [DO_{492} - \beta [AU]] / \alpha \\ DO_{520} &= \alpha' \times [ON] + \beta' [AU] & [AU] &= [DO_{520} - \alpha' / \alpha DO_{492}] / [(\alpha \beta' - \alpha' \beta) / \alpha] \end{aligned}$$

Avec :

- [ON] : concentration en oses neutres (en  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )
- [AU] : concentration en acides uroniques (en  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )
- $DO_{492}$  et  $DO_{520}$  : densité optique de l'échantillon lue à  $\lambda=492$  nm et à  $\lambda=520$  nm
- $\alpha$  : pente de la droite étalon de galactose obtenue pour le dosage au phénol sulfurique
- $\alpha'$  : pente de la droite étalon de galactose obtenue pour le dosage
- $\beta$  : pente de la droite étalon d'acide galacturonique obtenue par dosage d'ON
- $\beta'$  : pente de la droite étalon d'acide galacturonique obtenue par dosage d'AU

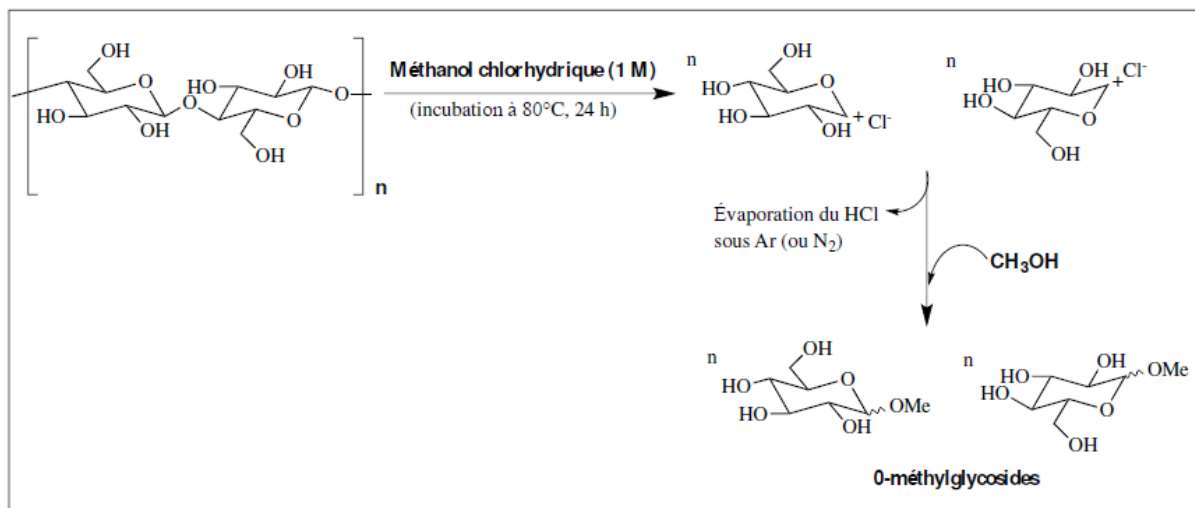
Après correction des concentrations, les teneurs en oses neutres sont exprimées en  $\text{mg.g}^{-1}$  MS et les acides uroniques en pourcentage (%).

### II.4.3. Détermination de la composition monosaccharidique des fractions extraites de la paroi cellulaire par chromatographie en phase gazeuse

Il s'agit d'obtenir, à partir des monosaccharides constitutifs des polysaccharides extraits, des dérivés, des méthylglycosides triméthylsilylés par une méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés. Ainsi, les monosaccharides neutres et les acides uroniques sont analysés sous forme de méthylglycosides O-triméthylsilylés (Kamerling et Gerwig, 1975; Montreuil *et al.*, 1986). A 150  $\mu\text{g}$  de polysaccharides sont ajoutés 20  $\mu\text{g}$  de méso-inositol (MI) comme témoin interne. L'échantillon est ensuite lyophilisé.

#### II.4.3.1. Méthanolyse

Un volume de 1 mL de méthanol chlorhydrique 1 M est ajouté à l'échantillon polysaccharidique anhydre afin de libérer les monosaccharides sous forme de méthylglycosides (Figure 39). Le mélange est incubé pendant 24 h à 80°C dans un tube scellé. Après refroidissement, la méthanolyse est stoppée par évaporation de l'hydrolysate sous un flux d'azote.



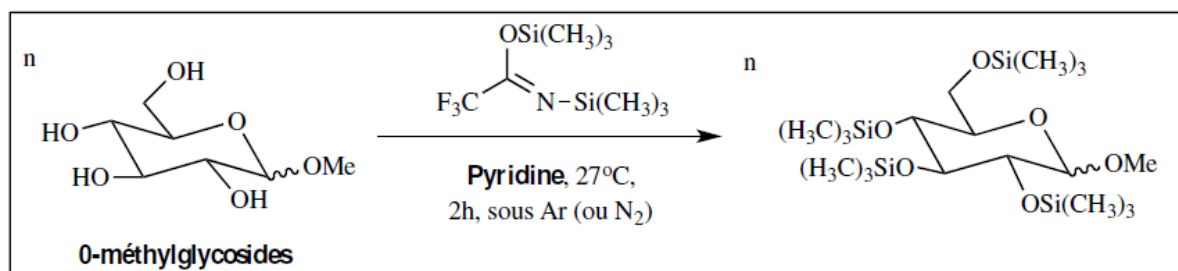
**Figure 39:** Etapes de la réaction de méthanolyse permettant d'aboutir à la formation de O-méthylglycosides proposée par (Kamerling et Gerwig, 1975)

### II.4.3.2. Délipidation

Afin d'éliminer les traces d'acides gras éventuellement présents, les échantillons secs sont mélangés avec 1 mL de méthanol anhydre puis 1 mL d'heptane. La phase supérieure constituée d'heptane et des traces d'acides gras est éliminée. La phase inférieure méthanolique subit deux autres lavages successifs à l'heptane avant d'être finalement séchée sous flux d'azote.

### II.4.3.3. Triméthylsilylation

Un volume de 100  $\mu\text{L}$  de pyridine et 100  $\mu\text{L}$  de N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA) à 1 % (v/v) dans du triméthylchlorosilane (TMCS) sont ajoutés aux méthylglycosides afin de les triméthylsilyler (Figure 40). Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 2 h à 27 °C. Les échantillons sont maintenus à -20 °C avant d'être injectés en CPG.



**Figure 40:** Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après (Kamerling et Gerwig, 1975)

### II.4.3.4. Identification et quantification par CPG des méthylglycosides triméthylsilylés

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont analysés à l'aide d'un chromatographe Perichrom PR 2100 équipé d'une colonne capillaire (0,32 mm x 60 m) OPTIMA®-1-Accent 0,25  $\mu\text{M}$  (Macherey-Nagel) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'azote est utilisé à une pression de 75 kPa comme gaz vecteur et la température de l'injecteur est fixée à 260 °C. Le programme de la température du four est défini comme suit : une montée de 130 à 210 °C à raison de 2 °C.  $\text{min}^{-1}$  avec un palier de 5 min à 190°C, puis une montée de 210 à 260°C à

raison de 5°C. min<sup>-1</sup>. Le chromatographe est piloté par le logiciel Winilab III (Perichrom). Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par les facteurs de correction.

Des monosaccharides témoins sont utilisés afin d'identifier, par comparaison des temps de rétention, les méthylglycosides triméthylsilylés. Les résultats sont exprimés en % molaire.

## **II.4.4. Analyse biochimique des constituants de la paroi cellulaire**

### **II.4.4.1. Extraction des protéines**

#### **II.4.4.1.1. Extraction préalable des protéines intracellulaires**

Pour extraire les protéines intracellulaires dans chacun des compartiments de la plante de sapin de Douglas (Racine, tige et épine), 150 mg de masse fraîche du matériel végétal ont été broyés au mortier dans de l'azote liquide avec 5 mg de Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) pour piéger les polyphénols. Puis, un volume de 1 mL de tampon d'extraction est ensuite ajouté à chaque échantillon.

Ce tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,5 est constitué de :

- 500 mM de Tris HCl ;
- 90 mM de saccharose (osmolarité) ;
- 10 mM d'EDTA (chélation des cations divalents) ;
- 4 mM d'acide ascorbique (agent réducteur empêchant l'oxydation excessive des protéines) ;
- 0,4 % de β- mercaptoéthanol (agent réducteur employé pour éviter l'oxydation des ponts disulfures présents dans les protéines) ;
- 0,1 % de Triton X-100 (détergent utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires) ;
- 2 % v/v inhibiteur de protéases (Protease inhibitor cocktail, P9599, Sigma).

Une fois broyage terminé, les échantillons sont centrifugés à 3000 g pendant 15 min à 4° C. Les surnageants constituent la fraction des protéines intracellulaires, alors que les culots sont conservés pour en extraire les protéines pariétales. Les deux fractions peuvent être conservées à -20 °C jusqu'à dosage des protéines par la méthode de (Bradford, 1976).

#### **II.4.4.1.2. Extraction des protéines pariétales**

Cette extraction est poursuivie à partir des culots obtenus à la fin de l'extraction des protéines intracellulaires, et auxquels est ajouté un volume de 1 mL de tampon salin. Ce tampon salin correspond au même d'extraction auquel est ajouté du NaCl à une concentration finale de 1 M. Le mélange est laissé sous agitation pendant 2 h à 4 °C et ensuite centrifugé à 3000 g pendant 15 min. Les surnageants sont récupérés pour subir un dessalage à l'aide de tubes à ultrafiltration Amicon Ultra (Ultracel-10K, Millipore), de porosité 10 kDa. La centrifugation dans ces tubes s'effectue à 2000 g à 4°C pendant 30 min. Les rétentats sont récupérés et leurs volumes sont ajustés à 1 mL avec le tampon d'extraction : ils constituent alors les extraits de protéines pariétales qui seront évaluées quantitativement par la méthode de (Bradford, 1976). Cet extrait enzymatique (EE) est celui qui va servir à doser les activités pectine méthylestérase (PME).

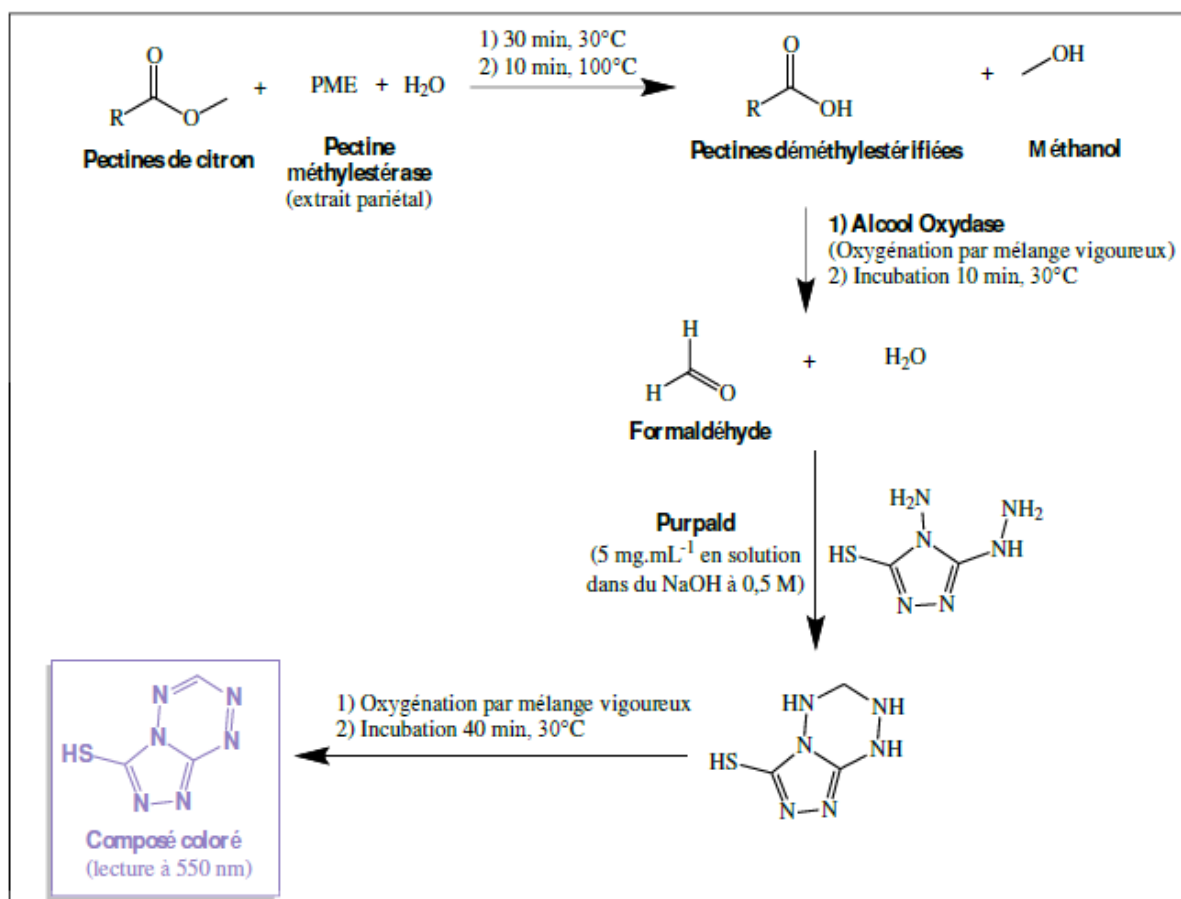
#### II.4.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (BioRad, Munich, Allemagne) (Bradford, 1976). Pour ce faire, 3 répétitions pour chaque échantillon ont été réalisées pour confirmer les résultats. Une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) est réalisée en parallèle de 0 à 3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans de l'eau distillée. Les échantillons sont dilués dans de l'eau déminéralisée.

Après 10 min à l'obscurité et à température ambiante, la densité optique est lue à 595 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) et les résultats sont exprimés en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS.

#### II.4.4.3. Dosage de l'activité Pectine Méthylestérase (PME)

Pour doser l'activité PME, les protéines extraites dans la fraction pariétale sont mises en contact avec des pectines fortement méthylestérifiées qui sont leur substrat préférentiel. Cette réaction de déméthylestérification va entraîner une libération de méthanol qui sera par la suite transformé sous l'action de l'alcool oxydase en formaldéhyde. Ce dernier sera dosé grâce à une réaction colorimétrique (figure 41) (Anthon et Barrett, 2008, 2004).



**Figure 41:** Principe du dosage indirect du méthanol : transformation du méthanol en formaldéhyde par l'intermédiaire de l'alcool oxydase (Bonet, 2016)

##### II.4.4.3.1. Réaction enzymatique

Un volume de 150  $\mu\text{L}$  de l'EE (extrait de protéines pariétales) est ajouté à 200  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7,5 contenant 0,1 % (m/v) de pectines de citron (Sigma, Degré

de méthylestérification > 85 %). Le mélange est incubé dans un bain marie à 30° C pendant 30 min parallèlement avec les blancs qui subiront les mêmes opérations le long du dosage :

- Blanc 1 : composé de 150 µL de tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7,5 et de 200 µL du même tampon auquel sont ajoutés 0,1% (m/v) de pectine de citron.
- Blanc 2 effectué pour chaque échantillon : composé de 150 µL d'EE préalablement dénaturé par chauffage à 100° C au bain-marie pendant 10 min et de 200 µL du même tampon auquel sont ajoutés 0,1% (m/v) de pectine de citron.

La réaction est arrêtée par une incubation à 100° C pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite refroidis dans la glace puis ramenés à température ambiante pour subir une centrifugation à 3000 g pendant 10 min à température ambiante et récupérer le surnageant pour y doser le méthanol.

#### II.4.4.3.2. Dosage du méthanol

La gamme étalon du méthanol 0 – 2 µg.mL<sup>-1</sup> est préparée à partir d'une solution de méthanol à 20 µg.mL<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7.

Parallèlement à la préparation de la gamme étalon, 10 µL du surnageant sont ajoutés à 90 µL de tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7. Les échantillons et les solutions étalons sont additionnés de 100 µL d'une solution d'alcool oxydase à 0.001 U.µL<sup>-1</sup> préparée extemporanément dans du tampon phosphate 0,2 M pH 7. L'ensemble est agité vigoureusement et incubé à 30° C pendant 10 min puis refroidi dans la glace pour arrêter la réaction. Au-delà des 10 min d'incubation, le formaldéhyde formé se transforme en acide formique, il est donc important de ne pas dépasser les 10 min d'incubation.

Un volume de 200 µL d'une solution de Purpald® (4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, 4-Amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole-3-thiol) fraîchement préparée à 5 mg.mL<sup>-1</sup> dans 0,5 M NaOH, est ajouté aux échantillons et à la gamme étalon, et l'ensemble est bien homogénéisé et incubé à 30° C pendant 40 min. Enfin, le tout est dilué par l'ajout de 600 µL d'eau déminéralisée, agité et laissé à température ambiante avant de mesurer les densités optiques à λ=550 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700). Il est à noter que le blanc 1 permet de régler le 0 pour la lecture des DO et que la DO<sub>550 nm</sub> à considérer pour chaque échantillon correspond à la différence entre la DO<sub>550 nm</sub> d'un échantillon et la DO<sub>550 nm</sub> du blanc 2 correspondant.

Les résultats sont exprimés en nKatal.mg de Protéines<sup>-1</sup>.

#### II.4.4.4. Évaluation du degré de méthylestérification des pectines par infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) a été utilisée pour caractériser le degré de méthylestérification (DME) des pectines du sapin de Douglas. Cette approche est inspirée des travaux de Chatjigakis *et al.*, (1998) et Manrique et Lajolo, (2002). Le principe est de mesurer des bandes de vibration émises par les carbonyles (C=O) des fonctions acide carboxylique à 1725-1700 cm<sup>-1</sup>, celles des groupements ester aliphatique à 1750-1735 cm<sup>-1</sup> et carboxylate à 1550-1630 cm<sup>-1</sup> selon Pretsch *et al.*, (2009).

Trois échantillons de DME connu ont été utilisés afin de construire une gamme étalon pour l'évaluation du DME des fractions pectiques extraits des sapins de Douglas : l'acide galacturonique (DME de 0 %), des pectines d'agrumes (DME de 85 %) commerciaux, et un mélange de ces deux derniers afin d'obtenir un échantillon standard à un DME de 21,25 %.

Les pectines de la gamme étalon ainsi que les fractions pectiques PHM et PFM extraites selon le protocole décrit dans le paragraphe II.4.1 ont été solubilisées dans de l'eau ultra pure et leur pH ajusté à 6 avec une solution de KOH 0,1 M afin d'ioniser totalement les fonctions acide carboxylique en fonctions carboxylate. Ceci permet de caractériser uniquement les fonctions C=O des carboxyles méthylestérifiés puisque, initialement, le pic à 1740 cm<sup>-1</sup> n'est pas spécifique à la vibration des fonctions carbonyle (C=O) des fonctions acide carboxylique méthylestérifiées (COOCH<sub>3</sub>) mais aussi des acides carboxyliques (COOH).

Après ajustement de pH, les échantillons ont été congelés puis lyophilisés. Afin de réaliser l'analyse IR, des pastilles ont été formées à partir de 180 mg de bromure de potassium (KBr) et de 1 mg d'échantillon (gamme, PHM ou PFM) et ensuite placées dans le faisceau d'un spectromètre Perkin Elmer (spectrum 1000) à transformée de Fourier. Les spectres IR obtenus sont analysés sur une gamme de nombres d'ondes compris entre 500 et 4000 cm<sup>-1</sup>. La bande à 1630 cm<sup>-1</sup> correspond à la vibration des fonctions carboxylate COO<sup>-</sup> des acides galacturonique non méthylestérifiés, alors que la bande à 1740 cm<sup>-1</sup> est attribuée à celle des carbonyles des acides galacturoniques méthylestérifiés. La droite des échantillons de la gamme permet de déterminer le DME des selon l'équation suivante :

$$\text{DME} = [A_{1740} / (A_{1740} + A_{1630})] / \alpha$$

Avec :

- A<sub>1740</sub> : aire du pic à 1740 cm<sup>-1</sup> ;
- A<sub>1630</sub> : aire du pic à 1630 cm<sup>-1</sup> ;
- α : coefficient directeur de la droite d'étalonnage.

## II.5. Dosage de molécules intracellulaires impliquées dans la réponse au stress aluminique

### II.5.1. Extraction des composés intracellulaires

Le protocole d'extraction a été adapté des travaux de (Bonet *et al.*, 2016a). Des plantules de sapin de Douglas, préalablement congelées à la récolte, sont découpées pour séparer racines, tiges et épines. Une masse comprise entre 100 et 150 mg de matière fraîche est pesée avant de broyer l'échantillon au mortier dans de l'azote liquide. La poudre végétale est mélangée à 1,5 mL de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH = 7,5. Après agitation, le mélange est centrifugé à 10000 g à 4° C pendant 30 min. Le surnageant est récupéré auquel est ajouté un volume de solution d'acide trichloracétique (TCA) 30 % pour obtenir une concentration finale en TCA de 10 % qui permet de précipiter les protéines. Après une nouvelle centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 10 min, le surnageant (TCA) est récupéré pour doser la teneur en proline et en thiols non protéiques.

### II.5.2. Détermination de la teneur en proline

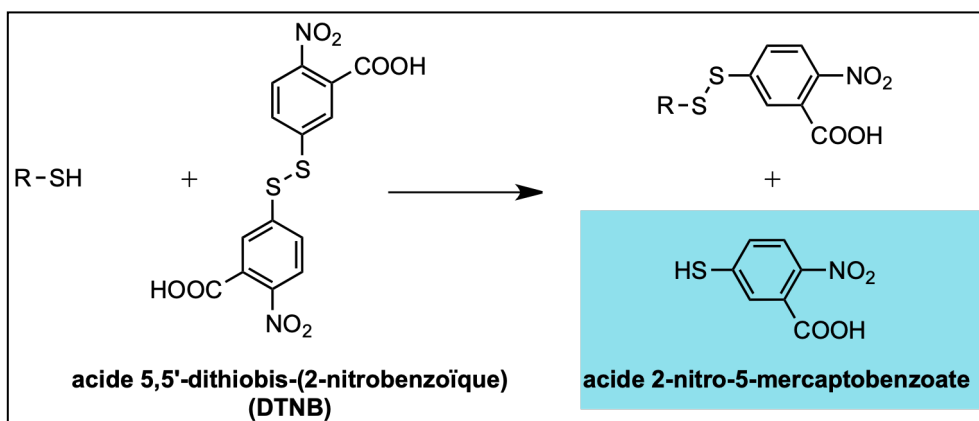
Un volume de 200 µL de l'échantillon (surnageant TCA) est additionné de 800 µL de ninhydrine 1% (m/v) dilué dans de l'acide acétique à 60 % (v/v). Après agitation, le mélange est chauffé pendant 20 min à 95°C. Après refroidissement, 1 mL de toluène est ajouté, le mélange est agité puis laissé décanter pendant deux heures. La phase supérieure comprenant le toluène et la proline ayant réagi avec la ninhydrine est prélevée. Une mesure de la densité optique est réalisée sur cette phase à une longueur d'onde λ = 520 nm. En parallèle, une gamme



étalon en proline est préparée pour des concentrations comprises entre 0 et 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  préparées dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH = 7,5.

### II.5.3. Détermination de la teneur en thiols non protéiques

Les thiols non protéiques présents chez les végétaux sont principalement la cystéine (libre), le glutathion, les phytochélatines et ses précurseurs (glutamylcystéine). Ces molécules (et principalement le glutathion et les phytochélatines) grâce à leur groupement thiol (-SH) sont potentiellement capables de complexer des cations métalliques. Leur dosage est basé sur une réaction avec l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque (DTNB) comme montré sur la figure 42.



**Figure 42:** Schéma de la réaction entre le DTNB et les fonctions thiols d'après (Bonet, 2016)

Au préalable, une gamme étalon de cystéine est préparée pour des concentrations comprises entre 0 et 300  $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  préparé dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH = 7,5. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  de l'échantillon (surnageant TCA) est additionné de 100  $\mu\text{L}$  de triéthanolamine 50 % pour neutraliser le TCA présent dans l'échantillon. Puis, un volume de 700  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH = 7,5 additionné d'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) à la concentration de 6.3 mM. Le DTPA permet de chélater les cations métalliques susceptibles d'être complexé avec les thiols non protéiques. Cette étape est indispensable car le dosage de ces composés suppose de disposer d'une forme libre de thiols non protéiques (non complexés avec un cation métallique). Après 10 min à température ambiante, un volume de 50  $\mu\text{L}$  de DTNB 10 mM préparé dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH = 7,5 additionné de DTPA à la concentration de 6.3 mM est ajouté à l'échantillon ou à 900  $\mu\text{L}$  d'une solution de la gamme étalon. Après agitation et incubation 5 min à température ambiante, la densité optique est mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 412 \text{ nm}$ .

### II.5.4. Dosage des pigments de type chlorophylles et caroténoïdes

Les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes des épines ont été déterminées par spectrophotométrie après extraction dans de l'acétone.

Une masse d'environ 100 mg de MF est pesée puis broyée au mortier préalablement refroidi en présence de 25 mg de  $\text{MgCO}_3$  afin de neutraliser le broyat. Puis, 2 mL d'acétone à 80 % (v/v) est ajouté avant de centrifuger le mélange 3000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est recueilli et constitue l'extrait de pigment dont l'absorbance est mesurée aux trois longueurs

d'onde : 470, 647 et 633 nm. Puis, les concentrations en pigments de l'extrait sont calculées à partir des équations de Lichtenthaler (1987) :

$$C_a = (12,25 \times \text{Abs}_{663}) - (2,79 \times \text{Abs}_{647})$$

$$C_b = (21,5 \times \text{Abs}_{647}) - (5,1 \times \text{Abs}_{663})$$

$$C_{\text{car}} = [(1000 \times \text{Abs}_{470}) - (1,82 \times C_a) - (85,02 \times C_b)] / 198$$

- $\text{Abs}_{470}$  : absorbance de l'extrait acétonique à  $\lambda = 470$  nm ;
- $\text{Abs}_{647}$  : absorbance de l'extrait acétonique à  $\lambda = 647$  nm ;
- $\text{Abs}_{663}$  : absorbance de l'extrait acétonique à  $\lambda = 663$  nm.
- $C_a, C_b, C_{\text{car}}$  : concentration en chlorophylle a, chlorophylle b, et caroténoïdes exprimées en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

A partir de ces données, les teneurs en pigments sont finalement exprimées en  $\text{mg.g}^{-1}$  MS.

### II.5.5. Dosage de l'activité gaïacol peroxydase (GPox)

L'activité de la peroxydase de gaïacol a été quantifiée dans les fractions protéiques intracellulaires obtenue lors de l'extraction de la PME (paragraphe II.4.4.1.1). Un échantillon de 10  $\mu\text{g}$  de protéines totales de la fraction intracellulaire est dilué dans 1 mL du tampon phosphate potassique 50 mM de pH 6,5 et mélangé avec du gaïacol (substrat) 0,25% (à partir d'une solution mère de 5 % préparée dans l'éthanol à 95% m/v) (Issawi *et al.*, 2018).

La réaction est déclenchée par l'addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à une concentration finale de 2,5 mM et l'augmentation de la densité optique à  $\lambda = 436$  nm est suivie pendant 2 min. Cette augmentation correspond à la formation du tétraguaiacol. L'activité GPox est alors calculée en prenant en considération la pente de cette augmentation, avec un coefficient d'extinction molaire de  $25,5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

## II.6. Analyses des tissus végétaux par microscopie

### II.6.1. Localisation de l'Al dans les tissus végétaux par microscopie confocale

Pour toutes les observations en microscopie confocale, des coupes transversales de 10  $\mu\text{m}$  ont été réalisées au cryomicrotome à  $-20$  °C sur du matériel végétal frais ou congelé après récolte.

Les analyses ont été réalisées par ensemble confocal Zeiss LSM 510-Meta équipé d'un microscope inversé, sur la plateforme Biscem de l'Université de Limoges. L'acquisition se fait par le logiciel LSM Zen.

#### II.6.1.1. Analyse après marquage au Calcofluor White

Pour étudier l'effet de l'aluminium sur les différents modèles d'études de sapin de Douglas, les coupes de tissus végétaux ont été marquées par une solution de Calcofluor White (Sigma-Aldrich, St Louis) à 0,02% dans de l'eau distillée pendant 5 min à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée. Le Calcofluor se fixe sur la cellulose des parois cellulaires et émet une fluorescence bleue à  $\lambda = 430$  nm quand il est excité à  $\lambda = 254$  nm en microscopie confocale.

### II.6.1.2. Analyse après marquage au Morin

Parmi les techniques de localisation de l'Al dans les tissus végétaux, le marquage au réactif de Morin a été réalisé. Le Morin (3,5,7,2'-4' pentahydroxy flavone), étant un composé phénolique qui, dans la nature, est faiblement fluorescent. Cependant, lorsqu'il est chélaté avec des ions métalliques non paramagnétiques, en particulier  $Al^{3+}$  et  $Be^{2+}$ , il forme des complexes hautement fluorescents et à pH acide, le Morin montre une spécificité élevée pour l'aluminium (Hajibolet et Poschenrieder, 2015). Cette propriété a été explorée pour la localisation de l'Al et a fait du marquage au Morin l'un des techniques les plus fiables pour repérer l'aluminium dans les tissus végétaux. Le complexe Al-Morin émet une fluorescence verte avec une longueur d'onde d'excitation de 420 nm et une longueur d'onde d'émission de 510 nm (Browne *et al.*, 1990). Une solution de Morin (Sigma-Aldrich) 100  $\mu$ M dans du tampon acétate d'ammonium 5 mM pH 5 a été donc utilisée pour le marquage de l'Al dans les tissus végétaux. Tout d'abord, les coupes ont été rincées pendant 10 min dans le tampon acétate d'ammonium 5 mM pH 5. Ensuite, elles ont été marquées par la solution de Morin pendant 60 min et enfin rincées par le tampon pendant 10 min. Au microscope confocal, le complexe Al-Morin émet une fluorescence verte avec une longueur d'onde d'excitation de 420 nm et une longueur d'onde d'émission de 510 nm.

Les tissus végétaux émettent une fluorescence endogène non spécifique appelée autofluorescence (AF) due à l'existence de composés naturels (principalement la lignine et la chlorophylle) capables d'absorber la lumière utilisée pour exciter le marqueur d'intérêt fluorescent, le Morin dans notre cas. Ainsi, lors de l'acquisition, des signaux d'émission du complexe Al-Morin et ceux correspondant au phénomène d'autofluorescence ont été mesurés. Cette autofluorescence émet sur un large spectre : par exemple, les coupes transversales des racines des sapins de Douglas ont émis dans le bleu, dans le jaune et dans le rouge lointain. Il a été donc nécessaire de faire l'acquisition en mode spectral dans l'intervalle 508 nm - 633 nm étant donné que c'est l'intervalle de la plus faible émission d'AF et en même temps l'intervalle potentiel de l'émission du complexe Al-Morin (510 nm) afin de supprimer le maximum de fluorescence endogène et d'optimiser le contraste du marquage au Morin.

### II.6.1.3. Conservation des coupes pour la microscopie confocale

Une fois les coupes (marquées ou pas) sur la lame, elles ont été couvertes de quelques gouttes d'une solution de Mowiol avant de déposer la lamelle. La solution du Mowiol a été préparée comme suit : 2,4 g de Mowiol (Calbiochem, 475904) ont été homogénéisés avec 4,75 mL de Glycérol et 6 mL d'eau distillée et laissés 2 h à température ambiante. Ensuite, le mélange est incubé à 53° C et 12 mL de Tris 0,2 M pH 8,5 y sont ajoutés avec des agitations fréquentes jusqu'à ce que le Mowiol soit bien dissout. Enfin, le tout est centrifugé pendant 20 min à 1500 g et le surnageant est récupéré et aliquoté par 1 mL pour conservation à -20° C.

### II.6.2. Microscopie électronique à balayage en mode environnemental

L'observation en microscopie électronique à balayage en mode environnemental à l'avantage de ne pas nécessiter une préparation de l'échantillon. Les racines des plantules *in vitro* et sous serre ainsi que celles des jeunes arbres de Douglas ont été isolées et bien lavées avec de l'eau distillée afin d'être observées au MEBE (FEI QUANTA FEG ESEM 450). Les observations ont été faites sur la plateforme CARMALIM de l'Université de Limoges.

## Chapitre III. Résultats

### III.1. Modèle d'étude *in vitro*

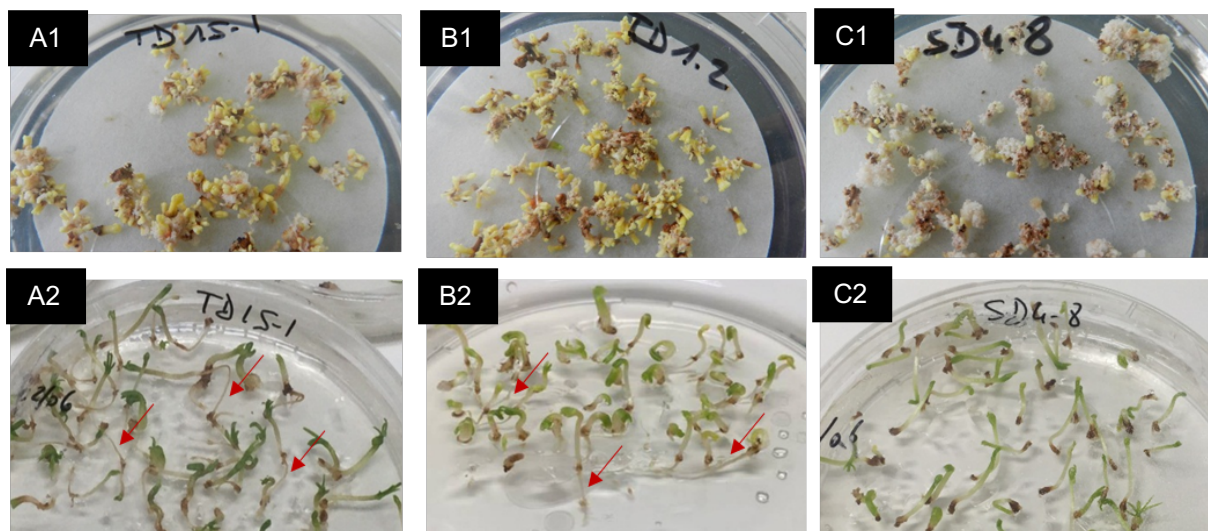
Des embryons somatiques (ES) de sapin de Douglas issus des croisements contrôlés comme indiqué dans le tableau 1 (Lelu-walter *et al*, 2018) ont été, dans un premier temps, utilisés comme modèle d'étude de la toxicité aluminique sur cette espèce. Il s'agit des lignées TD 15-1 et TD1-2, deux lignées apparentées, et SD4-8, non apparentée avec ces derniers. Les cultures *in vitro* présentent l'avantage en plus de l'obtention rapide de grandes quantités d'embryons, de minimiser la variabilité génétique du matériel et permettre d'évaluer plus facilement l'impact de l'aluminium au niveau racinaire.

Les embryons somatiques matures ont été cultivés pendant 8 semaines sur milieu de germination additionné ou non d' $AlCl_3$ , et les organes ont été séparés (racines, tiges et épines). Les analyses et mesures ont été réalisées sur chaque organe des plantules récoltées.

#### III.1.1. Effet de l'Aluminium sur l'élongation racinaire et la croissance de la partie aérienne des plantules cultivées *in vitro*

##### III.1.1.1. Mesures biométriques et effet sur la masse sèche des plantules

Comme il a été décrit dans le paragraphe II.1.1 les ES ont été mis en germination à l'obscurité pendant une semaine avant d'être repiqués sur les milieux de germination de la gamme de concentration en  $AlCl_3$  sélectionnée. A ce stade, des différences de développement apparaissent déjà entre les génotypes (Figure 43).



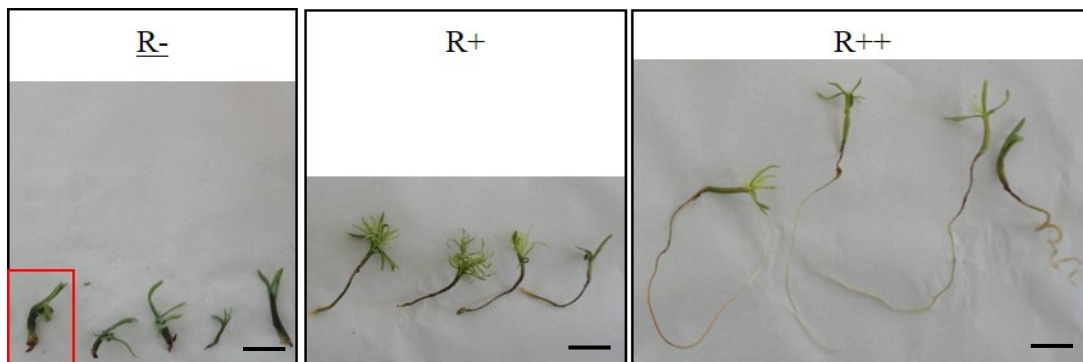
**Figure 43:** Evolution des ES entre la phase de maturation et la première semaine de germination à l'obscurité. Les ES matures : (A1) TD 15-1, (B1) TD 1-2 et (C1) SD 4-8. Les germinations d'ES après la première semaine de germination à l'obscurité : (A2) TD 15-1, (B2) TD 1-2 et (C2) SD 4-8. Les flèches repèrent des racines formées chez certaines plantules après 7 j de germination à l'obscurité.

Les lignées TD 15-1 et TD 1-2 présentent un comportement similaire : la racine est absente chez plus de 30% des plantules et elle mesure environ 1 cm pour le reste des plantules (Figure 43 A2 et B2). Ce phénotype proche peut être dû au lien de parenté qui lie les deux lignées. Par contre, pour les SD4-8, les racines sont complètement absentes chez toute la population

(Figure 43 C2). Ce modèle n'est donc pas conservé pour le reste des expériences. Les mesures d'élongation de la racine, le développement de la partie aérienne ainsi que les masses sèches des germinations d'ES ont ensuite été évalués uniquement pour les lignées TD15-1 et TD1-2 exposées à différentes concentrations en  $\text{AlCl}_3$ .

Un tri selon la longueur des racines est alors réalisé pour constituer les lots homogènes (Figure 44). Pour les TD 15-1 et les TD 1-2, 3 catégories ont été obtenues :

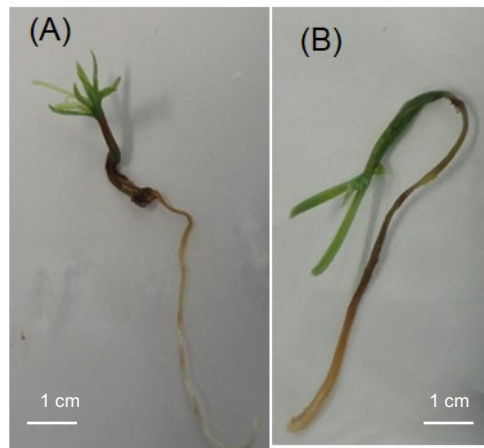
- « R- » : sans racines, et représente environ 40% du lot.
- « R+ » : la longueur de la racine est inférieure à 40 mm, et représente environ 30 % du lot.
- « R++ » : la longueur de la racine est supérieure à 40 mm, et représente environ 30 % du lot.



**Figure 44:** Différents phénotypes observés sur les plantules obtenues après 8 semaines de croissance des plantules de sapin de Douglas des deux lignées TD 15-1 en conditions témoins (sans apport d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu). Le cadre rouge montre les symptômes d'hyperhydricité. « R- » correspond aux plantules sans racines ; « R+ » correspond aux plantules dont la longueur de la racine est inférieure à 40 mm ; « R++ » correspond aux plantules dont la longueur de la racine est supérieure à 40 mm. La barre d'échelle représente 1 cm.

Les lignées TD 15-1 et TD 1-2, étant deux lignées apparentées, leur comportement est très similaire. Il semble donc inutile de les utiliser simultanément pour étudier la réponse du sapin de Douglas au stress aluminique. La lignée TD 1-2 a été donc abandonnée pour la suite de l'étude.

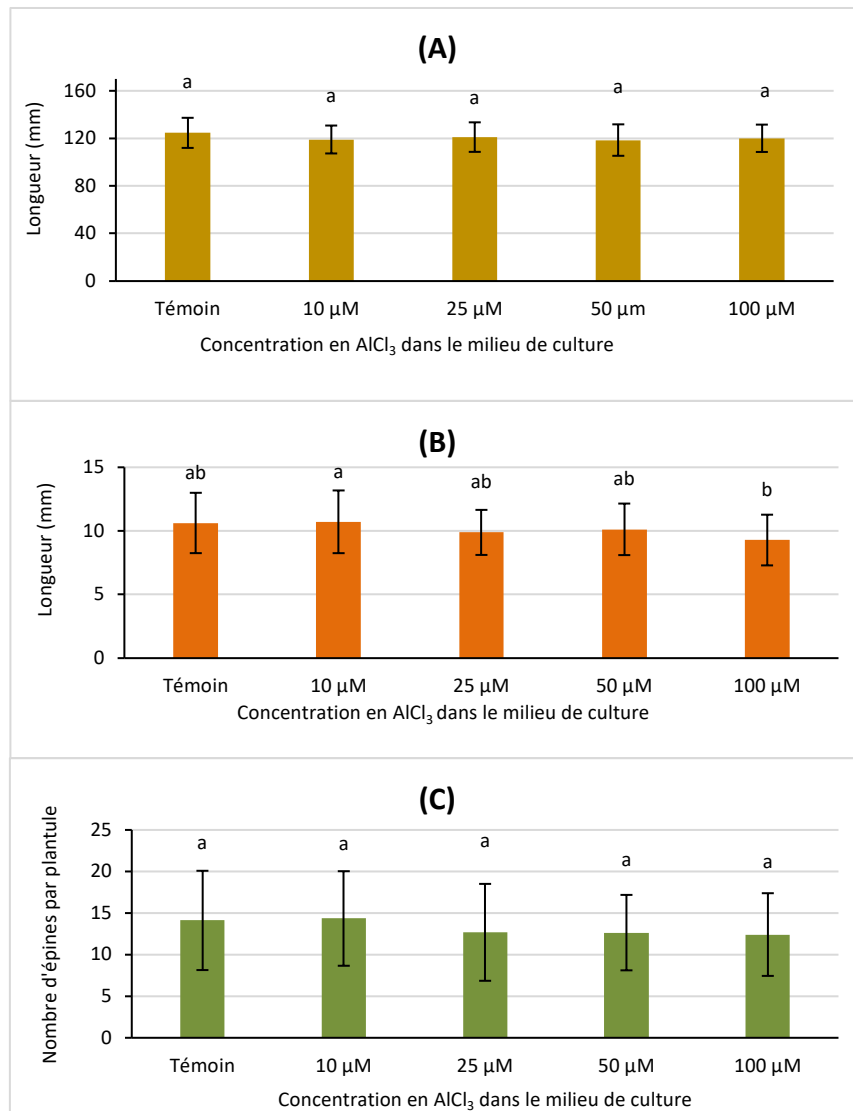
Seuls les ES TD 15-1 de la catégorie R++ a été conservée pour le reste des expériences et dosages, puisque, en plus de l'absence de la racine chez R-, plusieurs anomalies ont été repérées sur les R+ comme le phénomène d'hyperhydricité des épines et le durcissement au niveau des racines et des tiges (Figure 45).



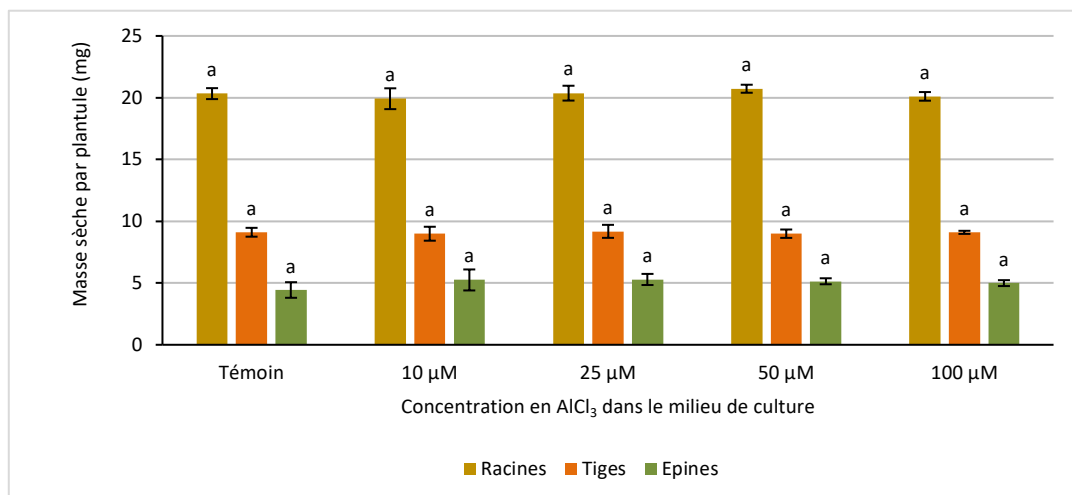
**Figure 45:** Symptômes du phénomène d’hyperhydricité des plantules de sapin de Douglas *in vitro*. **(A)** Une plantule R++ de morphologie normale après exposition 8 semaines à 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . **(B)** Une plantule R++ présentant des symptômes d’hyperhydricité après exposition 8 semaines à 500  $\mu\text{M}$  (épaississement de la racine, de la tige et des épines, des épines plus longues et foncées)

Dans un premier temps, la gamme de concentration utilisée est la suivante : 0 – 10 – 25 – 50 et 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Ce choix est appuyé sur l’analyse des données issues de la littérature. L’effet de l’aluminium sur les plantes est en effet souvent étudié dans une gamme de concentration qui ne dépasse pas 200  $\mu\text{M}$ . Pour les cellules de tabac TBX-2 par exemple, une gamme jusqu’à 150  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  a été utilisée, et à partir de 50  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , une altération de la membrane plasmique et un effondrement de la vacuole ont été notés (Kariya *et al*, 2013). Pour le maïs, la gamme est limitée à 25  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  et à cette faible concentration, une inhibition de l’élargissement racinaire a été observée (Eticha *et al*, 2005).

Les racines font en moyenne 120 mm quelle que soit la concentration de l’ $\text{AlCl}_3$ , les tiges environ 10 mm. Le nombre d’épines reste aux alentours de 13 épines par plantule (Figure 46). Ainsi, aucune différence significative n’est enregistrée. Ceci est aussi le cas des masses sèches des organes (Figure 47). Même en augmentant la concentration de l’ $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de germination, la masse sèche des racines est quasi constante d’environ 20 mg, les tiges 9 mg et les épines 5 mg par plantule.



**Figure 46:** Effet de la concentration en  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture (gamme 0-100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ ) sur la croissance des racines **(A)** et le développement des tiges **(B)** et des épines **(C)** des plantules issues des ES TD 15-1 de sapin de Douglas *in vitro*. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type (ET) de 4 expériences indépendantes avec 20 plantules par condition. Les différentes lettres indiquent les différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0.05$ ), ANOVA test,  $n = 80$  (moyenne +/- ET).

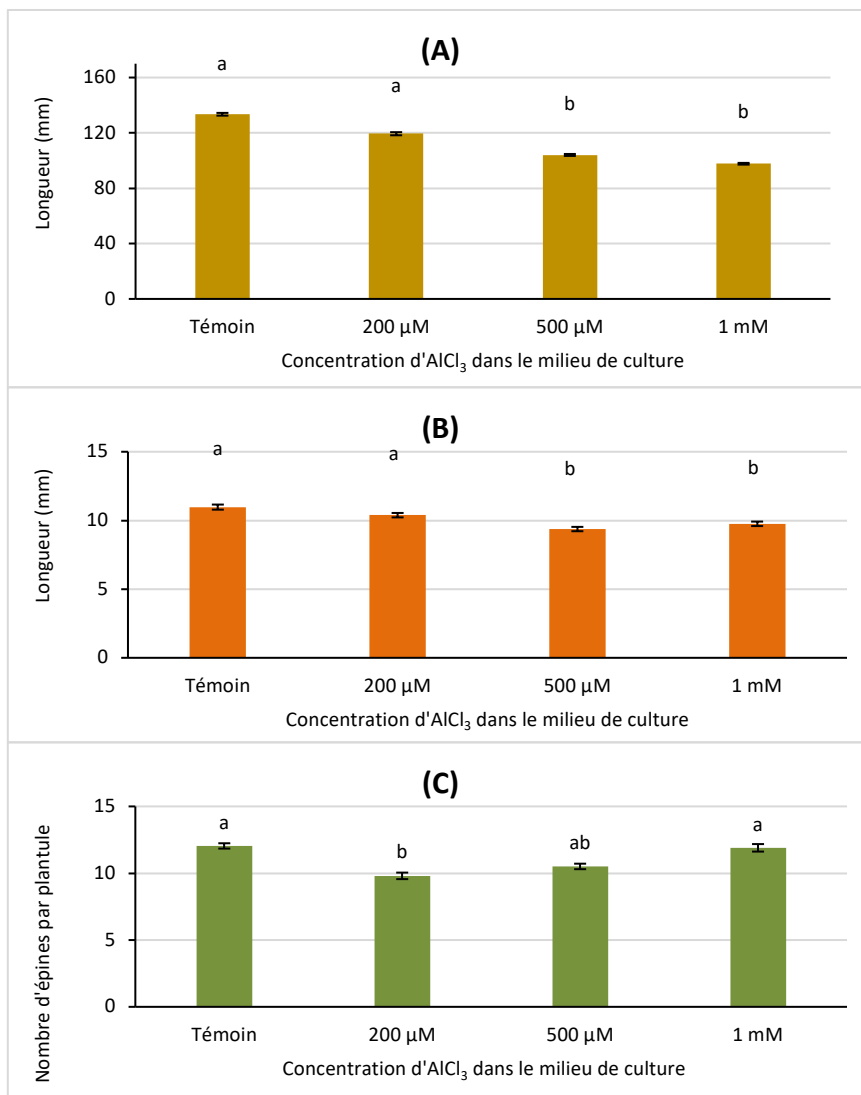


**Figure 47:** Effet de la concentration en AlCl<sub>3</sub> (gamme 0-100 µM) dans le milieu de culture sur la masse sèche des différents organes des plantules issues des ES de sapin de Douglas TD 15-1 R++. Pour une récolte, les masses du même organe de l'ensemble des plantules ont été regroupées pour obtenir une masse suffisante pour une pesée précise. Les organes ont été ensuite lyophilisés afin d'obtenir la masse sèche. Chaque barre de l'historgramme représente la moyenne et l'écart-type (ET) de 4 expériences indépendantes avec 20 plantules par condition. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=4$  (moyenne+/- ET).

Les expériences préliminaires ont montré que cette gamme était insuffisante pour atteindre des concentrations toxiques pour les plantules. Aucun effet n'a été observé sur la croissance racinaire (figure 47 A) et le développement de la partie aérienne (figure 46 B et C).

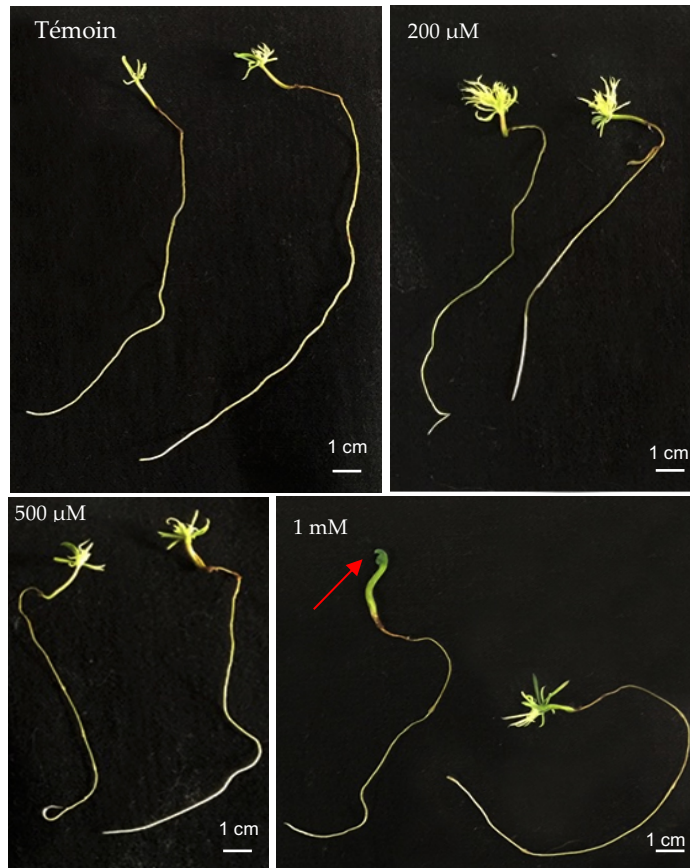
A la suite de l'obtention de ces résultats préliminaires, la gamme de concentration en AlCl<sub>3</sub> a été élargie jusqu'à 1 mM et les mêmes mesures ont été réalisées. Un effet inhibiteur significatif sur la croissance des racines a alors été observé en présence de 500 µM et 1 mM d'AlCl<sub>3</sub>: la longueur moyenne de la racine a été significativement réduite de 133 mm sur milieu témoin à 104 mm et 97 mm en présence de concentrations en AlCl<sub>3</sub> de 500 µM et 1 mM, respectivement (Figure 48). De plus, une diminution significative d'environ 18 % de la longueur de la tige a été observée à partir 500 µM d'AlCl<sub>3</sub> (environ 9 mm) par rapport à la condition témoin (environ 11 mm). Par ailleurs, le nombre moyen d'aiguilles a chuté de manière significative en présence de 200 µM d'AlCl<sub>3</sub> passant de 12 à 9 épines par plantule. De manière surprenante, une tendance inverse a été enregistrée avec des concentrations plus élevées et, finalement, en présence de 1 mM AlCl<sub>3</sub>, le nombre d'épines rejoint la valeur observée dans la condition témoin (12 épines par plantule).





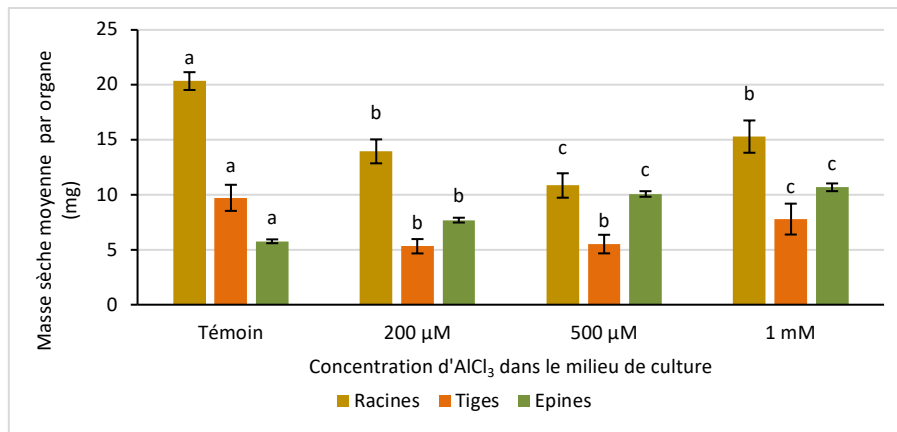
**Figure 48:** Effet de la concentration en  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture (gamme 0-1 mM) sur la croissance des racines **(A)** et le développement des tiges **(B)** et des épines **(C)** des plantules issues des ES de sapin de Douglas TD 15-1 R ++ *in vitro*. Chaque barre des histogrammes représente la moyenne et l'erreur standard (SE) de 13 expériences indépendantes avec chacune 20 plantules. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), test Kruskal-Wallis,  $n = 260$  (moyenne +/- SE)

En présence de 1 mM  $\text{AlCl}_3$ , deux phénotypes peuvent être distingués malgré le développement racinaire similaire : des plantules avec un développement normal des parties aériennes (avec plusieurs aiguilles) et des plantules avec des cotylédons épais vert foncé et apparemment dépourvues d'aiguilles développées (Figure 49).



**Figure 49:** Effet de la concentration en aluminium sur la morphologie des plantules de sapins de Douglas âgées de 8 semaines. La flèche rouge montre le phénotype présentant une hyperhydricité observé pour une concentration en  $\text{AlCl}_3$  du milieu de culture de 1 mM

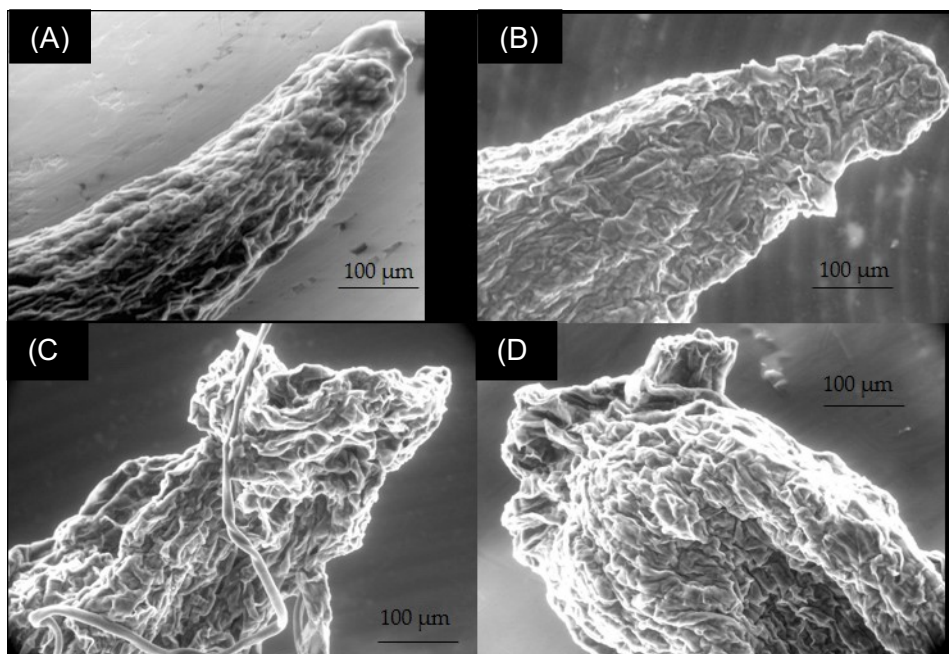
Les masses sèches des racines et leur élongation semblent évoluer dans le même sens jusqu'à 500  $\mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  (Figure 50). La masse sèche des racines diminue de 50% en présence de 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (11 mg) par rapport à la condition témoin (20 mg). Au contraire, la masse sèche des aiguilles augmente progressivement avec la concentration d' $\text{AlCl}_3$  et passe de 5 mg dans le milieu de culture témoin à 10 mg pour 1 mM d' $\text{AlCl}_3$ , alors que le nombre moyen d'aiguilles reste presque constant (environ 10 épines par plantule). Cette augmentation de masse peut être due à des phénomènes d'épaississement rencontrés de plus en plus fréquemment avec des concentrations plus élevées en  $\text{AlCl}_3$ : 20% des plantules présentent des symptômes d'hyperhydricité avec 500  $\mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  et 35% avec 1 mM d' $\text{AlCl}_3$ . Dans ce dernier cas, les aiguilles semblaient plus épaisses, plus longues et plus larges avec une tendance à s'enrouler et elles présentaient une couleur vert foncé, en plus d'être cassantes et translucides. Ce phénomène a également été observé avec les tiges de 30% des plantules somatiques cultivées en présence de 1 mM  $\text{AlCl}_3$ .



**Figure 50:** Effet de la concentration en AlCl<sub>3</sub> (gamme 0-1 mM) dans le milieu de culture sur la masse sèche des différents organes des plantules de sapin de Douglas R++. Pour une récolte, les masses du même organe de l'ensemble des plantules ont été regroupées et la moyenne de masse par plantule est considérée. Les organes ont été ensuite lyophilisés afin d'obtenir la masse sèche. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type (ET) de 13 expériences indépendantes avec 20 plantules par condition. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=13$  (moyenne $\pm$  ET).

### III.1.1.2. Aspect de la pointe racinaire

Des observations en microscopie électronique à balayage en mode environnemental (MEBe) ont permis d'observer les effets de l'exposition des plantules à l'Al sur la forme et l'aspect de la pointe racinaire (Figure 51). Les principaux effets phénotypiques de la toxicité aluminique, selon la littérature, étant en plus de l'inhibition de l'élongation racinaire, l'altération de l'aspect de la pointe racinaire.



**Figure 51:** Observations au MEBe des pointes racinaires des plantules de sapin de Douglas âgées de 8 semaines cultivées en absence (A) ou en présence de 200 μM (B), 500 μM (C) et 1 mM (D) AlCl<sub>3</sub> dans le milieu de culture. Plusieurs échantillons ont été observés et les échantillons présentés sur cette figure sont représentatifs de leurs lots.

En comparant les racines exposées aux différentes concentrations d' $\text{AlCl}_3$  à la racine témoin (Figure 51 A), la forme globale de l'apex de la racine n'a pas été significativement modifiée en présence de 200  $\mu\text{M}$  (Figure 51 B). Une surface plus rugueuse est observée à partir de 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  avec quelques fissurations. Ces fissurations deviennent plus prononcées à 1 mM  $\text{AlCl}_3$  avec une déformation et un enfoncement complet de la forme de la pointe racinaire qui devient plutôt arrondie.

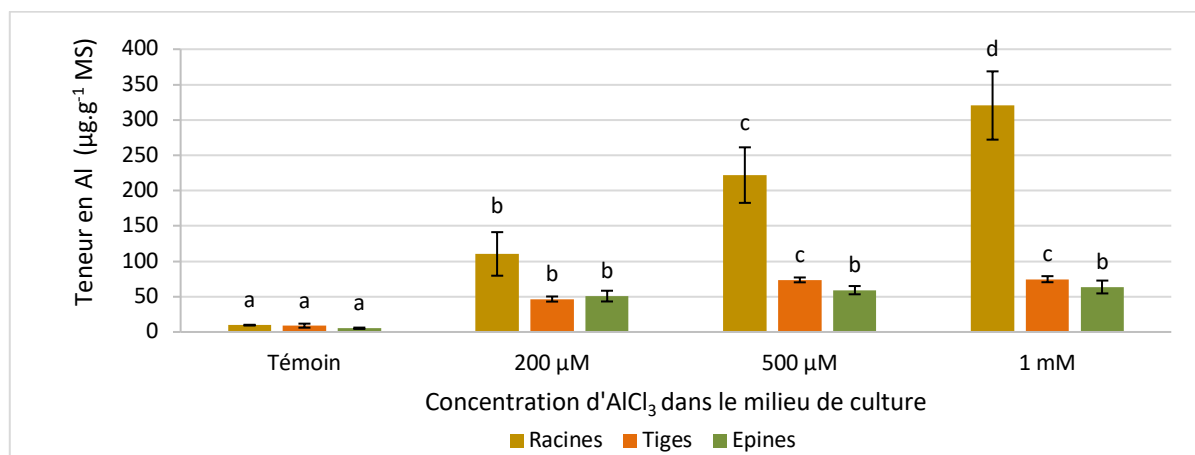
### III.1.2. Distribution de l'aluminium dans les plantules de sapin de Douglas

#### III.1.2.1. Distribution de l'Al dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas

Afin d'étudier l'effet de l'exposition des plantules *in vitro* à la gamme d' $\text{AlCl}_3$  sélectionnée, la distribution de l'Al dans les trois organes des plantules a été déterminée par MP-AES après minéralisation de la biomasse. Une masse sèche de 100 mg a été utilisée pour chaque essai, ce qui correspond à en moyenne la biomasse de 10 plantules.

L'Al est présent même dans les plantules témoins à une teneur de 10, 7 et 4  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS dans les racines, les tiges et les épines, respectivement. Les conditions témoins correspondent à un milieu où aucun ajout d' $\text{AlCl}_3$  n'a été effectué dans le milieu de culture. Ce résultat peut alors être expliqué par la présence d'Al dans l'un des constituants du milieu de culture. Pour le vérifier, le milieu de germination témoin a été donc lyophilisé (0,2 g masse sèche obtenue à partir de 7,5 ml de milieu) puis minéralisé afin de doser l'Al. L'expérience réalisée sur 3 échantillons a montré que le milieu de germination témoin contient 4,36  $\mu\text{mol Al.L}^{-1}$ . Cette teneur reste toutefois faible comparée aux concentrations utilisées pour la gamme d'Al (200  $\mu\text{M}$  – 1 mM).

Ensuite, les dosages montrent que quelle que soit la concentration du milieu en Al, les racines restent l'organe le plus riche en Al. La teneur d'Al est moindre dans les tiges et les épines environ 5 fois moins que dans les racines. Par exemple pour une concentration de 1 mM  $\text{AlCl}_3$ , la racine accumule 320  $\mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS alors que les tiges et les épines contiennent 75  $\mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS et 63  $\mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS respectivement (Figure 52).



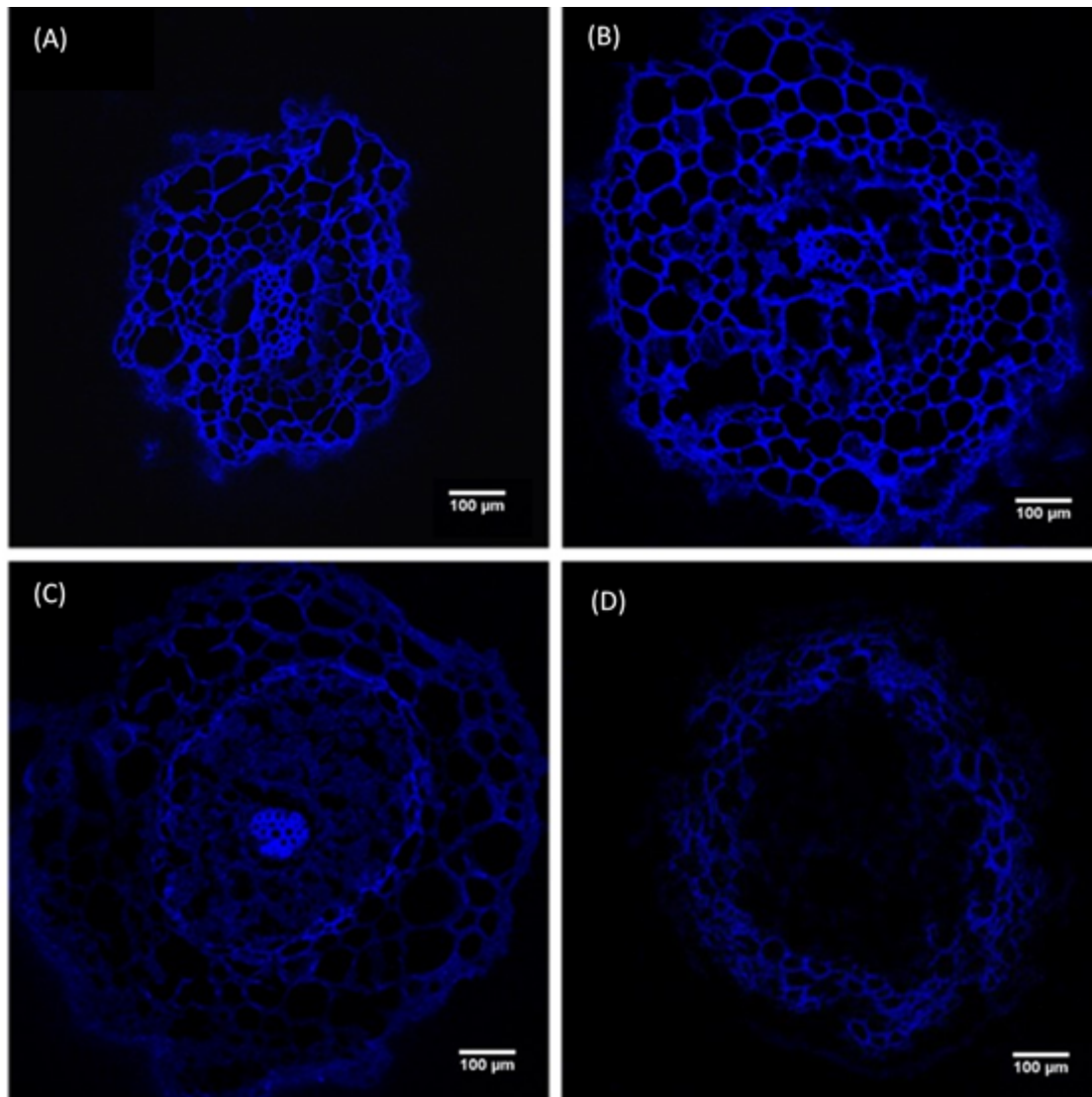
**Figure 52:** Teneurs en Al (en  $\mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS) dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* pendant 8 semaines dans un milieu de germination de concentration variable en  $\text{AlCl}_3$ . Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes avec 10 plantules par condition. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA. n=4 (moyenne +/- ET)

De plus, la teneur en Al dans chaque organe augmente significativement avec la concentration en Al dans le milieu de germination. Dans les racines, cette augmentation est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'Al dans le milieu : la teneur en Al est passée de 9,6  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  MS dans la condition témoin à 320  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  MS en présence de 1 mM d' $\text{AlCl}_3$ . Dans les mêmes conditions, la quantité d'Al augmente environ 8 fois de 9 à 74,7  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  MS dans les et environ 13 fois de 5,2 à 63,6  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  MS pour les épines.

### **III.1.2.2. Localisation tissulaire de l'Aluminium**

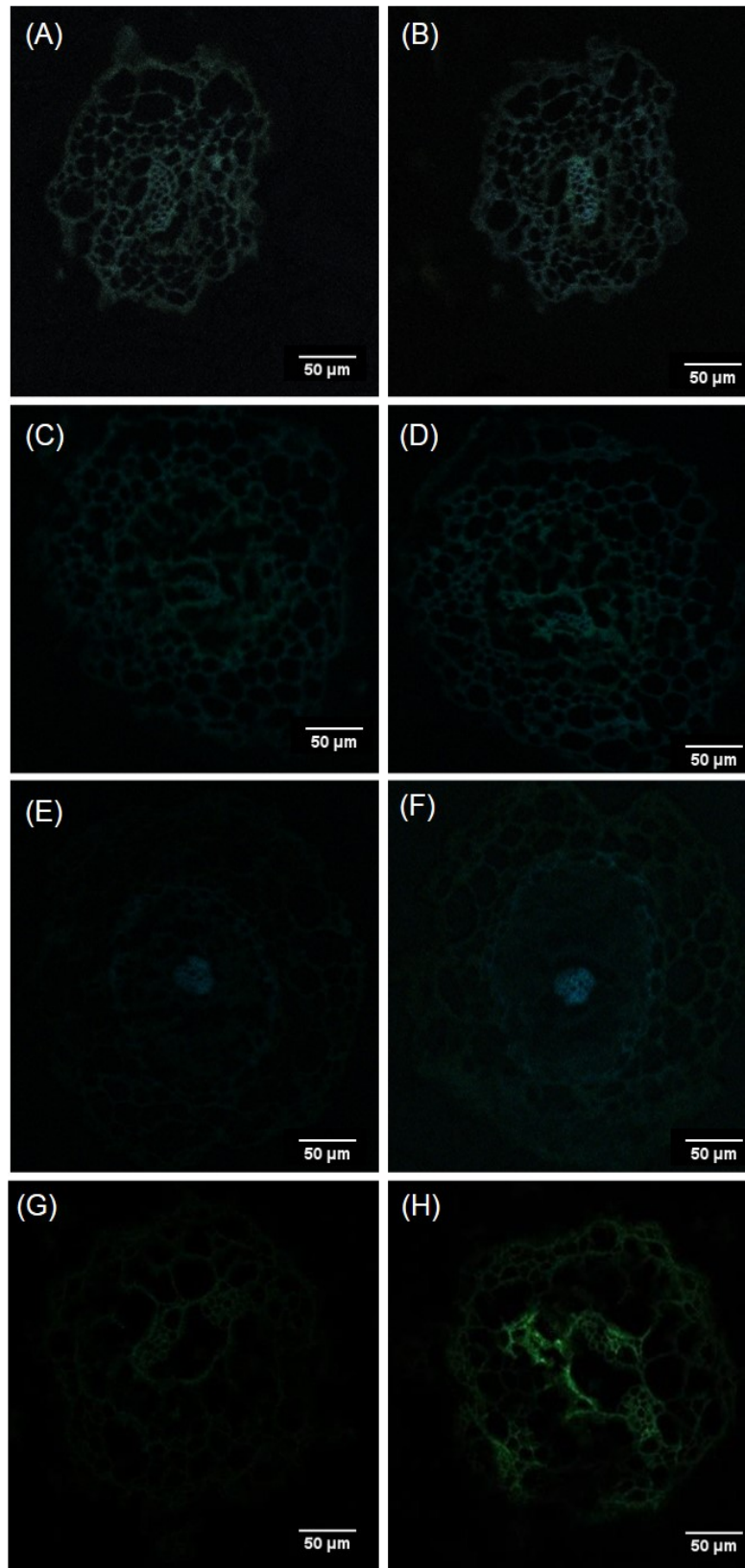
Dans un premier temps, afin de préciser la structure des tissus au niveau de la pointe racinaire, des coupes d'une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à 1 cm de la pointe racinaire et ensuite marquées au Calcofluor afin de mettre en évidence les parois cellulaires. Le Calcofluor est un composé qui se lie à la cellulose de la paroi végétale et émet une fluorescence à  $\lambda=430$  nm quand il est excité à  $\lambda=254$  nm.

Les images obtenues en microscopie confocale ont montré que pour la condition témoin et 200  $\mu\text{M AlCl}_3$  (Figure 53 A et B), la fluorescence se distribue de façon uniforme sur l'ensemble des tissus de la coupe, ce qui permet de voir l'organisation des cellules au sein des différents tissus. A partir de 500  $\mu\text{M AlCl}_3$  (Figure 53 C), le signal commence à présenter des intensités différentes d'un tissu à un autre. Il est possible d'observer une déformation de la structure cellulaire au niveau de l'épiderme racinaire et ces cellules corticales avec une nette diminution du signal fluorescent en comparaison à la coupe témoin. La fluorescence est absente dans le cylindre central de la racine exposée à 1 mM  $\text{AlCl}_3$  (Figure 53 D).



**Figure 53:** Images d’observation par microscopie confocale de coupes transversales des racines de plantules de sapin de Douglas, réalisées à 10 mm de l’extrémité des racines et marquées au Calcofluor. Les plantules ont été cultivées pendant 8 semaines dans des milieux de germination **(A)** Témoin, ou additionné de concentrations variables en AlCl<sub>3</sub> **(B)** 200 μM, **(C)** 500 μM, **(D)** 1 mM. Plusieurs échantillons ont été observés; les échantillons présentés sur cette figure sont chacun représentatifs de leur lot.

D’autres coupes effectuées sur les mêmes racines sont marquées au Morin afin de localiser la présence de l’Al à l’échelle de la cellule, la racine étant l’organe qui accumule le plus d’Al, selon les résultats obtenus par le dosage par MP-AES. Le Morin, en se liant à l’Al<sup>3+</sup>, émet une fluorescence à 510 nm quand excité à 420 nm. Les coupes ont également été observées au microscope confocal.



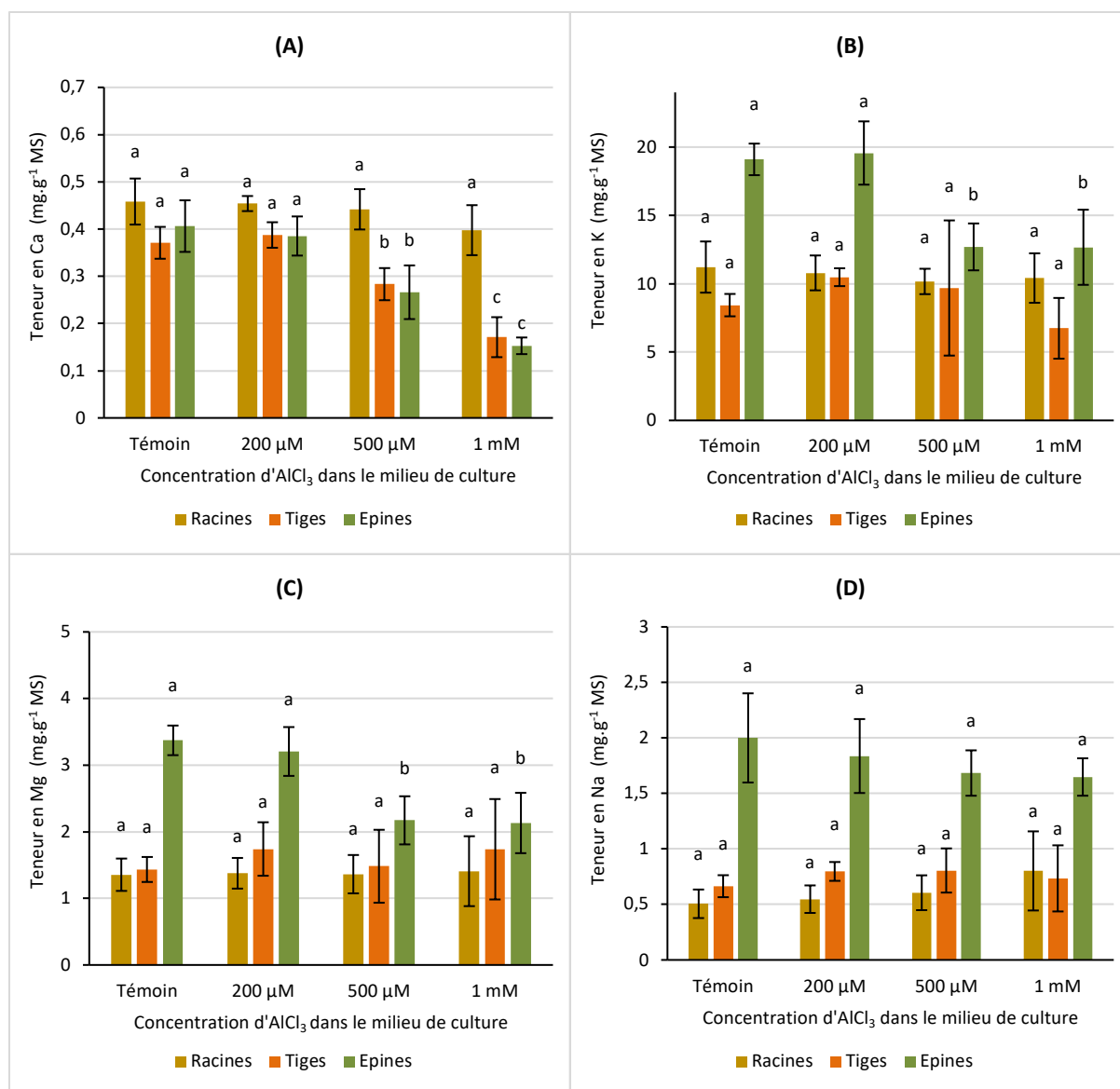
**Figure 54:** Images d'observation par microscopie confocale de coupes transversales des racines de plantules de sapin de Douglas, réalisées à 10 mm de l'extrémité des racines et marquées au Morin. Les plantules ont été cultivées pendant huit semaines dans des milieux de germination **(A, B)** Témoin, ou additionné de concentrations variables en  $\text{AlCl}_3$  **(C, D)** 200  $\mu\text{M}$ , **(E, F)** 500  $\mu\text{M}$ , **(G, H)** 1 mM. L'observation a été effectuée sans marquage préalable pour mesurer l'autofluorescence des tissus **(A, C, E, G)** ou suite à un marquage au Morin **(B, D, F, H)** respectivement.

La réduction du signal d'autofluorescence (AF) *via* le mode spectral a permis de mettre en évidence le signal de fluorescence émis par le complexe Morin-Al<sup>3+</sup>. Ce complexe, détecté y compris dans la condition témoin, est très faible et limité au niveau des parois cellulaires du cylindre central (Figure 54 A). Le signal émis par ce complexe augmente avec l'élévation de la concentration d'Al dans le milieu de culture. En présence de 1 mM AlCl<sub>3</sub>, l'Al a pu être localisé sur presque toute la section et toujours associé aux parois cellulaires. Bien que les intensités des signaux varient, l'émission de fluorescence reste plus prononcée au niveau des cellules des tissus vasculaires et du cortex (Figure 54 H).

### III.1.3. Effet de l'Aluminium sur la nutrition minérale

La teneur de certains éléments minéraux – Ca, K, Mg, Na – a été déterminée dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas exposées à différentes concentrations d'AlCl<sub>3</sub> dans le milieu de culture (Figure 55). La présence d'Al ne semble pas affecter de manière significative les teneurs en Ca, K, Mg et Na des racines. Cependant, dans les parties aériennes, la teneur en Ca a été significativement réduite de 37 % dans les tiges et les épinettes en présence de 500 µM d'AlCl<sub>3</sub> et de 62 % à 1 mM AlCl<sub>3</sub>. Les teneurs en K et de Mg ne diminuent significativement que dans les aiguilles en présence de 500 µM et 1 mM d'AlCl<sub>3</sub>. Les teneurs en K passent d'environ 20 à 12 mg K.g<sup>-1</sup> MS et celles de Mg passent de 3,2 à 2,1 mg Mg.g<sup>-1</sup> MS. Enfin, la teneur en sodium n'a pas été affectée par la présence d'Al dans le milieu dans aucun des organes considérés, elle reste de l'ordre de 0,5 mg Na.g<sup>-1</sup> MS dans les racines, 0,7 mg Na.g<sup>-1</sup> MS dans les tiges et 1,7 mg Na.g<sup>-1</sup> MS dans les épinettes.





**Figure 55:** Teneur en certains minéraux dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* dans des milieux de germination de concentrations variables en AlCl<sub>3</sub>. **(A)** : Ca, **(B)** : K, **(C)** : Mg, **(D)** : Na (en mg.g<sup>-1</sup> MS). Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes avec 10 plantules par condition. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=4$  (moyenne +/- EC)

### III.1.4. Etude de la réponse pariétale au stress aluminique

La paroi est la première barrière de la cellule contre les agressions extérieures et potentiellement le site de l'accumulation et d'exclusion de l'Al (Horst *et al*, 2010). Cette barrière étant essentiellement composée de polysaccharides, il est donc essentiel d'analyser de façon quantitative et qualitative les fractions polysaccharidiques de paroi extraites des différents organes des plantules de sapin de Douglas exposées aux différentes concentrations en AlCl<sub>3</sub> du milieu de culture.

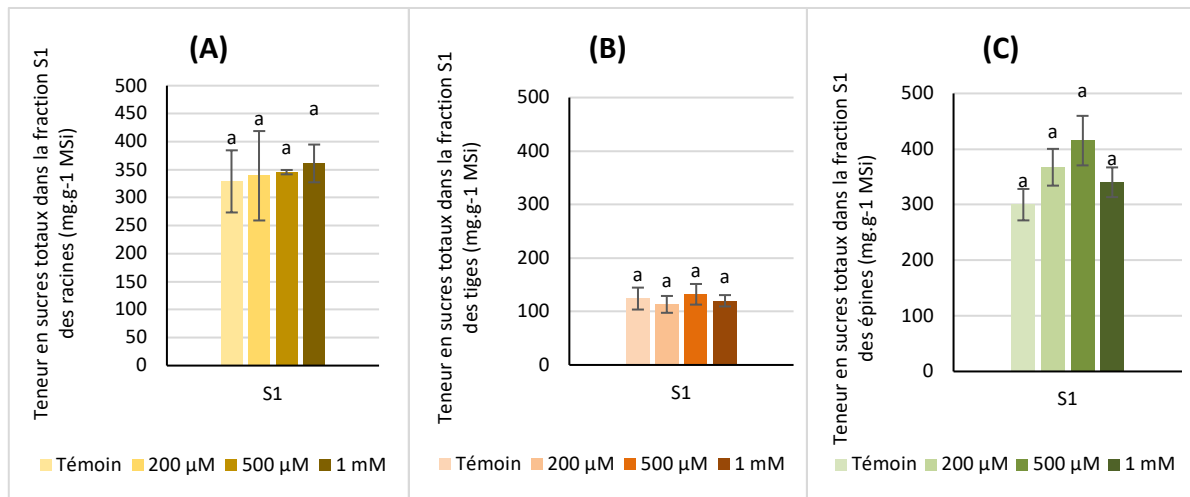
### III.1.4.1. Analyse de la fraction polysaccharidique de la paroi cellulaire

Afin d'étudier l'implication des constituants de la paroi cellulaire, essentiellement les polysaccharides, dans la séquestration de l'Al, les fractions polysaccharidiques de paroi des plantules de sapin de Douglas exposées à la gamme 0-1 mM  $\text{AlCl}_3$ , ont été extraites séquentiellement et analysées qualitativement et quantitativement. Ensuite, les éventuelles variations de l'activité pectine méthyl estérase pouvant affecter la nature acide des pectines composant la paroi ont été évaluées. Cette évaluation a porté sur les racines, tiges et épines des plantules somatiques de 2 mois exposées aux différentes concentrations d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture *in vitro*.

#### III.1.4.1.1. Quantification des polysaccharides pariétaux extraits des plantules de sapin de Douglas

Les sucres totaux ont été dosés dans chaque fraction de polysaccharides de la paroi cellulaire extraits séquentiellement selon le procédé décrit dans le paragraphe II.4.1. Le protocole d'extraction consiste à extraire dans un premier temps les sucres circulants et les tanins par l'éthanol 80% (fraction S1), et l'amidon est ensuite hydrolysé sous l'action de l' $\alpha$ -amylase. La première fraction pectique est extractible à l'eau chaude (fraction de pectines hautement méthylestérifiées PHM), et la seconde fraction pectique est ensuite extraite à l'oxalate d'ammonium (fraction pectines faiblement méthylestérifiées PFM). En effet, la chélation du Ca par l'oxalate d'ammonium permet de dissocier les structures en egg-box formées par les homogalacturonanes et donc facilitent l'extraction des pectines riches en HG. Les lignines sont par la suite éliminées en présence d'une solution d'hypochlorite de sodium en milieu acide à 80 °C. Les hémicelluloses sont enfin extraites en deux fractions selon leur solubilité, dans la potasse (fraction hémicellulosique HC KOH) et dans la soude (fraction hémicellulosique HC NaOH). Une dernière extraction à reflux pendant 1 h est effectuée afin d'obtenir le résidu cellulosique.

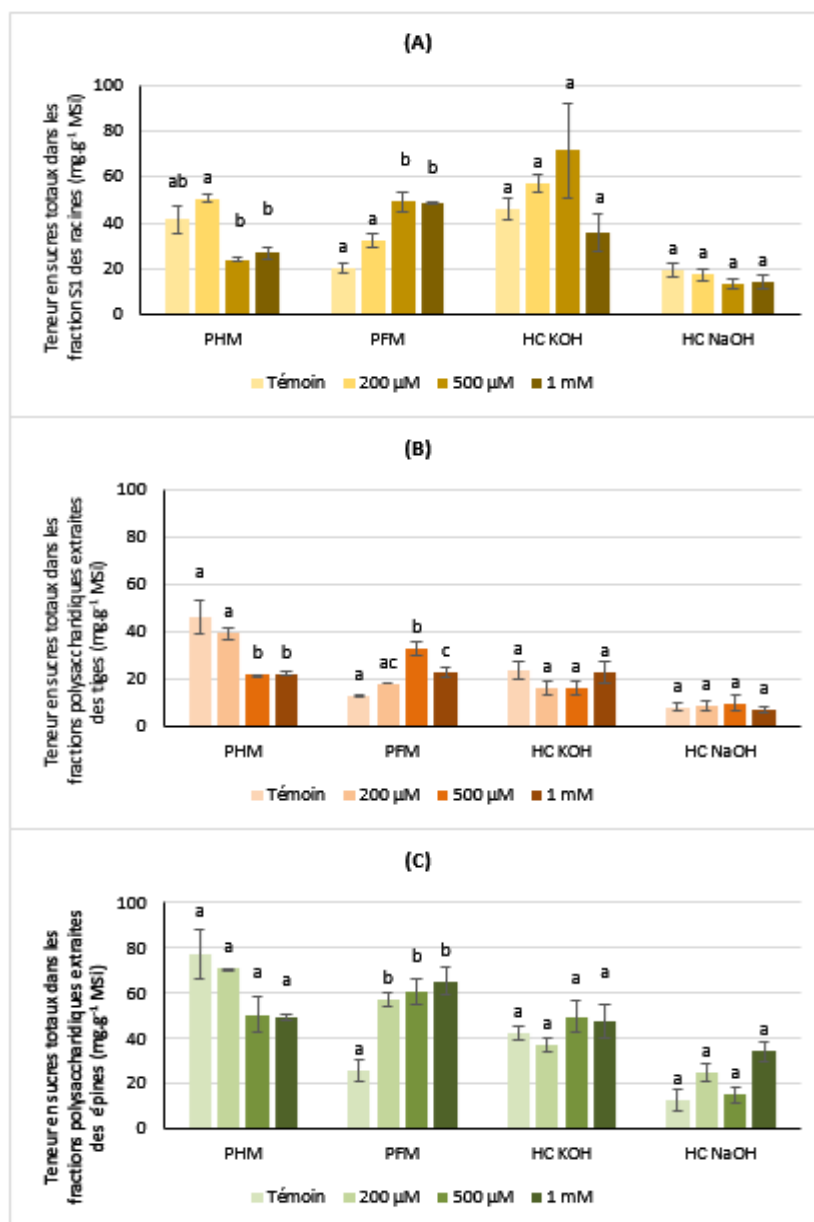
L'augmentation de la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu ne provoque aucune variation quantitative significative des teneurs en sucres totaux des fractions extraites à l'éthanol (S1) (Figure 56). Les racines et épines semblent être les organes les plus riches en sucres, avec de teneur d'environ  $350 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ , trois fois plus que les teneurs de sucres totaux dans les tiges.



**Figure 56:** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des fractions extraites à l'éthanol (S1) des (A) racines, (B) tiges et (C) épines de plantules de sapin de Douglas cultivées pendant 2 mois *in vitro* dans des milieux de germination Témoin, ou additionnés de concentrations variables en  $\text{AlCl}_3$  (200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  ou 1 mM). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 2 extractions différentes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes conditions de concentrations en Al des milieux de culture.

La figure 57 montre l'évaluation quantitative des différentes fractions obtenues lors des extractions successives effectuées sur les trois organes des plantules. En prenant en compte les résultats de la figure 55 et ceux de la figure 56, il peut être constaté que la fraction extraite à l'éthanol (sucres circulants, tanins...) est la fraction majoritaire quel que soit l'organe concerné et la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture. Les sucres totaux dans les fractions polysaccharidiques ne dépassent pas les 77  $\text{mg.g}^{-1}$  MS.

En ce qui concerne les polysaccharides pariétaux, de façon générale, les teneurs des sucres totaux dans les pectines sont deux fois plus importantes dans les épines que les racines et les tiges quelle que soit la condition du milieu de culture.



**Figure 57:** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions polysaccharidiques dans les **(A)** racines, **(B)** tiges et **(C)** épines des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* pendant 2 mois dans des milieux de concentrations variables en  $\text{AlCl}_3$  0 – 1 mM. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 2 extractions différentes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes conditions de concentration en Al des milieux de culture.

Les dosages montrent que les extraits pariétaux des racines et les épines semblent être plus riches en polysaccharides que ceux des tiges, quelle que soit la fraction polysaccharidique et la concentration de l'Al dans le milieu de culture.

Les variations suivent les mêmes tendances quel que soit l'organe analysé. Une concentration de 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  induit une diminution significative des sucres totaux dans les fractions PHM. Dans les racines par exemple, les teneurs passent d'environ 45  $\text{mg.g}^{-1}$  MS dans le milieu témoin et celui à 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , à environ 20  $\text{mg.g}^{-1}$  MS, soit une diminution de plus de la moitié. Cependant, les teneurs de sucres totaux des fractions PFM augmentent significativement à partir de 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  dans les racines et les tiges, et à partir de 200  $\mu\text{M}$

$\text{AlCl}_3$  dans les épinettes. Les variations observées pour les teneurs en oses totaux des hémicelluloses extraites à la potasse et à la soude ne semblent pas liées à la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture.

### **III.1.4.1.2. Analyse qualitative des fractions extraites de paroi**

#### **III.1.4.1.2.1. Détermination de la composition monosaccharidique**

Des analyses ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse afin de déterminer la composition monosaccharidique des différentes fractions polysaccharidiques dans les différents organes des plantules de sapins de Douglas cultivées sur différentes concentrations en  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture (Figures 58, 59 et 60).

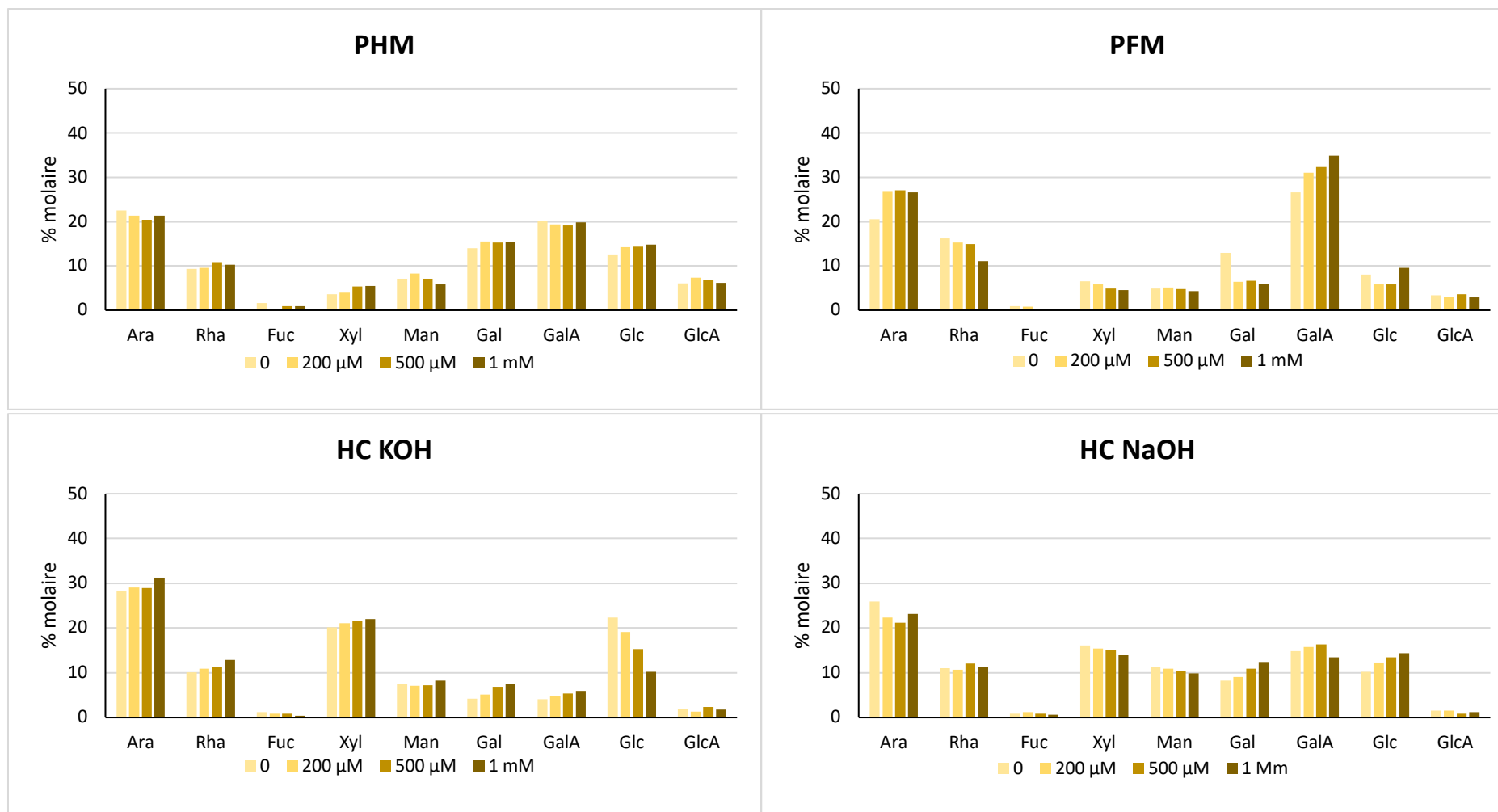
Les résultats de l'analyse par CPG présentent de façon générale une composition monosaccharidique représentative des glucides de chaque fraction dans les trois organes, racines, tiges et épinettes.

Ainsi, dans les fractions pectiques PHM et PFM, le monosaccharide majoritaire est l'acide galacturonique (GalA) avec des proportions d'environ 20 % dans les PHM et 30 % dans les PFM, composant notamment des homogalacturonanes. Le rhamnose (Rha) est présent avec des taux inférieurs à 20%, traduisant aussi la présence des rhamnoglacturonanes éventuellement substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et d'arabinogalactanes. Une richesse remarquable de ces fractions en arabinose (Ara) est de plus observée avec généralement des proportions > 25% est de plus observée, l'Ara pouvant effectivement substituer les chaînes de rhamnoglacturonanes.

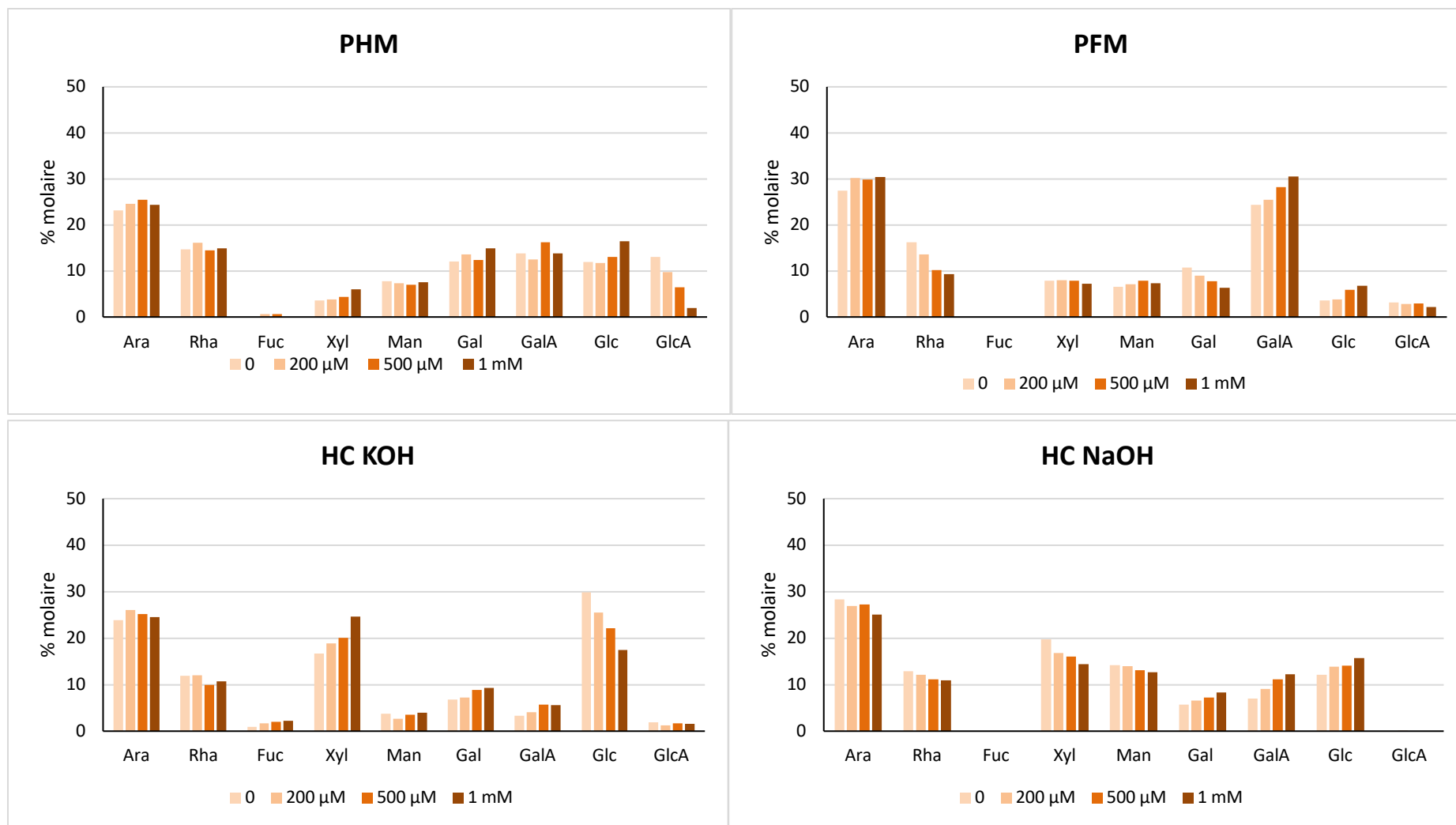
Dans la fraction PHM, le pourcentage de GalA reste constant dans les racines, et augmente dans les tiges avec l'élévation de la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture, il passe de 12 à 14 % entre 0 et 1 mM  $\text{AlCl}_3$ . Cependant, une tendance inverse est observée dans les épinettes, puisque ce taux diminue considérablement, de 30 à 11%.

Alors que dans le cas des PFM, l'augmentation de la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture engendre une augmentation remarquable du contenu en GalA quel que soit l'organe en question. Il passe de 26 à 34 % dans les racines, de 24 à 30 % dans les tiges et de 16 à 36 % dans les épinettes en comparant la condition à 1 mM  $\text{AlCl}_3$  à la condition témoin.

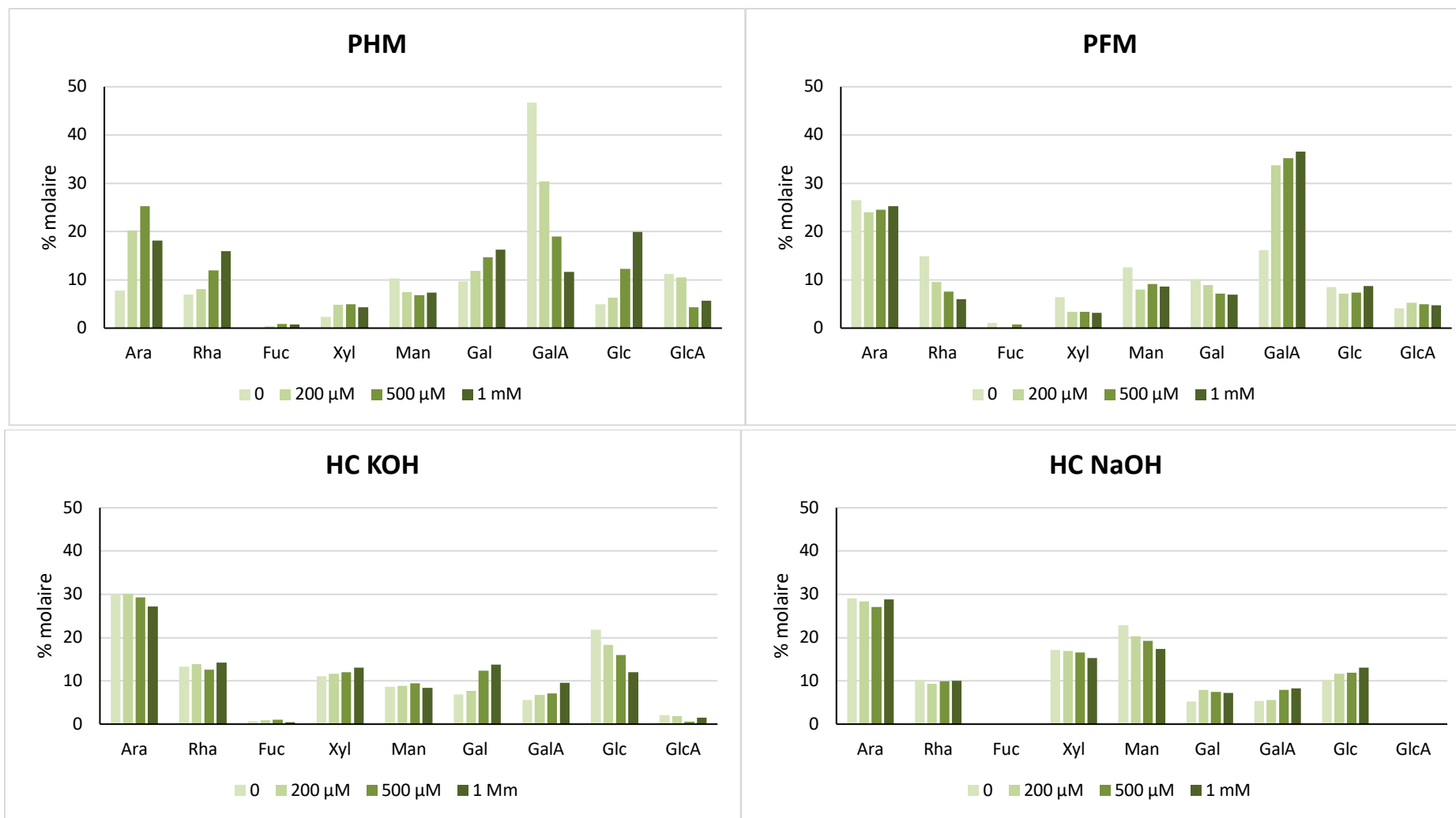
Des analyses complémentaires seront nécessaires pour valider statistiquement les tendances observées ici car elles ne concernent qu'une seule extraction par échantillon.



**Figure 58:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH dans les racines des plantules de sapin de Douglas cultivées huit semaines *in vitro* sur des milieux de concentrations variables en  $AlCl_3$ . Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction.



**Figure 59:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH dans les tiges des plantules de sapin de Douglas cultivées huit semaines *in vitro* sur des milieux de concentrations variables en  $AlCl_3$ . Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction.



**Figure 60:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH dans les épines des plantules de sapin de Douglas cultivées huit semaines *in vitro* sur des milieux de concentrations variables en  $AlCl_3$ . Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction.



Le rhamnose (Rha) est présent avec des taux inférieurs à 20%, traduisant aussi la présence des rhamnoglacturonanes éventuellement substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et d'arabinogalactanes. Dans la fraction PHM, la composition en Rha augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration d'AlCl<sub>3</sub> contrairement au cas de la fraction PFM, ceci quel que soit l'organe considéré, suggérant que cette réponse serait généralisée à l'ensemble de la plante.

A partir de ces données, le rapport GalA/Rha a été calculé pour les fractions pectiques. En effet, lorsque ce rapport est proche de 1, il caractérise la présence de pectines riches en domaines RGI. Au contraire, un rapport très largement supérieur à 1 est caractéristique de la présence de pectines possédant de nombreux domaines HG, donc potentiellement capables de former des structures en egg-box (interagissant avec des cations métalliques). Comme indiqué dans le tableau 8, plus la concentration en AlCl<sub>3</sub> augmente dans les milieux de culture, plus le rapport GalA/Rha diminue dans les PHM extraites des racines et des épines des plantules, ce phénomène étant beaucoup plus important pour les épines où ce taux est divisé par 19 (contre 2 pour les racines). Il semblerait donc que les épines soient le siège d'un changement structural important en réponse à l'exposition croissante à l'Al avec une moindre représentation des HGs au profit de domaines de type RGI pouvant produire des structures pectiques plus ramifiées. Les ramifications sont souvent constituées d'arabinanes ou de galactanes (voire d'arabinogalactanes). Ainsi, en parallèle une augmentation du taux de Gal est enregistrée pour les trois organes, le taux d'Ara n'augmentant quant à lui que dans les tiges et les épines. Dans le cas des PHM extraites des tiges, le rapport GalA/Rha augmente légèrement. Concernant les fractions PFM dans des trois organes des plantules, la même tendance est enregistrée : les structures pectiques semblent être moins ramifiées puisque le rapport GalA/Rha devient plus important quand la concentration d'AlCl<sub>3</sub> du milieu de culture augmente (Tableau 8). A nouveau, cette évolution apparaît beaucoup plus marquée pour les épines que pour les tiges ou les racines et pourrait être révélatrice d'une plus grande richesse en domaines HG dans les pectines PFM quand le stress aluminique s'intensifie.

**Tableau 8:** Variation du rapport GalA/Rha dans les fractions pectiques de la paroi cellulaire dans les différents organes des plantules de sapins de Douglas

Concentration d'AlCl <sub>3</sub> dans le milieu de culture		Témoin	200 µM	500 µM	1 mM	
Rapport GalA/Rha	PHM	<b>Racines</b>	3,97	2,01	2,03	2,02
		<b>Tiges</b>	0,61	0,71	1,11	0,92
		<b>Epines</b>	6,75	3,75	1,58	0,35
	PFM	<b>Racines</b>	1,64	2,03	2,16	2,83
		<b>Tiges</b>	1,63	1,88	2,55	2,65
		<b>Epines</b>	1,08	3,54	4,09	4,75

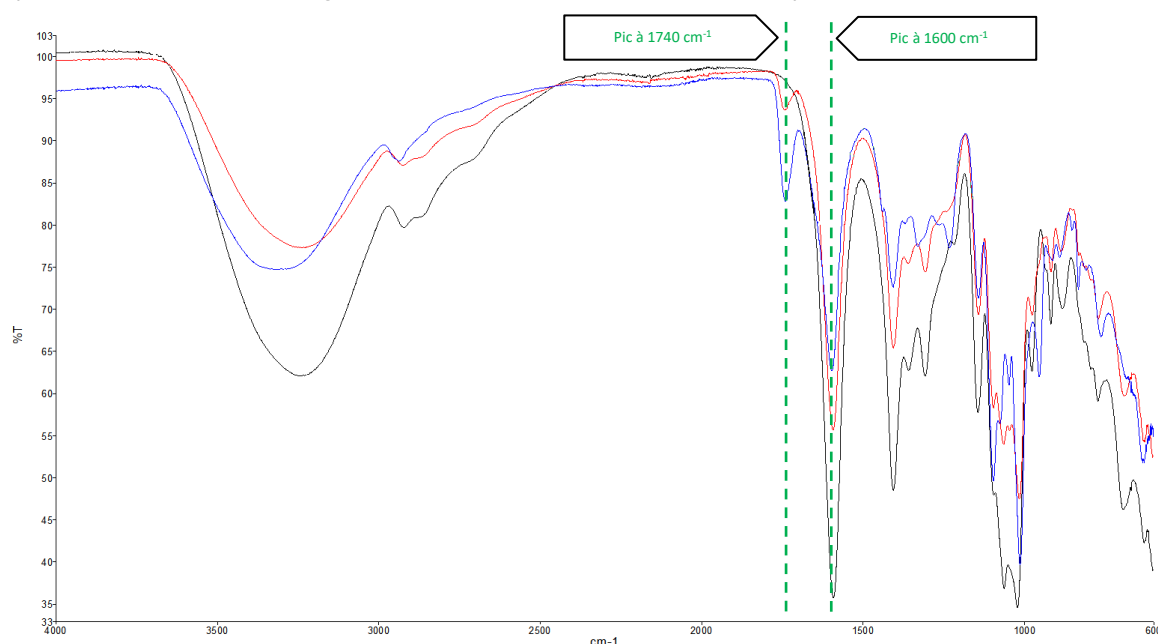
Pour ce qui concerne les fractions hémicellulosiques, celle extraite à la potasse présentent comme monosaccharides majoritaires l'Ara (de l'ordre de 30, 25 et 30 % dans les racines, tiges et épines, respectivement) et la xylose (Xyl) (de l'ordre de 12, 20 et 12 % dans les racines, tiges et épines respectivement), qui, avec les traces d'acide glucuronique identifiés ne dépassant pas les 3 %, pourrait indiquer l'extraction d'arabinoglucuronoxylanes par le KOH. Des résidus de glucose (Glc) et de Mannose (Man) sont aussi présents dans cette fraction.

Par ailleurs, les hémicelluloses extraites à la soude présentent des teneurs plus importantes en mannose (entre 10 et 15 %), glucose (entre 10 et 20 %), et galactose (entre 7 à 12 %), suggérant éventuellement l'extraction de glucogalactomannanes. Les proportions d'Ara et de Xyl sont aussi non négligeables avec environ 25 % et 15 % respectivement. Ces extractions ne sont donc pas sélectives d'une classe particulière d'hémicelluloses. Winandy et Morrell (1993) ainsi que Astier et ses collaborateurs (2014) ont précisé que ces deux catégories d'hémicelluloses sont caractéristiques de la paroi cellulaire du sapin de Douglas. En présence d' $\text{AlCl}_3$ , la composition monosaccharidique des HC KOH et des HC NaOH ne semble varier que pour Gal, GalA et Glc. Le pourcentage molaire de Gal et GalA augmente avec l'augmentation de la quantité d'Al dans le milieu de culture pour les trois organes et pour les deux extraits hémicellulosiques. Dans le cas du Glc, sa proportion diminue dans la fraction HC KOH, et augmente dans HC NaOH, extraites des racines, des tiges et des épines.

### III.1.4.1.2.2. Détermination du degré de méthylestérification des fractions pectiques

Comme décrit dans le paragraphe II.4.4.4., la spectroscopie infrarouge (IR) peut être utilisée afin de déterminer le degré de méthylestérification (DME) des pectines. Ceci est rendu possible grâce à la mesure de l'intensité des bandes de vibration correspondant au signal issu des carbonyles ( $\text{C}=\text{O}$ ) des fonctions acide carboxylique, ester et carboxylate. Les signaux correspondants ont été observés à  $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$  pour la fonction ester aliphatique ;  $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  pour la fonction acide carboxylique et  $1550\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  pour la fonction carboxylate.

Une gamme étalon a été donc préparée avec 3 échantillons standards avec des DME connus : 0% (acide galacturonique commercial), 85% (pectines d'agrumes commerciales) et 21,25% (préparé avec un mélange des deux standards à 0% et 85%).



**Figure 61:** Spectres IR à transformée de Fourier des 3 échantillons étalons de DME égal à 0 % (trait noir), 21,25 % (trait rouge) et 85 % (trait bleu). L'analyse s'effectue sur une gamme de nombres d'ondes comprises entre  $600$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

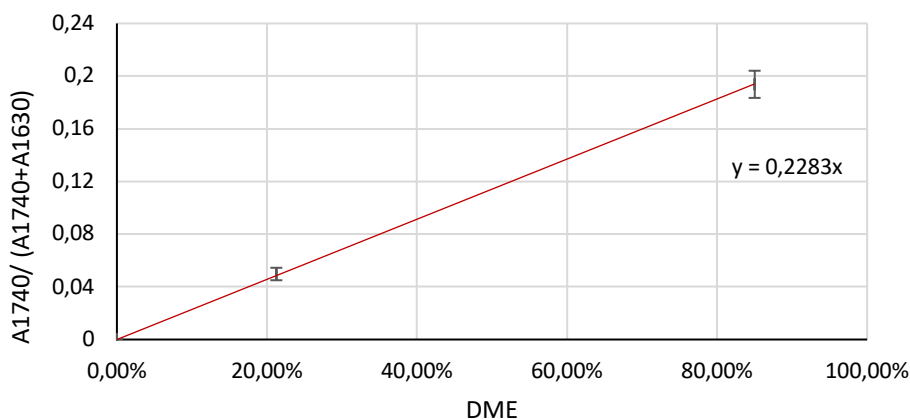
Les spectres obtenus pour les échantillons standards sont représentés dans la figure 61. L'ajustement du pH à 6 a permis, comme prévu d'ioniser totalement les acides carboxyliques dans le standard de DME égal à 0 %, ceci est traduit par l'absence de bande caractéristique des acides carboxyliques (COOH : 1725-1700  $\text{cm}^{-1}$ ) des acides galacturoniques et la présence d'un pic intense à 1600  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux carboxylates. Il est ainsi vérifié que plus le DME augmente, et donc plus les fonctions méthylestérifiées sont présentes, plus le signal à 1740  $\text{cm}^{-1}$  apparaît contrairement à la bande caractéristique du groupement carboxylate à 1600  $\text{cm}^{-1}$  qui diminue.

La droite obtenue à partir des échantillons standards est représentée dans la figure 62 et son équation est la suivante :

$$\text{DME} = [A1740 / (A1740 + A1630)] / \alpha$$

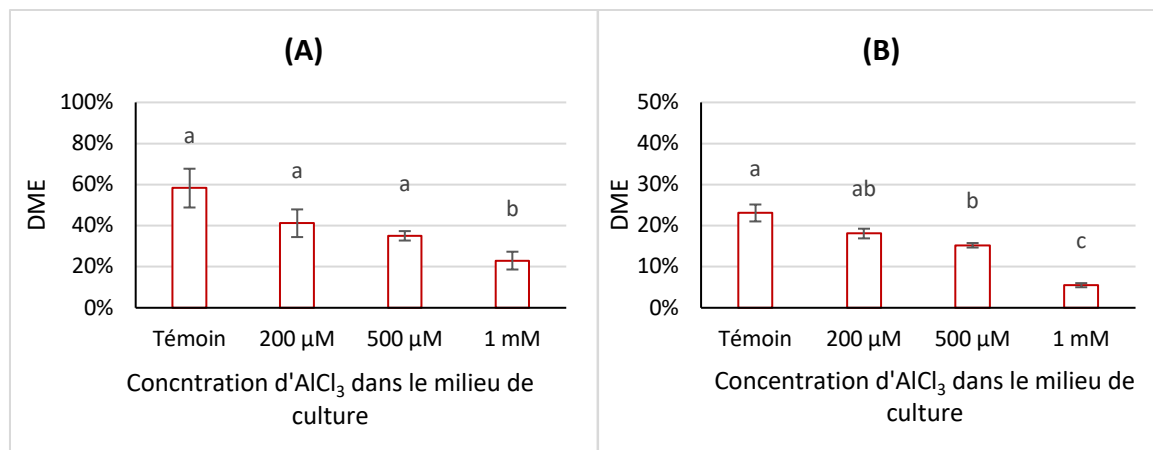
Avec :

- A1740 : aire du pic à 1740  $\text{cm}^{-1}$  ;
- A1630 : aire du pic à 1630  $\text{cm}^{-1}$  ;
- $\alpha$  : coefficient directeur de la droite d'étalonnage.



**Figure 62:** Courbe d'étalonnage préparée afin d'estimer le DME des échantillons à analyser. Trois analyses indépendantes ont été effectuées pour chaque standard. Chaque point correspond à la moyenne +/- SE.

Les fractions pectiques extraites des parois cellulaires des plantules somatiques exposées à la gamme 0 – 1 mM  $\text{AlCl}_3$  *in vitro* ont été analysées par la même technique, afin d'estimer le DME dans chaque fraction pectique obtenues à partir des racines, et dans chaque condition d'exposition (Figure 63).

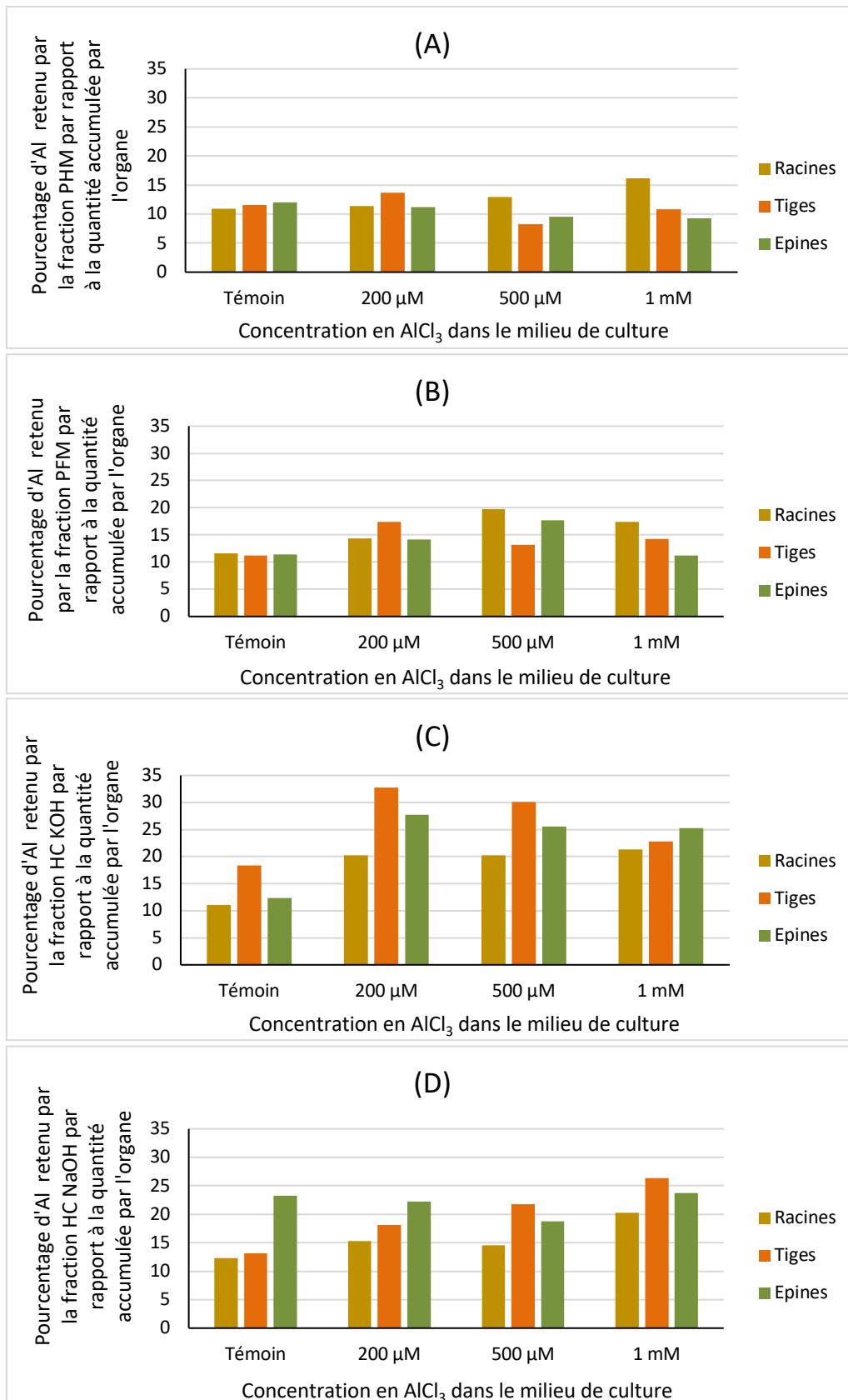


**Figure 63:** Évolution du degré de méthyl estérification dans les racines des plantules de Douglas cultivées *in vitro* pendant 2 mois dans des milieux de concentrations variables en AlCl<sub>3</sub> 0 – 1 mM. **(A)** : PHM ; **(B)** : PFM Les résultats sont la moyenne ± l'écart-type de 2 mesures différentes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes conditions de concentration en Al des milieux de culture.

L'analyse des fractions pectiques extraites des racines de plantules de sapin de Douglas confirme déjà que l'extraction par l'eau chaude a permis d'extraire des pectines présentant des DME plus élevés que la fraction extraite à l'oxalate d'ammonium pour un même échantillon. Ainsi, en conditions témoin, la fraction PHM se caractérise par un DME de 58 % alors que la fraction PFM a un DME de seulement 23 %. De plus, une diminution significative du DME dans les fractions extraites à l'oxalate d'ammonium (PFM) suite à une exposition à 500 μM et 1 mM AlCl<sub>3</sub> est observée : de 23 % en condition témoin, à 15 % à 500 μM et à 6 % à 1 mM AlCl<sub>3</sub>. Bien que non significative jusqu'à 500 μM AlCl<sub>3</sub>, la même tendance est aussi notée dans la fraction pectique extraite à l'eau chaude (PHM) avec des DME qui s'avèrent plus faibles quand le taux d'Al dans le milieu augmente : 23% pour 1 mM d'AlCl<sub>3</sub> comparé à 58 % en conditions témoin.

#### III.1.4.1.2.3. Évaluation de la rétention de l'Aluminium par les différentes fractions de la paroi cellulaire

Comme il a été émis comme hypothèse et suggéré dans la littérature, l'Al pourrait être piégé au niveau des parois cellulaires pour limiter sa pénétration dans la cellule. Ceci pourrait constituer l'une des réponses de défense de la plante. Pour apporter des arguments en faveur de cette hypothèse, l'Al a été dosé dans les fractions extraites de polysaccharides de paroi (Figure 64).



**Figure 64:** Proportion d'Al détecté dans les différentes fractions polysaccharidiques exprimée en % par rapport à la quantité d'Al présent dans chaque organe (racines, tiges ou épines) des plantules de sapins de Douglas cultivées pendant 2 mois dans des milieux de différentes concentrations en AlCl<sub>3</sub>. **(A)** Fraction PHM ; **(B)** Fraction PFM ; **(C)** Fraction HC KOH ; **(D)** Fraction HC NaOH.

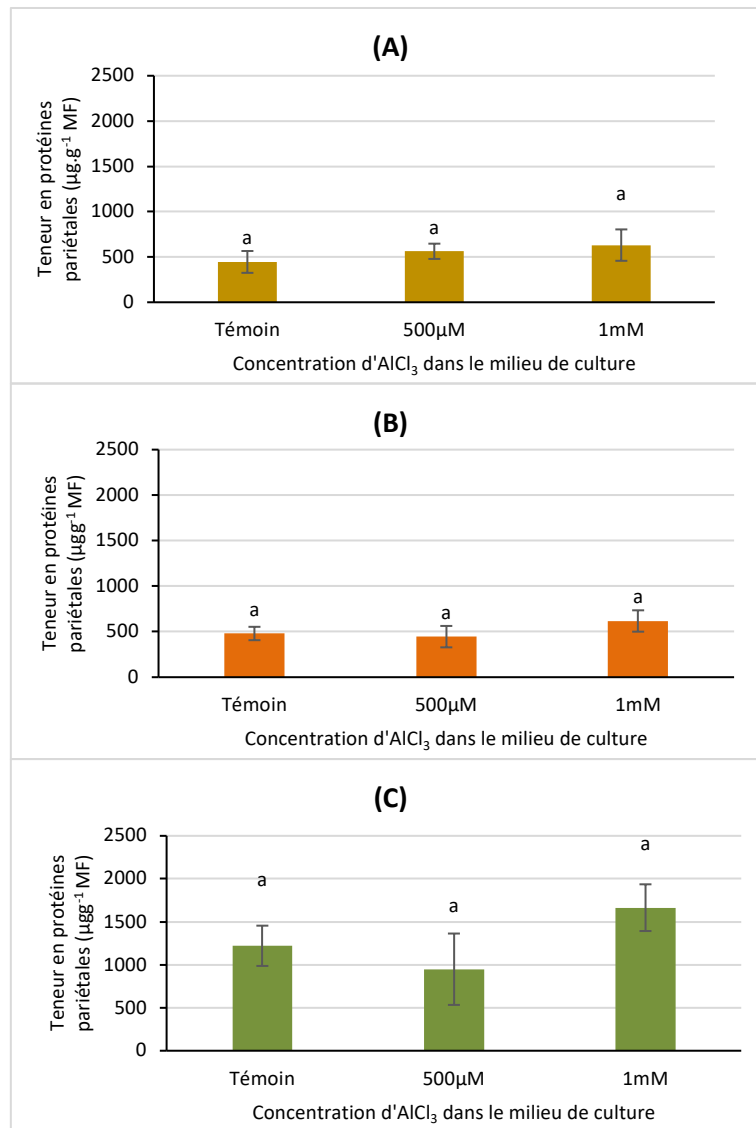
En comparant les différentes fractions de paroi, et quelle que soit la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de germination, il est à noter que ce sont les hémicelluloses extraites par KOH et par NaOH qui retiennent le plus d'Al dans les racines, les tiges et les épines des plantules *in vitro*. Entre 20 et 30% de l'Al dosé dans les différents organes des plantules est présent dans les fractions pariétales hémicellulosiques extraites à la potasse, pour environ 20 % dans les fractions extraites à la soude. Cependant, 15 à 20% de l'Al dosé pour les plantules de sapin de Douglas *in vitro* et exposées à l' $\text{AlCl}_3$ , a été retrouvé dans la fraction PFM, pour moins de 15% dans la fraction PHM.

En augmentant la concentration d'Al dans le milieu de culture, ces proportions de rétention d'Al semblent augmenter légèrement dans les PHM et les PFM des racines (de 10 à 17 % environ). Elles sont cependant doublées dans les HC KOH de tous les organes, et dans les HC NaOH des racines et des tiges.

#### **III.1.4.2. Évaluation de l'effet du stress aluminique sur l'activité Pectine Méthyl Estérase des plantules de sapin de Douglas**

L'activité Pectine Méthyl Estérase (PME) a été étudiée dans les plantules exposées pendant 8 semaines à la gamme 0 – 1 mM  $\text{AlCl}_3$  *in vitro*. En effet, cette enzyme est impliquée dans le remodelage pariétal et peut réguler la capacité de la paroi à piéger l'Al. Cette enzyme pariétale est susceptible de faire évoluer la structure des pectines et d'en modifier les propriétés au sein de la paroi. En catalysant la déméthylestérification des acides galacturoniques des domaines pectiques riches en homogalacturonanes son action conduit à la régénération de fonctions acides carboxyliques libres. Un cation, comme l' $\text{Al}^{3+}$  pourraient donc interagir avec les acides carboxyliques libres et ceci serait l'une des stratégies de résistance des plantes aux stress aluminique par piégeage du métal aux HGs de la paroi cellulaire.

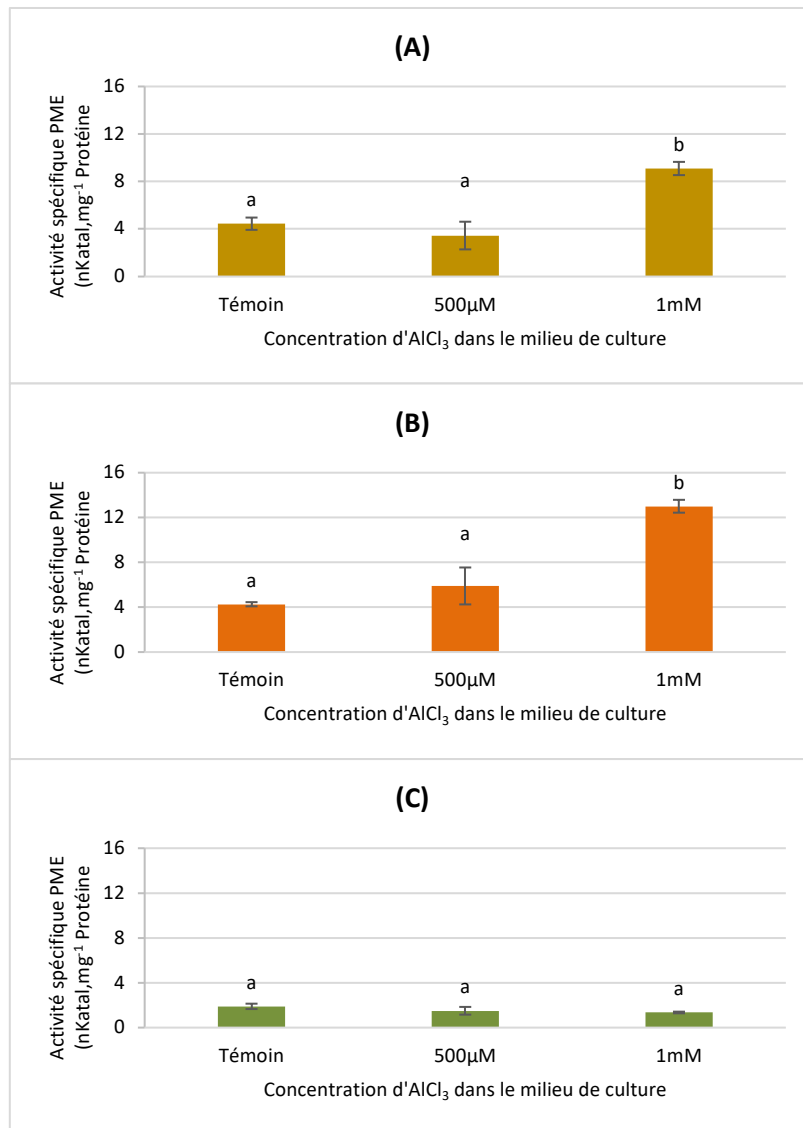
Dans un premier temps, les protéines pariétales ont été extraites, leurs quantités sont présentées dans la figure 65.



**Figure 65:** Teneurs moyennes en protéines pariétales dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas exprimées en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF en fonction de la concentration du milieu de germination en  $\text{AlCl}_3$ . **(A)** : Racines ; **(B)** : Tiges ; **(C)** Épines. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 6 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition pour le même organe ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=6$  (moyenne +/- EC)

Les résultats du dosage ont montré que la quantité des protéines pariétales totales est 2 à 3 fois plus importante dans les épines des plantules que dans les racines et les tiges. Cependant, aucune variation significative n'a été observée dans les quantités de protéines pariétales en comparant les plantules dans les différentes conditions d'exposition à l'Al.

Afin d'évaluer l'effet de l'exposition des plantules cultivées *in vitro* aux différentes concentrations d'Al sur l'activité PME, les fractions protéiques pariétales ont été utilisées pour le dosage de cette activité (Figure 66).



**Figure 66:** Evolution de l'activité PME dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* dans des milieux de culture de concentrations différentes en AlCl<sub>3</sub> : **(A)** Racines ; **(B)** Tiges et **(C)** Epines. Les résultats sont exprimés en activité spécifique (nKatal.mg<sup>-1</sup> Protéine). Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.n=4 (moyenne +/- EC)

Une augmentation significative de l'activité PME dans les racines et les tiges est notée à partir d'une exposition à 1 mM AlCl<sub>3</sub>. L'activité PME est doublée dans les racines (de 4,5 à 9 nKatal.mg<sup>-1</sup> Protéine), et triplée dans les tiges (de 4,3 à 13 nKatal.mg<sup>-1</sup> Protéine) quand sont comparés les valeurs obtenues pour les conditions témoin et celles correspondant à une concentration de 1 mM AlCl<sub>3</sub> dans le milieu de culture. Cependant, cette activité reste inchangée dans les épines quelle que soit la condition de culture.

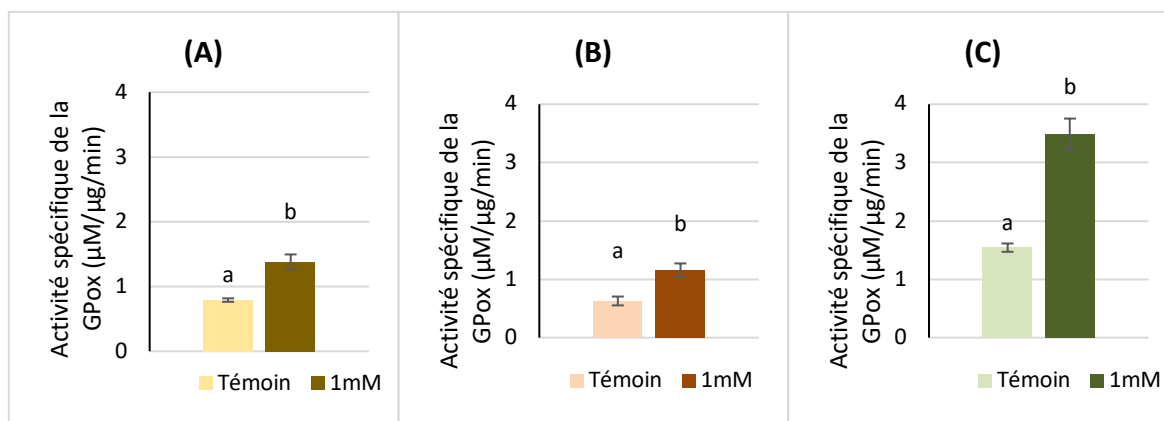


### III.1.5. Etude des réponses intracellulaires au stress aluminique

#### III.1.5.1. Evaluation de l'effet du stress aluminique sur l'activité Gaïacol peroxydase (GPox) chez les plantules de sapin de Douglas

Les guaiacol-peroxydases (GPox), situées dans le cytosol, la vacuole et la paroi cellulaire sont des enzymes impliquées dans les réponses au stress induit par les ROS. En effet, l'hypothèse serait que le stress aluminique chez les plantes induit un stress oxydatif, et qu'en réponse à ce stress oxydatif, les plantes produisent des molécules antioxydantes qui pourraient piéger les ROS. Parmi les enzymes participant dans cette détoxification, la gaïacol peroxydase, permettant la réduction de l' $H_2O_2$  (ROS) en  $H_2O$  dans la cellule.

L'activité GPox a été évaluée dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas *in vitro*, cultivées sur milieu témoin ou contenant 1 mM  $AlCl_3$  pendant 8 semaines (Figure 67).

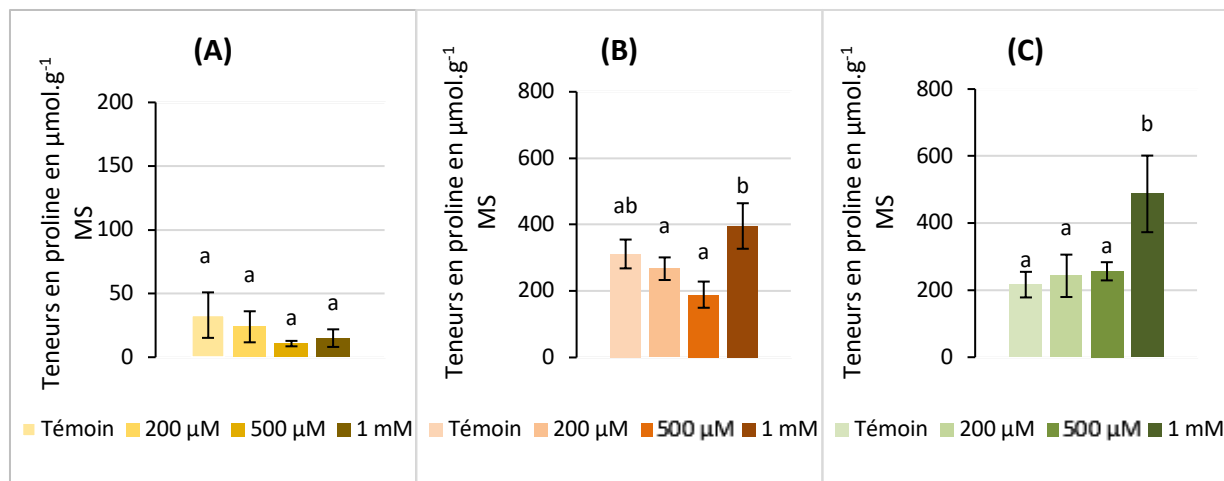


**Figure 67:** Evolution de l'activité GPox dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* dans des milieux de culture de concentrations différentes en  $AlCl_3$  (Témoin et 1 mM): (A) Racines ; (B) Tiges et (C) Épines. Les résultats sont exprimés en activité spécifique ( $\mu M \cdot \mu g^{-1} \cdot min^{-1}$ ). Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=3$  (moyenne  $\pm$  EC)

Le dosage montre que, quel que soit l'organe, l'activité spécifique de la GPox ( $As_{GPox}$ ) dans les fractions protéiques intracellulaires est significativement plus importante quand les plantules sont exposées à 1 mM  $AlCl_3$ . Dans les racines, l' $As_{GPox}$  passe 0,8 à 1,4  $\mu M \cdot \mu g^{-1} \cdot min^{-1}$  dans les tiges elle passe de 0,6 à 1,15  $\mu M \cdot \mu g^{-1} \cdot min^{-1}$  et dans les épines elle est doublée de 1,5 à 3,5  $\mu M \cdot \mu g^{-1} \cdot min^{-1}$ .

#### III.1.5.2. Evaluation de l'effet de l'exposition à l'Al sur les teneurs en proline des plantules de sapin de Douglas

La proline est un acide aminé participant dans le piégeage des ROS en excès. Elle peut agir comme un antioxydant et réguler le statut d'oxydo-réduction cellulaire dans des conditions de stress. Les teneurs en proline dans les différents organes des plantules de Douglas exposées à la gamme 0, 200, 500 et 1 mM  $AlCl_3$  ont été dosées (Figure 68).

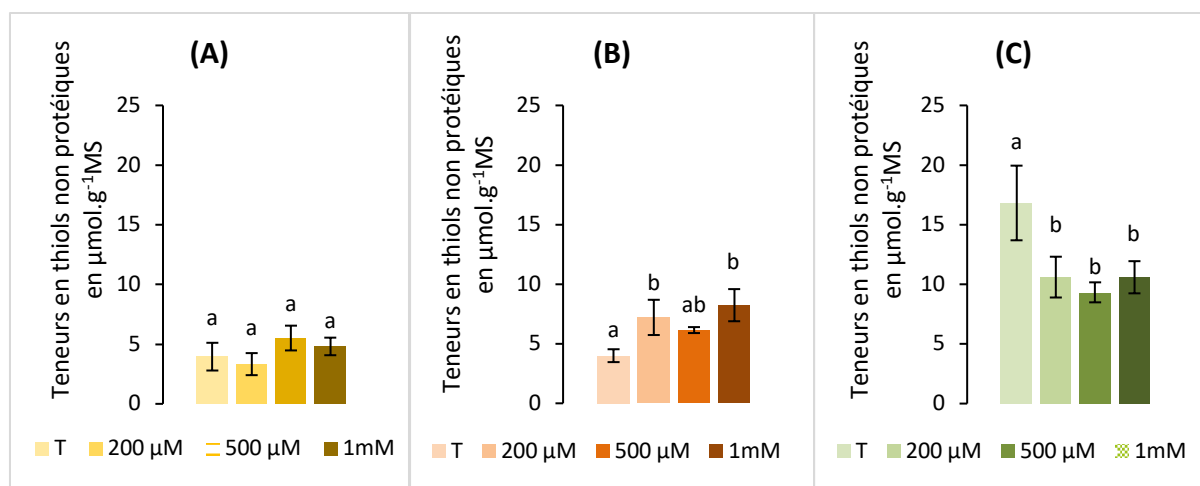


**Figure 68:** Evolution des teneurs en proline dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* dans des milieux de culture de concentrations différentes en AlCl<sub>3</sub> : **(A)** Racines ; **(B)** Tiges et **(C)** Epines. Les résultats sont exprimés en (µmol.g<sup>-1</sup>MS). Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition (p < 0,05), Test ANOVA.n=3 (moyenne +/- EC)

Bien que statistiquement non significatives, les teneurs en proline dans les racines sont globalement faibles et ont tendance à diminuer lorsque la concentration d'Al dans le milieu de culture augmente. Dans les tiges, une augmentation d'environ 60 % a été observée à 1 mM par rapport aux tiges des plantules exposées à 200 µM et 500 µM. Cependant, les teneurs en proline dans les tiges à 1 mM AlCl<sub>3</sub> sont équivalentes à celles retrouvées dans la condition témoin. Dans le cas des épines, les teneurs en prolines sont de l'ordre de 220 µmol.g<sup>-1</sup> MS, et restent inchangées jusqu'à 500 mM AlCl<sub>3</sub>. A 1 mM, ces teneurs sont doublées et atteignent 490 µmol.g<sup>-1</sup> MS.

### III.1.5.3. Évaluation de l'effet de l'exposition à l'Al sur les teneurs en thiols non protéiques des plantules de sapin de Douglas

Les groupes thiols non protéiques, comme les cystéines libres, le glutathion et les phytochélatines, sont des composés potentiellement piègeurs de cations. Ces composés ont été quantifiés et ce dosage a été effectué dans les différents organes de plantules issues de l'embryogenèse somatique de Douglas (Figure 69).

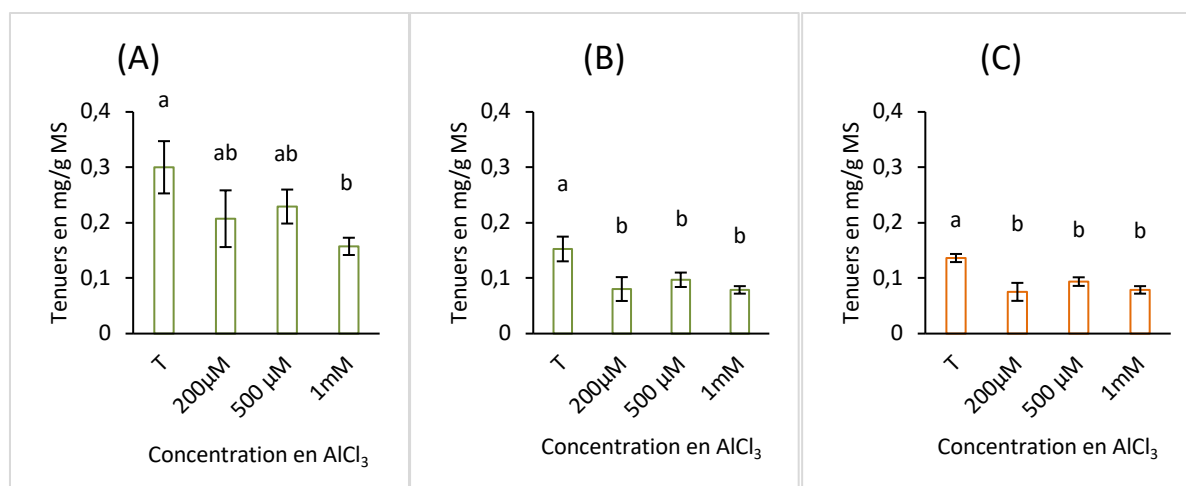


**Figure 69:** Effet de l'Al sur la teneur en thiols non protéiques totaux dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* dans des milieux de culture de concentrations différentes en  $AlCl_3$  : **(A)** Racines ; **(B)** Tiges et **(C)** Épines. Les résultats sont exprimés en ( $\mu mol.g^{-1}MS$ ). Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=3$  (moyenne +/- EC)

Les résultats montrent que l'Al n'a pas eu d'effet significatif sur la teneur en thiols non protéiques au niveau des racines. Une augmentation a été notée au niveau des tiges à partir de 200  $\mu M$   $AlCl_3$  qui se confirme pour 1 mM d' $AlCl_3$  où la teneur en thiols non protéiques est de 8,2  $\mu mol.g^{-1}$  contre 4  $\mu mol.g^{-1}$  dans la condition témoin. Cependant, une teneur en thiols non protéiques plus faible dans les épines des plantules de Douglas a été remarquée. Ce dernier résultat reste à valider statistiquement avec de nouveaux lots de plantules, vu la grande variabilité des valeurs obtenues pour la condition témoin.

#### III.1.5.4. Évaluation de l'effet de l'exposition à l'Al sur les teneurs en pigments photosynthétiques chez les plantules de sapin de Douglas

Les teneurs en chlorophylle a, chlorophylle b et en caroténoïdes ont été dosées dans les épines des plantules de sapin de Douglas. Les résultats sont présentés dans la figure 70.



**Figure 70:** Effet de l'Al sur les teneurs en pigments photosynthétiques dans les épines des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* dans des milieux de culture de concentrations différentes en AlCl<sub>3</sub> : (A) Chlorophylle a ; (B) Chlorophylle b et (C) caroténoïdes. Les résultats sont exprimés en (mg.g<sup>-1</sup>MS). Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.n=3 (moyenne +/- EC)

Globalement, les teneurs moyennes en pigments de type chlorophylles et caroténoïdes sont plus faibles pour les plantules exposées à la présence d'Al dans le milieu comparé à celles cultivées en condition témoin. Une diminution significative de 50 % des teneurs en chlorophylle a est ainsi observée dans les épines des plantules exposées à 1 mM AlCl<sub>3</sub> comparé au témoin. De même, des teneurs significativement plus faibles en chlorophylle b et en caroténoïdes par rapport à la condition témoin ont été retrouvées ceci dès la concentration de 200 μM AlCl<sub>3</sub> dans le milieu.

### III.1.6. Bilan

- L'établissement d'une gamme de concentration croissante en AlCl<sub>3</sub> dans le milieu de culture nous a permis de déterminer que le seuil de tolérance à partir duquel des symptômes de retard de croissance aussi bien au niveau des racines que des parties aériennes sont observés est de 500 μM AlCl<sub>3</sub>.
- Les racines semblent être l'organe accumulant la majorité de l'Al absorbé par la plante et que l'Al est localisé préférentiellement dans les parois cellulaires des tissus de la pointe racinaire. Quand exposées à 500 μM AlCl<sub>3</sub> pendant 8 semaines, les racines présentent des altérations de l'aspect de leurs pointes, et de leur organisation cellulaire.
- Les plantules exposées à 500 μM et 1 mM AlCl<sub>3</sub> présentent des teneurs en éléments minéraux essentiels plus faibles dans leurs organes, que les plantules témoins, notamment une diminution du Ca et du Mg dans les tiges et les épines et du K dans les épines. Une diminution des teneurs en pigments photosynthétiques est également observée.

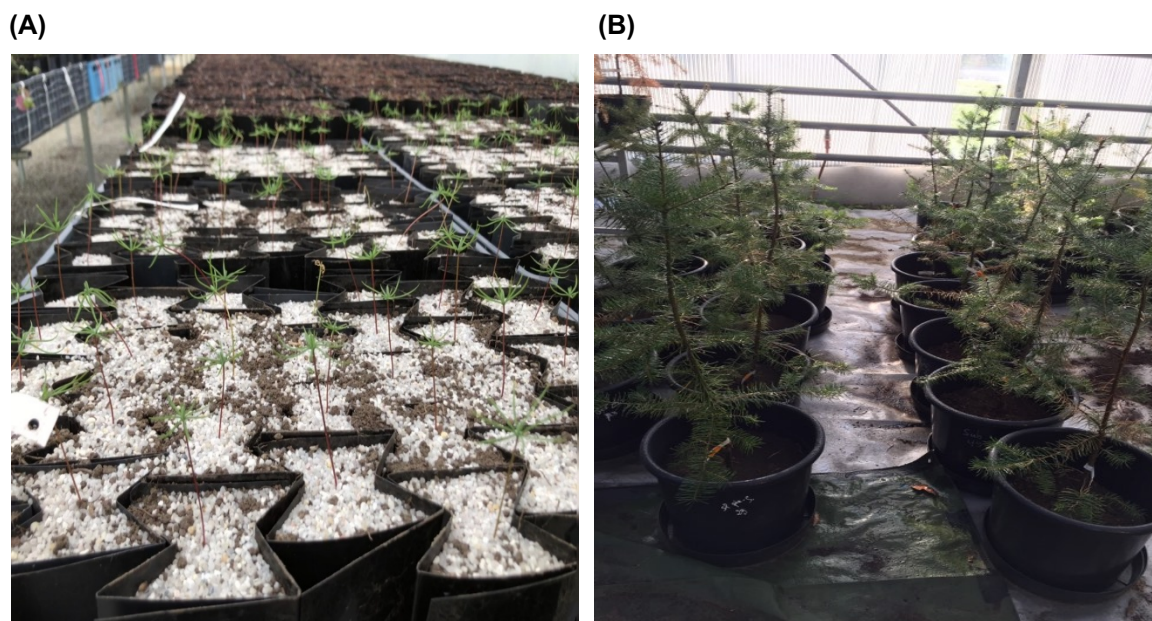
- L'adaptation à ce stress passe par une augmentation de la proportion des PFM au détriment de celle des PHM. De plus l'analyse monosaccharidique des fractions PFM montre une augmentation de la proportion d'acide galacturonique . En outre, une modification des proportions en monosaccharides capables de substituer les chaînes latérales dans les fractions pectiques a été observée. La proportion des fractions hémicellulosiques reste constante quelle que soit la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture. La composition monosaccharidique des HC KOH et HC NaOH a été modifiée avec l'augmentation de la concentration de l'Al dans le milieu de culture.
- Au niveau pariétal, en réponse à l'exposition des plantules à 1 mM  $\text{AlCl}_3$ , une stimulation significative de l'activité PME a été observée. Cette stimulation a été confirmée par une diminution du DME dans les fractions pectiques extraites des racines des plantules exposées à l' $\text{AlCl}_3$ .
- A une concentration de 1 mM  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture, d'autres processus au niveau intracellulaire ont été déclenchés, comme l'augmentation de l'activité GPox dans tous les organes des plantules, une accumulation de proline dans les tiges et les épines. Cependant, pour ce qui concerne les thiols non protéiques, leur teneur n'augmente que dans les tiges.

### III.2. Réponses de sapin de Douglas en conditions de culture sur sols forestiers naturellement riches en Al biodisponible

Les conditions de l'étude réalisée sur des plantules de sapin de Douglas issues d'embryogenèse somatique et cultivées *in vitro* permettent d'imposer les concentrations en Al au voisinage des racines. Cependant, ces conditions apparaissent différentes des conditions naturelles, principalement à cause de la complexité de la composition et des propriétés du sol.

Pour se rapprocher des conditions naturelles, des sols forestiers du territoire Limousin ont été utilisés pour mettre en germinations des graines et conduire des cultures de jeunes arbres sous serre. Les sols forestiers proviennent de prélèvements réalisés sur le site de l'Office National des Forêts à Peyrat-le-Château (87). Ce domaine est subdivisé en parcelles cultivées où des plantations de différents résineux sont suivies depuis plusieurs dizaines d'années. En comparaison, deux substrats de culture ont également été utilisés : un substrat de culture commercial (terreau horticole) et un substrat préparé dans la pépinière de l'ONF à base de broyat d'écorce et tourbe brune adapté pour les résineux. Les cultures réalisées sous serre ont concerné des sapins de Douglas à deux stades de développement :

- Des jeunes plantules obtenues par germination de graines cultivées pendant deux mois (PI2) (Figure 71A).
- Des jeunes arbres âgés de 3 ans fournis par la pépinière de l'ONF (Peyrat le Château, 87) et cultivés pendant 11 mois (Arb11) (Figure 71B).



**Figure 71:** Photos des deux modèles de sapins de Douglas cultivés sous serre: **(A)** plantules âgées de 2 mois issues de la germination de graines; **(B)** Jeunes arbres âgés de 4 ans.

La nature géochimique des sols de la pépinière est essentiellement granitique, de type Alocrisol typique (Rossignol, 1996). Les sols alocrisols typiques sont caractérisés par un pH acide à très acide inférieur à 5 et une richesse en Al<sup>3+</sup> dans la solution du sol représentant environ 50 % de la CEC. Les prélèvements ont été réalisés sur des parcelles différentes sur lesquelles étaient implantées différents types de végétations.

Dans un premier temps, les substrats de culture collectés ont été caractérisés en termes de concentrations en aluminium biodisponible et d'éléments minéraux essentiels (Ca, Mg et K) dans la solution du sol, de pH, de capacité d'échange cationique et de teneurs en azote total.

Les sols présentant les teneurs les plus fortes en Al biodisponible et présentant une acidité marquée, ont été sélectionnés pour la mise en place de cultures de sapin de Douglas. Le substrat le moins riche en Al biodisponible et le moins acide a également été utilisé. Il servira de référence. A la suite des récoltes des sapins de Douglas (soit après 8 semaines de culture pour les germinations de graines, et 11 mois pour les jeunes arbres), les caractéristiques des substrats de culture ont à nouveau été évaluées.

Enfin, l'effet de l'exposition des plantules ou des jeunes arbres à ces conditions de culture sur sols présentant différents niveaux d'acidité et d'Al biodisponible a été étudié. Il s'agit d'évaluer plus particulièrement l'impact de cette exposition sur la croissance et le développement de ces plantes ainsi que sur leur nutrition minérale. La distribution de l'Al dans ces plantes tout comme les conséquences de l'exposition de ces plantes à l'Al, sur les caractéristiques des principaux constituants des parois cellulaires des racines, tiges et épines ont été évaluées.

### **III.2.1. Caractérisation des propriétés physicochimiques des sols forestiers et évolution suite à la culture de sapin de Douglas**

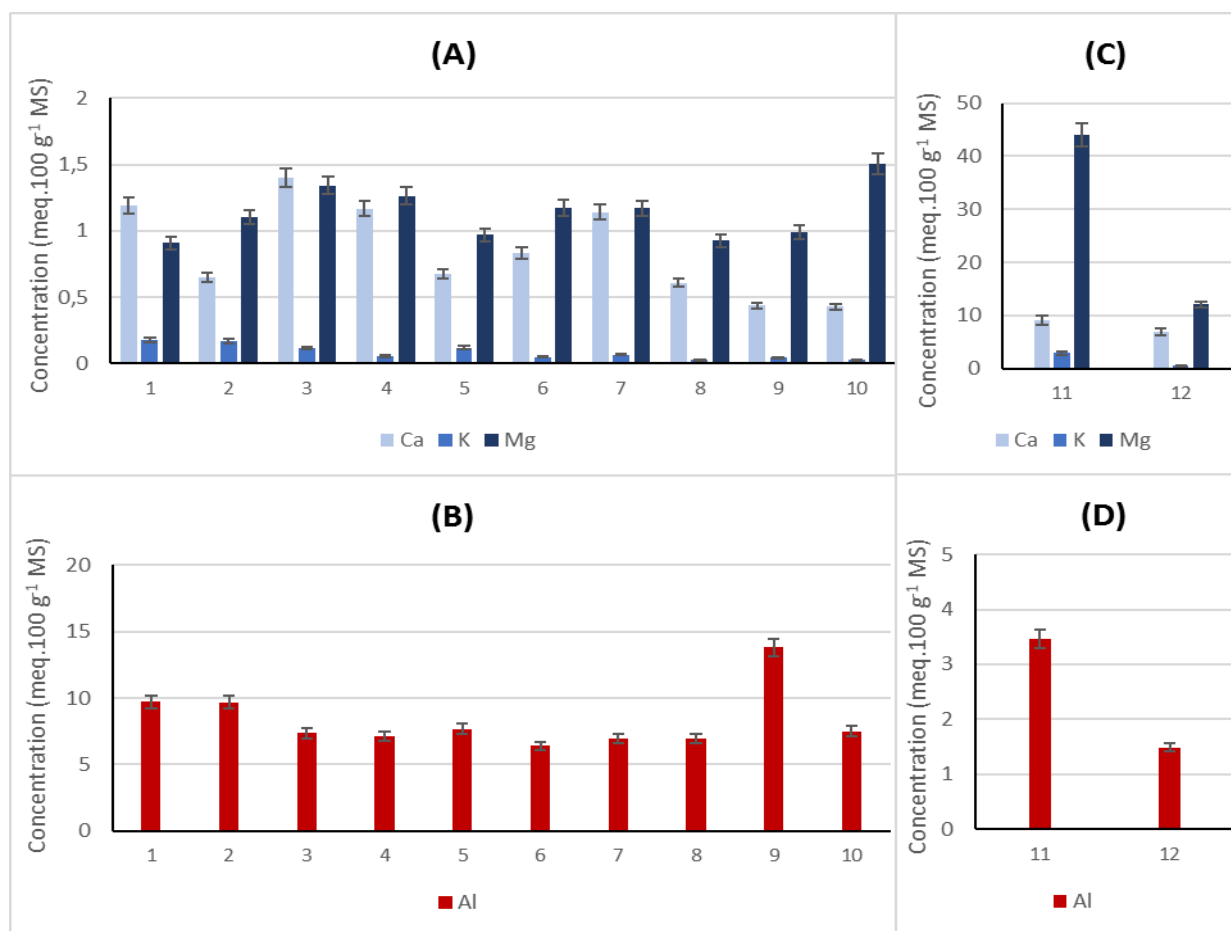
Dix sols ont été récupérés sur le site de la pépinière de l'Office national des Forêts situé à Peyrat-le Château (23). Sur un domaine de 65 hectares, sont cultivés plusieurs types de végétation de résineux, de feuillus, et d'autres plantes sur des parcelles voisines comme montré dans la figure 37. L'âge des plantations varie entre 20 et 30 ans. Il s'agit de sols de plantation **(1)** de sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), **(2)** de Cyprès de Lawson (*Chamaecyparis lawsoniana*), **(3)** de choux (*Brassica oleracea*) et orge (*Hordeum vulgare*), **(4)** de sol nu, **(5)** de de chêne (*Quercus robur*), **(6)** de mélèze (*Larix decidua*), **(7)** de châtaignier (*Castanea sativa*), **(8)** de sapin pectiné (*Abies alba*), **(9)** de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et **(10)** de cèdre du Japon (*Cryptomeria japonica*). D'autres substrats de cultures ont été aussi analysés en parallèle des sols forestiers : **(11)** un terreau commercial polyvalent constitué de 40 % de tourbe noire et 60 % de tourbe blonde (GO-PP7, Vertys, Fontenay Le Comte) et **(12)** un substrat préparé pour les germinations de l'ONF à base de tourbe noire et de broyat d'écorces.

La sélection des substrats à utiliser pour la mise en culture a été faite selon leur pH, leur concentration en Al, leur composition en minéraux majeurs et leur capacité d'échange cationique.

#### **III.2.1.1. Composition minérale**

Afin de doser l'Al et certains éléments minéraux essentiels à la croissance des plantes (Ca, Mg et K) dans le sol, une extraction avec le mélange Rhizo A (Feng *et al.*, 2005) qui simule les exsudats racinaires (sécrétion d'acides organiques par les racines) a été réalisée.

La Figure 72 montre les quantités de Ca, Mg, K et Al présents dans l'extraction au mélange Rhizo A obtenues à partir des 12 substrats de culture.



**Figure 72:** Teneurs en éléments minéraux (Ca, Mg, et K) (**A** et **C**) et Al (**B** et **D**) en meq.(100 g)<sup>-1</sup> MS dans les fractions extraites par le Rhizo A des différents sols forestiers ou substrats de culture. (**A** et **B**) : Sols forestiers : les abscisses correspondent aux sols prélevés dans des parcelles avec une plantation de : 1. sapin de Douglas, 2. Cyprès de Lawson, 3. Chou et orge, 4. absence de plantation, 5. Chêne, 6. Mélèze, 7. Châtaignier, 8. Sapin pectiné, 9. Pin sylvestre, 10. Cèdre du Japon. (**C** et **D**): les abscisses correspondent au 11. Terreau commercial, 12. Mélange de broyat d'écorce et de tourbe brune (substrat ONF). Les résultats sont la moyenne de trois extractions différentes (n=3) ± écart-type.

Tout d'abord, la comparaison des teneurs en Al des fractions extraites par le Rhizo A des sols forestiers, montre que les deux sols qui présentent les valeurs les plus élevées en aluminium sont les sols issus de plantation de deux résineux : le pin sylvestre et le sapin de Douglas (environ 14 et 10 meq Al.(100 g)<sup>-1</sup> MS respectivement). A l'inverse, le sol de plantation de chêne est celui qui présente la valeur la plus faible avec 6,5 meq Al.(100 g)<sup>-1</sup> MS.

De plus, en comparant les extraits de sols forestiers de façon générale aux extraits des autres substrats de culture, il apparait que les fractions extraites de sols forestiers ont des teneurs globalement plus importantes en Al (entre 6,4 et 13,8 meq.100<sup>-1</sup> MS pour les sols forestiers comparé à 3,5 meq Al.(100g)<sup>-1</sup> MS pour les substrats de culture).

Contrairement à l'Al, les teneurs en minéraux, notamment en magnésium, sont beaucoup plus importantes dans les extraits de substrats de culture, et surtout dans le cas du terreau universel commercial, avec 44 meq Mg.(100 g)<sup>-1</sup> MS, comparé à seulement 1,5 meq Mg.(100



g)<sup>-1</sup> MS pour le sol de plantation de Cèdre du Japon, qui présente la teneur la plus faible en Ca parmi tous les sols forestiers.

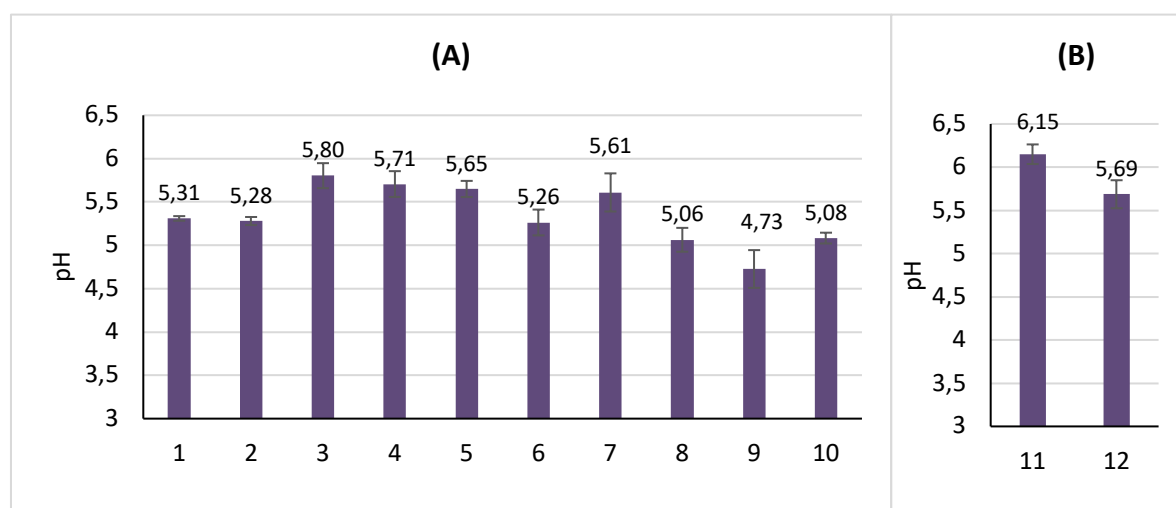
**Tableau 9:** Le rapport (Ca+K+Mg) / Al dans les sols ou les substrats de culture analysés

Sol ou substrat de culture	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rapport (Ca+K+Mg) / Al	0,23	0,19	0,38	0,34	0,23	0,32	0,34	0,22	0,10	0,26	16,6	12,5

Cette richesse des sols naturels, essentiellement les sols de plantation de résineux, en Al, accompagnée d'un faible du contenu minéral, se traduit par un faible rapport (Ca+K+Mg) / Al, qui, selon Oulehle et Hruska (2005) suggère des conditions de faible disponibilité minérale pour les plantes. Ce rapport, comme montré dans le tableau 9 est compris entre 0,1 et 0,38 dans les sols naturels, le rapport le plus faible (0,1) correspondant au sol de plantation du pin sylvestre (arbre résineux), et le plus fort (0,38) correspondant au sol de plantation d'orge et de choux. Ce rapport est considérablement plus élevé dans les substrats de culture commercial et de l'ONF (16,66 et 12,5 respectivement).

### III.2.1.2. Mesure du pH de la solution du sol

Etant donné que la teneur en Al<sup>3+</sup> de la solution est fortement corrélée au pH, ce paramètre a également été déterminé par mesure du pH<sub>eau</sub> pour les différents sols forestiers ou substrats de culture (Figure 73).



**Figure 73:** Mesures des pH des différents sols forestiers (A) : les abscisses correspondent aux sols prélevés dans des parcelles avec une plantation de : 1. sapin de Douglas, 2. Cyprès de Lawson, 3. Chou et orge, 4. absence de plantation, 5. Chêne, 6. Mélèze, 7. Châtaignier, 8. Sapin pectiné, 9. Pin sylvestre, 10. Cèdre du Japon et des substrats de cultures (B): les abscisses correspondent au 11. Terreau commercial, 12. Mélange de broyat d'écorce et de tourbe brune (substrat ONF). Les résultats sont la moyenne des mesures sur 3 échantillons différents pour chaque sol / substrat (n=3) ± écart-type.

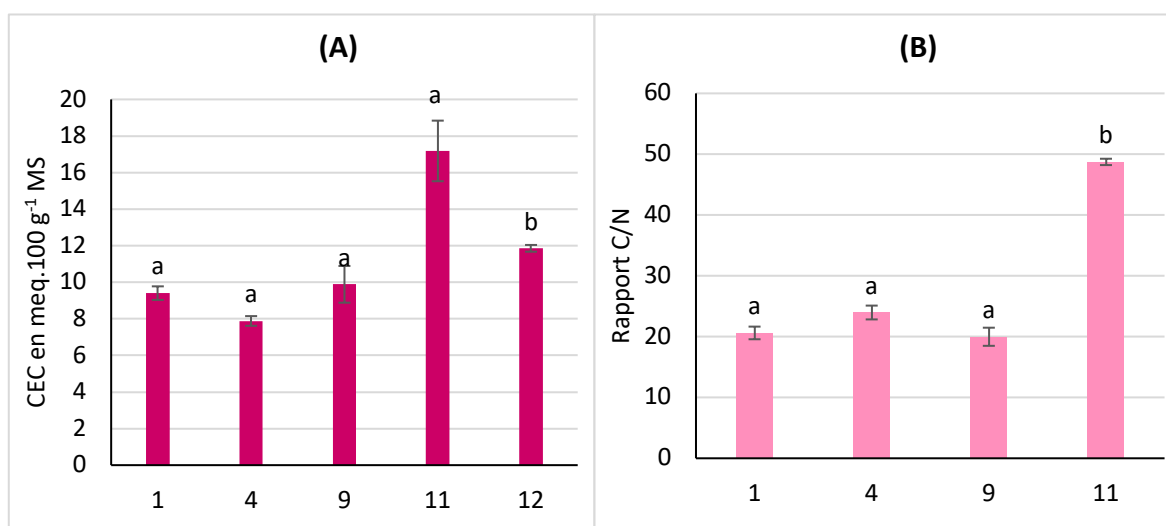
Les mesures effectuées sur les sols forestiers ont permis de mettre en évidence des différences significatives entre les pH des sols de différentes parcelles. Ainsi, les valeurs de pH des parcelles plantées avec des résineux varient entre 4,73 pour le sol avec une plantation de pin sylvestre et 5,31 pour celui de sapin de Douglas, ce qui les classe parmi les sols acides ( $\text{pH} < 5,5$ ). Au contraire, les parcelles de feuillus peuvent être classées parmi les sols faiblement acides à neutres, avec des pH supérieurs à 5,61. Enfin, le substrat ayant le pH le plus élevé correspond au terreau commercial avec un pH de 6,15.

### III.2.1.3. Caractéristiques supplémentaires

En se basant sur les critères de teneur en Al phytodisponible et de pH, une première sélection a été faite qui a conduit à retenir quatre sols forestiers permettant d'avoir les deux conditions nécessaires à l'étude :

- Les sols de plantation de sapin de Douglas et de pin sylvestre présentant l'acidité la plus importante et la plus grande teneur en Al phytodisponible ;
- Le sol sans plantation et le terreau commercial qui présentent des caractéristiques opposées : moins acides et moins riches en Al.

Pour ces quatre échantillons, des analyses complémentaires ont été réalisées : la capacité d'échange cationique (CEC) et la teneur en azote total ont été évaluées (Figure 74).



**Figure 74:** Mesures de la CEC exprimée en meq.100 g<sup>-1</sup> MS (A) et du rapport C/N (B). Les abscisses correspondent aux sols prélevés dans des parcelles avec une plantation de : 1. Sapin de Douglas, 4. absence de plantation, 9. Pin sylvestre, 11. Terreau commercial. Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes des différentes conditions ( $p < 0,05$ ). Les résultats sont une moyenne ( $n=3$ )  $\pm$  écart-type pour la CEC, et ( $n=6$ ) pour l'azote total. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes des différentes conditions ( $p < 0,05$ ).

La capacité d'échange cationique a été mesurée par une méthode colorimétrique suite à un échange avec une solution de cobaltihexamine. Les résultats obtenus sur les sols forestiers sont compris entre 8 et 10 meq.100 g<sup>-1</sup> de sol ce qui les classe parmi les CEC faibles à moyennes, et 17 meq.100 g<sup>-1</sup> de sol pour le terreau commercial, correspondant à une CEC élevée selon le programme d'interprétation LANO/CA de Basse Normandie.

Le rapport C/N reste aux alentours de 20 pour les trois sols forestiers, et est de 48 pour le terreau commercial.

Pour la suite des expériences, les sols forestiers prélevés au niveau des plantations de sapin de Douglas ( $S_D$ ) et de pin sylvestre ( $S_{PS}$ ) ainsi que le terreau commercial ont été retenus. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 10:

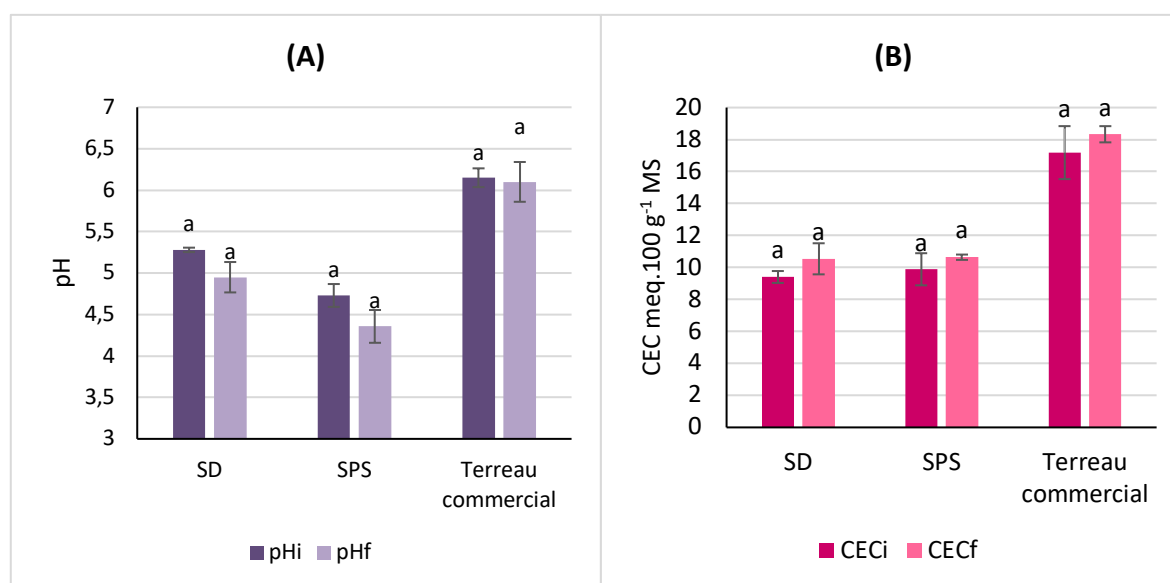
**Tableau 10:** Caractéristiques physicochimiques des sols / substrats de culture sélectionnés

	$S_D$	$S_{PS}$	Terreau commercial
<b>pH</b>	5,31	4,73	6,15
<b>Teneur en Al (meq.100 g<sup>-1</sup> MS)</b>	9,73	13,80	3,46
<b>CEC (meq.100 g<sup>-1</sup> MS)</b>	9,4	9,88	17,17
<b>Rapport C/N</b>	20,61	19,98	48,73

### III.2.1.4. Evolution des caractéristiques des sols après cultures de sapin de Douglas

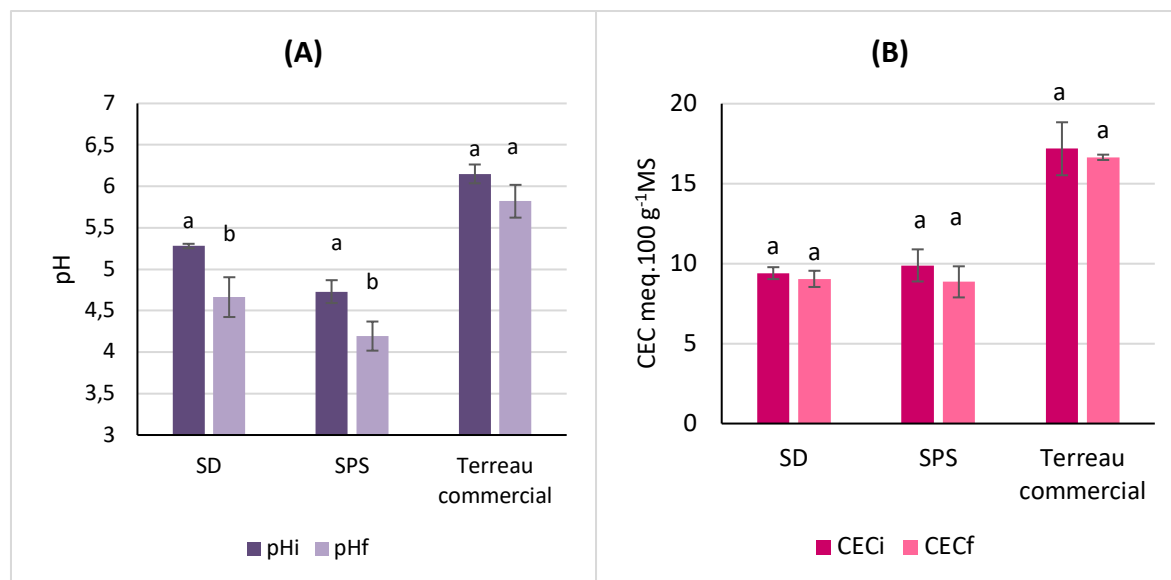
Les jeunes plantules issues de germination ont été cultivées pendant 8 semaines sur les 3 sols sélectionnés, cette durée a été prolongée à 11 mois pour les jeunes arbres âgés de 3 ans. Après récolte, les substrats ont été caractérisés en termes de pH et de CEC.

Concernant les plantules, l'acidité et la capacité d'échange cationique des substrats de culture n'ont pas évolué significativement. Les plantules étant très jeunes et donc de petite taille, ne semblent pas avoir un effet sur les caractéristiques des sols ou substrats sur lesquels elles se développent (Figure 75).



**Figure 75:** Evolution du pH (A) et de la CEC (B) des sols forestiers ou substrat de culture après culture de plantules de sapin de Douglas pendant 8 semaines sur ces mêmes substrats. Les mesures ont été faites de façon indépendante pour chaque condition de culture avec 3 répétitions pour la même condition. Les résultats sont une moyenne (n=3) ± écart-type. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes des différentes conditions (p<0,05).

Par contre, la mesure du pH des substrats après culture des jeunes arbres de 3 ans a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les pH initiaux et les pH finaux des sols forestiers (Figure 76 A). Les sols ont été acidifiés au bout de 11 mois de culture et le pH a diminué de 0,6 unité pH environ. Cependant, la CEC ne montre pas de variation significative (Figure 76 B).



**Figure 76:** Evolution du pH (A) et de la CEC (B) des substrats de culture après 11 mois de culture des jeunes arbres de Douglas de 4 ans sur ces substrats. L'indice i correspond à la mesure avant culture, l'indice f correspond à la mesure après récolte. Les mesures ont été effectuées de façon indépendante sur chaque pot de culture avec 3 répétitions pour la même condition. Les résultats sont une moyenne (n=3) ± écart-type. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes des différentes conditions ( $p < 0,05$ ).

### III.2.2. Effet de l'Aluminium sur les jeunes plantules et les jeunes arbres de Douglas cultivés sur sols forestiers.

Afin d'étudier l'effet de l'exposition du sapin de Douglas à des conditions de sol acides et riches en Al phytodisponibles, les plantes de sapin de Douglas récoltées ont été découpées en trois compartiments : les racines, les tiges et les épines. Pour les jeunes arbres, l'exposition au sol riche en Al n'étant intervenue que pour la dernière année de croissance, seules les parties correspondantes à la dernière année de croissance ont été récupérées (Figure 77). Pour décrire les résultats sur ces jeunes arbres, « racines » désignera les 20 derniers centimètres des racines, « tige » désignera la pousse de l'année au niveau de la tige et « épines » désignera les épines sur la pousse de l'année. Chaque organe a été analysé séparément du reste de la plante.

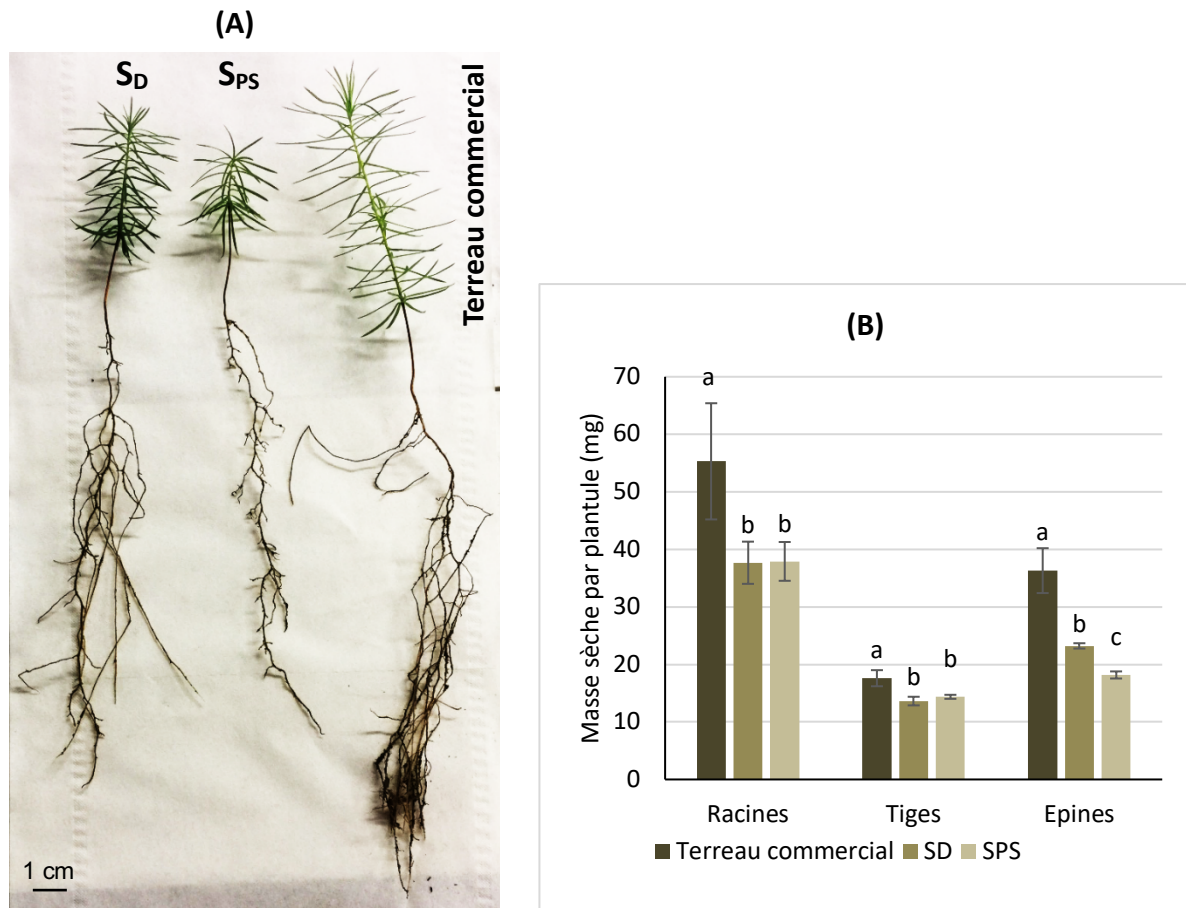


**Figure 77:** Les points de découpe et de mesures sur les jeunes arbres de sapin de Douglas. (a) les 20 derniers cm de la racine, (b) mesure du diamètre au collet, (c) pousse de l'année.

### III.2.2.1. Effet de l'Aluminium sur la morphologie et la croissance des plantules

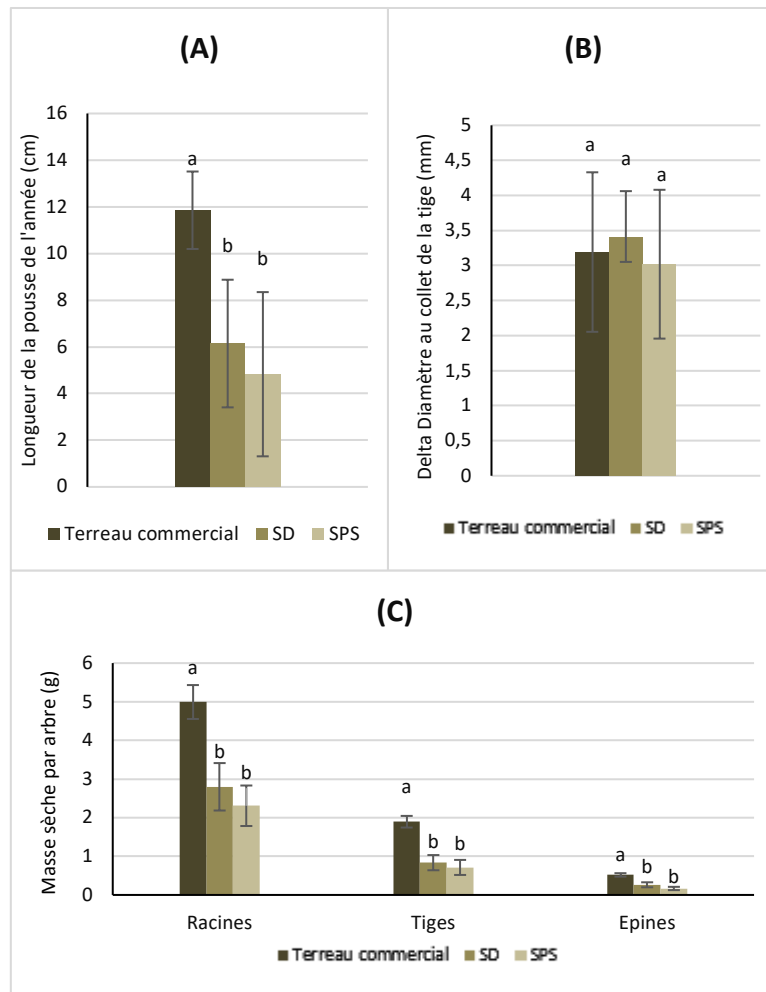
#### III.2.2.1.1. Mesures biométriques

Les plantules issues de germinations de graines, présentent après 8 semaines de culture, des niveaux de croissance différents en fonction du sol ou du substrat considérés. Les plantules cultivées sur les sols forestiers prélevés sur des plantations de sapin de Douglas, de pin sylvestre, à caractère acide et riches en Al, ont une croissance réduite au niveau des racines et de la partie aérienne par rapport aux plantules cultivées sur le terreau commercial (condition témoin). Sur la figure 78 A, il apparaît que la plantule sur terreau commercial a un système racinaire considérablement plus développé, avec une racine principale plus longue, et un nombre de racines secondaires plus important que les deux autres conditions. La partie aérienne est aussi plus développée en termes de croissance de la tige principale avec des épines moins condensées sur terreau commercial. Ceci a été confirmé par les mesures des masses sèches des différents organes (Figure 78 B). Les masses sèches des racines des plantules cultivées sur  $S_D$  et  $S_{PS}$  (environ 37 mg par plantule) sont 33% plus faibles que celles des plantules cultivées sur terreau commercial (environ 55 mg par plantule). Pour les épines, leur masse sèche passe de 36 mg dans la condition témoin à 23 mg pour la condition  $S_D$  et 18 mg pour la condition  $S_{PS}$ .



**Figure 78:** Effet de la nature du sol ou du substrat de culture **(A)** sur la croissance des plantules de sapin d Douglas issues de germination de graines après 2 mois de culture et **(B)** sur la masse sèche de différents compartiments à la récolte. Les mesures ont été effectuées de façon indépendante sur 3 récoltes différentes pour la même condition. Les résultats sont une moyenne ( $n=3$ )  $\pm$  écart-type. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes des masses sèches d'un même organe ( $p < 0,05$ ).

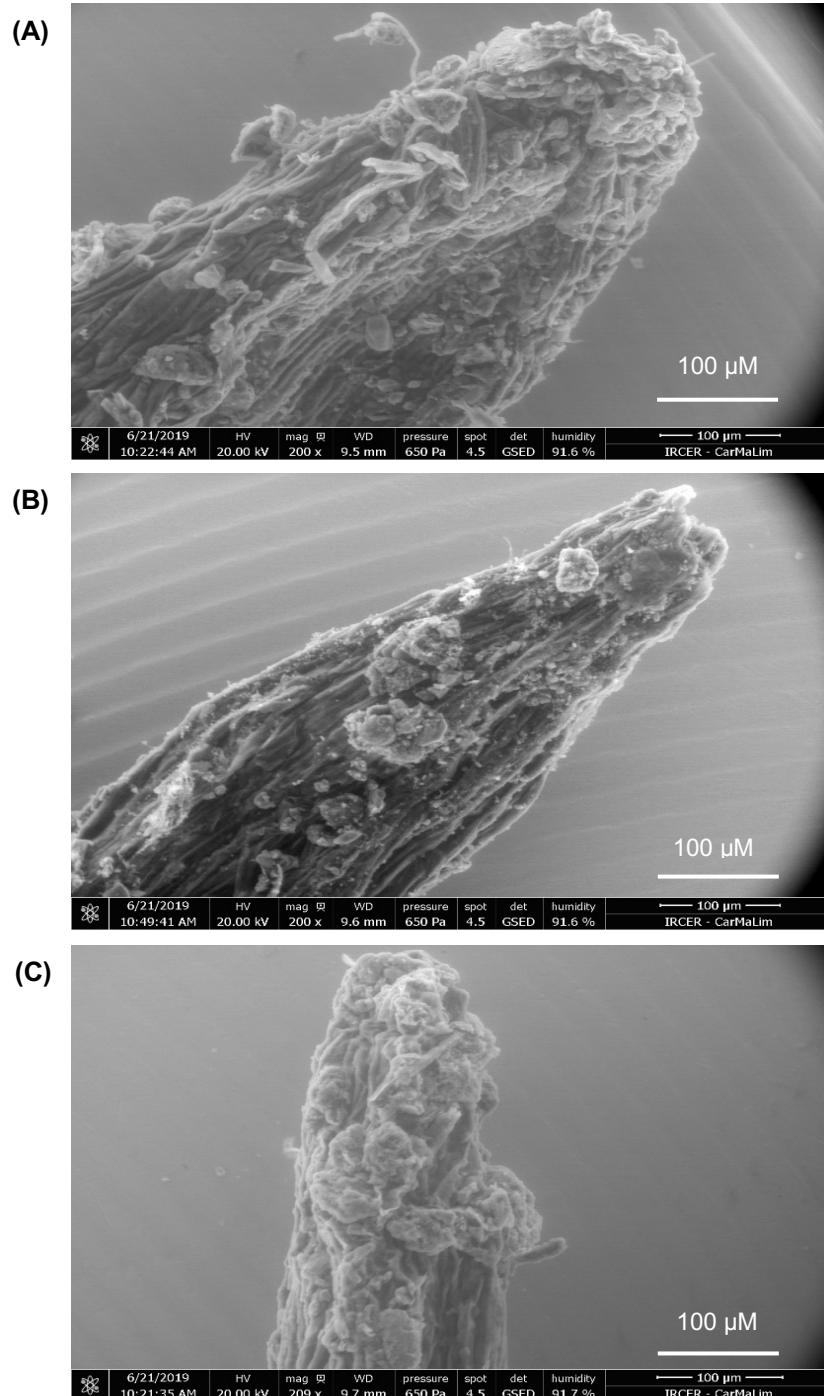
Dans le cas des jeunes arbres de sapin de Douglas cultivés pendant 11 mois sur les trois substrats différents, on remarque que les arbres exposés aux  $S_D$  et  $S_{PS}$  ont une pousse de l'année significativement moins développée par rapport aux arbres cultivés sur terreau commercial (environ la moitié) si la longueur de la tige principale est prise en considération (Figure 79 A). Dans la dernière année de culture, la tige sur terreau commercial présente une croissance d'environ 11 cm, contre environ 5 cm sur  $S_D$  et  $S_{PS}$ . Cependant, le diamètre de la tige reste inchangé quel que soit le substrat de culture (Figure 79 B). Par ailleurs, les racines, les tiges et les épines des arbres exposés aux sols forestiers présentent des masses sèches deux fois moins importantes que celles des arbres cultivés sur le terreau commercial (Figure 79 C). Les masses sèches passent de 5 à 2,5 g pour les racines, de 2 à 0,8 g pour la tige et de 0,5 à 0,25 g pour les épines.



**Figure 79:** Effet de la nature des substrats de culture sur la croissance des jeunes arbres de sapin de Douglas. **(A)** Effet sur l'élongation de la pousse de l'année ; **(B)** Effet sur l'augmentation du diamètre au collet de la tige ; **(C)** Effet sur les masses sèches des racines, tiges et épines de la pousse de l'année. Les résultats sont la moyenne de mesures effectuées sur 11 plantes par condition. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes des masses sèches d'un même organe ( $p < 0,05$ ).

### III.2.2.1.2. Aspect de la pointe racinaire

Il a semblé judicieux de s'intéresser plus particulièrement à la pointe des racines car d'une part, la racine est l'organe directement exposé au sol, d'autre part, des effets de l'AI sur la structure de la pointe racinaire sont souvent cités dans la littérature (Arroyave et al., 2011; Krill et al., 2010; Panda et al., 2009). Il a été donc intéressant, en complément des observations de la morphologie générale des plantes, et des mesures des masses sèches, d'observer les pointes des racines pour chacune des conditions de culture en microscopie électronique à balayage en mode environnemental (MEBe FEI QUANTA FEG ESEM 450 sur la plateforme CARMALIM de l'Université de Limoges) afin d'examiner leurs aspects et les éventuelles déformations pouvant y avoir lieu. Cette technique a l'avantage de ne pas nécessiter une préparation de l'échantillon.

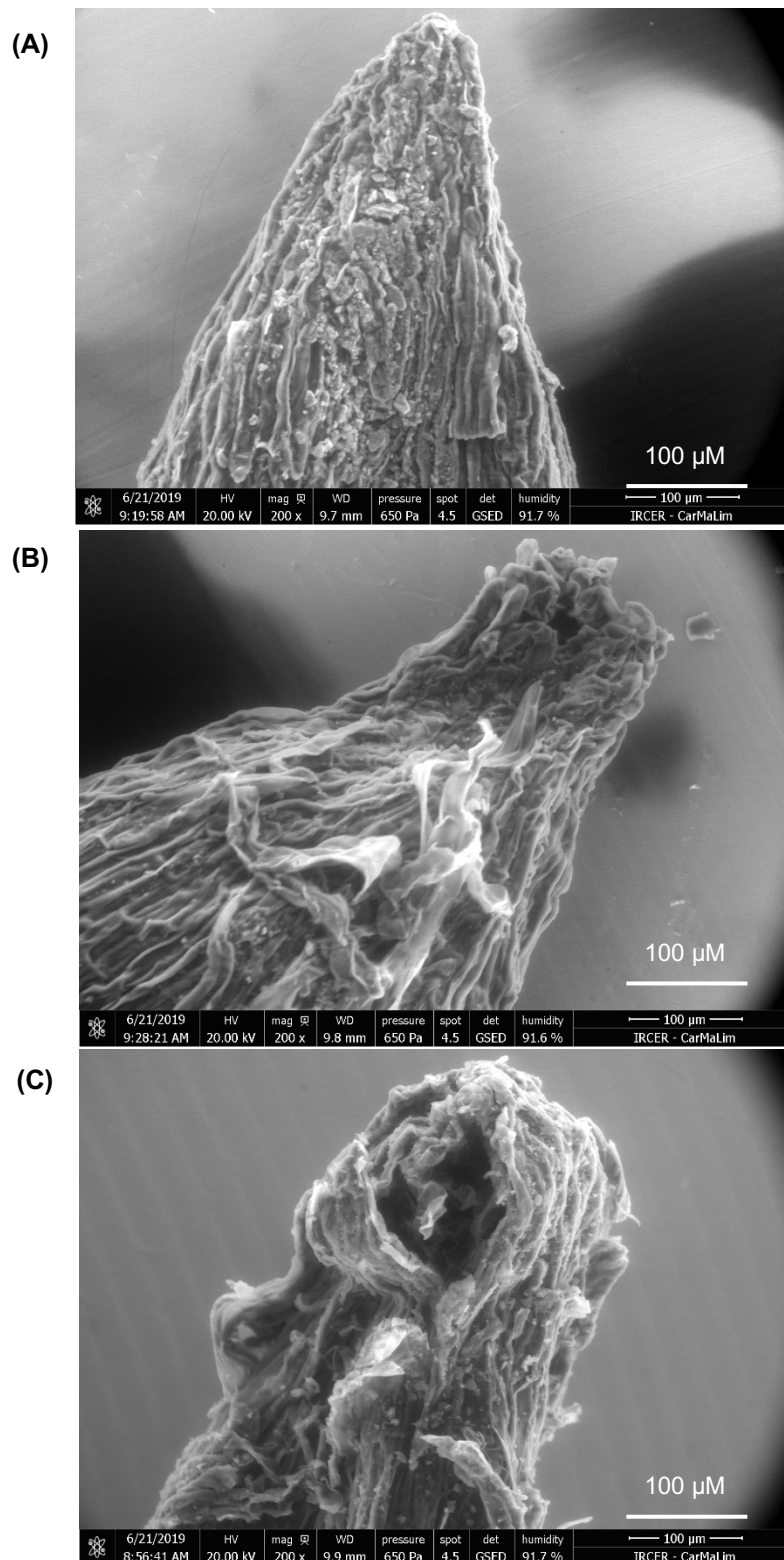


**Figure 80:** Photographies d'observations au MEB des pointes racinaires des plantules de sapin de Douglas après 8 semaines de culture sur différents substrats de culture : **(A)** Terre commercial ; **(B)** S<sub>D</sub> ; **(C)** S<sub>PS</sub>.

Sur la figure 80 A, et après 8 semaines de culture, la racine de la plantule cultivée sur terreau commercial ne montre aucune anomalie remarquable dans son extrémité. Cette pointe semble être légèrement enfoncée dans le cas de la racine de la plantule sur S<sub>D</sub> (Figure 80 B). L'enfoncement est plus prononcé au niveau de la pointe racinaire de la plantule sur S<sub>PS</sub> avec un enroulement du rhizoderme et une déformation de son aspect normalement pointu (Figure 80 C). Dans le cas des jeunes arbres, avec une durée s'exposition aux substrats sélectionnés



plus longue, on constate des phénomènes similaires au niveau des pointes racinaires des arbres cultivés sur  $S_D$  et  $S_{PS}$ .



**Figure 81:** Photographies d'observations au MEBE des pointes racinaires des jeunes arbres de sapin d Douglas après 1 mois de culture sur différents substrats de culture: **(A)** Terreau commercial ; **(B)**  $S_D$  ; **(C)**  $S_{PS}$ .

Les observations au microscope électronique en mode environnemental ne mettent pas en évidence d'anomalie remarquable dans l'extrémité de la racine de l'arbre cultivé sur terreau commercial (Figure 81 A). Cependant, les racines exposées au  $S_D$  présentent une légère désorganisation tissulaire de surface au niveau de la coiffe (Figure 81 B) qui ressemble à celle observée chez les racines des plantules de 2 mois.

Sur  $S_{PS}$ , la racine présente des ruptures plus profondes des couches externes à l'extrémité de la racine (Figure 81 C).

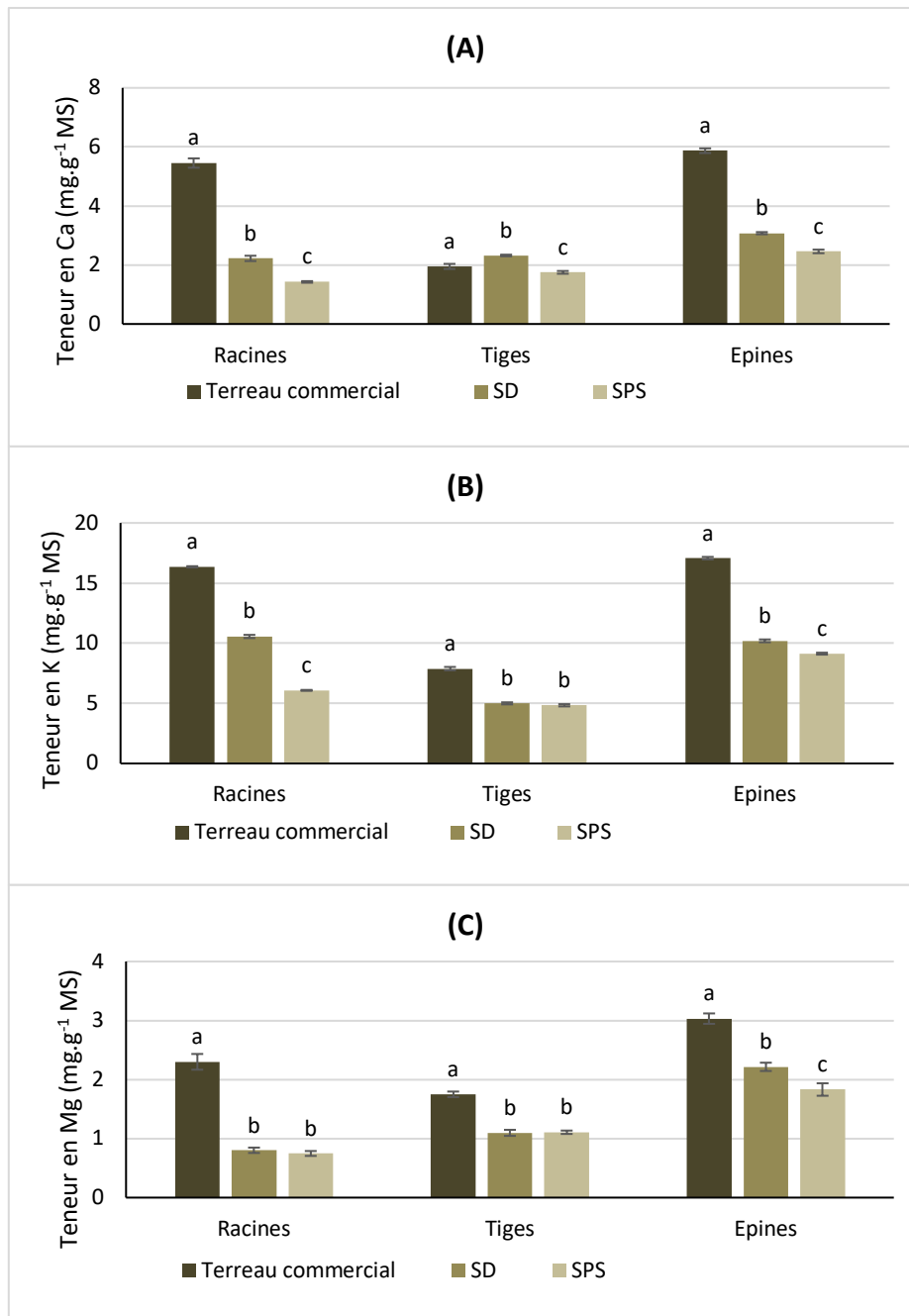
### **III.2.2.1.3. Effet de l'Aluminium sur la nutrition minérale des plantes cultivées sur sols forestiers ou substrat de culture**

Les effets remarqués au niveau des racines et des parties aériennes des plantes de sapin de Douglas exposées à des sols acides riches en Al suggèrent que l'Al a été absorbé par la plante, et a éventuellement été véhiculé vers les parties aériennes. L'absorption de l'Al, selon la littérature, a aussi pour conséquence la perturbation de la nutrition minérale (Steiner *et al.*, 2012).

Pour vérifier ce phénomène sur nos modèles d'étude, certains éléments minéraux essentiels pour la croissance de la plante (Ca, K, et Mg) ont été dosés dans les différents organes pour les 3 conditions de culture (Figure 82).

Les plantules témoins sont nettement plus riches en Ca, K et Mg dans tous les organes par rapport aux plantules cultivées sur  $S_D$  et  $S_{PS}$ . Dans les racines des plantules de sapin de Douglas par exemple, les teneurs en Ca, K et Mg sont 40 à 60 % plus faibles sur sols forestiers que sur terreau commercial. Les teneurs en Ca dans les racines passent de 5,5 mg  $Ca.g^{-1}$  MS sur terreau commercial à environ 2,5 mg  $Ca.g^{-1}$  MS sur  $S_D$ , à 1,5 mg  $Ca.g^{-1}$  MS sur  $S_{PS}$ . Pour le K, les teneurs dans les racines passent de 16 mg  $K.g^{-1}$  MS sur terreau commercial à 10 mg  $K.g^{-1}$  MS sur  $S_D$  et à 6 mg  $K.g^{-1}$  MS sur  $S_{PS}$ . Le Mg dans les racines passe à son tour de 2,3 mg  $Mg.g^{-1}$  MS sur terreau commercial à environ 0,7 mg  $Mg.g^{-1}$  MS sur les sols forestier.

Ces faibles teneurs en minéraux chez les plantules cultivées sur sols forestiers peuvent expliquer les différences de croissance des plantules exposées à ces conditions en comparaison avec les plantules témoins, car les teneurs faibles en éléments minéraux essentiels peuvent constituer un facteur limitant pour la croissance.

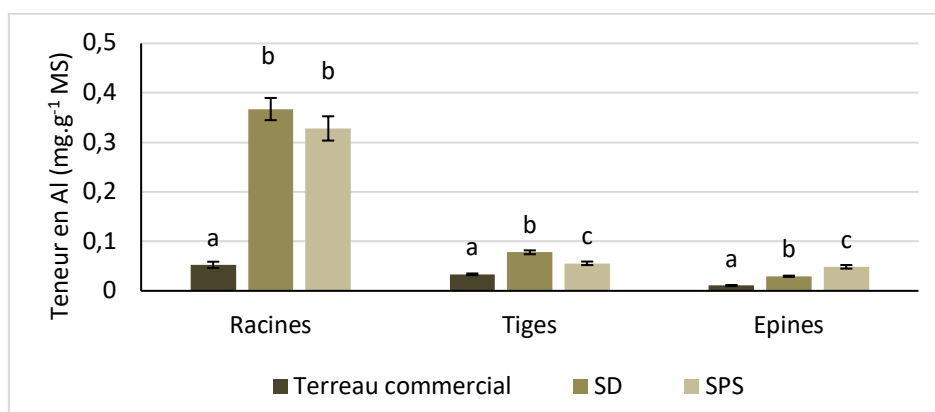


**Figure 82:** Teneurs en minéraux essentiels dans les racines, tiges et épines des plantules cultivées pendant 8 semaines sur terreau commercial,  $S_D$  et  $S_{PS}$ . **(A)** Ca ; **(B)** K et **(C)** Mg. Les mesures ont été effectuées de façon indépendante sur 3 récoltes différentes pour la même condition. Les résultats sont une moyenne ( $n=3$ )  $\pm$  écart-type. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes au sein d'un même organe ( $p < 0,05$ ).

### III.2.2.2. Localisation racinaire de l'Aluminium

Comme pour les éléments minéraux, l'Al a été dosé dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas, afin de déterminer son accumulation dans chaque compartiment de la plante.

Les teneurs en Al (Figure 83) présentent des variations inverses comparées à celles relevées pour les éléments minéraux essentiels Ca, K et Mg (Figure 82).



**Figure 83:** Teneurs en Al dans les racines, tiges et épines des plantules cultivées pendant 8 semaines sur terreau commercial, S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>. Les mesures ont été effectuées de façon indépendante sur 3 récoltes différentes pour la même condition. Les résultats sont une moyenne (n=3) ± écart-type. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les moyennes au sein d'un même organe (p<0,05).

Il est à noter que l'Al est présent même dans les racines, tiges et épines des plantules cultivées sur terreau commercial à des teneurs de 0,05, 0,03 et 0,01 mg g<sup>-1</sup> MS, respectivement.

Ensuite, les dosages montrent que quel que soit la condition de culture, les racines restent l'organe le plus riche en Al. Par exemple, Sur S<sub>PS</sub>, la racine accumule 0,325 mg Al.g<sup>-1</sup> MS pour 0,05 mg Al.g<sup>-1</sup> MS dans les tiges et les épines (Figure 83).

En outre, la teneur en Al dans chaque organe est significativement plus importante chez les plantules cultivées sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub> que sur terreau commercial. La teneur en Al est passée de 0,05 mg Al g<sup>-1</sup> MS dans les racines sur terreau commercial à environ 0,35 mg Al g<sup>-1</sup> MS dans les racines sur sols forestiers.

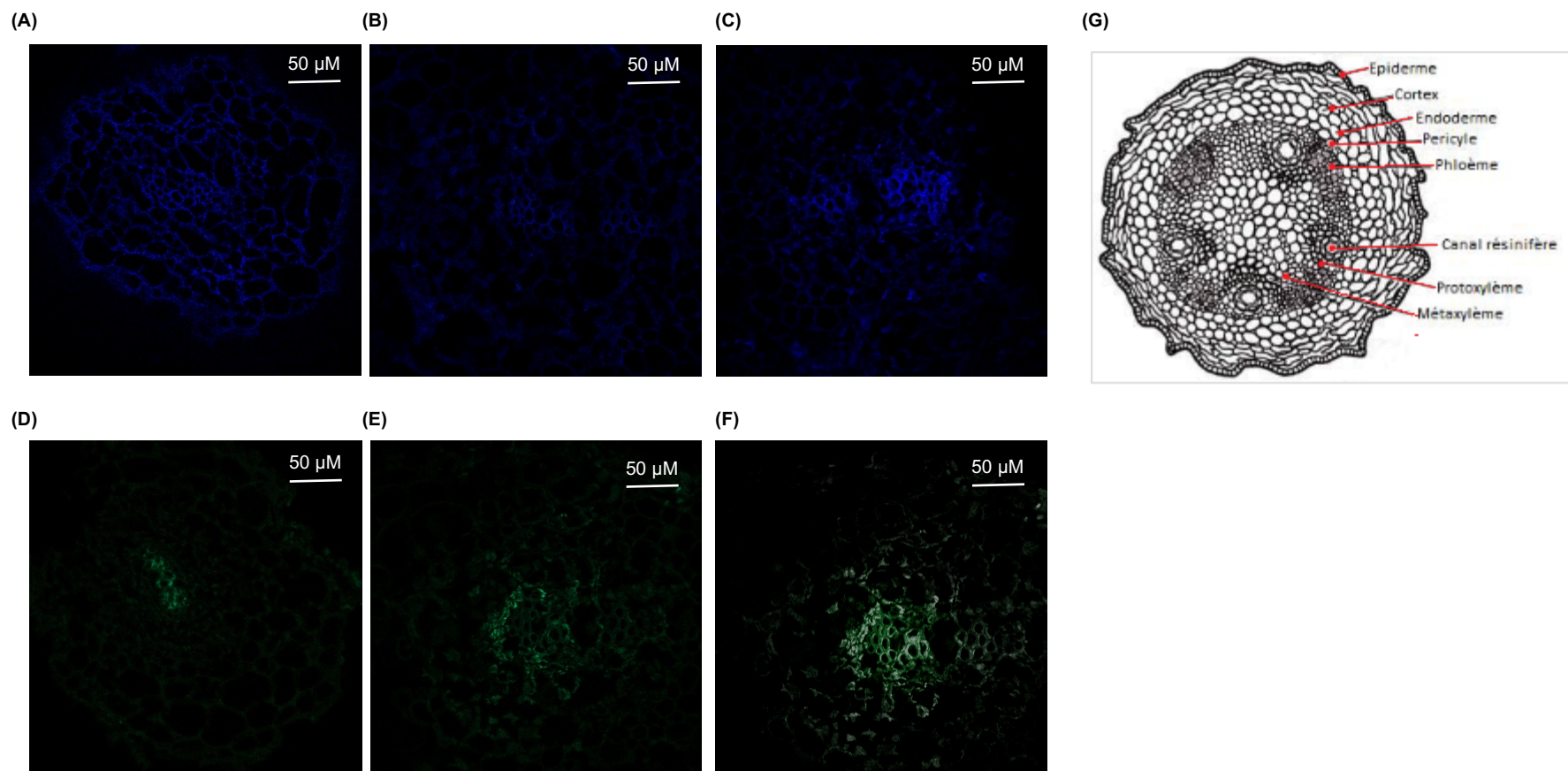
En faisant le rapport avec la quantité d'Al dans la solution du sol, on peut établir le facteur d'accumulation de l'Al dans la plante (Tableau 11)

**Tableau 11:** Les taux d'accumulation de l'Al par les plantules de Douglas

	Quantité d'Al dans le substrat de culture (mg Al.g <sup>-1</sup> )	Quantité d'Al dans la plante (mg Al.g <sup>-1</sup> )	Quantité d'Al dans chaque organe à part (mg Al.g <sup>-1</sup> )			Facteur d'accumulation par la plante (%)	Facteur d'accumulation par chaque organe à part (%)		
			Racine	Tige	Épines		Racine	Tige	Épines
<b>Terreau commercial</b>	0,31	0,1	0,053	0,033	0,011	32%	17%	11%	3%
<b>S<sub>D</sub></b>	0,81	0,47	0,367	0,078	0,029	58%	45%	10%	4%
<b>S<sub>PS</sub></b>	1,24	0,43	0,328	0,056	0,049	35%	26%	4%	4%

Dans le cas des plantules âgées de 2 mois, on constate que, quelle que soit la condition, l'Al est détecté dans les 3 compartiments de la plante, avec des teneurs relativement faibles pour la condition témoin (0,01 dans les épines et 0,05 mg Al.g<sup>-1</sup> MS dans les racines), ce qui montre que l'Al a été absorbé par la racine et transporté vers les épines en passant par la tige. Les racines étant l'organe directement exposé au sol, elles présentent les teneurs les plus importantes en Al pour les 3 conditions avec environ 0,35 mg Al.g<sup>-1</sup> MS pour les sols forestiers (correspondant à 45% de l'Al dosé dans le S<sub>D</sub> et 28% de l'Al dosé dans S<sub>PS</sub>) et 0,05 mg Al.g<sup>-1</sup> MS pour le terreau commercial (correspondant à 17 % de l'Al dosé dans le terreau commercial). Ces teneurs sont 4 à 10 fois moins importantes dans les tiges et les épines. On note une accumulation nettement plus importante que ce soit dans les racines (environ 3,5 mg.g<sup>-1</sup> MS), les tiges (environ 0,6 mg.g<sup>-1</sup> MS) ou les épines (environ 0,4 mg.g<sup>-1</sup> MS) par rapport aux plantules témoins.

Les dosages d'Al dans les différents organes de la plante ont montré que les racines sont l'organe qui accumule le plus d'Al. Afin de préciser la localisation de l'Al à l'échelle tissulaire, des coupes d'une épaisseur de 10 µm ont été réalisées à 1 cm de la pointe racinaire puis marquées au Morin (Figure 84). Le Morin, lorsqu'il est lié à l'Al<sup>3+</sup>, émet une fluorescence à λ = 510 nm à la suite d'une excitation à λ=420 nm. Les coupes ont donc été observées au microscope confocal. De plus, pour observer l'aspect général des tissus, des coupes ont été marquées au Calcofluor, afin de visualiser les parois cellulaires.



**Figure 84:** Observations en microscopie confocale de coupes transversales des racines de plantules de sapin de Douglas âgées de 2 mois cultivées sur terreau commercial (**A et D**) ;  $S_D$  (**B et E**) et sur  $S_{PS}$  (**C et F**). Des coupes sur les mêmes racines ont été marquées au Calcofluor (**A, B et C**) et au Morin (**D, E et F**) ; (**G**) Schéma d'une coupe transversale d'une jeune racine de gymnosperme (Khusboo, 2018).

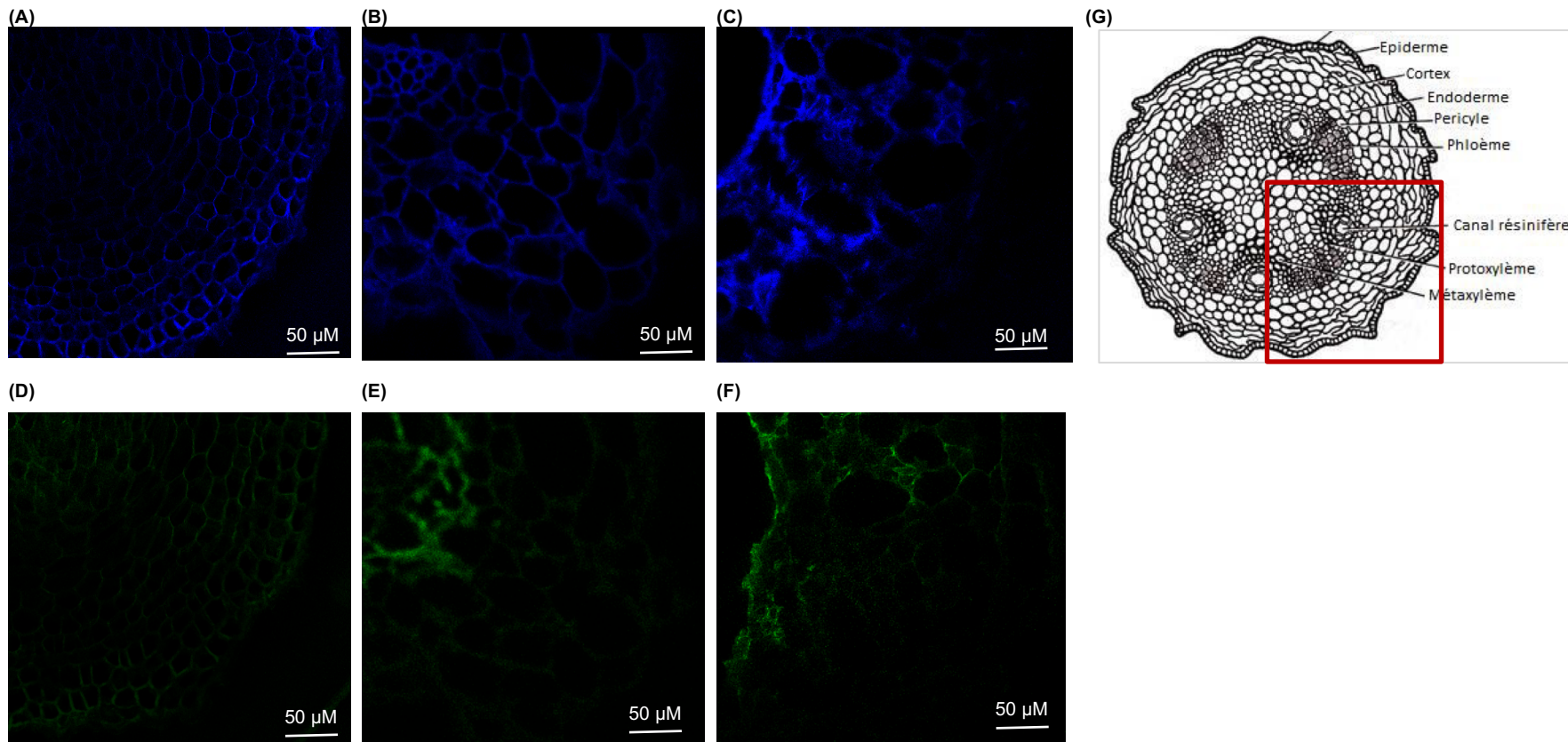
Le marquage au Calcofluor a montré sur la racine témoin une fluorescence uniforme sur les parois des cellules de la quasi-totalité de la coupe ce qui permet de visualiser l'organisation des cellules au sein des différents tissus. Chez les racines des plantules cultivées sur sols forestiers, le signal est moins uniforme : il est faible au niveau de la zone corticale des racines.

La fluorescence du complexe Al-Morin représentée dans la figure 84 D, E, F a été considérée après atténuation de l'autofluorescence des tissus végétaux. Ce complexe a été détecté y compris dans les conditions témoins, mais très réduit au niveau du cylindre central, au niveau des parois des cellules conductrices (Figure 84 D). Le signal émis par ce complexe augmente en intensité et en répartition si on considère les échantillons issus de sols acides riches en Al. L'aluminium a été observé non seulement dans le cylindre central, mais aussi dans le cortex, toujours au niveau des parois cellulaires, avec des intensités de signal variables mais qui restent plus prononcées au niveau des cellules conductrices (Figure 84 D, E). L'Al absorbée semble donc essentiellement accumulé au niveau des parois cellulaires dans les tissus du cylindre central.

Des coupes transversales des racines des jeunes arbres de sapin de Douglas de 4 ans ont été aussi observées avec les mêmes marquages et dans les mêmes conditions.

A 4 ans, les arbres de sapin de Douglas présentent des racines plus développées que celles des plantules de 2 mois à la fois en termes de longueur que de diamètre. De ce fait, il n'a pas été possible d'observer la totalité d'une coupe sous l'objectif du microscope, et uniquement un quart de coupe (coté bas à droite) a été considéré.

Le signal de la fluorescence du complexe Al-Morin est très faible dans les conditions témoins (Figure 85 D). Ce signal est davantage marqué dans les conditions de sols forestiers. Dans le cas des racines sur sol de sapin de Douglas, le signal est plus intense dans le cylindre central (Figure 85 E). Il est réduit à la zone corticale dans le cas des racines sur sol de pin sylvestre (Figure 85 F). Ces signaux sont toujours localisés au niveau des parois cellulaires, ceci est confirmé par le marquage effectué sur des coupes voisines sur la même racine, au Calcofluor (Figure 85 A,B et C).



**Figure 85:** Observations en microscopie confocale des coupes transversales des racines des jeunes arbres de sapin de Douglas de 4 ans cultivés sur substrat commercial (**A et D**) ;  $S_D$  (**B et E**) et  $S_{PS}$  (**C et F**) pendant 11 mois. Des coupes sur les mêmes racines ont été marquées au Calcofluor (**A, B et C**) et au Morin (**D, E et F**) ; (**G**) Schéma d'une coupe transversale d'une jeune racine de gymnosperme (Khusboo, 2018). Le cadre rouge montre la zone observée des coupes.



### **III.2.2.3. Analyse de la fraction polysaccharidique de la paroi cellulaire**

Comme pour les plantules de sapin de Douglas *in vitro*, les fractions des polysaccharides de paroi extraites de plantes de sapin de Douglas exposées aux différentes conditions de sol ont été évaluées quantitativement et qualitativement. L'activité pectine méthyl estérase qui peut affecter la nature acide des pectines composant la paroi a été étudiée de façon concomitante.

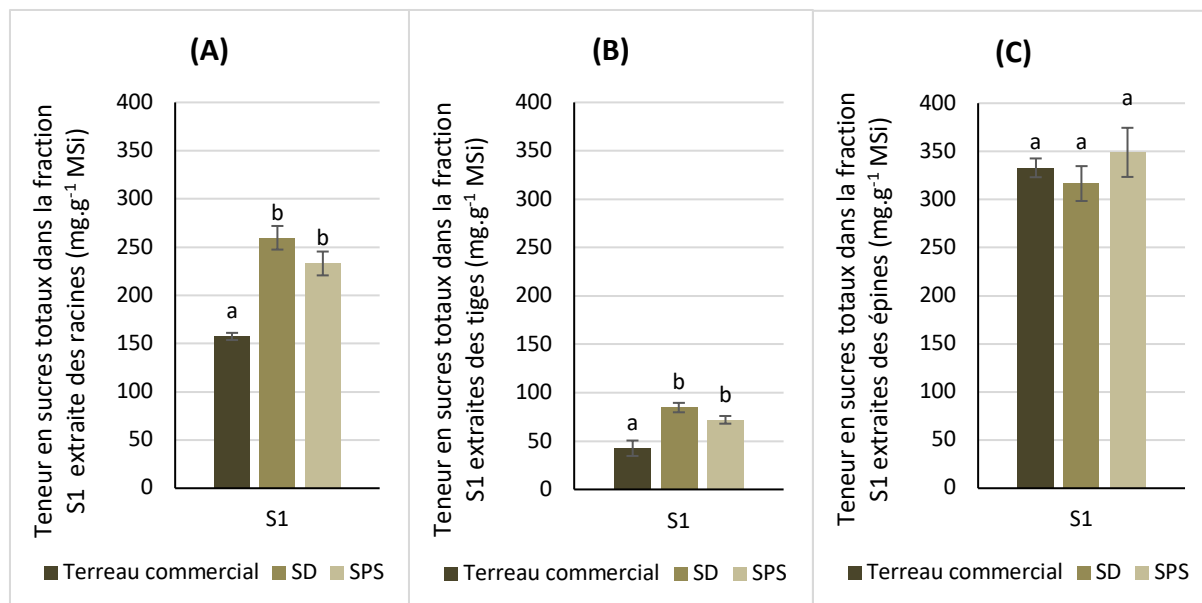
Cette évaluation a porté sur les racines, tiges et épines des plantules âgées de 2 mois, ainsi que sur les pousses de la dernière année de ces trois organes chez les jeunes arbres de 3 ans, c'est-à-dire l'année au cours de laquelle les arbres ont été exposés aux sols acides riches en Al.

#### **III.2.2.3.1. Analyse quantitative des fractions polysaccharidiques extraites de paroi de sapins de Douglas exposés à différents sols forestiers ou substrat de culture**

Dans un premier temps, une extraction séquentielle a été réalisée afin de séparer les différentes fractions polysaccharidiques de la paroi cellulaire pour chaque organe, et les sucres totaux ont ensuite été dosés dans chaque fraction pour obtenir une évaluation quantitative.

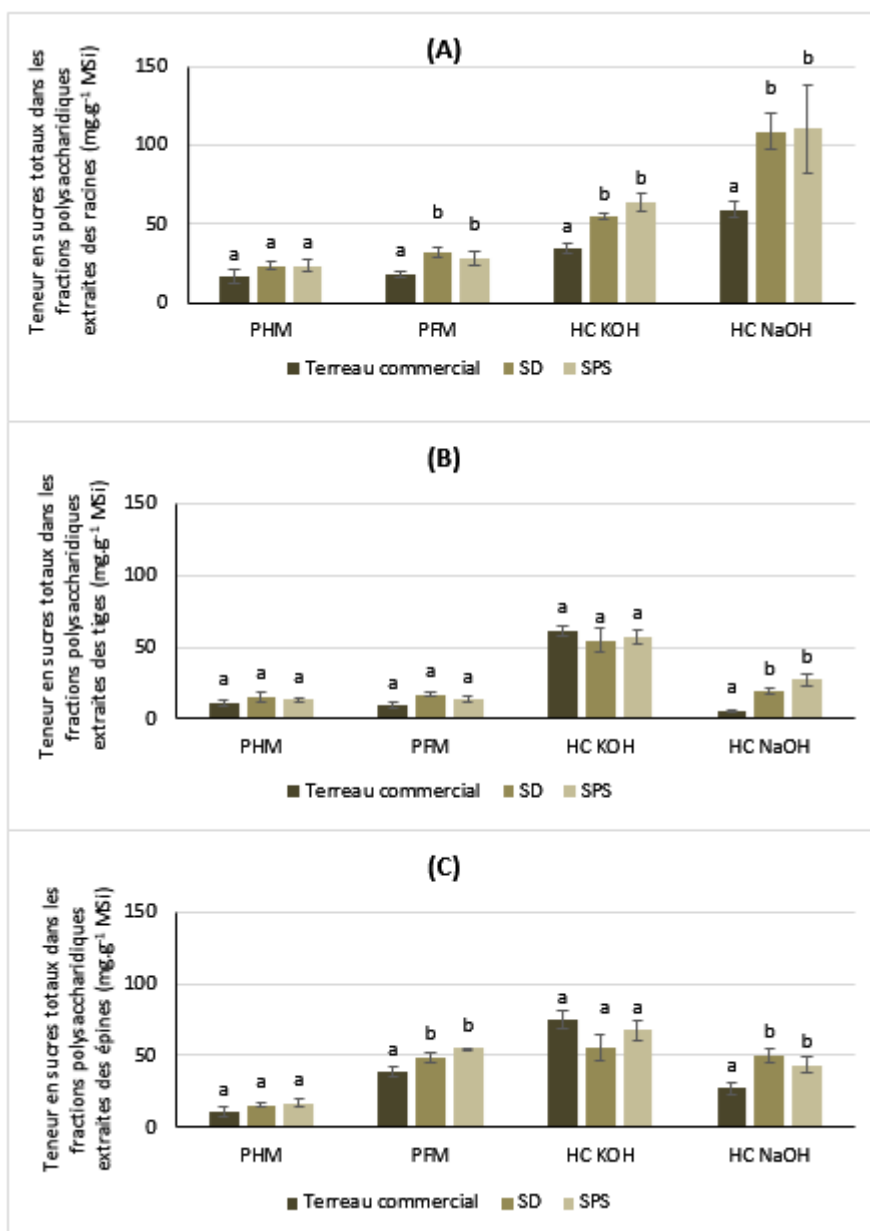
Comme il a déjà été décrit dans le paragraphe II.4.1, le protocole d'extraction des polysaccharides de la paroi prévoit, après l'extraction des sucres circulants par l'éthanol (S1), une extraction à l'eau chaude (fraction pectique hautement méthylestérifiées PHM), une extraction à l'oxalate d'ammonium (fraction pectique faiblement méthylestérifiées PFM), une extraction à la potasse (fraction hémicellulosique HC KOH) et une extraction à la soude (fraction hémicellulosique HC NaOH).

Les figures 86 et 87 montrent, respectivement, l'évaluation quantitative des teneurs en sucres totaux des fractions S1 et des différentes fractions polysaccharidiques obtenues lors des extractions successives effectuées sur les trois organes des plantules. La fraction S1 extraite à l'éthanol (sucres circulants, tanins...) est la fraction majoritaire quel que soit l'organe concerné et la condition de culture (Figure 86). En comparant les trois organes, les épines apparaissent plus riches en sucres totaux que les racines qui sont elles-mêmes plus riches que les tiges. Le dosage des sucres totaux dans les fractions S1 dans les épines ne montre aucune variation quelle que soit la condition de culture des plantules de sapin de Douglas (Figure 86).



**Figure 86:** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des fractions S1 dans les **(A)** racines, **(B)** tiges et **(C)** épines des plantules de sapin de Douglas de 2 mois cultivées sur les 3 substrats sélectionnés. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 dosages indépendants réalisés chacun sur les organes de 3 plantules. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs dans différentes conditions.

La quantité des sucres totaux dans les fractions S1 est significativement plus élevée (de 60 %) dans les racines des plantules cultivées sur sols forestiers (environ 250 mg.g<sup>-1</sup> MS) rapport à celles des plantules cultivées sur terreau commercial (environ 150 mg.g<sup>-1</sup> MS). Dans le cas des tiges, les sucres totaux dans S1 sont plus abondants (50 % plus élevés) 40 mg.g<sup>-1</sup> MS sur terreau commercial à environ 80 mg.g<sup>-1</sup> MS sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>.



**Figure 87:** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions polysaccharidiques dans les **(A)** racines, **(B)** tiges et **(C)** épines des plantules de sapin de Douglas de 2 mois cultivées sur les 3 substrats sélectionnés. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 dosages indépendants réalisés chacun sur les organes de 3 plantules. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs dans différentes conditions.

En ce qui concerne les polysaccharides pariétaux (Figure 87), de façon générale, les hémicelluloses (HC KOH et HC NaOH) apparaissent plus abondantes que les pectines indépendamment des conditions de culture pour les racines et les tiges. Dans les épines, les hémicelluloses sont quasiment du même ordre que les pectines hautement méthylestérifiées.

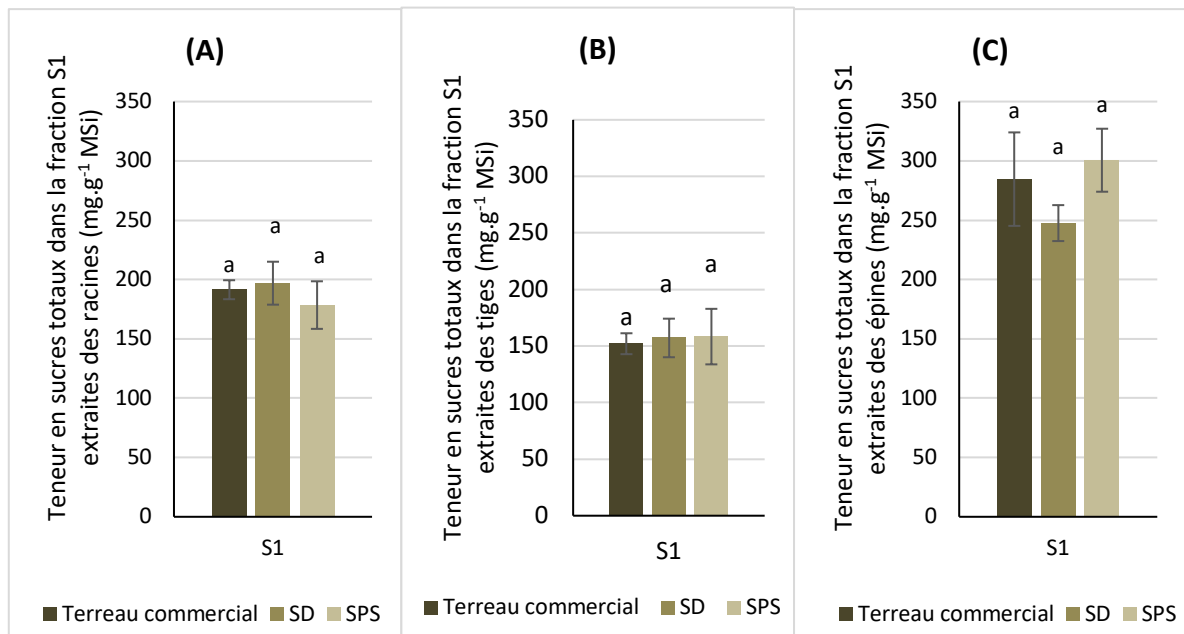
La culture sur sols forestiers semble induire une légère augmentation au niveau des PFM essentiellement dans les racines et les épines. En effet, les PFM augmentent significativement

d'environ 40 % (de 18 à 30 mg.g<sup>-1</sup> MS) dans les racines, et de 32 % (de 38 à environ 50 mg.g<sup>-1</sup> MS) en comparant les plantules cultivées sur terreau commercial à celles cultivées sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>.

Pour leur part, les teneurs en PHM ne montrent pas de différences significatives entre les différentes conditions de culture, elles sont de l'ordre de 20, 12 et 15 mg.g<sup>-1</sup> MS dans les racines, tiges et épines respectivement (même si une augmentation de la teneur en oses totaux de la fraction PHM est observée dans le cas des racines et des épines pour les sols forestiers comparés au substrat de type terreau, mais de façon non significative).

Les HC extraites à la soude ont tendance à être environ deux fois plus abondantes dans le cas des cultures sur sols forestiers dans les trois organes (de 60 à 100 mg.g<sup>-1</sup> MS dans les racines, de 9 à 20 mg.g<sup>-1</sup> MS dans les tiges, et de 27 à 50 mg.g<sup>-1</sup> MS dans les épines). Les HC extraites à la potasse restent inchangées dans les tiges et les épines, de l'ordre de 60 mg.g<sup>-1</sup> MS, et augmentent uniquement au niveau des racines en passant de 35 mg.g<sup>-1</sup> MS sur terreau commercial à 55 mg.g<sup>-1</sup> MS sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>.

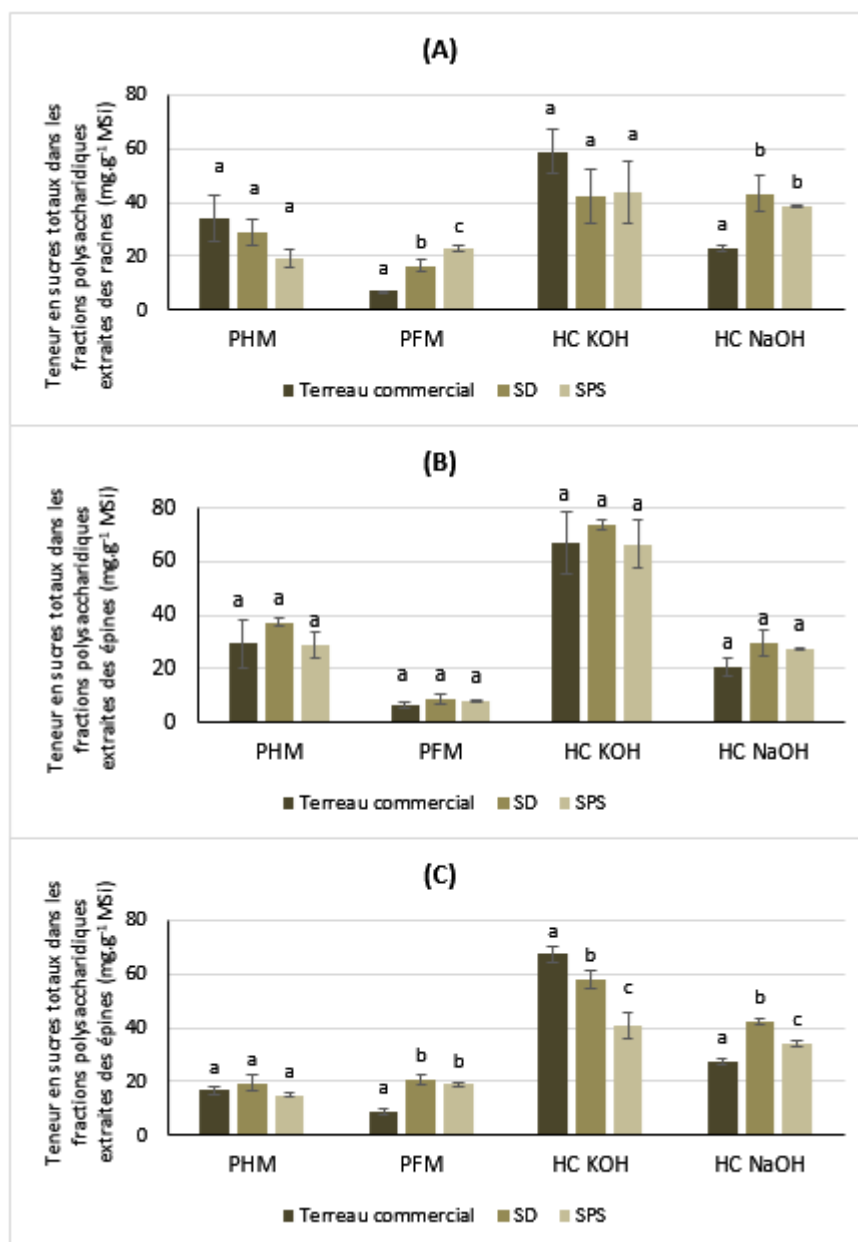
Dans le cas des jeunes arbres de sapin de Douglas cultivés sur terreau commercial, S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>, l'évaluation quantitative des fractions S1 est représentée dans la figure 88. Cette fraction reste aussi majoritaire essentiellement dans les racines et les épines des Arb11 quelle que soit la condition de culture. En comparant les trois organes, les épines sont l'organe le plus riche en oses totaux avec en moyenne 280 mg.g<sup>-1</sup> MS quel que soit la condition de culture.



**Figure 88:** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des fractions S1 dans les **(A)** racines, **(B)** tiges et **(C)** épines des jeunes arbres de sapin de Douglas cultivées sur les 3 substrats sélectionnés.

Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 dosages différents correspondant à 3 arbres analysés indépendamment. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs dans différentes conditions.

Ces teneurs en oses totaux dans la fraction S1 des racines et des tiges des Arb11 n'ont pas été modifiées en comparant les différentes conditions de culture. Elles sont de l'ordre de 180 mg.g<sup>-1</sup> MS dans les racines et de 150 mg.g<sup>-1</sup> MS dans les tiges.



**Figure 89:** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions polysaccharidiques dans les **(A)** racines, **(B)** tiges et **(C)** épines des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans cultivés pendant 11 mois sur les 3 substrats sélectionnés. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 dosages différents correspondant à 3 arbres analysés indépendamment. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs dans différentes conditions.

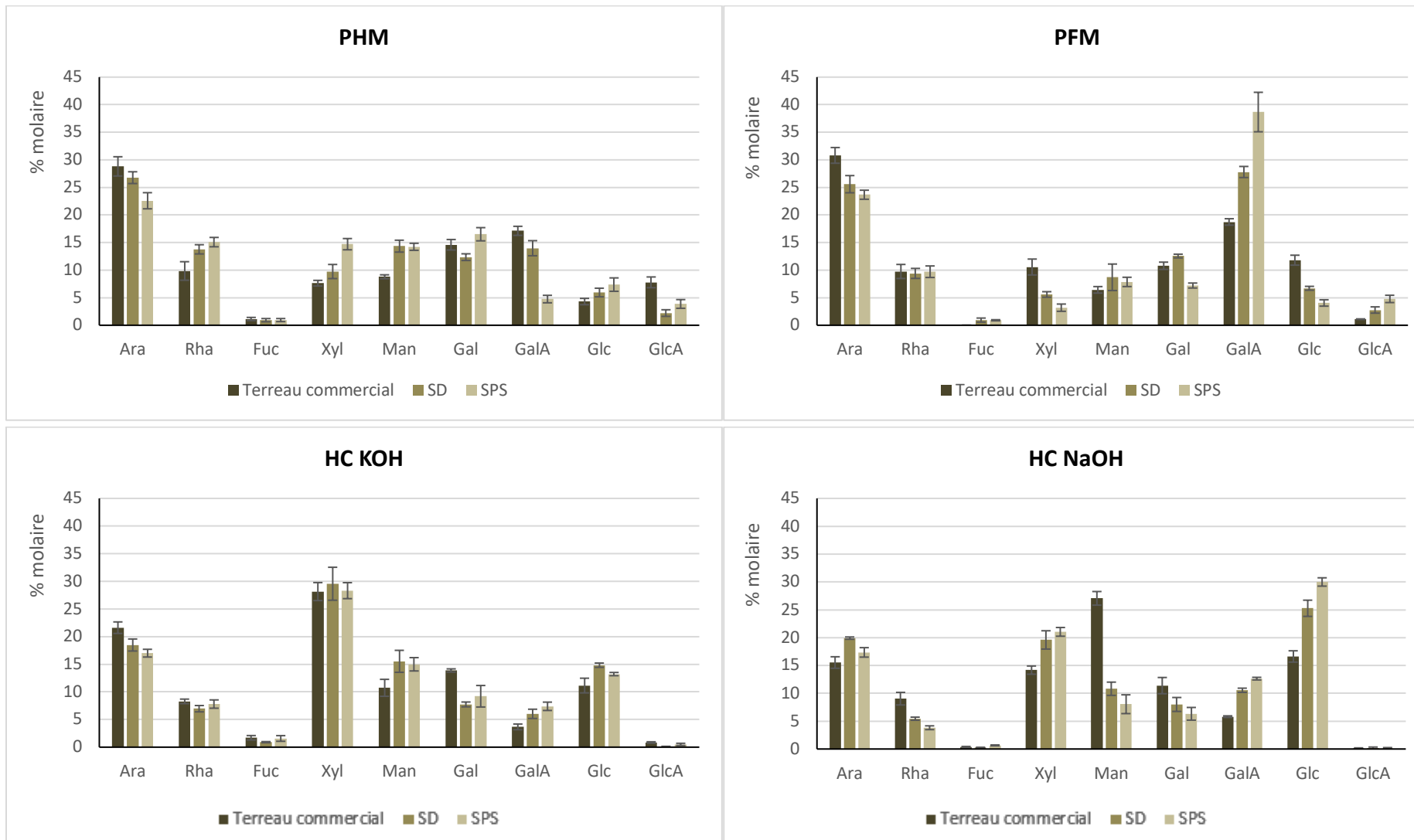
Chez les arbres (Arb11), les fractions des pectines hautement méthylestérifiées présentent des teneurs en sucres totaux stables indépendamment du substrat de culture essentiellement dans les tiges et les épines (30 et 20  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS respectivement). Dans les racines, une diminution a été observée, sans être statistiquement validée. Au niveau des racines, les teneurs en oses totaux dans les fractions PHM ont tendance à diminuer entre substrat de type terreau (30  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS) et sols forestiers (20  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS), cette diminution n'est toutefois pas statistiquement significative.

Cependant, les teneurs des sucres totaux dans les fractions pectines faiblement méthylestérifiées dans les racines et les épinettes des arbres cultivés sur sol de sapin de Douglas et de pin sylvestre ont doublé par rapport à la condition témoin. Les teneurs en sucres totaux des fractions hémicellulosiques extraites au KOH varient significativement uniquement dans les épinettes, elles sont 40% plus faibles dans les conditions de sols forestiers, contrairement aux hémicelluloses extraites au NaOH dans les racines et les épinettes, où les teneurs en sucres totaux sont 45 à 70 % plus importantes sur  $S_D$  et  $S_{PS}$ . Ces augmentations des teneurs en PFM et en HC NaOH sont presque similaires à celles observées chez les PI2 (Figure 89).

### **III.2.2.3.2. Analyse qualitative**

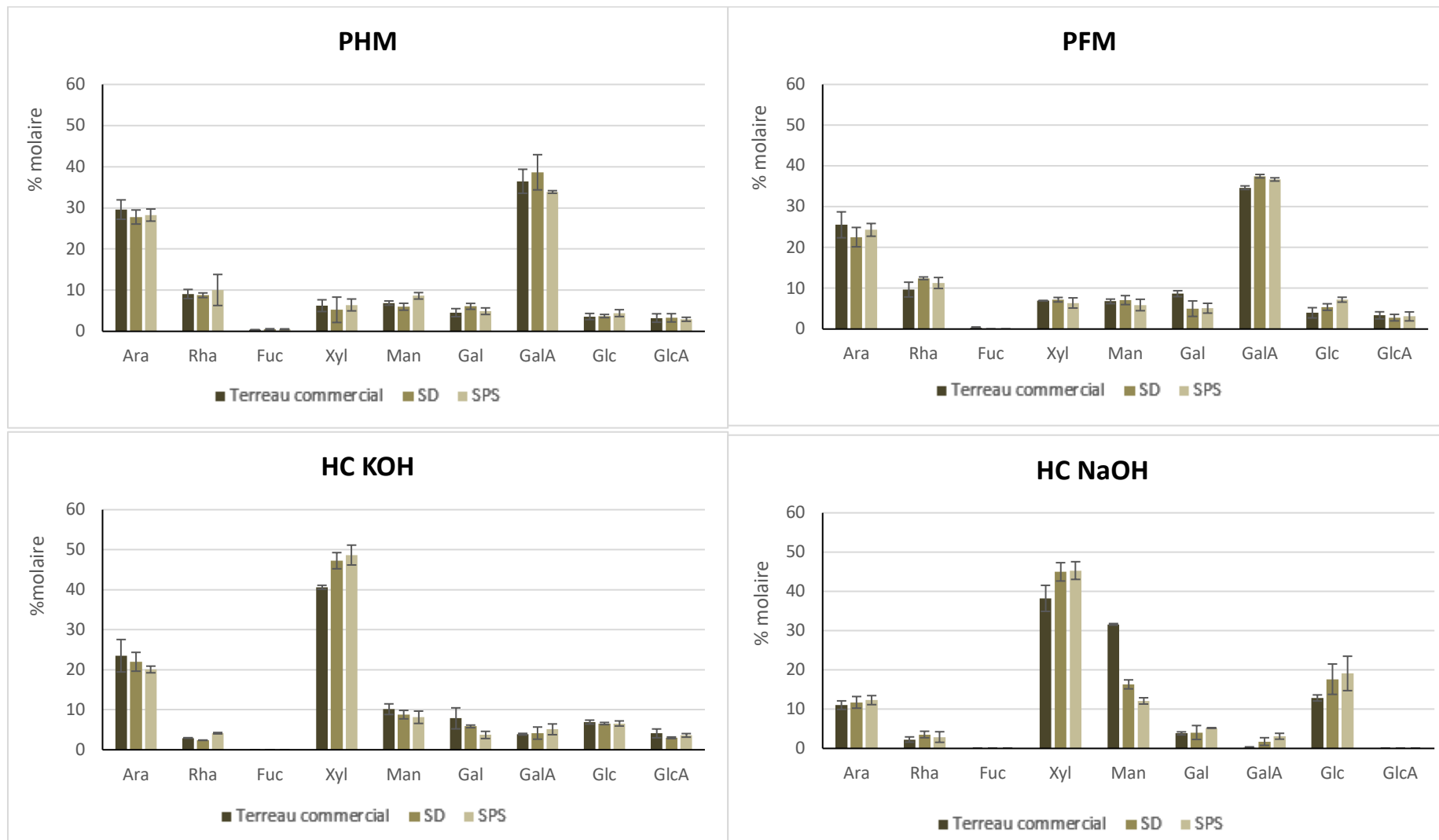
#### **III.2.2.3.2.1. Détermination de la composition monosaccharidique**

Afin de déterminer la composition monosaccharidique des différentes fractions polysaccharidiques, des analyses ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse pour les plantes PI2 (figures 90, 91 et 92) et les Arb11 (Figures 93, 94 et 95).

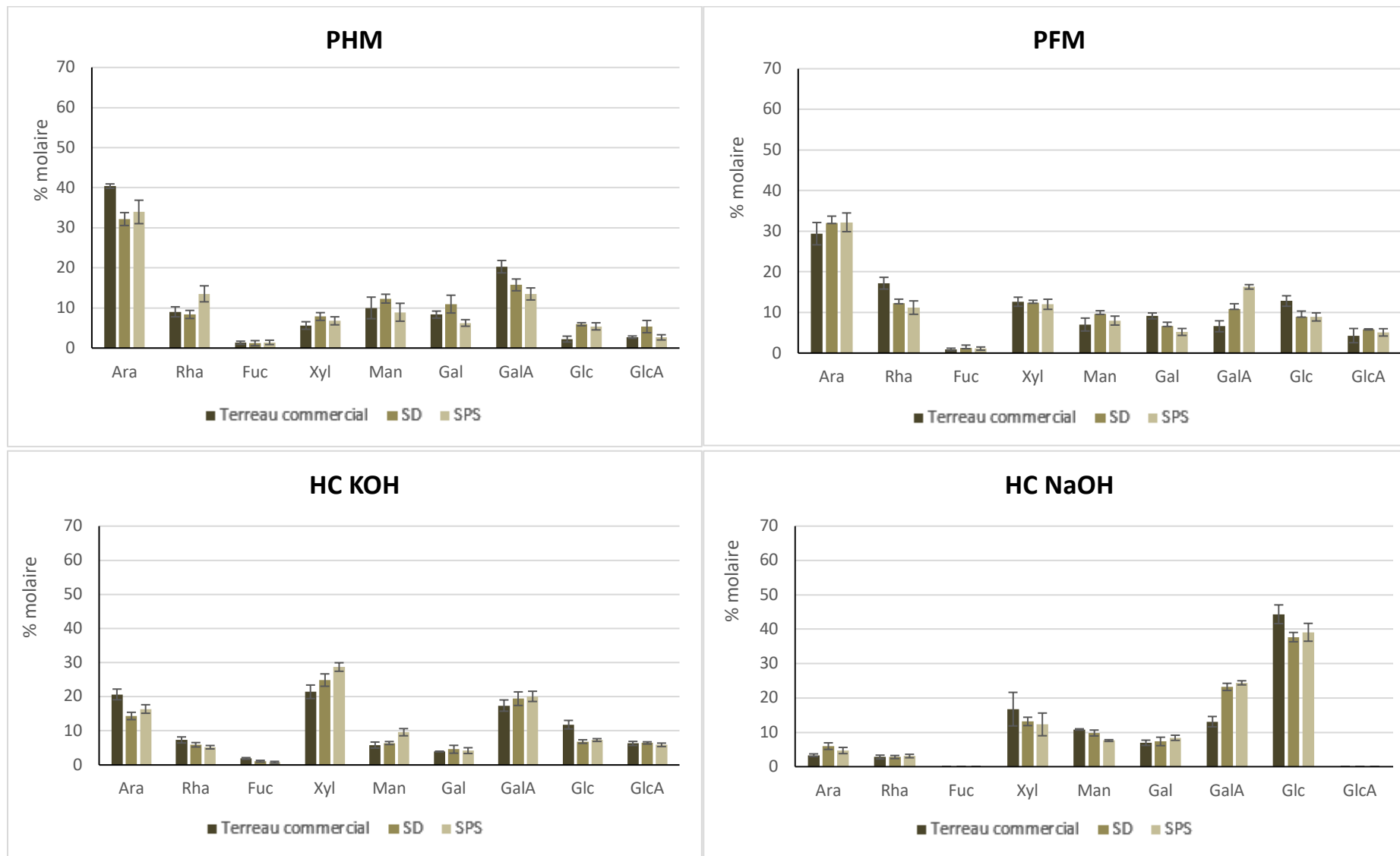


**Figure 90:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites **des racines** des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction des conditions des substrats de culture. Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction. Les écarts types sont calculés à partir de deux extractions indépendantes en CPG.





**Figure 91:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites **des tiges** des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction des conditions des substrats de culture. Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction. Les écarts types sont calculés à partir de deux extractions indépendantes en CPG



**Figure 92:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites **des épinés** des plantules de sapin de Douglas de 2 mois en fonction des conditions des substrats de culture. Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction. Les écarts types sont calculés à partir de deux extractions indépendantes en CPG

Les résultats de l'analyse par CPG témoignent d'une homogénéité de la composition en monosaccharides représentatifs des glucides de chaque fraction dans les trois organes, racines, tiges et épines.

L'analyse des fractions pectiques PHM et PFM, révèle des taux élevés et majoritaires d'acide galacturonique (> 20%), qui traduit la présence d'homogalacturonanes. Les pectines les plus riches en acide galacturonique étant celles des parois cellulaires des tiges (entre 40 et 70 %). Le rhamnose (Rha) est présent avec des taux inférieurs à 15%, traduisant aussi la présence des rhamnoglacturonanes éventuellement substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et d'arabinogalactanes. Par rapport à la condition témoin, il est possible de remarquer dans les conditions de culture sur sols forestiers que la proportion d'acide galacturonique (GalA) des PHM est moins importante (de 20 à environ 8% dans les racines et les épines et de 50 à 35% dans les tiges) pour des teneurs en rhamnose constantes. Les structures pectiques semblent être davantage ramifiées notamment sur S<sub>PS</sub> puisque des rapports GalA/Rha plus faibles y sont caractérisés (Tableau 12) .

**Tableau 12:** Le rapport GalA/Rha dans les fractions pectiques des PI2

Fraction	Organe	Rapport GalA/Rha		
		Terreau commercial	S <sub>D</sub>	S <sub>PS</sub>
PHM	Racines	1,74	1,01	0,31
	Tige	4,01	4,40	3,36
	Epines	2,24	1,87	0,99
PFM	Racines	1,92	2,95	3,98
	Tige	3,58	3,01	3,24
	Epines	0,38	0,88	1,45

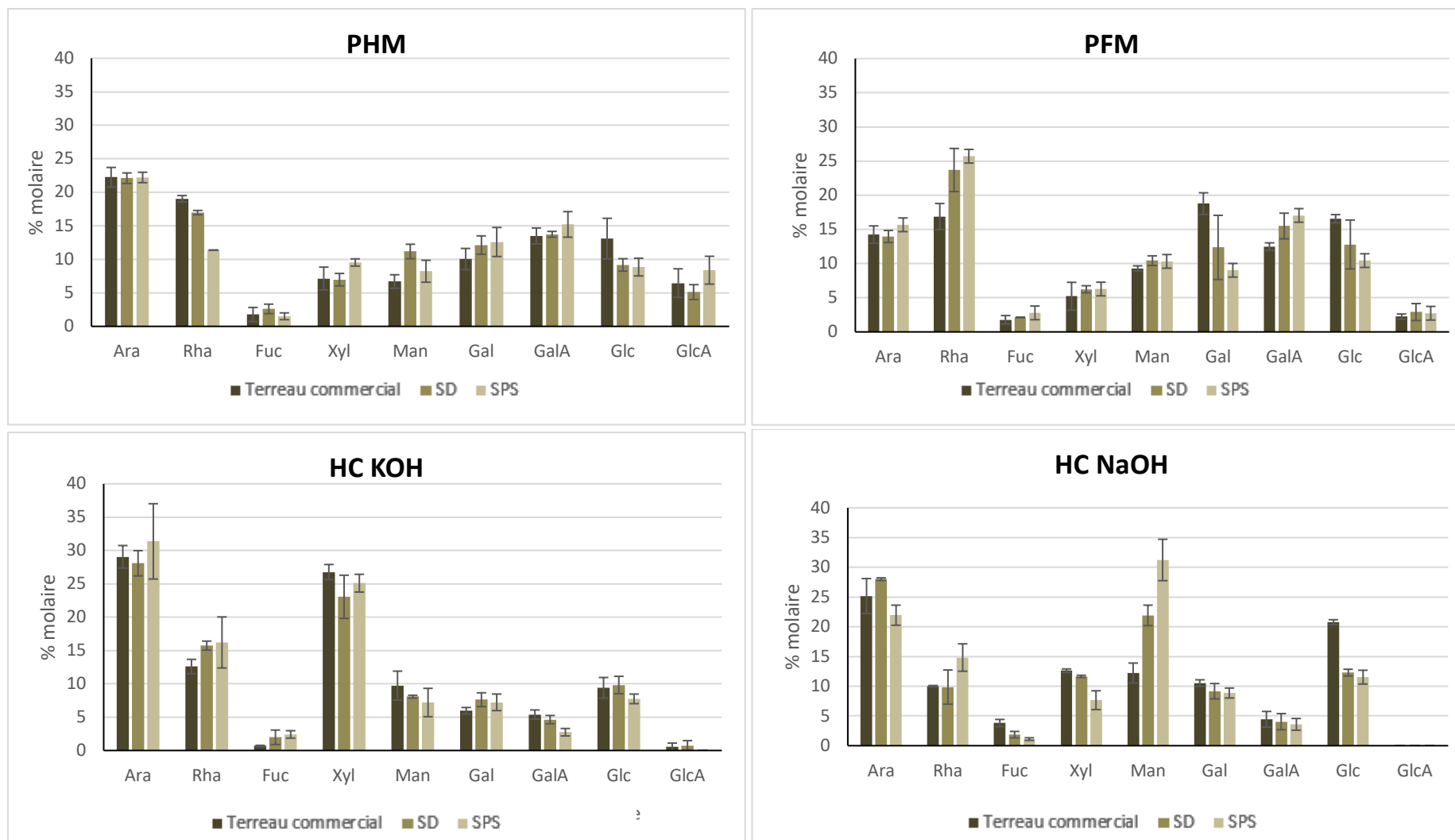
Par ailleurs, les PFM présentent des taux de GalA significativement plus importants après exposition aux sols forestiers indépendamment de l'organe étudié. Dans les racines, le taux de GalA passe de 18 % sur terreau commercial, à 28 % sur S<sub>D</sub>, à 38 % sur S<sub>PS</sub>. Dans les épines, ce taux a quasiment doublé (de 6 à 11 %) sur S<sub>D</sub> et triplé sur S<sub>PS</sub> (de 6 à 17 %).

La fraction hémicellulosique extraite à la potasse présentent comme monosaccharides majoritaires Ara et Xyl, qui, avec les traces d'acide glucuronique identifiés, suggèrent l'extraction d'arabinoglucuronoxylanes par le KOH. Par ailleurs, les hémicelluloses extraites à la soude présentent des teneurs plus importantes en mannose, glucose, et galactose, indiquant l'extraction de glucogalactomannanes. Winandy et Morrell (1993) ont précisé que ces deux catégories d'hémicelluloses sont caractéristiques de la paroi cellulaire du sapin de Douglas. Des résultats similaires ont été aussi obtenus par Astier et ses collaborateurs (2014). Cependant, ces extractions ne sont pas tout à fait sélectives d'une classe particulière d'hémicelluloses, vu l'obtention d'autres monosaccharides avec des proportions non négligeables dans chaque extrait.

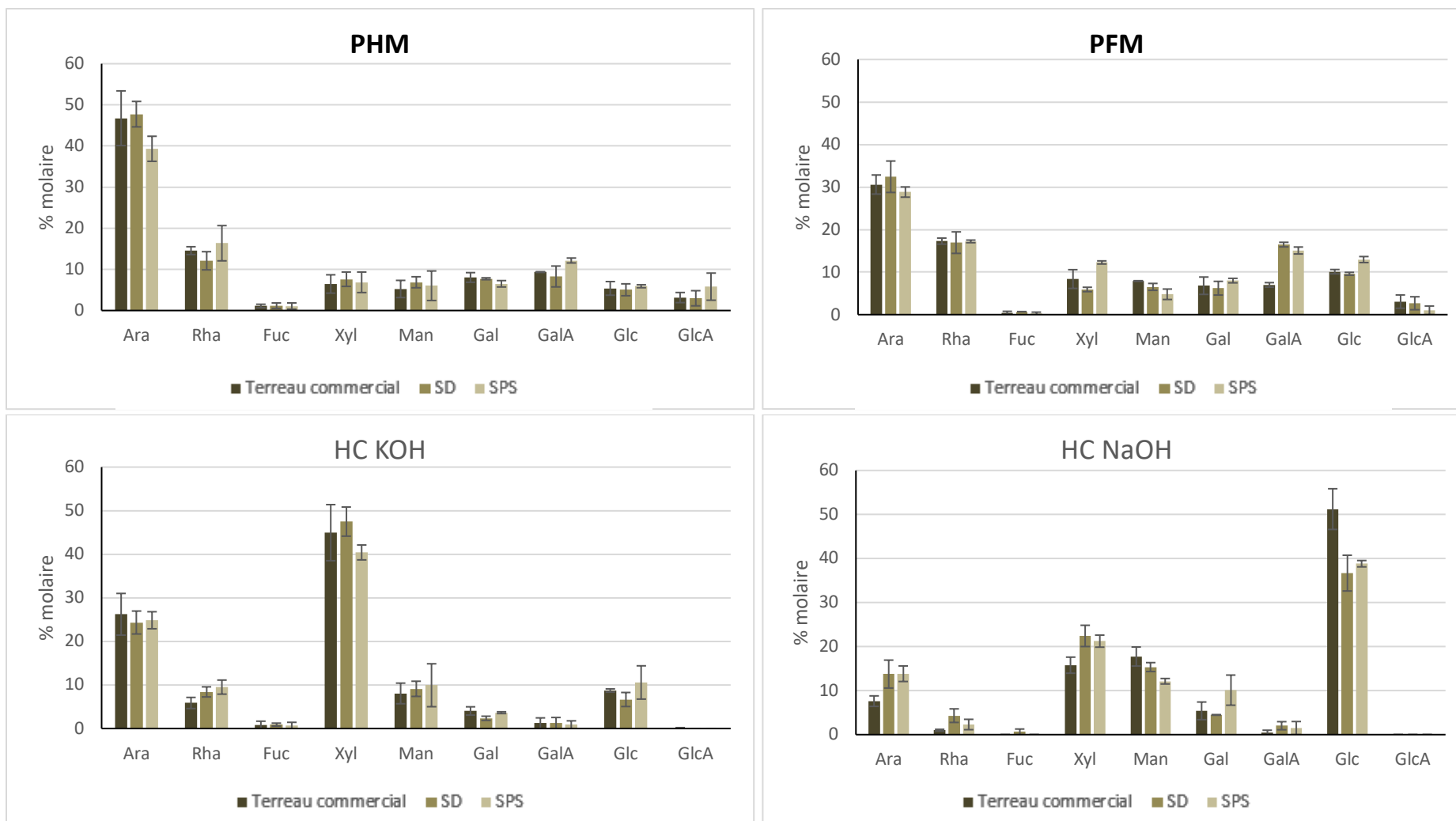
La composition monosaccharidique des HC KOH a été comparée entre d'une part le terreau commercial (référence) et d'autre part les sols forestiers : les variations concernent essentiellement l'Ara, dont le taux diminue légèrement dans les racines et les épines. Dans les tiges, l'Ara a aussi tendance à diminuer, mais cette diminution n'est pas statistiquement

confirmée. Le taux en Xyl est stable dans les racines (autour de 30 %) et a tendance à augmenter dans les tiges et les épinés (de 40 à 50 % et de 20 à 25 % respectivement).

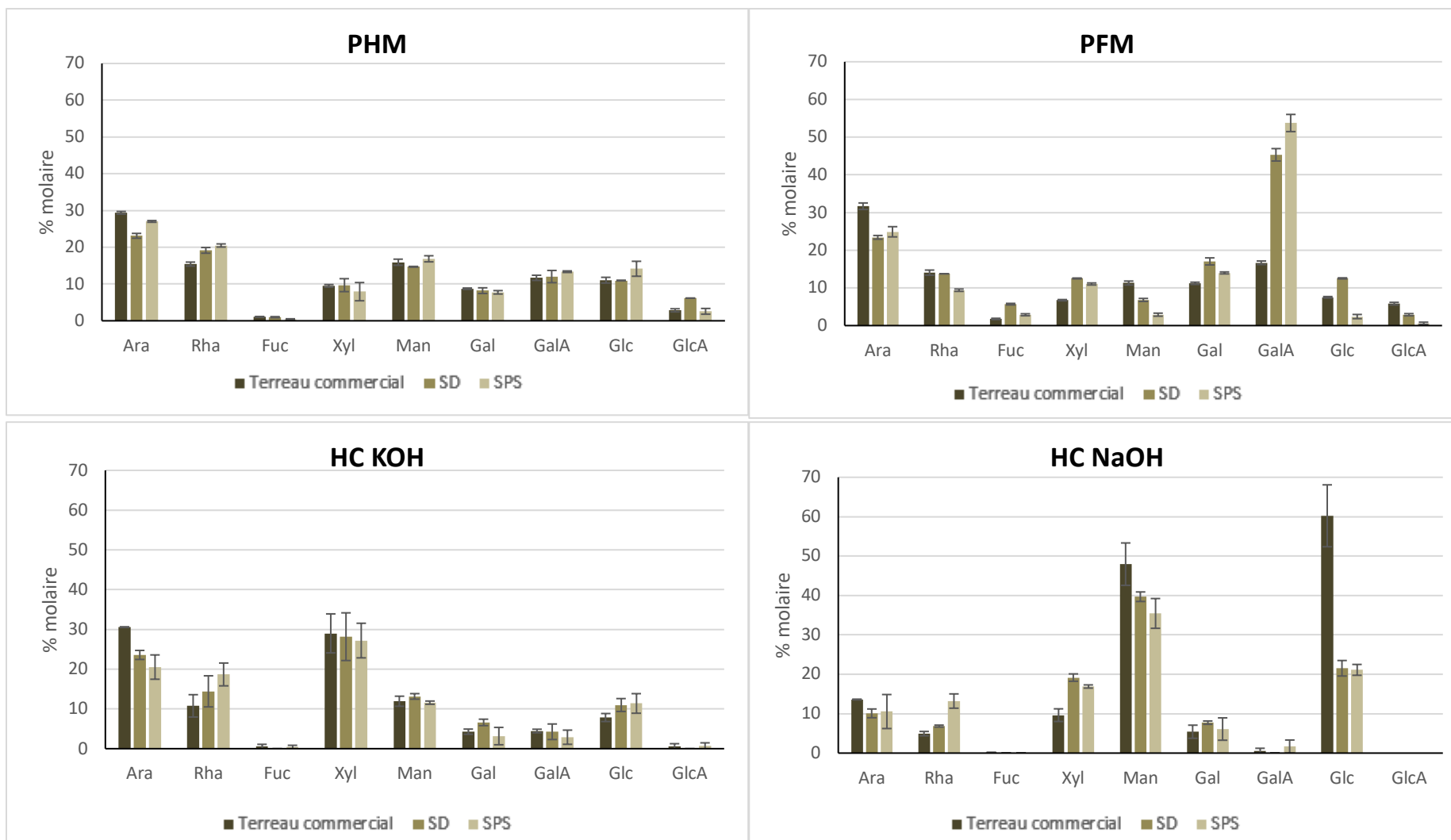
Dans le cas des HC NaOH, l'augmentation du taux de GalA est remarquable dans les trois organes en comparant les plantules cultivées sur terreau commercial à celles cultivées sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>. Cependant, le taux de mannose est deux fois moins important dans les racines et les tiges des plantules cultivées sur sols forestiers que sur terreau commercial. Une légère diminution du taux de mannose est aussi observée dans les épinés uniquement sur S<sub>PS</sub> (7 %) par rapport à la condition terreau (11 %).



**Figure 93:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites **des racines** des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans en fonction des conditions des substrats de culture. Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction. Les écarts types sont calculés à partir de deux extractions indépendantes en CPG.



**Figure 94:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites **des tiges** des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans en fonction des conditions des substrats de culture. Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction. Les écarts types sont calculés à partir de deux extractions indépendantes en CPG.



**Figure 95:** Composition monosaccharidique exprimée en pourcentage molaire des fractions PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH extraites **des épinés** des jeunes arbres de sapin de Douglas âgés de 4 ans en fonction des conditions des substrats de culture. Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction. Les écarts types sont calculés à partir de deux extractions indépendantes en CPG.

Comme dans le cas des PI2, chez les jeunes arbres de sapin de Douglas, l'exposition à des sols forestiers acides riches en Al pendant 11 mois induit une augmentation significative de la teneur en GalA dans la fraction PFM et ceci quel que soit l'organe considéré. Dans les racines, le taux de GalA passe de 12 à 16 % sur sols forestiers, de 7 à 17 % dans les tiges, et de 16 à environ 50 % dans les épines.

Cependant, les taux de GalA restent inchangés dans la fraction pectique PHM et le rapport GalA/Rha est plutôt stable les tiges et les épines des Arb11 cultivés sur sols forestiers et n'augmente que légèrement dans les racines des Arb11 cultivées sur S<sub>PS</sub> (Tableau 12).

**Tableau 13:** Le rapport GalA/Rha dans les fractions pectiques des Arb11

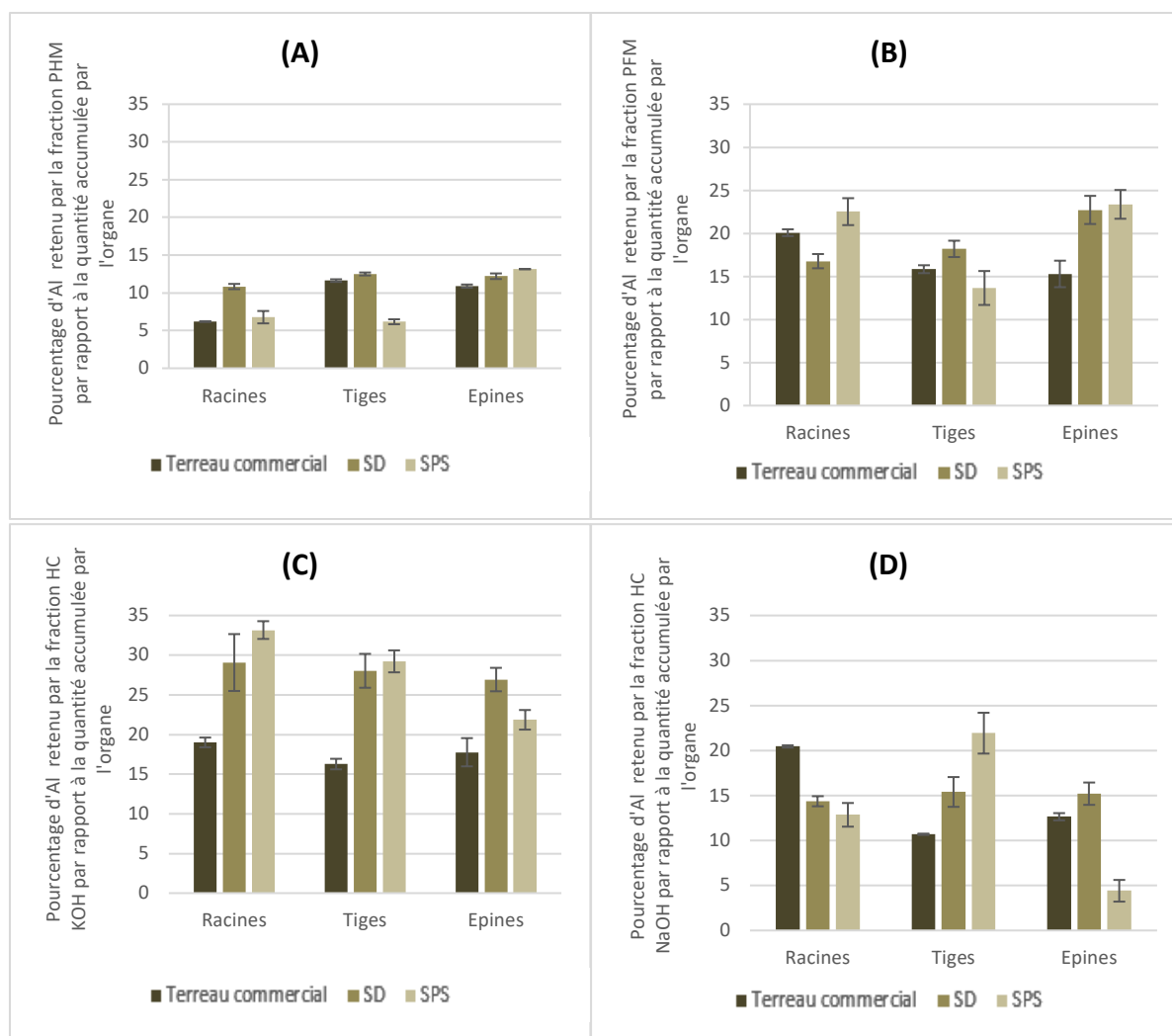
Fraction	Organe	Rapport GalA/Rha		
		Terreau commercial	S <sub>D</sub>	S <sub>PS</sub>
PHM	Racines	0,70	0,80	1,33
	Tige	0,64	0,68	0,74
	Epines	0,75	0,62	0,65
PFM	Racines	0,73	0,65	0,66
	Tige	0,40	0,97	0,87
	Epines	1,18	3,29	5,72

Les extraits obtenus par la potasse, et la soude sont, comme il a déjà été observé dans le cas des plantules âgées de 2 mois, essentiellement des arabinoglucuronoxylanes et des glucogalactomannanes respectivement. De façon similaire dans les trois organes des jeunes arbres, le taux de Rha a tendance à augmenter dans les fractions HC KOH, cette augmentation n'est toutefois pas statistiquement confirmée, contrairement à l'augmentation des taux de Rha observée dans les fractions HC NaOH essentiellement en comparant les arbres cultivés sur terreau commercial à celles cultivées sur S<sub>PS</sub>. Il est à noter aussi que dans la fraction HC NaOH, le taux de Man augmente considérablement de 13 % sur terreau à 23 % sur S<sub>D</sub> et à 30 % sur S<sub>PS</sub> dans les racines des arbres de sapin de Douglas contrairement aux cas des tiges et des épines. Le Glc dans les fractions HC NaOH diminue considérablement quel que soit l'organe de l'arbre, en comparant la culture sur terreau commercial et celle sur sols forestiers.

### III.2.2.3.2.2. Evaluation de la rétention de l'Aluminium par les différentes fractions de la paroi cellulaire

Une des hypothèses de cette étude est que l'Al puisse être retenu au niveau des parois cellulaires afin de limiter sa pénétration dans la cellule. Ce piégeage pariétal pourrait alors constituer une réponse de défense de la plante. Pour apporter des arguments en faveur de cette hypothèse, l'Al a été dosé dans les fractions extraites de polysaccharides de paroi (Figure 96).





**Figure 96:** Proportion d'Al retenu par les différentes fractions polysaccharidiques exprimée en % par rapport à la quantité d'Al présent dans chaque organe (racines, tiges ou épines) des plantules de sapin de Douglas de 2 mois. **(A)** Fraction PHM ; **(B)** Fraction PFM ; **(C)** Fraction HC KOH ; **(D)** Fraction HC NaOH. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 2 expériences indépendantes.

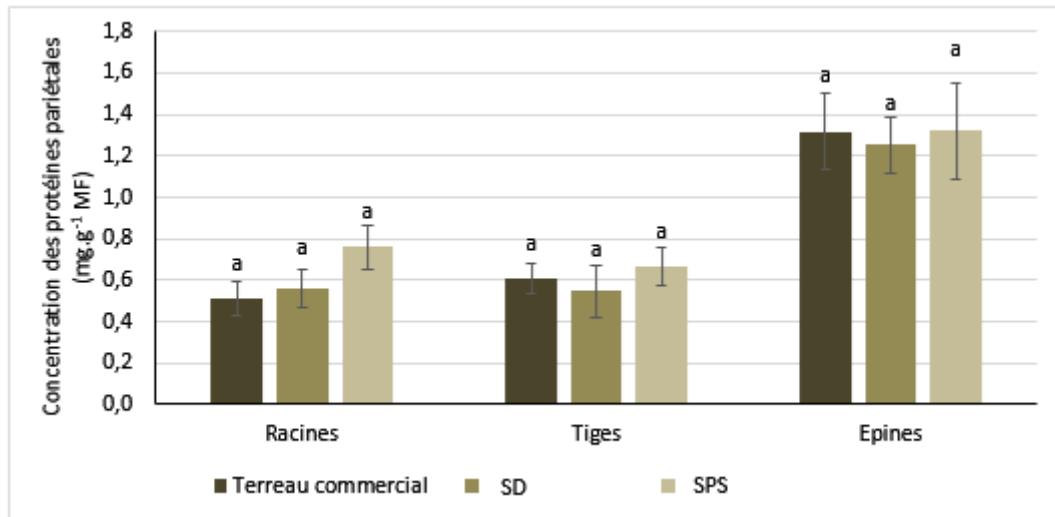
En comparant les différentes fractions de paroi, on remarque que ce sont les hémicelluloses extraites par KOH qui fixent le plus d'Al dans les racines, les tiges et les épines des plantules exposées aux sols forestiers avec plus de 25 % de l'Al accumulé par ces organes. Dans les racines, environ 30 % de l'Al dosé pour les plantules de sapin de Douglas cultivées sur les sols forestiers, ont été fixés dans la fraction KOH, suivi de la fraction PFM avec 17 à 22 % et des HC NaOH avec environ 13 %, contre moins de 10 % dans la fraction PHM. Ces tendances sont aussi observées dans les tiges et les épines.

### III.2.2.4. Evaluation de l'activité Pectine Méthyl Estérase

La pectine méthylestérase (PME) est une enzyme importante susceptible de faire évoluer la structure des pectines et d'en modifier les propriétés au sein de la paroi. En catalysant la déméthylestérification des acides galacturoniques des domaines pectiques riches en homogalacturonanes, elle régénère des fonctions acides carboxyliques libres. Un cation,

comme l'Al<sup>3+</sup> pourraient donc interagir avec les acides carboxyliques libres et ceci serait l'une des stratégies de résistance des plantes aux stress aluminiques par piégeage du métal à la paroi cellulaire. Cette activité a été donc étudiée dans les plantules cultivées sous serre car cette enzyme est impliquée dans le remodelage pariétal et peut donc réguler la capacité de la paroi à piéger l'Al.

Dans un premier temps, il a été nécessaire d'extraire les protéines pariétales, leurs quantités sont présentées dans la figure 97.

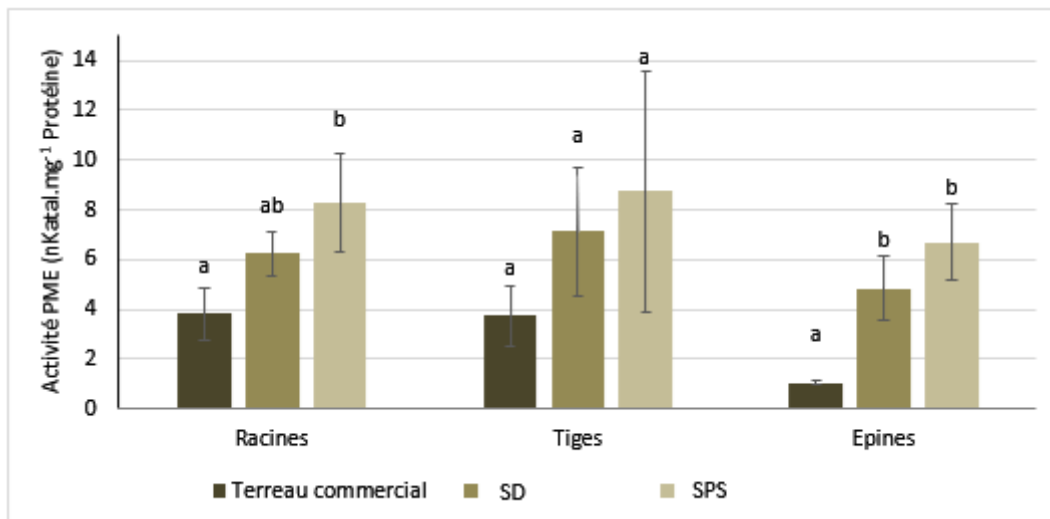


**Figure 97:** Moyenne des teneurs en protéines totales pariétales dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas de 2 mois exprimées en mg.g<sup>-1</sup> MF en fonction du substrat de culture.

Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 6 expériences indépendantes réalisées chacune sur une masse fraîche équivalente aux organes de 3 plantules. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition pour le même organe ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.  $n=6$  (moyenne +/- EC)

Ces résultats ont montré que la quantité des protéines pariétales totales est plus importante (environ 2 fois plus) dans les épines des plantules de sapin de Douglas de 2 mois par rapport aux racines et tiges quelle que soit la condition de culture. Les protéines pariétales totales dans les racines ont des quantités équivalentes au niveau des tiges. L'exposition des plantules à des sols forestiers acides et riches en Al comme le S<sub>D</sub> et le S<sub>PS</sub> n'a pas modifié les teneurs en protéines pariétales dans les différents organes des PI2.

Les fractions protéiques pariétales ont été utilisées pour doser l'activité PME (figure 98).



**Figure 98:** Evolution de l'activité PME chez les plantules de sapin de Douglas sous serre en fonction des conditions des sols. Activité spécifique exprimée en nKatal.mg<sup>-1</sup> Protéine. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne et l'écart-type de 6 expériences indépendantes réalisées chacune sur une masse fraîche équivalente aux organes de 3 plantules. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition dans le même organe ( $p < 0,05$ ), Test ANOVA.n=6 (moyenne +/- EC)

L'activité PME a tendance dans tous les organes à être plus importante dans les plantules cultivées sur sols forestiers comparé à celles cultivées sur terreau. Cette forte activité est davantage marquée dans le cas des épines où elle a été significativement multipliée par 5 environ. Dans les racines, cette activité a également augmenté mais seules les plantules cultivées sur sol de plantation de pin sylvestre présentent une activité PME significativement plus importante que celles cultivées sur terreau. Concernant les tiges, et bien que non significative, la même tendance est observée.

### III.2.3. Bilan

- Les sols forestiers prélevés sur lesquels des arbres de résineux sont plantés depuis plusieurs années semblent être plus acides et plus riches en Al potentiellement relargable dans la solution du sol que les sols de culture d'autres types de végétations (feuillus, herbacées...). De plus, ces sols se montrent pauvres en éléments minéraux nécessaires à la croissance des plantes. Ces différences ont été observées malgré la proximité des différentes parcelles des différents types de plantations.
- Les PI2 et les Arb11 cultivés pendant 2 et 11 mois respectivement sur les deux sols naturels les plus acides et les plus riches en Al (S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>) présentent quasiment les mêmes symptômes de toxicité observés chez les plantules *in vitro* exposées à des concentrations élevées en AlCl<sub>3</sub>, à savoir une inhibition du développement du système racinaire et de la partie aérienne, une diminution de la biomasse, une altération de l'aspect de la pointe racinaire et de son organisation cellulaire
- La majorité de l'Al absorbé par les PI2 a été accumulé au niveau des racines et plus précisément dans les parois cellulaires des tissus racinaires.

- Une perturbation de la nutrition minérale des PI2 a été mise en évidence vu les teneurs en éléments minéraux essentiels plus faibles dans les organes des plantules cultivées sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub> par rapport aux plantules témoins.
- En réponse à l'exposition des PI2 et des Arb11 à des sols acides riches en Al, une augmentation de la proportion des PFM et des HC a été souvent observée. L'analyse monosaccharidique des fractions PFM a permis de repérer une diminution du rapport GalA/Rha, et donc une augmentation de la proportion des homogalacturonanes quand les plantes de sapin de Douglas sont cultivées sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub>. Il est toutefois moins évident de corréliser les variations des proportions des fractions HC KOH et HC NaOH et de leurs monosaccharides dans le cas des PI2 et Arb11 en fonction de la quantité d'Al dans les sols.
- L'activité PME est significativement plus importante dans les racines et les épines des PI2 cultivées pendant 2 mois sur S<sub>D</sub> et S<sub>PS</sub> par rapport à celle dosée chez les plantules cultivées sur terreau commercial.

## Chapitre IV. Discussion

---

### IV.1. Seuil de tolérance du sapin de Douglas à l'aluminium et symptômes de toxicité

L'aluminium, à cause de sa forte mobilité dans des conditions de sol acide, devient facilement biodisponible pour les plantes et donc rapidement toxique. Cependant, la complexité de ce milieu rend difficile l'étude des échanges sol-racines. C'est pourquoi, dans un premier temps, une approche de culture *in vitro* a été mise en place en cultivant des plantules obtenues à partir d'embryons somatiques de sapin de Douglas. Ce type de modèle d'étude présente l'avantage majeur, en plus du contrôle de la variabilité génétique du matériel biologique pour évaluer le réel impact de l'aluminium, de pouvoir constituer une gamme de concentrations croissantes d'Al dans le milieu de culture, pour définir les concentrations d'Al engendrant les premiers signes de toxicité chez la plante étudiée.

#### IV.1.1. Inhibition de la croissance et du développement des plantules et des jeunes arbres de sapin de Douglas

Au cours de cette étude, quel soit le type de culture de sapin de Douglas utilisé - *in vitro*, plantule ou jeune arbre sur sol forestier, les résultats ont montré de façon générale que l'exposition du sapin de Douglas à l'Al inhibe sa croissance, aussi bien au niveau des parties racinaires que des parties aériennes.

Pour le modèle *in vitro*, grâce à l'établissement d'une gamme croissante de concentration d'AlCl<sub>3</sub> dans le milieu de culture, il a été possible de définir la concentration en Al à partir de laquelle des symptômes de retard de croissance sont observés. Ainsi, pour des concentrations inférieures à 200 µM, les plantules présentent une croissance équivalente à celle du témoin, ceci pour une durée d'exposition de 8 semaines. Cependant, à partir de 500 µM, une réduction de 24 % de la longueur des racines et une perturbation du développement de la partie aérienne apparaissent (Figure 48) accompagnées d'une diminution de la biomasse des racines (-30 %), tiges (-50 %) (Figure 50). Le seuil de tolérance, dans les conditions de cette étude, peut donc être défini à une concentration d'AlCl<sub>3</sub> de 500 µM (Amara *et al.*, 2020). A 1 mM AlCl<sub>3</sub>, une augmentation de la masse sèche des trois organes est observée et pourrait être expliquée en partie par l'augmentation de la biomasse pariétale en réponse à l'exposition à des concentrations élevées en AlCl<sub>3</sub> notamment au niveau des épines. L'augmentation de la masse sèches pourrait être aussi liée à l'augmentation du nombre des plantules présentant des symptômes d'hyperhydricité. En effet, selon (Franck *et al.*, 2004), les plantules de Merisier (*Prunus avium*) ayant montré des symptômes d'hyperhydricité produisent des quantités plus élevées en substances considérées comme des marqueurs de stress (comme les polyamines et la proline), ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de leurs masses sèches.

La comparaison de ce résultat avec ceux de la littérature montre que ce seuil est équivalent à celui déterminé pour certains résineux comme *Pinus thunbergii* qui présente, après 18 jours d'exposition à une concentration d'Al dans le milieu de 500 µM une réduction significative de l'élongation des racines (Hirano *et al.*, 2012). Une inhibition de l'élongation racinaire de 40 % a été aussi décrite chez *Picea rubens* lorsque ces plantules sont exposées à 500 µM AlCl<sub>3</sub> pendant 5 semaines. Une diminution de la masse sèche de la partie aérienne de 26 % est aussi observée et celle du système racinaire est d'environ 50 % (Thornton *et al.*, 1987). Concernant *Cryptomeria japonica*, la masse sèche racinaire des plantules exposées à une concentration de 2,5 mM en AlCl<sub>3</sub> pendant 4 semaines est restée inchangée par rapport à la condition témoin mais celle de la partie aérienne diminue significativement (Tomioka et

Takenaka, 2004). Pour cette espèce en particulier, le seuil de tolérance serait donc plus élevé. Cependant, chez d'autres résineux, comme l'Epicéa, un traitement à 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  pendant 7 jours suffit pour induire une réduction de l'élongation racinaire de 60 % (Ryder *et al.*, 2003).

Selon une étude de Keltjens et Loenen (1989) sur 5 espèces de jeunes arbres cultivés en hydroponie (résineux et feuillus âgés d'un an), pour une gamme de concentrations d'Al équivalentes à celles retrouvées dans les solutions de sol de forêts acides de 5 à 30  $\text{mg.L}^{-1}$  (Breemen et Visser, 1988), le sapin de Douglas a présenté une réduction de la croissance racinaire à partir d'une concentration de 10  $\text{mg Al.L}^{-1}$  (équivalent à 360  $\mu\text{M}$  Al). A partir de cette concentration, la viabilité des jeunes arbres est affectée tout comme celle du Mélèze. Pour les autres espèces (bouleau, chêne, et pin sylvestre), l'Al n'a pas affecté la viabilité des arbres (Keltjens et Loenen, 1989). Une autre étude menée sur de jeunes arbres de sapin de Douglas âgés d'un an qui ont été aussi soumis à une gamme de 4, 8, 16 et 32  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$  (Keltjens, 1990). Suite à une exposition à une concentration en Al de 8  $\text{mg.L}^{-1}$  (équivalent 228  $\mu\text{M}$  Al) pendant 9 mois, une réduction significative de 30% de la masse sèche de la partie aérienne et des racines des jeunes arbres de sapin de Douglas a été observée.

Dans la littérature, il a été décrit que l'Al est toxique pour de nombreuses plantes (Kochian *et al.*, 2005) et qu'à des concentrations de 10 à 50  $\mu\text{M}$ , il est capable de limiter la croissance des racines même après un temps d'exposition de quelques minutes à quelques heures dans la plupart des espèces étudiées. Par exemple, si on considère des plantes herbacées, les seuils de tolérance à l'Al apparaissent relativement faibles : pour le tabac 25  $\mu\text{M}$  (Kariya *et al.*, 2013), le soja 30  $\mu\text{M}$  (Kopittke *et al.*, 2008) ou *Arabidopsis thaliana* 50  $\mu\text{M}$  (J. L. Yang *et al.*, 2011). En revanche, il a été signalé que pour avoir le même effet sur des espèces d'arbres, des concentrations plus élevées sont nécessaires. Dans le cas de résineux comme la Pruche de l'ouest (*Tsuga heterophylla*) par exemple, une inhibition de l'élongation racinaire de 17 % a été observée au bout de 98 jours d'exposition à 3  $\text{mM}$   $\text{AlCl}_3$  pour un système de culture en hydroponie (Ryan *et al.*, 1986). Par conséquent, les espèces d'arbres sont considérées plus tolérantes que les d'autres espèces d'herbacés vis-à-vis de l'Al étant plus adaptés à mettre en place les mécanismes de résistance à l'Al nécessaires.

Ainsi, si les données recueillies au cours de ce travail sur un modèle *in vitro* sont comparées à des données de la littérature correspondant à des cultures en hydroponie, il s'avère que les plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* développent une résistance relativement élevée au stress aluminique, équivalente à celle d'autres résineux.

Sous serre, les deux modèles d'études choisis ont permis d'observer l'effet de l'Al sur le sapin de Douglas à différents stades de croissance de la plante (germination et jeunes arbres) en utilisant des substrats de culture constitués par du terreau ou des sols forestiers prélevés sur une plantation de conifères (réputés acides et riches en Al phytodisponible. Prélevés sur une plantation de sapin de Douglas ( $S_D$ ) ou sur une plantation de sapin de Pin sylvestre ( $S_{PS}$ ), ces sols présentent des teneurs en Al phytodisponible de 0,864  $\text{mg Al.g}^{-1}$  et 1,24  $\text{mg Al.g}^{-1}$  avec des pH de 5,31 et 4,73 respectivement. Les jeunes arbres de sapin de Douglas de 4 ans (Arb11) et les plantules issues de la germination des graines de sapin de Douglas (PI2), malgré les courtes durées d'exposition (11 mois et 2 mois respectivement), présentent une croissance plus faible par rapport à ceux cultivés sur terreau ou substrat (mélange tourbe/écorces broyées). La masse sèche des racines, tiges et épines des PI2 est plus faible sur sols forestiers que sur terreau commercial (de 40 %, 23 % et 30 % respectivement) (Figure 78 B) ; Il en est de même pour les Arb11 (d'environ 50 % dans les trois organes) (Figure 79 C).

Des modifications morphologiques visibles au niveau du système racinaire et de la partie aérienne ont été observées après leur récolte. Pour les PI2, un système racinaire et une partie aérienne visiblement moins développés ont été observés essentiellement sur  $S_{PS}$ , accompagnés d'une masse sèche significativement plus faible d'environ 40 % dans les racines, 20 % dans les tiges, et jusqu'à 70 % dans les épines chez les plantules exposées aux  $S_D$  et  $S_{PS}$  comparées aux PI2 cultivées sur terreau. Une même tendance est observée pour les Arb11, les trois organes présentent une masse sèche d'environ 50 % plus faible quand cultivés sur  $S_D$  et  $S_{PS}$  par rapport aux Arb11 sur terreau commercial.

Des travaux portant sur l'effet de l'Al sur les paramètres biométriques et la masse sèche des jeunes plantes de conifères cultivés sur sols naturels sont peu nombreux. Selon Dahlgren et al 1991, les dommages causés par l'Al dans les tissus racinaires sont observés et peuvent être expliqués par un rapport Al/Ca élevé. Les auteurs suggèrent que ce rapport puisse être un indicateur plus pertinent que la seule concentration en Al. Ainsi, avec l'augmentation du rapport Al/Ca dans le sol, et notamment lorsqu'il est supérieur à 1, l'élongation racinaire de l'épicéa a été ralentie et des lésions plus fréquentes de la pointe racinaire ont été constatées (Dahlgren *et al.*, 1991).

Les ratios Al/Ca des sols utilisés dans notre étude sont de 8,16, 11,44 et 0,3 pour les  $S_D$ ,  $S_{PS}$  et le terreau commercial respectivement. Ceci pourrait expliquer les inhibitions de croissance observées chez les deux modèles de sapin de Douglas cultivés sur les deux sols forestiers  $S_D$  et  $S_{PS}$ .

Par ailleurs, une autre étude menée sur l'orge (*Hordeum vulgare L.*) avait comme objectif de déterminer l'effet de l'exposition à l'Al en cultivant cette plante pendant 25 jours au contact d'un sol acide (pH 4,4) riche en Al (sol Tatum : sol argileux à caractère fortement acide) ; ce sol a été traité ou non par du  $CaCO_3$  pour augmenter le pH à 5,7. Que ce soit pour les variétés d'orges sensibles ou tolérantes à l'Al, des masses sèches plus faibles de racines et de la partie aérienne ont été observées pour les plantes cultivées sur le sol le plus acide (pH 4,4) comparé aux lots cultivés sur sols à pH 5,7 (Foy *et al.*, 1993). Les auteurs de cette étude lient l'effet de l'acidification du sol sur la masse sèche des plantes à la quantité d'Al phytodisponible pour la plante. A pH 4,4, l'Al semble être solubilisé sous une forme plus disponible pour la plante, engendrant la perte de masse observée chez les variétés d'orge et de blé cultivées sur sol à pH 4,4 (Foy, 1996; Foy *et al.*, 1993).

En effet, indépendamment de la durée de culture et de la quantité d'Al total dans le substrat / milieu de culture, c'est essentiellement la phytodisponibilité de l'Al qui importe quant à ses conséquences néfastes sur la plante.

Chez d'autres espèces végétales, une stratégie de résistance à l'Al différente est observée. Elles optent pour un développement plus important de leur système racinaire quand elles sont exposées à l'Al (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). La stimulation de la croissance induite par l'Al a été observée fréquemment chez les plantes indigènes des régions tropicales et tempérées ou les plantes qui ont acquis une certaine résistance aux sols acides et lorsque l'Al est principalement administré à de faibles concentrations (Osaki *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 2009; Yoshii, 1937). Dans le cas de *Tabebuia chrysantha*, de faibles concentrations en Al (300  $\mu M$   $AlCl_3$ ) ont stimulé la biomasse racinaire. Un effet inhibiteur est cependant observé à des concentrations plus élevées en Al (à partir de 600  $\mu M$   $AlCl_3$ ) (Rehmus *et al.*, 2014). Pour la plante de thé (*Camellia sinensis*), il est décrit qu'une concentration de 300  $\mu M$  Al stimule la croissance de la biomasse, l'allongement des racines et la prolifération à court et à long terme des racines latérales (Mukhopadyay *et al.*, 2012; Tomioka *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2016). Dans

le cas de cette plante, il a même été démontré qu'en l'absence de l'Al, la croissance de la racine et de la plante en entier sont retardées (Fung *et al.*, 2008; Tsuji *et al.*, 1994)

Les perturbations de la croissance des plantes suite à l'exposition à l'Al sont souvent des effets indirectes de l'Al, liées à son interférence avec la division cellulaire essentiellement au niveau des extrémités racinaires et des racines latérales, l'augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire, l'interférence avec un certain nombre d'activités enzymatiques, l'induction d'un stress oxydatif, la fixation du phosphore et des éléments minéraux essentiels à la croissance de la plante sous des formes moins disponibles dans la rhizosphère (Sade *et al.*, 2016). Dans cette étude, certains aspects ont été étudiés, et seront discutés dans les paragraphes suivants.

La pointe racinaire, et plus précisément la zone méristématique de la coiffe, constitue le lieu privilégié de l'action de l'Al. Des observations en microscopie électronique à balayage en mode environnemental (MEBe) ont été réalisées sur les pointes racinaires des différents modèles de sapin de Douglas. *In vitro*, la forme globale de l'apex de la racine n'a pas été significativement modifiée pour les plantules cultivées en présence de 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Par contre, à partir d'une concentration de 500  $\mu\text{M}$  en  $\text{AlCl}_3$ , une surface plus rugueuse a été observée ainsi que quelques fissurations (Figure 51). Ces dernières deviennent plus prononcées pour la concentration la plus élevée en  $\text{AlCl}_3$  (1 mM) avec une déformation et un enfoncement complet de la forme de la pointe racinaire (Amara *et al.*, 2020). Dans un contexte proche, des observations similaires ont été réalisées dans plusieurs modèles : différents génotypes de maïs (Yamamoto *et al.*, 2001 ; Jones *et al.* 2006), le pois (Motoda et Kano, 2010), la cornille (Kopittke *et al.*, 2008). Les ruptures de l'extrémité des racines observées pour tous ces modèles peuvent apparemment être causées par l'augmentation du diamètre des racines et la déchirure du cortex externe et des cellules rhizodermiques de la zone d'élongation (Blamey *et al.*, 2004; Kopittke *et al.*, 2008; Motoda et Kano, 2010). Selon ces auteurs, l'inhibition et la rupture de l'allongement des racines sont le résultat d'une liaison de l'Al aux composants de la paroi cellulaire et d'une biosynthèse accrue de la lignine provoquant ainsi une augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire. De plus, il a été observé que les cellules épidermiques et corticales étaient plus courtes et plus larges quand exposées à 50  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  que les cellules des racines des plantules de maïs (*Zea mays*) témoins (Čiamporová, 2000). Les cellules de la pointe racinaire, passent de la zone de division cellulaire à celle de l'élongation cellulaire, dans une zone appelée DTZ (partie distale de la zone de transition), et cette zone est considérée comme le site préférentiel d'accumulation d'Al et la région la plus sensible à l'Al de la racine (Sivaguru et Horst, 1998)

Chez des plantules de blé (*Triticum aestivum* L.) cultivées en hydroponie, une inhibition de l'élongation racinaire a été accompagnée avec un épaississement des racines, une coiffe radicaire endommagée et des lésions dans les tissus épidermiques et corticaux dans la zone apicale quand exposées à des solutions minérales contenant de l' $\text{AlCl}_3$ , (Ryan *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2011). Le système racinaire est réduit et endommagé comparé aux conditions témoin (sans Al), ce qui limite l'absorption de l'eau et de nutriments.

Au cours de nos travaux, des observations similaires ont été obtenues dans le cas des plantules de sapin de Douglas cultivées sous serre sur  $S_D$ . En effet, un léger enfoncement de la pointe racinaire a été observé. Cet enfoncement est davantage marqué dans le cas des plantules qui se sont développées sur  $S_{PS}$ . Chez ces dernières, un enroulement du rhizoderme et une déformation de l'aspect de la racine normalement pointu ont même été observés (Figure 80 C). Les durées d'exposition des arbres aux substrats sélectionnés étant plus longue, les



mêmes phénomènes que pour les plantules cultivées *in vitro* ont été observés mais plus prononcés (Figure 81).

Pour observer l'aspect des cellules de la pointe racinaire, un marquage au Calcofluor a été réalisé sur des coupes transversales des racines des plantules *in vitro*, de PI2 et des Arb11. Sur les racines des plantules cultivées en conditions témoin, ce marquage a permis d'observer une fluorescence uniforme sur la totalité des parois des cellules de la coupe. Pour les plantules *in vitro*, l'exposition à l' $\text{AlCl}_3$ , même à  $200 \mu\text{M}$ , a engendré une augmentation du diamètre de la racine qui est quasiment doublé (Figure 53). Ce phénomène a été décrit dans plusieurs travaux. Par exemple, pour les plantules de maïs (Batista *et al.*, 2013) suite à des traitements avec  $75$  et  $300 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , il a été suggéré que l'augmentation du diamètre des racines peut engendrer une déchirure des cellules du cortex externe et des cellules du rhizoderme de la zone d'élongation, et par suite, une perturbation du processus de l'élongation racinaire (Blamey *et al.*, 2004; Kopittke *et al.*, 2008; Motoda et Kano, 2010).

Dans cette étude, le signal du marquage au Calcofluor présente des intensités différentes d'un tissu à un autre à partir d'une concentration de  $500 \mu\text{M}$  en  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu (Figure 53 C). L'atténuation du signal et la modification de sa distribution, peuvent s'expliquer par une déformation de la structure cellulaire au niveau de l'épiderme racinaire et des cellules corticales. La diminution de la fluorescence dans les tissus conducteurs du cylindre central de la racine observé pour la condition  $1 \text{ mM}$   $\text{AlCl}_3$  pourrait s'expliquer par

- Soit une diminution de la quantité de cellulose présente dans les parois ; Cependant, l'estimation quantitative du résidu cellulosique obtenu à la fin des extractions des polysaccharides de la paroi n'a pas donné de différences significatives, éventuellement à cause de l'inefficacité de l'élimination des résidus après chaque centrifugation ;
- Soit une augmentation de la lignification qui pourrait induire un masquage de la cellulose par la lignine, et une inaccessibilité du Calcofluor à la cellulose ; Pour le vérifier, il faudrait estimer quantitativement la lignine au cours des extractions des polysaccharides de la paroi.

Chez les racines des PI2 exposées aux sols  $S_D$  et  $S_{PS}$ , le signal est devenu plus faible au niveau de la zone corticale des racines. Dans le cas des racines des Arb11, le signal est devenu absent aussi dans le cylindre central, quand exposées au sol  $S_{PS}$ . Ces cellules étant responsables de la conduction de l'eau, des minéraux et des nutriments carbonés, et les cellules corticales étant responsables de la réserve de ces nutriments, l'exposition à l'Al affecterait donc l'approvisionnement de la plante en nutriments, ce qui affecterait la croissance.

#### IV.1.2. Perturbation de la nutrition minérale

La détermination des teneurs en Al dans les différents organes des plantes de sapin de Douglas a été accompagnée de celle des éléments minéraux essentiels à la croissance des végétaux.

L'exposition des plantules de sapin de Douglas à l'aluminium en conditions de culture *in vitro* n'a pas modifié de façon significative le contenu en minéraux essentiels dans les racines de sapin de Douglas. Cependant, les teneurs en Ca dans les parties aériennes sont significativement plus faibles en présence de  $500 \mu\text{M}$  et  $1 \text{ mM}$  d' $\text{AlCl}_3$  comparé aux conditions témoins (Figure 55 A). Des tendances similaires ont déjà été décrites chez le blé. Selon (Huang *et al.*, 1992), l' $\text{Al}^{3+}$  serait capable de substituer le  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des structures

homogalacturoniques de la paroi cellulaire, par conséquent de réduire l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, une baisse des teneurs en Mg dans les épines en présence de  $500 \mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  a été observée dans les plantules de sapin de Douglas *in vitro* (Figure 55C). Cette baisse a également été constatée chez le théier (Pongrac *et al.*, 2020). Il a même été reporté que l'inhibition de l'absorption de  $\text{Mg}^{2+}$  est plus prononcée que celle de  $\text{Ca}^{2+}$  chez des plants d'épicéa (*Picea abies*) âgés d'un an et cultivés pendant 6 mois en hydroponie en présence de  $1 \text{ mM}$   $\text{AlCl}_3$  (van Praag *et al.*, 1997). Concernant le K, les teneurs de cet élément dans les épines sont plus faibles en présence de  $500 \mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  comparées au témoin (Figure 55 B). Au sujet des teneurs en K, les données de la littérature sont divergentes en fonction des modèles considérés : l'absorption de  $\text{K}^+$  aurait été réduite chez de nombreuses plantes en réponse à l'Al comme le cacao (*Theobroma cacao*) (Antonio *et al.*, 2013), elle aurait en revanche été stimulée chez d'autres, comme l'orge (*Hordeum Vulgare*) (Abdalla, 2008).

Dans le cas des plantules sous serre, les éléments minéraux essentiels Ca, K et Mg sont présents généralement à des teneurs 40 à 60 % plus faibles dans les différents organes des plantules cultivées sur  $S_D$  et  $S_{PS}$  par rapport à celles cultivées sur terreau commercial (condition témoin) sauf pour les teneurs en Ca dans les tiges (environ  $2 \text{ mg Ca.g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Figure 82). L'inhibition de la croissance des plantes de sapin de Douglas exposées à l'Al peut être expliquée par ces faibles teneurs en minéraux chez les plantules cultivées sur sols forestiers, celles-ci pouvant devenir un facteur limitant pour la croissance. De la même façon, Krizek et Foy, (1988) ont constaté que l'exposition au sol « Tatum » fortement acide et riche en Al diminuait les concentrations de P et de Ca dans les plantules d'orge (que ce soit pour des variétés tolérantes ou sensibles à l'Al). Foy 1996, le confirme en reportant qu'en plus de diminuer la croissance des plantes, le stress aluminique peut diminuer la distribution des éléments minéraux essentiels pour la croissance de la plante, en particulier le Ca, le Mg et le P, dans la plante (Foy, 1996).

Ainsi, des déséquilibres nutritionnels induits par l'exposition à l'Al ont été signalés chez plusieurs espèces végétales. L'Al interfère avec l'absorption, le transport et l'utilisation de la plupart des éléments minéraux. Dans des conditions de stress aluminique, l'absorption de nombreux cations dont le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$  est inhibée, probablement parce que l'Al peut substituer les cations essentiels à la croissance de la plante dans la paroi cellulaire lors de leur absorption par les racines, créant, ainsi, un phénomène de compétition, ou en affectant la structure des cellules conductrices de la sève brute, limitant ainsi la bonne circulation des minéraux dans la plante. Selon Kochian *et al.*, (2004), une exposition à long terme à l'Al endommage gravement les systèmes racinaires, ce qui réduit par conséquent l'absorption d'eau et des nutriments minéraux. Également, Eticha *et al.*, (2005) suggèrent que la fixation de l'Al dans la paroi cellulaire végétale réduit le mouvement de l'eau et des solutés à travers l'apoplasme, ce qui diminue la distribution des nutriments par le système racinaire.

Outre l'inhibition de la croissance, ces carences peuvent être à l'origine d'autres anomalies morphologiques et fonctionnelles chez les plantes. Par exemple, des teneurs réduites en Mg ont été observées ici sur les différents modèles de sapin de Douglas :

- Dans les épines des plantules de sapin de Douglas *in vitro*, une teneur moindre est enregistrée :  $2,1 \text{ mg Mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour une exposition à  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  comparé au témoin ( $3,2 \text{ mg Mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) ;
- Sur sols forestiers  $S_D$  et  $S_{PS}$ , la teneur en Mg est toujours plus faible que sur le terreau :  $0,8$  comparé à  $2,3 \text{ mg Mg.g}^{-1} \text{ MS}$  dans les racines,  $1$  comparé à  $1,7 \text{ mg Mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour les tiges et  $2$  comparé à environ  $3 \text{ mg Mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour les épines).

Cette faible teneur en Mg pourrait altérer la biosynthèse de la chlorophylle, et donc le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Ainsi, les plantes de riz sensibles à l'Al se caractérisent par une chlorose en condition de stress aluminique, associée à une diminution de la concentration de Fe, de Ca et de Mg dans la plante (Macêdo et Jan, 2008).

Dans le cas particulier du calcium, cet élément joue un rôle pivot dans les mécanismes de résistance (essentiellement les mécanismes d'exclusion) contre l'Al (Konarska, 2010). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est en effet un cation nécessaire à l'organisation spatiale des pectines de la paroi cellulaire (Franco *et al.*, 2002). Plusieurs études ont suggéré que la liaison de l'Al sous sa forme de cation trivalent  $\text{Al}^{3+}$  à la paroi cellulaire se fait par substitution du  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui réduit l'extensibilité de la paroi par fixation de l' $\text{Al}^{3+}$  par les pectines (Tabuchi et Matsumoto, 2001; Zhang *et al.*, 2007). Il a aussi été proposé que la perturbation de l'équilibre ionique en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme pouvait causer l'inhibition de la division cellulaire et donc de l'élongation racinaire (Panda *et al.*, 2009).

De plus, il a été fréquemment reporté que l'aluminium agit sur l'absorption des nutriments essentiels (Ca, Mg, K, P et Fe) mais aussi sur leur transport et leur assimilation (Azinwi Tamfuh *et al.*, 2017). Ceci se traduit par une moins bonne assimilation des éléments minéraux (Steiner *et al.*, 2012). En effet, plusieurs symptômes de la toxicité aluminique sont liés à des carences en minéraux. L'Al serait capable de limiter l'absorption ou la biodisponibilité des éléments minéraux par les racines,

L'Al a tendance à se lier au phosphore (P) avec pour conséquence de le rendre moins disponible dans la solution de sol et sur les surfaces des racines créant ainsi un déficit en P nécessaire pour la croissance des plantes (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). La carence en Fe précédemment décrite par Clark et ses collaborateurs (1981) suite aux symptômes observés au niveau des feuilles de sorgho a été plutôt associée à une faible assimilation de l'élément Fe et non pas à sa faible quantité disponible. En effet, dans cette étude, les feuilles des plantes soumises au stress aluminique présentaient des concentrations de Fe aussi élevées et parfois plus élevées que celles des plantes témoins. La présence des symptômes de carence en Fe suggère qu'il s'agit d'un problème de disponibilité de l'élément Fe et non pas de la quantité présente (Clark *et al.*, 1981)

Les perturbations de la nutrition minérale de la plante en conditions de stress aluminique peuvent également expliquer le phénomène d'hyperhydricité observée pour les épines des plantules de sapin de Douglas cultivées *in vitro* en présence de  $500 \mu\text{M AlCl}_3$ . L'absorption de l'aluminium par les plantules perturbe dans un premier temps l'absorption des minéraux essentiels, et ce déséquilibre minéral pourrait être une cause majeure de cette malformation. Dans un contexte équivalent, Pasqualetto *et al.*, (1988) ont indiqué qu'une baisse de la teneur en K avait entraîné une augmentation significative du pourcentage de plantes «vitrifiées» pour des cultures de pommiers. Dans une étude sur des plantes de Cognassier (*Cydonia oblonga* Mill.), Singha *et al.*, (1990) ont également montré que l'augmentation de la concentration de Ca dans le milieu de culture réduisait le phénomène d'hyperhydricité.

## **IV.2. Distribution de l'aluminium : du milieu à la plante**

### **IV.2.1. Répartition de l'aluminium dans le milieu (synthétique ou sol forestier)**

Comme il a été précisé, nous avons choisi de débiter l'étude par une approche fondamentale en conditions de culture contrôlées (culture *in vitro*) afin de cibler plus spécifiquement l'effet de l'Al sur les plantes. La gamme de concentration d' $\text{AlCl}_3$  (0, 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  et 1 mM) dans

les milieux de culture a été choisie en se basant sur les concentrations d'Al précédemment utilisées dans les différentes études sur l'effet de l'Al sur les différentes espèces de plantes. L'Al, ajouté sous forme d' $\text{AlCl}_3$  est phytodisponible dans un milieu de culture *in vitro* conventionnel, ce qui permet d'évaluer plus rapidement les capacités maximales de tolérance des plantes.

La phytodisponibilité de l'Al est un facteur clé dans l'identification de ses effets sur la plante.

En effet, l'Al, comme tous éléments traces métalliques contaminant les sols, se répartit entre la phase solide et la phase liquide des sols. Généralement, la quantité d'Al qui existe dans la solution du sol, plutôt mobile et phytodisponible, est minoritaire par rapport à la quantité d'Al total dans le sol. Cependant, la fraction majoritaire d'Al est retenue, fortement ou faiblement dans la phase solide du sol car liée aux différentes fractions organiques et minérales (Perrono, 1999). Dans le cas des milieux de culture hydroponiques ou gélosés sur lesquels l'effet de l'Al sur les plantes est étudié, la phytodisponibilité de l'Al est plus élevée par rapport à un sol solide à pH peu acide.

Une approche en conditions semi-naturelles (sous serre) a été ensuite mise en place afin de mettre en évidence dans quelles mesures les réponses observées *in vitro* sont transposables à des modèles cultivés sur des sols forestiers. En effet, les modèles sous serre sont soumis à davantage de variations que le modèle *in vitro*, notamment au niveau de la phytodisponibilité de l'Al dans le substrat qui dépend beaucoup du pH, mais aussi de la luminosité et de la température.

Les échantillons de sols ont été prélevés sur le site de la pépinière de l'Office National des Forêts situé à Peyrat-le-Château (Région Nouvelle Aquitaine), sur lequel sont cultivés plusieurs types de végétation de résineux, de feuillus et d'autres plantes sur des parcelles voisines comme montré dans la figure 37. De façon générale, la nature géochimique des sols de la pépinière est essentiellement granitique, de type Alocrisol typique. Cependant, nous avons montré que les caractéristiques des sols changent d'une parcelle à une autre selon la nature de son couvert végétal.

Des différences significatives entre les pH des sols de différentes parcelles ont été notées. Les valeurs de pH des parcelles plantées avec des résineux varient entre 4,73 et 5,31 (correspondant à  $S_{PS}$  et  $S_D$  respectivement), ce qui les classent parmi les sols acides ( $\text{pH} < 5,5$ ). Avec des pH supérieurs à 5,61, les parcelles de feuillus seraient pour leur part classées parmi les sols faiblement acides à neutres.

Le dosage de l'Al phytodisponible dans les différents échantillons de sols forestiers montre que les sols les plus riches en Al phytodisponible sont ceux ayant un pH acide inférieur à 5,5, et correspondant à des sols de plantation de résineux : le pin sylvestre et le sapin de Douglas (environ 14 et 10  $\text{meq Al} \cdot (100 \text{ g})^{-1} \text{ MS}$  respectivement). Cette richesse en Al phytodisponible a été accompagnée d'un faible contenu minéral, ce qui s'exprime par un faible rapport  $(\text{Ca} + \text{K} + \text{Mg}) / \text{Al}$  (0,1 pour le  $S_D$  et 0,23  $S_{PS}$ ) qui, selon Oulehle et Hruska, (2005), suggère des conditions de faible disponibilité minérale pour les plantes.

L'aluminium potentiellement phytodisponible retrouvé dans ces sols est principalement issu de la solubilisation de certains éléments présents dans le sol qui vont réagir différemment selon la composition, la structure, et le pH du sol qui reste l'un des facteurs essentiels dans l'augmentation des formes mobiles d'aluminium dans la solution du sol (Guibaud et Ayele, 2000). Il a souvent été reporté que les forêts de résineux induisent une augmentation de l'acidité et des teneurs en aluminium libéré dans les solutions des sols de ces forêts (Guibaud

et Ayele, 1997). Ce phénomène est plus prononcé quand le sol est pauvre en cations échangeables ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), puisque ce sont ces cations qui seraient capables de contrer cet apport de protons. C'est justement le cas des forêts du Limousin, où la culture de sapin de Douglas a provoqué une acidification des sols et son corollaire, une mobilité accrue de l'aluminium (Guibaud *et al.*, 1996b; Guibaud et Ayele, 1997). Les litières de résineux sont connues pour être lentement décomposables, à cause de :

- La présence d'un revêtement cireux qui rend difficile la décomposition des épinettes par les bactéries et les champignons ;
- La richesse des épinettes en composés organiques volatils (terpènes, alcaloïdes et phénols) ayant un pouvoir bactéricide, limitant ainsi l'activité des bactéries du sol et donc leur capacité à dégrader la litière ;
- Le pH acide des épinettes (environ 3,5) inhiberait davantage l'activité des micro-organismes du sol et ralentirait encore plus le processus de décomposition.

Ce phénomène d'acidification a été observé dans les sols sur lesquels les jeunes arbres ont été mis en culture pendant 11 mois. Le pH de  $S_D$  est passé de 5,28 à 4,66 et celui de  $S_{PS}$  est passé de 4,73 à 4,19. Deux mois de culture (dans le cas des PI2) ne sont toutefois pas suffisants pour observer des modifications des caractéristiques du sol.

Les mesures de la CEC des sols forestiers indiquent des valeurs comprises entre 8 et 10 meq.100 g<sup>-1</sup> de sol ce qui les classent parmi les CEC faibles à moyennes, pour 17 meq.100 g<sup>-1</sup> de sol pour le terreau commercial, correspondant à une CEC élevée. En comparant les mesures de la CEC, et les teneurs d'Al rendu disponible dans le sol par le mélange Rhizo A, il s'avère que, l' $\text{Al}^{3+}$  potentiellement phytodisponible occuperait la totalité de la CEC dans le cas des sols forestiers, et 20 % de la CEC du substrat de culture de type terreau.

Le rapport C/N ne présente pas de différences significatives entre les sols forestiers sélectionnés (alentours de 20). Dans le cas du substrat de type le terreau commercial, ce rapport est de 48. Ces valeurs classent ces substrats naturels parmi les sols riches en matière organique et dont la minéralisation de cette dernière est lente avec un rapport C/N > 20.

Après 2 mois de culture de PI2, l'acidité et la capacité d'échange cationique des substrats de culture n'ont pas évolué significativement. Les plantules étant très jeunes et donc de petite taille, ne semblent pas avoir un effet sur les caractéristiques des sols ou substrats sur lesquels elles se développent (Figure 75).

Par contre, la mesure du pH des substrats après 11 mois de culture des Arb11 a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les pH initiaux et les pH finaux des sols forestiers (Figure 76 A). Les sols ont été acidifiés au bout de 11 mois de culture, le pH diminuant de 0,6 unité environ. Cependant, la CEC ne montre pas de variation significative (Figure 76 B).

#### **IV.2.2. Distribution de l'aluminium dans les plantes de sapin de Douglas**

Le dosage de l'Al dans les différents organes des sapins de Douglas a montré que quelle que soit la condition de culture, l'Al est présent dans toutes les parties de la plante.

*In vitro*, l'Al a été détecté y compris dans les plantules sur milieu témoin avec 10 µg Al.g<sup>-1</sup> MS, 7 µg Al.g<sup>-1</sup> MS et 4 µg Al.g<sup>-1</sup> MS dans les racines, les tiges et les épinettes, respectivement. Ceci

peut être dû à la contamination de l'un des constituants du milieu de culture par l'élément Al. En effet, l'analyse du milieu de germination témoin a révélé qu'il présentait une concentration de  $4,36 \mu\text{mol Al.L}^{-1}$ . Cette valeur s'avère faible comparée aux concentrations d' $\text{AlCl}_3$  ajoutées dans le milieu présentant un effet sur la croissance (à partir de  $200 \mu\text{M}$ ). Des résultats équivalents ont été observés par Zhang et al 2014 pour des germinations de *Pinus massoniana* qui, dans des conditions témoins, contiennent environ 23, 18 et  $9 \mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS dans les racines, les tiges et les épines, respectivement (Zhang et al., 2014).

Pour les plantules cultivées dans des milieux où une concentration connue d' $\text{AlCl}_3$  a été ajoutée, les racines accumulent la majorité de l'Al détecté au sein de la plante (50 %) (avec  $320 \mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS à  $1 \text{ mM AlCl}_3$ ) et, de façon moindre, dans les tiges et les épines (environ 25% dans chacun des organes) quelle que soit la concentration d'Al dans le milieu de culture.

Une répartition proche est observée chez les plantules de sapin de Douglas cultivées sur sols forestiers, les racines restent l'organe accumulant le plus d'Al avec 75 % de l'Al absorbé par la plante. Les tiges et les épines en contiennent environ 15 et 10 % respectivement (Figure 83) (correspondant à 45% dans les racines, 10% dans les tiges et 4% dans les épines par rapport à l'Al dosé dans le  $S_D$  et 26% dans les racines, 4% dans les tiges et 4% dans les épines par rapport à l'Al dosé dans le  $S_{PS}$  comme le montre le tableau 11). Ces résultats sont comparables à ceux de Frankowski (2016), qui a réalisé des travaux sur de jeunes arbres de Bouleau (*Betula pendula*) âgés de 3 ans, cultivés sur des sols naturellement acides et contaminés par des effluents industriels riches en Al. Après 3 ans d'exposition à des sols contenant environ  $1,5 \text{ mg Al.g}^{-1}$ , 65 % de l'Al initialement détecté dans les sols, a été retrouvé dans les racines, comparé à environ 3% dans les tiges et environ 7 % dans les feuilles (Frankowski, 2016).

La forte proportion d'Al dosée dans les racines est cohérente avec le fait que les racines sont directement exposées à la source d'Al. De plus, l'absorption et le stockage de fortes concentrations d' $\text{Al}^{3+}$  dans les parties aériennes de la plante sont un trait commun à de nombreuses espèces des régions tropicales ; elle constitue une stratégie pour faire face au stress aluminique (Ryan et Delhaize, 2010). *Richeria grandis* (Euphorbiaceae, dicotylédone) est un exemple typique d'une plante ligneuse capable d'accumuler de grandes quantités d'Al ( $> 15 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) dans ses feuilles. Ce résultat a été obtenu sur des feuilles matures prélevées d'arbres plantés sur un sol riche en Al (Cuenca et al., 1991).

Le facteur de translocation est un indicateur de la capacité de la plante à acheminer l'élément accumulé depuis les racines vers les parties aériennes. C'est un ratio entre la teneur de l'élément accumulé dans les parties aériennes et la concentration dans les racines. Après 8 semaines d'exposition à la gamme d' $\text{AlCl}_3$  ou aux sols forestiers riches en Al, les plantules de sapin de Douglas ne semblent pas être hyperaccumulatrices à l'Al, puisque leur facteur de translocation, quelle que soit la concentration d'Al dans le milieu de culture ou le sol, reste inférieur à 1 (Tableau 14). Ceci est encore confirmé par l'accumulation préférentielle de l'Al dans les racines ( $320,37 \mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS) par rapport aux parties aériennes ( $138,32 \mu\text{g Al.g}^{-1}$  MS) chez les plantules cultivées *in vitro*, en présence de  $1 \text{ mM AlCl}_3$  mais aussi chez les plantules cultivées sous serre sur  $S_D$  avec  $0,37 \text{ mg Al.g}^{-1}$  MS dans les racines comparé à  $0,11 \text{ mg Al.g}^{-1}$  MS au niveau des parties aériennes.

**Tableau 14 :** Translocation de l'Al dans les différents organes des plantules de sapin de Douglas *in vitro* et sous serre en fonction de la concentration en Al dans le milieu de culture.

Concentration d'AlCl <sub>3</sub> dans le milieu de culture (µM)	Teneurs dans les racines (µg Al .g <sup>-1</sup> MS)	Teneurs dans les parties aériennes (µg Al .g <sup>-1</sup> MS)	Facteur de translocation
200	110	97	0,88
500	221	132	0,59
1000	320	138	0,43
Sols forestiers utilisés pour la mise en germination des plantules de sapin de Douglas	Racines (mg Al .g <sup>-1</sup> MS)	Parties aériennes (mg Al .g <sup>-1</sup> MS)	Facteur de translocation
S <sub>D</sub>	0,37	0,11	0,29
S <sub>PS</sub>	0,33	0,11	0,33

Les mesures de la distribution d'Al dans les plantes de sapin de Douglas ont été accompagnées par des observations par microscopie confocale des coupes racinaires marquées au Morin, afin de localiser l'Al dans les cellules de la racine.

Comme l'avait précédemment montré le dosage de l'Al par MP-AES, un signal de fluorescence caractéristique du complexe Al-Morin apparaît dans les racines des plantes témoins, bien que faible. Puis, le signal augmente avec l'augmentation de la concentration d'Al dans le milieu de culture, et à 1 mM AlCl<sub>3</sub>, la fluorescence occupe toute la section, toujours au niveau des parois cellulaires tout en étant plus prononcée au niveau du tissu vasculaire et du cortex (Figure 54). Dans les plantules et les jeunes arbres cultivés sous serre, le signal de la fluorescence du complexe Al-Morin devient plus intense dans les conditions de sols forestiers comparé aux conditions sur terreau. Pour les PI2, l'Al semble être essentiellement accumulé au niveau des parois cellulaires dans les tissus du cylindre central, contrairement aux Arb11 où le signal est plutôt détecté autour du cylindre central.

Ce même type d'analyses, réalisé sur des plants de thé (*Camellia sinensis* L.), suite à une exposition à 100 µM AlCl<sub>3</sub> pendant 8 semaines. Hajiboland et Poschenrieder (2015) a révélé que l'accumulation de l'Al se fait essentiellement dans la paroi cellulaire au niveau des racines, mais différemment en fonction de la zone la racine observée (apicale ou basale) (Hajiboland et Poschenrieder, 2015). Une autre étude menée chez les plantes de *Picea abies* âgées de 3 ans, traitées par 500 µM AlCl<sub>3</sub> pendant une semaine, a montré que l'Al était localisé dans les cellules épidermiques et corticales de la pointe de la racine (Heim *et al.*, 1999). Dans les deux types de cellules, plus de 88% de l'Al total est détecté dans la paroi cellulaire. De plus, il a été observé que la quantité de Ca dans la paroi cellulaire était beaucoup plus faible dans les plantes traitées à l'Al<sup>3+</sup> que dans les plantes témoins. Heim et ses collaborateurs (1999) ont suggéré que l'Al<sup>3+</sup> a remplacé le Ca<sup>2+</sup> aux sites de fixation sur la paroi cellulaire.

Chez les plantules de maïs (*Zea mays*) exposées à 50 µM AlCl<sub>3</sub>, l'Al a été détecté dans les parois cellulaires des cellules épidermiques après seulement quelques secondes de traitement. Une augmentation progressive de l'accumulation d'Al dans le tissu racinaire interne est enfin constatée en fonction du temps d'exposition (Čiamporová, 2000).

La liaison principale d' $\text{Al}^{3+}$  dans la paroi cellulaire est probablement la matrice pectique, avec ses groupes carboxyliques, potentiellement chargés négativement (Delhaize *et al.*, 2007), normalement fixant le cation  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire à la bonne organisation de la paroi cellulaire. Cette substitution du  $\text{Ca}^{2+}$  par l' $\text{Al}^{3+}$  rendrait la paroi cellulaire plus rigide et réduirait ainsi son extensibilité requise pour l'allongement normal des cellules (Tabuchi et Matsumoto, 2001).

### **IV.3. Réponses physiologiques à l'exposition à l'aluminium : stratégies mises en place pour tolérer le stress aluminique**

#### **IV.3.1. Stratégies mises en place au niveau pariétal**

La paroi cellulaire étant l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale, elle constitue la première barrière contre les agressions extérieures (Wang *et al.*, 2008). La paroi cellulaire au niveau des racines par exemple, a été décrite à la fois en tant que site potentiel de l'accumulation et de l'exclusion de l'Al (Horst *et al.*, 2010). L'une des stratégies potentielles de tolérance des plantes aux éléments traces métalliques comme l'Al, se déroule donc au niveau pariétal, en chélatant l' $\text{Al}^{3+}$  aux groupements fonctionnels anioniques de la paroi. L' $\text{Al}^{3+}$  peut par exemple être fixé par les groupes carboxyle chargés négativement de pectines non méthylestérifiées. Cette stratégie empêcherait la pénétration de l'Al dans le symplasme et permettrait de maintenir les conditions du bon fonctionnement des activités physiologiques dans les cellules végétales (Yang *et al.*, 2008).

##### **IV.3.1.1. Modification des polysaccharides de la paroi en réponse au stress aluminique**

Comme il a été déjà montré, l'Al a été accumulé dans tous les organes de la plante, essentiellement dans les racines. Cette accumulation se fait plus particulièrement au niveau de la paroi cellulaire comme l'a montré le signal de fluorescence caractéristique du complexe Al-Morin sur les coupes transversales de racines exposées à l'Al *in vitro* ou sur sol sous serre (Figures 54, 84 et 85). Il est alors primordial d'étudier le rôle de la paroi dans la chélation de l'Al dans chacun de ces organes. Une étude portant sur la composition de la paroi cellulaire des différents organes des plantes de sapin de Douglas suite à leur exposition à l'Al en conditions *in vitro* et sous serre a été menée.

Avant d'extraire les polysaccharides pariétaux, une étape préalable permet de recueillir la fraction S1 extractible à l'éthanol - riche notamment en sucres circulants (saccharose...) et tanins. Au niveau quantitatif, les proportions en la fraction S1 sont restées inchangées dans les différents organes des Arb11 (Figure 88) et des plantules *in vitro* (Figure 56). Cependant, la teneur en Al dans le sol a significativement affecté les proportions en S1 dans les racines et les tiges chez les PI2 (Figure 86). Les teneurs en sucres totaux de la fraction S1 augmentent chez les PI2 sur sols forestiers, de 157 à 250  $\text{mg.g}^{-1}$  MSi dans les racines et de 40 à 80  $\text{mg.g}^{-1}$  MSi dans les tiges. Elles restent stables dans les épines (environ 320  $\text{mg.g}^{-1}$  MSi).

Un traitement à 200  $\mu\text{M}$  Al augmentait considérablement les teneurs en sucres solubles dans les plantules de riz (Moreno-Alvarado *et al.*, 2017). Le rôle des sucres solubles ne se limite pas à être des ressources métaboliques et des constituants structurels des cellules, mais ils agissent également comme des signaux régulant divers processus associés à la croissance et au développement des plantes (Rosa *et al.*, 2009). Dans les travaux de Moreno-Alvarado *et al.*, (2017), il a été reporté de manière significative une surexpression de gènes impliqués dans les processus de tolérance de la plante au stress abiotique induit par l'exposition à l'Al. La surexpression de ces gènes a entraîné des augmentations significatives des teneurs en sucres solubles et des concentrations de proline.



Les changements qualitatifs et quantitatifs observés dans les fractions polysaccharidiques extraites des différents organes des plantules *in vitro*, sous serre et des jeunes arbres de sapin de Douglas sont résumés dans les tableaux 15 et 16 :

**Tableau 15 :** Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les PHM et PFM issues des 3 organes des 3 modèles de sapin de Douglas suite à une exposition à l'Al *in vitro* ou sous serre sur sol forestier

	Fraction	Quantitativement (Teneurs en sucres totaux mg.g <sup>-1</sup> MSi)			Qualitativement			
					(Rapport GalA/Rha)			DME
		Racines	Tige	Epines	Racines	Tige	Epines	Racines
<b>In vitro</b>	PHM	↘ à partir de 500 µM	↘ à partir de 500 µM	↔	↘ à partir de 200 µM	↗ à partir de 200 µM	↘ à partir de 200 µM	↔
	PFM	↗ à partir de 500 µM	↗ à partir de 500 µM	↗ à partir de 200 µM	↗ à partir de 200 µM	↗ à partir de 200 µM	↗ à partir de 200 µM	↘ à partir de 500 µM
<b>PI2</b>	PHM	↔	↔	↔	↘ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↘ sur S <sub>PS</sub>	↘ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	
	PFM	↗ sur S <sub>PS</sub>	↗ sur S <sub>D</sub>	↗ sur S <sub>PS</sub>	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↔	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	
<b>Arb1 1</b>	PHM	↔	↔	↔	↗ sur S <sub>PS</sub>	↔	↔	
	PFM	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↔	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↔	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	

↘ : diminue ; ↗ : augmente ; ↔ : inchangé

**Tableau 16 :** Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les HC KOH et HC NaOH issues des 3 organes des 3 modèles de sapin de Douglas suite à une exposition à l'Al *in vitro* ou sous serre sur sol forestier

	Fraction	Quantitativement (Teneurs en sucres totaux mg.g <sup>-1</sup> MSi)			Qualitativement		
		Racines	Tige	Epines	Racines	Tige	Epines
<b>In vitro</b>	HC KOH	↔	↔	↔	Gal ↗ GalA ↗ Glc ↘	Gal ↗ GalA ↗ Glc ↘	Gal ↗ GalA ↗ Glc ↘
	HC NaOH	↔	↔	↔	Gal ↗ GalA ↗ Glc ↗	Gal ↗ GalA ↗ Glc ↗	Gal ↗ GalA ↗ Glc ↗
<b>PI2</b>	HC KOH	↗ sur S <sub>PS</sub>	↔	↔	Ara ↘ Xyl ↔	Ara ↘ Xyl ↗	Ara ↘ Xyl ↗
	HC NaOH	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↗ S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↗ S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	GalA ↗ Man ↘	GalA ↗ Man ↘	GalA ↗ Man ↘
<b>Arb11</b>	HC KOH	↔	↔	↘ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	Rha ↗	Rha ↗	Rha ↗
	HC NaOH	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	↔	↗ sur S <sub>D</sub> et S <sub>PS</sub>	Rha ↗ Man ↗ Glc ↘	Rha ↗ Man ↘ Glc ↘	Rha ↗ Man ↘ Glc ↘

↘ : diminue ; ↗ : augmente ; ↔ : inchangé

Tout d'abord, concernant les pectines, et quels que soient le modèle d'étude considéré - *in vitro* ou sols forestiers - les teneurs en sucres totaux des PFM, augmentent avec la concentration d'Al dans le milieu de culture dans les racines, tiges et épinnes. Ce qui signifie que quantitativement cette catégorie de pectines s'avère plus abondante dans les parois des plantules de sapins de Douglas lorsque celles-ci sont soumises à un stress aluminique. Bien que statistiquement non significative dans les tiges des Arb11, cette tendance est aussi observée. Un autre résultat important qui se confirme pour beaucoup de parties des plantes et quelles que soient les conditions de culture appliquées est l'augmentation du rapport GalA/Rha (sauf pour les tiges des PI2, et les racines des Arb11). Ce résultat suggère que les PFM présenteraient dans ces cas une plus grande proportion d'acide galacturonique. Elles seraient donc plus riches en HG et seraient caractérisées par un taux plus faible de Rha traduisant une diminution de la ramification des PFM. Ainsi, les deux résultats considérés simultanément amènent à penser que les PFM potentiellement impliquées dans les processus de rétention des cations  $Al^{3+}$  seraient plus abondantes et possèderaient une plus grande proportion de sites de fixation.

En ce qui concerne les monosaccharides pouvant substituer les chaînes latérales des rhamnoglacturonanes dans les fractions PFM, une diminution de la proportion en Xyl et Gal dans les fractions PFM a été observée quel que soit l'organe étudié en comparant les plantules témoins aux plantules exposées à 1 mM  $AlCl_3$ . Les proportions d'Ara augmentent aussi dans les racines (de 20 à 27% à 1 mM  $AlCl_3$ ) et les tiges (de 28 à 30% 1 mM  $AlCl_3$ ), mais restent inchangées dans les épinnes (environ 25%).

Ces variations à la fois quantitative et qualitative relevées pour les PFM pourraient conduire à l'amélioration des capacités d'adsorption de l'Al par les pectines de la paroi cellulaire des différents organes du sapin de Douglas exposé à un stress aluminique.

Pour la fraction pectique extraite à l'eau (PHM), les teneurs en sucres totaux restent inchangées dans tous les organes des PI2 et Arb11 exposés aux sols riches en Al, et diminuent dans les racines et tiges des plantules *in vitro* exposées à des concentrations croissantes en Al. Les rapport GalA/Rha, excepté pour les tiges du modèle *in vitro* et les racines des Arb11, diminuent dans la plupart des cas, témoignant de structures pectiques davantage ramifiées et plus riches en rhamnoglacturonanes.

En augmentant la concentration de l'Al dans le milieu de culture *in vitro*, les chaînes latérales des structures rhamnoglacturonanes sembleraient être plus riches en Ara, Xyl et Gal dans les parties aériennes. Par exemple, les proportions d'Ara augmentent de 23 à 25 %, de Xyl de 3 à 6 % et de Gal de 12 à 15 % dans les tiges en comparant les plantules témoins aux plantules à 1 mM  $AlCl_3$  (Figures 59 et 60). Dans les racines, une légère augmentation de la proportion de Gal (de 14 à 15 %) et de Xyl de (3,5 à 5 %) a été observée (Figure 58).

Ces tendances n'ont pas été observées dans les fractions PHM chez les PI2 et les Arb11. En effet, les variations de la composition monosaccharidique des PHM dans ces deux modèles ne peuvent pas être corrélées à l'évolution des teneurs en Al des sols sur lesquels se sont développées les plantes de sapins de Douglas. Afin de bien comprendre la tendance des teneurs en monosaccharides dans ces conditions, il serait intéressant d'élargir la gamme des sols sur lesquelles les PI2 et les Arb11 seraient plantées, et reproduire les mêmes dosages sur des plantes de sapins de Douglas exposées à un sol naturel, moins acide et moins riche en Al que  $S_D$  et  $S_{PS}$ , comme le sol non planté (4) (Figures 72 et 73). Des essais de germination de graines de sapin de Douglas sur le sol (4) ont été effectués afin d'obtenir un modèle PI2 dans les conditions de ce sol. Les essais ont débuté décembre 2019, les délais de germination

ont été plus longs de d'habitude (germination homogène en 15 jours), la majorité des graines restaient sous le sol jusqu'à leur contamination. Le nombre de plantules obtenu ne s'avère pas suffisant afin d'assurer la totalité des expérimentations.

Ainsi, les pectines PHM seraient moins représentées au sein de la paroi lorsque les plantes subissent un stress aluminique, et l'augmentation de leur ramification pourrait générer un réseau pectique plus dense ralentissant la diffusion de l'Al au sein de la paroi.

Suite à l'exposition à l'Al, deux stratégies s'avèrent donc complémentaires au niveau des pectines afin de limiter l'entrée de l'Al<sup>3+</sup> à l'intérieur de la cellule :

- La diminution de la fraction PHM accompagnée d'une augmentation de la fraction PFM favoriserait la fixation de l'Al<sup>3+</sup> aux groupes carboxyle chargés négativement de pectines non méthylestérifiées ;
- L'augmentation du degré de ramification dans la fraction des PHM, rendrait moins disponibles les acides galacturoniques non méthylestérifiées, dans le contexte d'une stratégie d'exclusion de l'Al à l'extérieur de la paroi.

Un autre phénomène contribuant potentiellement au piégeage pariétal de l'Al est basé sur la diminution du DME des fractions pectiques. Ce phénomène a été observé pour les fractions extraites des racines des plantules *in vitro* suite au traitement à l'AlCl<sub>3</sub> et suggère que le stress aluminique provoque une augmentation de la déméthylesterification, qui permet d'obtenir plus de fonctions carboxylate, et donc des pectines plus acides ayant une plus grande capacité à lier l'Al<sup>3+</sup> renforçant la stratégie de chélation de l'Al dans la paroi cellulaire (Yang *et al.*, 2008). En comparant deux variétés de riz Yang et ses collaborateurs (2008) ont démontré une élévation de l'activité PME suite au traitement à l'AlCl<sub>3</sub> et donc un degré de méthylestérification plus faible de la pectine au niveau des pointes racinaire de la variété sensible à l'Al. Dans ce cas, l'Al serait plus fortement lié aux parois cellulaires par rapport à la variété tolérante à l'Al.

Pour ce qui concerne les hémicelluloses, les évaluations quantitatives des fractions extraites montrent une tendance à l'augmentation des HC NaOH pour la plupart des organes des plantes cultivées sur sol forestier quand celles-ci sont exposées à des sols acides plus riches en Al phytodisponible comparé aux cultures sur terreau. Cette tendance n'est pas observée chez les plantules cultivées *in vitro*.

La composition monosaccharidique des HC NaOH évolue de façon similaire dans les racines, tiges et épines des plantules *in vitro*, essentiellement en termes de contenus en Glc et Gal dont les proportions augmentent légèrement en comparant les plantules témoins à celles exposées à 1 mM AlCl<sub>3</sub> et de Xyl et Man donc les proportions diminuent dans les mêmes conditions. Il est cependant moins évident de corrélérer les variations des monosaccharides dosés dans les fractions HC NaOH dans le cas des PI2 et Arb11.

Concernant la fraction HC KOH, son évaluation quantitative ne montre pas de corrélation avec l'augmentation de la teneur en Al dans le substrat de culture. Sa proportion est souvent stable, mais elle diminue dans les épines des Arb11 et augmente dans les racines des PI2. De point de vue qualitatif, dans les trois organes des plantules *in vitro*, une diminution de la proportion en Glc (de 18 à 10 % entre condition témoin et 1 mM AlCl<sub>3</sub> dans les racines) ainsi qu'une augmentation de Gal (de 4 à 8 % entre condition témoin et 1 mM AlCl<sub>3</sub> dans les racines) et Xyl (de 20 à 22 % entre condition témoin et 1 mM AlCl<sub>3</sub> dans les racines) ont été observées. De plus, les proportions de GalA augmentent légèrement avec l'augmentation de la concentration

d'Al dans le milieu. Ce monosaccharide qui n'entre pas dans la composition et la structure des hémicelluloses, pourrait provenir de résidus de pectines PHM et PFM inefficacement extraites par l'eau chaude et l'oxalate d'ammonium ou de la présence de protopectines, non extractibles par les protocoles mis en place, mais en présence d'acide.

Chez les PI2, une augmentation de Xyl et une diminution d'Ara ont surtout été notées au niveau des fractions HC KOH dans les parties aériennes des plantules *in vitro*. Les variations de la composition monosaccharidique des HC KOH dans les différents organes des Arb11 ne sont toujours pas corrélées à la variation des teneurs d'Al dans les sols utilisés.

L'analyse qualitative de ces deux fractions, est en accord avec (Astier *et al.*, 2014) et (Winandy et Morrell, 1993) qui précisent la nature chimique de ces deux catégories d'hémicelluloses chez le sapin de Douglas : les arabinoglucuronoxylanes extraits à la potasse et glucogalactomannanes extraits à la soude. Ces extractions ne sont toutefois pas tout à fait sélectives d'une famille particulière d'HC, vu les teneurs non négligeables d'autres monosaccharides dans les deux fractions (surtout Gal et Glc dans HC KOH, et Ara, Xyl et GalA dans HC NaOH).

Précédemment, les modifications de la composition pariétale en réponse à un stress métallique, et aluminique en particulier, ont été évaluées sur d'autres modèles ou pour d'autres éléments métalliques. Tout d'abord, chez le sapin de Douglas, si à notre connaissance aucune étude n'a été menée sur les variations de composition pariétale en réponse à l'exposition à l'Al, une étude réalisée au laboratoire sur un modèle proche des Arb11 mais en condition d'exposition au Cd a été effectuée. L'exposition des jeunes arbres de sapin de Douglas à des sols contaminés au Cd a montré une diminution significative de la proportion de Gal A en même temps qu'une stabilité des proportions de Rha (donc une diminution du rapport GalA / Rha), reflétant ainsi une augmentation de la proportion de structures pectiques ramifiées (Astier *et al.*, 2014). De plus, les DME estimés indiquaient que des concentrations élevées de Cd dans le sol provoquaient une diminution du DME de la fraction PFM et par conséquent, les interactions des pectines avec les éléments traces métalliques pourraient être augmentées. Le sapin de Douglas développerait ainsi une stratégie d'accroissement des capacités d'adsorption.

Pour ce qui concerne d'autres modèles végétaux en condition de stress aluminique cette fois, il a été montré que l'exposition de la plante de potiron (*Cucurbita maxima*) cultivée en hydroponie et exposée à 1 mM  $AlCl_3$  pendant 6 heures augmente la teneur en sucres totaux de la fraction pectique et la fraction hémicellulosique de la pointe racinaire (Van *et al.*, 1994). Chez *Zea mays* une augmentation du contenu pectique de la paroi cellulaire a aussi été observée (Schmohl et Horst, 2000) en réponse à l'Al. Cette tendance a également été enregistrée pour *Solanum tuberosum* (Marienfeld *et al.*, 2000; Schmohl *et al.*, 2000). L' $Al^{3+}$  provoquerait surtout une augmentation de la fraction PFM dans le cadre de la mise en place d'un mécanisme de tolérance, puisque, la liaison principale d' $Al^{3+}$  dans la paroi cellulaire pourrait être la matrice pectique, avec ses groupes carboxyliques chargés négativement, limitant ainsi la pénétration de l'Al dans la cellule (Delhaize *et al.*, 2007; Eticha *et al.*, 2005). Cette stratégie de tolérance repose sur le fait que l'affinité de l' $Al^{3+}$  aux groupements acides de la paroi soit plus forte que celle du  $Ca^{2+}$ . Par ailleurs, certaines études ont montré qu'une augmentation du niveau de pectines faiblement méthylestérifiées et du contenu hémicellulosique suite à une exposition à l'Al est plutôt caractéristique de plantes sensibles à l'Al (Amenós *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Les plantes plus résistantes opteraient pour

une stratégie de d'exclusion par libération de l' $\text{Al}^{3+}$  *via* les exsudats racinaires dans la rhizosphère. Chez le riz (*Oryza sativa*), le contenu pariétal en polysaccharides au niveau des racines (pectines et hémicelluloses) s'est révélé significativement plus élevé chez la variété sensible à l'Al que chez celle tolérante, même en absence d'Al.

Plusieurs études ont rapporté que le métabolisme des hémicelluloses est plus sensible au stress aluminique. Par exemple, Tabuchi et Matsumoto, (2001) ont constaté que l'exposition d'une variété de blé (*Triticum aestivum*) sensible à l'Al à 10  $\mu\text{M}$  d'Al pendant 6 heures entraînait l'accumulation des hémicelluloses mais pas des pectines. Dans le cas du riz (*Oryza sativa*), le changement le plus significatif de la composition pariétale suite à une exposition à 50  $\mu\text{M}$  Al consistait en l'augmentation de la fraction hémicellulosique (Yang *et al.*, 2008). Dans les travaux de Zhu *et al.*, (2012) sur une variété d'*Arabidopsis* hautement résistante à l'Al, la faible accumulation d'Al dans les parois cellulaires a été liée à la faible teneur en xyloglucane. Le xyloglucane est potentiellement responsable de la fixation de l' $\text{Al}^{3+}$  au niveau des hémicelluloses de la paroi cellulaire (Zhu *et al.*, 2014). Dans ce contexte, une réduction significative de la O-acétylation du xyloglucane a été observée au niveau des racines après 6 h de traitement des plantules d'*Arabidopsis* à l'Al. Selon Zhu et ses collaborateurs (2014), les plantes ayant une activité O-acétyltransférase plus faible (par conséquent une O-acétylation inférieur) pourraient entraîner une accumulation plus importante d'Al dans la paroi cellulaire. L' $\text{Al}^{3+}$  serait donc capable de se lier aux groupements OH du xylose potentiellement par des liaisons de coordination.

Pour expliquer l'implication des hémicelluloses dans l'accumulation de l'Al, il a été proposé que l'Al inhiberait l'action de la xyloglucane endotransglucosylase qui joue un rôle important dans l'élongation cellulaire et le remodelage de la paroi. L'extension de la paroi cellulaire nécessite le clivage du squelette xyloglucane et la reformation de chaînes de xyloglucane plus longues. C'est justement le rôle principal de la XET. L'accumulation de polysaccharides hémicellulosiques est donc liée à l'inhibition de l'activité XET par l'Al, qui entraînerait l'inhibition de ces processus de clivage et la recombinaison de chaînes de xyloglucane (Yang *et al.*, 2011) ce qui pourrait donc ralentir l'élongation cellulaire.

Ces résultats suggèrent que l'Al cible très probablement plusieurs sites simultanément, et le principal composant de sa liaison à la paroi n'est toujours pas identifié. Dans l'objectif de compléter notre étude sur les conséquences du stress aluminique sur la structure et la composition des parois cellulaires, et renforcer les hypothèses émises, il serait judicieux de :

- Mesurer et évaluer les DME des extraits pectiques du reste des organes des plantules *in vitro*, et dans les modèles sous serre ;
- et suivre l'expression et l'activité d'autres enzymes (comme la XET) impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides, et dans les modifications des structures pariétale.

Afin de faire suite aux résultats obtenus sur les modifications de la composition polysaccharidiques suite à une exposition du sapin de Douglas à l'Al, un dosage de l'Al a été effectué sur chacune des fractions polysaccharidiques de la paroi cellulaire. Les proportions d'Al retenu par PHM, PFM, HC KOH et HC NaOH de chaque organe par rapport à l'Al dosé dans les racines, tiges et épines sont représentées dans les tableaux 17 et 18.

**Tableau 17** : Pourcentage d'Al retenu par les différentes fractions polysaccharidiques par rapport à la quantité accumulée par chaque organe des plantules de sapin de Douglas *in vitro* exposées au milieu témoin et au milieu à 1 mM AlCl<sub>3</sub>

Conditions de culture	Fraction polysaccharidique	Racines	Tige	Epines
Témoin	PHM	11	11,5	12
	PFM	11,5	11,2	11,5
	HC KOH	11	18,3	12,3
	HC NaOH	12,3	13	23,3
1 mM AlCl <sub>3</sub>	PHM	16	10	9
	PFM	17	14	11
	HC KOH	21	22	25
	HC NaOH	20	26	23

**Tableau 18** : Pourcentage d'Al retenu par les différentes fractions polysaccharidiques par rapport à la quantité accumulée par chaque organe des plantules de sapin de Douglas sous serre exposées au terreau commercial et au S<sub>PS</sub>

	Fraction polysaccharidique	Racines	Tige	Epines
Terreau commercial	PHM	6	11,5	11,9
	PFM	20	15,8	15,3
	HC KOH	19	16,3	17,7
	HC NaOH	20,5	10,7	12,6
S <sub>PS</sub>	PHM	6	6	13
	PFM	22	13	23
	HC KOH	33	29	21
	HC NaOH	13	21	5

Les fractions les plus riches en Al sont les fractions hémicellulosiques HC KOH et HC NaOH pour les plantules *in vitro*, suivies de la fraction PFM que ce soit pour les plantules témoins, ou celles exposées à 1 mM AlCl<sub>3</sub>. Dans le modèle PI2, sur terreau commercial ou sur S<sub>PS</sub>, la fraction retenant la majorité de l'Al reste la fraction HC KOH, suivie de façon équivalente des fractions PFM et HC NaOH.

En plus des pectines, le rôle des hémicelluloses dans le piégeage de l'Al<sup>3+</sup> a souvent été rapporté. Yang *et al.*, (2011), ont comparé la teneur en Al dans différents composants pariétaux de différentes espèces végétales, y compris les monocotylédones (blé et riz) et les dicotylédones (sarrasin, haricot et riz), et ont constaté que la majorité d'Al résidait dans la fraction HC KOH. Cependant, dans les travaux de Yang et ses collaborateurs (2011), le protocole d'extraction des polysaccharides de paroi afin d'y doser l'Al consiste à extraire la fraction pectique à l'eau chaude, et extraire ensuite les fractions hémicellulosiques avec deux solutions de KOH à deux concentrations différentes. Le choix de l'extraction des pectines uniquement à l'eau chaude a été fait après avoir conclu que :

- Les teneurs en acide uronique dans les différentes fractions pectiques extraites séparément avec de l'eau chaude, et à l'oxalate d'ammonium n'étaient significativement pas différentes ;
- L'oxalate est capable de chélater, en plus du Ca<sup>2+</sup>, l'Al<sup>3+</sup> lié aux structures pectiques, mais aussi aux autres polysaccharides de la paroi comme les hémicelluloses.

Il reste à noter que, le choix de Yang et ses collaborateurs (2011), n'est toutefois pas renforcé par un dosage du DME dans les fractions pectiques extraites séparément à l'eau chaude et à

l'oxalate d'ammonium qui pourrait donner plus de précisions sur la nature des pectines extraites par chaque protocole.

Dans le cas de notre étude, et si on considère la capacité de l'oxalate d'ammonium à chélater l' $\text{Al}^{3+}$  autant que le  $\text{Ca}^{2+}$ , il serait possible que l'Al dosé dans la fraction extraite à l'oxalate d'ammonium ne serait pas forcément associé aux PFM, mais aussi aux HC. Une surestimation de la quantité d'Al dans les fractions PFM est alors probable.

Chez des plantes d'*Arabidopsis* exposées à 50  $\mu\text{M}$  d'Al pendant 24h, environ 20% de l'Al accumulé dans la paroi cellulaire a été retrouvé dans la fraction pectique, contre environ 75% dans la fraction HC KOH. Ces résultats, démontrent clairement que les HC KOH, comme les autres composants de la paroi cellulaire, ont également une grande capacité à accumuler l'Al. Il a donc été proposé que l'Al cible facilement les hémicelluloses et inhibe l'activité XET mettant en jeu un processus de régulation transcriptionnelle, qui est décrit par (Zhu *et al.*, 2014) comme le principal phénomène responsable de l'inhibition de la croissance des racines induite par l'Al chez *Arabidopsis*.

Selon Jones et Ryan, (2017), plus de 95 % de l'Al associé aux racines est lié à la paroi cellulaire et la majorité de cet Al s'accumule dans la fraction hémicellulosique.

Dans notre étude, les résultats collectés permettent de conclure que ce sont les fractions hémicellulosiques essentiellement extractibles à la potasse qui semblent contribuer le plus à la rétention de l'Al par rapport aux fractions pectiques faiblement méthylestérifiées.

#### **IV.3.1.2. Régulation enzymatique de la modification des polysaccharides de la paroi en réponse au stress aluminique**

Nos résultats ont montré chez les plantules de sapin de Douglas (*in vitro* et sous serre) que l'Al n'a pas eu d'effet sur la teneur en protéines pariétales quel que soit l'organe considéré (Figures 67 et 97 respectivement). Cependant, l'activité de la pectine méthyl estérase, protéine clé de la modification de l'acidité des domaines de type HG des pectines et donc du processus de séquestration de l'Al, est affectée en fonction de l'intensité du stress aluminique (Bordenave, 1996) (Figures 68 et 98 respectivement).

Dans la littérature, il est souvent reporté que les modifications observées au niveau des fractions pectiques, essentiellement leur DME, sont le résultat de la régulation de l'activité enzymatique des PME : En catalysant la déméthylestérification des acides galacturoniques méthylestérifiés, l'activité de cette enzyme conduit à la régénération de fonctions acides carboxylique capables de fixer et d'interagir avec les  $\text{Al}^{3+}$ .

Nos résultats obtenus sur des plantules cultivées *in vitro* ont montré une forte stimulation de l'activité PME en réponse à une concentration de 1 mM en  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu comparé au témoin. Cette activité est doublée dans les racines (de 4,5 à 9 nKatal.mg<sup>-1</sup> Protéine respectivement) et triplée dans les tiges (4,3 à 13 nKatal.mg<sup>-1</sup> Protéine). Cependant, cette activité reste inchangée dans les épines quelle que soit la condition de culture. Dans le cas des plantules sous serre, l'activité PME a tendance à être plus importante quel que soit l'organe (résultat significatif dans les racines et les épines, contrairement aux tiges) chez les plantules cultivées sur sols forestiers comparé à celles sur cultivées sur terreau. Pour les jeunes arbres âgés de 4 ans, l'analyse n'a pas pu être effectuée en raison de difficultés d'extraction des protéines sur ce type de modèle où les tissus plus lignifiés constituent un matériel où les rendements d'extraction en protéines s'avèrent faibles.



Avec cette augmentation de l'activité PME dans les racines et les tiges, les plantules pourraient ainsi développer des pectines pariétales plus riches en HG à faible DME et donc favoriser la fixation de l'Al au niveau pariétal, la paroi cellulaire étant un lieu de stockage préférentiel de l'Al pour différentes espèces végétales (Yang *et al.*, 2008). Ce résultat a été confirmé par la diminution du DME observée dans les racines des plantules *in vitro* quand exposées à 500  $\mu\text{M}$  et 1 mM  $\text{AlCl}_3$ .

Tout d'abord, l'hypothèse d'une action directe de l'Al sur l'activité de la PME pourrait être envisagée. Ainsi, il a été montré que les cations renforceraient l'activité des PME et que les cations trivalents seraient plus efficaces que les cations bivalents et monovalents (Micheli, 2001; Schmohl *et al.*, 2000). Selon Schmohl et ses collaborateurs (2000), une interaction entre l'Al, les pectines et l'enzyme PME est responsable de l'augmentation de l'activité PME sous stress aluminique. Il a été démontré que la PME liée à la paroi cellulaire *via* un cation est plus active que la PME soluble (Schmohl *et al.*, 2000). L'aluminium, en se liant à la PME, pourrait assurer sa stabilité dans l'apoplasme en liant les charges négatives de l'enzyme à la matrice de la paroi cellulaire, augmentant ainsi l'activité enzymatique.

De plus, une stimulation de l'expression des gènes codant pour des PME pourrait être à l'origine de cette régulation de la PME (Brunner et Sperisen, 2013; El-moneim *et al.*, 2014). Dans les travaux de El-Moneim *et al.*, (2014), une réduction de l'expression du gène ScPME chez une variété de seigle (*Secale cereale* L.) tolérante à l'Al a été observée. Cette expression a été plutôt augmentée dans la variété sensible. Chez les plantules de maïs, plusieurs gènes agissant sur la structure de la paroi cellulaire présentent une expression régulée sous stress aluminique. La PME a été régulée à la hausse chez deux génotypes de maïs (tolérant et sensible à l'Al) après 2 h de traitement à 140  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Maron *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère une régulation de la transcription de gènes codant pour des PME en réponse à l'Al.

#### **IV.3.2. Stratégies mises en place au niveau intracellulaire**

Les processus extracellulaires de chélation sont souvent accompagnés de processus intracellulaires de détoxification.

L'Aluminium échappant aux mécanismes d'exclusion et de chélation à la paroi, rentre à l'intérieur de la cellule, perturbe les diverses voies métaboliques et induit un stress oxydatif conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont à l'origine de nombreux dommages cellulaires, voire la mort cellulaire. La réponse des plantules face au stress oxydatif a été étudiée, notamment à travers l'évaluation de l'activité de la GPox, une enzyme clé dans la réduction des teneurs en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ROS le plus stable) et de la teneur en molécules connues pour jouer un rôle de défense contre l'oxydation, notamment la proline.

L'activité GPox a doublé dans tous les organes des plantules de sapin de Douglas exposées à 1 mM  $\text{AlCl}_3$  en conditions *in vitro* (figure 67). Des concentrations croissantes d' $\text{Al}^{3+}$  dans le milieu de culture de plants de riz (*Oryza sativa*) ont entraîné une augmentation considérable de l'activité GPox dans les racines et les parties aériennes (Sharma et Dubey, 2007). Les plantules traitées avec 160  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  pendant 15 jours ont montré une augmentation de l'activité GPox d'environ 26 à 76% dans les différents organes. Les mêmes tendances ont été reportées dans les racines de la camomille sauvage (*Matricaria chamomilla*) exposée à 60  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Kováčik *et al.*, 2010).

Le rôle des GPox est par conséquent primordial dans l'élimination de l'excès de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit dans des conditions de toxicité aluminique (Verma et Dubey 2003). Le sapin de Douglas répond de façon similaire au stress aluminique.

Pour ce qui concerne la proline, une accumulation significative (de plus que 60 %) de cet acide aminé notamment dans les tiges (entre 200 µM et 1 mM AlCl<sub>3</sub>) et les épines (entre témoin et 1mM AlCl<sub>3</sub>) des plantules *in vitro* exposées à 1 mM AlCl<sub>3</sub> a été observée (Figure 68). Cette accumulation peut être considérée comme un biomarqueur de tolérance chez les plantules de sapin de Douglas étudiées. Dans la littérature, d'autres plantes ont précédemment été décrites pour leur capacité à accumuler plus de proline en condition de stress aluminique. C'est le cas de la canne à sucre où une augmentation de 58 % de la teneur en proline a été induite dans les feuilles suite à une exposition à une concentration de 45 µM en AlCl<sub>3</sub>. Cette augmentation est de 75 % chez les plantes exposées à 444 µM AlCl<sub>3</sub> (Mantovanini *et al.*, 2019). Des résultats équivalents ont été aussi obtenus chez le maïs (Khan *et al.*, 2000), le sorgho (Zaifnejad *et al.*, 1997) et le haricot (Nahar *et al.*, 2017).

La proline semble en effet être un élément clé dans la réponse au stress métallique car la littérature fait souvent mention de la diversité de ses rôles comme la contribution à l'ajustement osmotique (Yamchi *et al.*, 2005) et sa capacité à piéger des espèces réactives de l'oxygène en excès pour protéger notamment les cellules (Ben Rejeb *et al.*, 2014). La proline pourrait donc favoriser la tolérance des plantules de sapin de Douglas à l'Al, probablement grâce à son rôle antioxydant mais aussi d'agent potentiellement chélatant de l'Al.

Les TNP correspondent principalement au glutathion, un composé anti-oxydant, et aux phytochélatines, des molécules capables de fixer les cations (Bonet *et al.*, 2016a). Les résultats ont montré que la teneur en TNP n'était pas modifiée dans les racines après exposition à l'Al. Ce résultat suggère que ces composés ne seraient pas impliqués dans la défense contre l'Al chez le sapin de Douglas.

Au niveau de la partie aérienne, deux phénomènes différents ont été notés : une augmentation des teneurs en thiols non protéiques dans les tiges à partir de 200 µM AlCl<sub>3</sub>, contre une diminution de ces teneurs au niveau des épines. Il est donc possible que la synthèse du TNP soit stimulée de manière transitoire dans les tiges des plantules de sapin de Douglas en réponse à l'exposition à l'Al, mais ces composés ne seraient donc pas responsables de la prise en charge et du transport de l'Al vers les épines. Il serait donc judicieux de vérifier si la complexation et le transport de l'Al chez le sapin de Douglas seraient effectués par d'autres ligands comme les acides organiques (malate, oxalate, citrate) ou les polyamines (putrescine, spermidine, spermine). Les TNP sont souvent impliqués dans les mécanismes de réponse au stress oxydatif induit par le Cd, ceci est traduit par une diminution de la quantité en glutathion réduit et une chélation du cation Cd<sup>2+</sup> par les phytochélatines (Loix *et al.*, 2017).

Une quantification des espèces réactives de l'oxygène et un suivi d'autres activités enzymatiques anti-oxydantes comme celle des superoxyde dismutases (SOD), de la catalase (CAT), de diverses peroxydases comme l'ascorbate peroxydase (APX) ou de la glutathion peroxydase (GPX) pourrait permettre compléter ces travaux et évaluer le niveau de stress et les capacités de défense du sapin de Douglas dans des conditions de stress aluminique.

Comme il a été souvent reporté, la toxicité aluminique surproduit les ROS et cause des dommages oxydatifs aux composants cellulaires et également aux pigments photosynthétiques (Nahar *et al.*, 2017). Dans notre étude, la teneur en pigments photosynthétiques (chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes) a diminué de manière

notable, indiquant des dommages induits par l'Al : à partir de 1 mM pour la chlorophylle a et à partir de 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  pour la chlorophylle b et les caroténoïdes.

Une diminution de la concentration de caroténoïdes a été aussi révélée suite à un traitement à 100  $\text{mg. L}^{-1}$  chez deux clones de pomme de terre sensibles à l'Al (Tabaldi *et al.*, 2007). Les caroténoïdes étant des pigments de la photosynthèse et des composés protecteurs contre les dommages oxydatifs, cette diminution pourrait être à l'origine d'une inefficacité de la détoxification des ROS et donc des différents symptômes de toxicité. Également, il a été souvent reporté que l'Al affecte la photosynthèse en réduisant les teneurs en chlorophylle dans les feuilles des plantes. Une diminution de la teneur en chlorophylle a été signalée dans les agrumes, le sorgho et l'orge suite à un traitement à l'Al (Chen *et al.*, 2010). De plus, le stress aluminique a provoqué une réduction de l'expansion foliaire, une fermeture stomatique et une réduction de la photosynthèse des feuilles (Panda *et al.*, 2009).

Cette diminution est expliquée par le fait qu'en présence d'Al, l'enzyme responsable de la formation de la molécule de chlorophylle ainsi que le processus de sa synthèse sont inhibés (Mukhopadyay *et al.*, 2012). Ceci est surtout corrélé aux carences en éléments nutritifs provoquées par la toxicité aluminique, notamment en magnésium, le magnésium étant un élément essentiel de la structure des chlorophylles.

## Conclusion

---

La France est le premier pays Européen producteur de sapin de Douglas, cet arbre qui représente la première essence résineuse de la région Limousin. Grâce aux propriétés mécaniques intéressantes de son bois, le sapin de Douglas est d'un grand intérêt économique et industriel. Cependant, les forêts de résineux sont connues pour leur capacité à acidifier les sols forestiers. Des pH du sol inférieurs à 5,5 sont à l'origine d'une solubilisation de l'aluminium du sol qui se trouve alors sous une forme mobile ( $\text{Al}^{3+}$ ), très réactive, biodisponible et toxique pour les plantes. Le développement des deux approches phénotypique et biochimique a permis de caractériser une partie des réponses du sapin de Douglas au stress aluminique en utilisant trois modèles d'étude du sapin de Douglas obtenus dans des conditions de culture différentes :

- Plantules de sapin de Douglas cultivées pendant 2 mois dans des conditions contrôlées *in vitro* ;
- Plantules de sapin de Douglas cultivées pendant 2 mois dans des conditions semi contrôlées sous serre sur sols forestiers ;
- Jeunes arbres de sapin de Douglas âgées de 3 ans, cultivés pendant 11 mois dans des conditions semi contrôlées sous serre sur sols forestiers.

Du point de vue morphologique, quel que soit le modèle de sapin de Douglas utilisé, les résultats montrent que l'exposition à l'Al inhibe sa croissance. Grâce à l'établissement d'une gamme de concentration croissante en  $\text{AlCl}_3$  dans le milieu de culture (conditions *in vitro*), le seuil de tolérance à partir duquel des symptômes de retard de croissance sont observés est défini à une concentration en  $\text{AlCl}_3$  de  $500 \mu\text{M}$ . Ainsi, les plantules exposées pendant deux mois à  $200 \mu\text{M AlCl}_3$ , présentent une croissance équivalente à celle des plantules témoin avec une faible diminution de la masse sèche des racines et tiges. Pour caractériser les réponses du sapin de Douglas dans un contexte plus proche des conditions naturelles, des prélèvements de sols forestiers ont été réalisés pour y cultiver des plantules et des jeunes arbres. Ces sols prélevés sur une plantation de sapin de Douglas ( $S_D$ ) ou sur une plantation de Pin sylvestre ( $S_{PS}$ ), présentent naturellement des teneurs en Al potentiellement phytodisponible de  $0,864 \text{ mg Al.g}^{-1}$  et  $1,24 \text{ mg Al.g}^{-1}$  avec des pH de 5,31 et 4,73 respectivement. Quel que soit les modèles considérés (plantules ou jeunes arbres) une inhibition de la croissance est constatée notamment en termes de masse sèche par rapport à ceux cultivés sur un substrat de culture de type terreau commercial considéré comme condition témoin. Il conviendrait de compléter cette étude par des analyses de plantules cultivées sur un sol prélevé sur une parcelle non cultivée (désignée « sol nu ») pour vérifier si les réponses enregistrées sont bien dues à la teneur en Al phytodisponible. En effet, le « sol nu » présente une teneur en Al moindre et une acidité moins marquée. Il constituerait un témoin plus pertinent que le terreau commercial. Des premiers essais sont en cours et mériteraient d'être poursuivis.

En plus de l'inhibition de l'élongation racinaire précédemment décrite, le dosage de l'Al couplé aux techniques de microscopie électronique à balayage en mode environnemental et de microscopie confocale ont montré que les racines :

- Accumulent la majorité de l'Al absorbé par la plante dans les parois cellulaires de ses tissus

- Présentent des altérations de l'aspect de leurs pointes et de leur organisation cellulaire quand les racines sont exposées aux teneurs élevées en Al.

Ces altérations peuvent expliquer les perturbations observées de la distribution dans le reste de la plante des éléments minéraux essentiels pour sa croissance notamment le Ca, Mg et K. En effet, les perturbations de l'apport en minéraux peuvent impacter les processus métaboliques essentiels comme la photosynthèse (exemple : Mg et chlorophylle) et donc réduire la croissance. Ceci a été confirmé par la diminution de la teneurs en pigments photosynthétiques chez les plantules exposées à  $AlCl_3$  *in vitro*. La caractérisation d'autres paramètres physiologiques sont actuellement à l'étude au laboratoire comme la teneur en sucres ou en protéines.

Les travaux se sont orientés vers l'étude des différents processus mis en place par le sapin de Douglas afin de maintenir sa croissance en limitant les conséquences de son exposition à un environnement riche en aluminium, notamment les modifications au niveau de la paroi cellulaire, le site potentiel de l'accumulation et de l'exclusion de l'Al.

Ainsi, des modifications de la composition de la paroi cellulaire des différents modèles de sapin de Douglas exposés aux teneurs toxiques d'Al sont observées. En effet, que ce soit *in vitro* ou sur sols forestiers, les teneurs en pectines faiblement méthylestérifiées s'avèrent plus abondantes dans les parois des plantes soumises à un stress aluminique, elles sont plus riches en acide galacturonique et sont potentiellement moins ramifiées. A l'inverse, les teneurs en pectines hautement méthylestérifiées sont moins élevées au sein de la paroi des plantes subissant un stress aluminique, et celles-ci seraient davantage ramifiées. Il est donc possible de conclure à l'existence de deux stratégies complémentaires au niveau des pectines afin de limiter l'entrée de  $Al^{3+}$  à l'intérieur de la cellule :

- une diminution de la fraction PHM accompagnée d'une augmentation de la fraction PFM favoriserait la fixation de  $Al^{3+}$  aux groupes carboxyle chargés négativement de pectines non méthylestérifiées,
- une augmentation du degré de ramification dans la fraction des PHM qui rendrait moins disponibles les acides galacturoniques non méthylestérifiées dans le contexte d'une stratégie d'exclusion de l'Al à l'extérieur de la paroi.

Les dosages biochimiques montrent que l'Al ne modifie pas les teneurs en protéines pariétales totales. En revanche la synthèse de certaines protéines comme les PME est stimulée. Les PME, étant responsables de la déméthylestérification des acides galacturoniques des pectines, la stimulation de leur activité faciliterait la séquestration de  $Al^{3+}$  au niveau des fonctions acide carboxylique et expliquerait les modifications observées précédemment dans les fractions pectiques. La diminution du DME enregistrée pour toutes les fractions pectiques extraites de racines des plantules cultivées *in vitro* constitue une première confirmation de ce phénomène.

Pour la suite, il faudrait approfondir l'étude de la synthèse et de la modification des composants de la paroi cellulaire. La détermination du degré de méthylestérification des fractions pectiques par IR est à poursuivre sur les organes aériens. Il permettra de préciser si la modification du caractère acide des pectines et donc de leur capacité à s'associer à  $Al^{3+}$  au niveau des structures en « boîte à oeufs » des homogalacturonanes peut être généralisée à l'ensemble de la plante. Aussi, une étude d'autres enzymes que la PME, dont les rôles sont associés à la biosynthèse des pectines comme par exemple la galacturonosyl-transférase, largement impliquée dans la biosynthèse des domaines HG des pectines, s'avèrerait intéressante.

En plus des pectines qui représentent au sein de la paroi un site de liaison majeur pour l' $\text{Al}^{3+}$ , les hémicelluloses de la paroi cellulaire apparaissent elles aussi potentiellement impliquées dans l'interaction avec l' $\text{Al}^{3+}$ . En effet, le dosage de l'Al dans les différentes fractions polysaccharidiques de la paroi montre que c'est la fraction hémicellulosique qui retient le plus d'Al.

Si, dans nos conditions expérimentales, la variabilité des teneurs en Al dans le milieu de culture ne semble pas modifier la quantité des hémicelluloses présentes au sein de la paroi, la composition monosaccharidique de ces dernières - essentiellement de type arabinoglucuronoxylanes et glucogalactomannanes - est affectée.

Il serait judicieux d'envisager des expériences complémentaires en mettant l'accent sur la modulation de la composition d'autres composés pariétaux (notamment hémicelluloses et lignines) tout comme de l'activité d'enzymes participant au remodelage de la paroi et/ou aux processus de défense en réponse à l'exposition à l'Al. Malgré la mise en œuvre d'un protocole de dosage colorimétrique de l'activité XET, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des résultats reproductibles. Une optimisation des protocoles tout comme le recours à d'autres techniques (comme par radiochimie et par immunohistochimie) pour assurer une quantification de cette activité enzymatique serait intéressante. La XET est en effet responsable de l'allongement des chaînes d'hémicelluloses pariétales, elle joue donc un rôle majeur dans l'expansion cellulaire, le relâchement ou le renforcement des parois cellulaires.

Au niveau intracellulaire, l'Al franchissant la barrière de la paroi cellulaire induit une augmentation significative de la teneur en proline de plus que 60 % notamment dans les tiges et les épines chez les plantules *in vitro* exposées à 1 mM  $\text{AlCl}_3$  comparé au témoin. Cette accumulation peut être considérée comme un biomarqueur de tolérance chez les plantules de sapin de Douglas étudiées. Cependant, les thiols non protéiques ne semblent pas être impliqués dans les processus de réduction de la toxicité aluminique par complexation car l'augmentation de leur teneur se limite aux tiges. De plus, d'autres composés potentiellement chélateurs de l' $\text{Al}^{3+}$  pourraient être étudiés plus particulièrement. C'est par exemple le cas de certains acides organiques tels que le citrate, le malate et l'oxalate dont l'augmentation de la synthèse a déjà été mise en évidence chez plusieurs espèces végétales en réponse au stress aluminique.

Par ailleurs, le stress aluminique a souvent pour conséquence directe un stress oxydatif que les cellules végétales peuvent minimiser, notamment en produisant des enzymes consommant les ROS. Ainsi, une stimulation de l'activité guaiacol peroxydase responsable de l'élimination de l'excès d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est constatée chez les plantules *in vitro*. Dans ce contexte, une étude sur les mécanismes de production des différents types de ROS (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, anion superoxyde) ainsi qu'une évaluation du système anti-oxydatif mettant en jeu des enzymes (comme les superoxyde dismutase, catalase, ascorbate peroxydase) et métabolites secondaires (glutathion, ascorbate, tocophérol...) serait nécessaire.

La mise en œuvre d'une approche transcriptomique permettrait enfin d'étudier la régulation de l'expression des gènes responsables des modifications quantitatives et/ou qualitatives des constituants pariétaux impliqués dans les stratégies de défense de la plante.

Pour conclure, les approches proposées dans ces travaux, et grâce à la combinaison du modèle *in vitro* aux modèles sous serre sur sols forestiers, contribuent à compléter les connaissances bibliographiques sur les stratégies adaptatives / de tolérance des arbres en

général, du sapin de Douglas en particulier - à un stress par les éléments traces métalliques, l'Al notamment.

## Références bibliographiques

---

- Abdalla, M.M., 2008. Physiological Aspects of Aluminium Toxicity on Some Metabolic and Hormonal Contents of *Hordeum Vulgare* Seedlings. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 2, 549–560.
- Adams, W.T., 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New For.* 6, 217–240. <https://doi.org/10.1007/BF00120646>
- AGRESTE, 2012. Enquêtes annuelles de branches exploitations forestières et scieries. Paris.
- AgroParisTech-ENGREF, 2008. Guide d'utilisation de la carte des pH de surface des sols forestiers français. Umr LERFoB), IFN.
- Ahonen-Jonnarth, U., Van Hees, P.A.W., Lundström, U.S., Finlay, R.D., 2000. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytol.* 146, 557–567. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00653.x>
- Albenne, C., Canut, H., Boudart, G., Zhang, Y., San Clemente, H., Pont-Lezica, R., Jamet, E., 2009. Plant cell wall proteomics: Mass spectrometry data, a trove for research on protein structure/function relationships. *Mol. Plant* 2, 977–989. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp059>
- Alebeek, G.W.M.V.A.N., Scherpenzeel, K.V.A.N., Beldman, G., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2003. Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methyltransferase of *Aspergillus niger* 218, 211–218.
- Alén, R., 2000. Structure and chemical composition of wood, 3rd ed. *Papermaking Science and Technology*.
- Aljos, F., 2010. *A Handbook of the World's Conifers* (2 vols.). Brill. <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/9789047430629>
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1331>
- Amara H., Lelu-Walter M.A., Gloaguen V., Faugeron-Girard C., (2020), Tolerance of Douglas-fir somatic plantlets to Aluminum stress: biological, cytological and mineral studies, *Plants*, 9:536-553
- Amenós, M., Corrales, I., Poschenrieder, C., Illés, P., Baluška, F., Barceló, J., 2009. Different Effects of Aluminum on the Actin Cytoskeleton and Brefeldin A-Sensitive Vesicle Recycling in Root Apex Cells of Two Maize Varieties Differing in Root Elongation Rate and Aluminum Tolerance 50, 528–540. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp013>
- Angelier, A., 2007. *Guide des sylviculteurs : Douglasaies françaises*. Paris.
- Anoop, V.M., Basu, U., McCammon, M.T., McAlister-Henn, L., Taylor, G.J., 2003. Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Synthase. *Plant Physiol.* 132, 2205–2217. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023903>
- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2008. Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin : Application to tomato products 110, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.042>
- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2004. Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase . Application to the Assay of Pectin Methyltransferase. <https://doi.org/10.1021/jf035284w>



- Antonio, M., Ribeiro, Q., Almeida, A.F. De, 2013. ALUMINUM EFFECTS ON GROWTH , PHOTOSYNTHESIS , AND MINERAL NUTRITION OF CACAO GENOTYPES 37–41. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.766889>
- Aquaportail, 2019. Définition de pH du sol [WWW Document]. URL <https://www.aquaportail.com/definition-7851-ph-du-sol.html> (accessed 2.2.20).
- Aran, D., Maul, A., Masfaraud, J., 2008. A spectrophotometric measurement of soil cation exchange capacity based on cobaltihexamine chloride absorbance. *Geoscience* 340, 865–871. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2008.07.015>
- Arroyave, C., Barceló, J., Poschenrieder, C., Tolrà, R., 2011. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning , a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. *J. Inorg. Biochem.* 105, 1477–1483. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.011>
- Astier, C., Gloaguen, V., Faugeron, C., 2014a. Phytoremediation of Cadmium- Contaminated Soils by Young Douglas Fir Trees : Effects of Cadmium Exposure on Cell Wall Composition. *Int. J. Phytoremediation* 16, 790–803. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.856849>
- Astier, C., Gloaguen, V., Faugeron, C., 2014b. Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils by Young Douglas Fir Trees: Effects of Cadmium Exposure on Cell Wall Composition. *Int. J. Phytoremediation* 16, 790–803. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.856849>
- Augusto, L., Bonnaud, P., Ranger, J., 1998. Impact of tree species on forest soil acidification. *For. Ecol. Manage.* 105, 67–78.
- Azinwi Tamfuh, P., Tsozué, D., Tita, M.A., Boukong, A., Ngnipa Tchinda, R., Ntangmo Tsafack, H., Mvondo Ze, A.D., 2017. Effect of Topographic Position and Seasons on the Micronutrient Levels in Soils and Grown Huckleberry (*Solanum scabrum*) in Bafut (North-West Cameroon). *World J. Agric. Res.* 5, 73–87. <https://doi.org/10.12691/wjar-5-2-3>
- Azmat, R., Hasan, S., 2008. Photochemistry of light harvesting pigments and some biochemical changes under aluminum stress. *Pakistan J. Bot.* 40, 779–784.
- B. Neale, D., C. Wheeler, N., W.Allard, R., 1986. Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 16, 1152–1154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/x86-205>
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *J. Plant Nutr.* 13, 1–37. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/01904169009364057>
- Barta, K., Matson, T.D., Fettig, M.L., Scott, S.L., Iretskii, V., Ford, P.C., 2010. Catalytic disassembly of an organosolv lignin via hydrogen transfer from supercritical methanol † 1640–1647. <https://doi.org/10.1039/c0gc00181c>
- Bastien, J., Sanchez, L., Michaud, D., 2013. Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco), in: *Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives. Managing Forest Ecosystems.* Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp. 325–369. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6146-9>
- Batista, M.F., Moscheta, I.S., Bonato, C.M., Batista, M.A., Almeida, O.J.G. de, Inoue, T.T., 2013. Aluminum in corn plants: influence on growth and morpho-anatomy of root and leaf. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 37, 177–187. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832013000100018>
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C., Savouré, A., 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together *Plant Physiology and Biochemistry* How reactive oxygen species and

- proline face stress together. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 278–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>
- Bever, D.N., 1954. Evaluation of factors affecting natural reproduction of forest trees in central western Oregon. State of Oregon.
- Bian, M., Zhou, M., Sun, D., Li, C., 2013. Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. *Crop J.* 1, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2013.08.002>
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., C, D.-F., 2007. Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 1183–1192.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 994–1003.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Blamey, F.P.C., Nishizawa, N.K., Yoshimura, E., 2004. Timing , magnitude , and location of initial soluble aluminum - injuries to Mungbean roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50, 67–76.  
<https://doi.org/10.1080/00380768.2004.10408453>
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 91, 179–194.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative Determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 53, 484–489.
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., Martínez-Estévez, M., 2017. Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. *Front. Plant Sci.* 8, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01767>
- Bonet, A., 2016. Réponses de plusieurs espèces de mélèzes et du sapin de Douglas aux éléments traces Étude de mécanismes de tolérance et des capacités d'accumulation.
- Bonet, A., Lelu-Walter, M.-A., Faugeron, C., Gloaguen, V., Saladin, G., 2016a. Physiological responses of the hybrid larch ( *Larix × eurolepis* Henry ) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8617–8626.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-6094-6>
- Bonet, A., Pascaud, G., Faugeron, C., Soubrand, M., Joussein, E., Gloaguen, V., Saladin, G., 2016b. Douglas fir ( *Pseudotsuga menziesii* ) plantlets responses to As , Pb , and Sb-contaminated soils from former mines. *Int. J. Phytoremediation* 18, 559–566.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1086297>
- Bordenave, M., 1996. Analysis of pectin methyl esterases., in: *Plant Cell Wall Analysis*. Springer, Berlin, pp. 165–180.
- Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., 2011. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2251–2264. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq456>
- Bose, J., Babourina, O., Shabala, S., Rengel, Z., 2010. Aluminum-dependent dynamics of ion transport in *Arabidopsis*: Specificity of low pH and aluminum responses. *Physiol. Plant.* 139, 401–412. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01377.x>
- Bourrié, G., 2018. Les sols au coeur de la zone critique 4: Qualité de l'eau. France.
- Bourrié, G., 1990. Conséquences de l'existence de complexes polynucléaires de Al(III) sur la stabilité des minéraux alumineux: une reconsidération du système gibbsite-kaolinite-quartz. Paris.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 254,

248–254.

- Brautigan, D.J., Rengasamy, P., Chittleborough, D.J., 2012. Aluminium speciation and phytotoxicity in alkaline soils. *Plant Soil* 360, 187–196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1232-5>
- Breemen, N. van, Visser, W.F.J., 1988. Biogeochemistry of an oak-woodland ecosystem in The Netherlands affected by acid atmospheric deposition., in: Pape, T. (Ed.), *Agricultural Research Report*.
- Browne, B.A., McColl, J.G., Driscoll, C.T., 1990. Aluminum Speciation Using Morin: I. Morin and Its Complexes with Aluminum. *J. Environ. Qual.* 19, 65–72. <https://doi.org/https://doi-org.ezproxy.unilim.fr/10.2134/jeq1990.00472425001900010008x>
- Bruce Martin, R., 1986. The Chemistry of Aluminum as Related to Biology and Medicine. *Clin. Chem.* 32, 1797–1806.
- Brunner, I., Luster, J., Günthardt-Goerg, M.S., Frey, B., 2008. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. *Environ. Pollut.* 152, 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.006>
- Brunner, I., Sperisen, C., 2013. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Front. Plant Sci.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00172>
- Buchanan, B.B., Grissem, W., Jones, R.L., 2001. Book reviews: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. *Acta Physiol. Plant.* 58, 185–186. <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0014-0>
- Cairney, J., Pullman, G.S., 2007. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytol.* 176, 511–536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02239.x>
- Cárcamo, M.P., Reyes-díaz, M., Rengel, Z., Alber, M., Omena-garcia, R.P., Nunes-nesi, A., Inostroza-blancheteau, C., 2019. Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47569-8>
- Cassab, G.I., 1998. PLANT CELL WALL PROTEINS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 281–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.281>
- Chatjigakis, A.K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., Polissiou, M., 1998. FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydr. Polym.* 37, 395–408.
- Chen, L.-S., Qi, Y.-P., Jiang, H.-X., Yang, L.-T., Yang, G.-H., 2010. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. *African J. Biotechnol.* 7, 9237–9247.
- Chen, L.S., Qi, Y.P., Smith, B.R., Liu, X.H., 2005. Aluminum-induced decrease in CO<sub>2</sub> assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO<sub>2</sub> assimilation. *Tree Physiol.* 25, 317–324. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.3.317>
- Chen, Z.C., Ma, J.F., 2013. Magnesium transporters and their role in Al tolerance in plants. *Plant Soil* 368, 51–56. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1433-y>
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S.K., 2007. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* <https://doi.org/10.4161/psb.23681>
- Čiamporová, M., 2000. Diverse responses of root cell structure to aluminum stress. *Plant Soil* 226, 113–116. <https://doi.org/10.1023/A>
- Claire, R., 2010. *Le Douglas: un arbre exceptionnel*, (Imprimeri. ed. Association Trifide.

- Clark, R.B., Pier, P.A., Knudsen, D., Maranville, J.W., 1981. Effect of Trace Element Deficiencies and Excesses on Mineral Nutrients in Sorghum 1. *J. Plant Nutr.* 3, 357–374. <https://doi.org/10.1080/01904168109362844>
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove, D.J., 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 171–201. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.171>
- Cuenca, G., Herrera, R., Merida, T., 1991. Distribution of aluminium in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. *Plant, Cell Environ.* 14, 437–441.
- Dahlgren, R.A., Vogt, K.A., Ugolini, F.C., 1991. The influence of soil chemistry on fine root aluminum concentrations and root dynamics in a subalpine Spodosol , Washington State , USA. *Plant Soil* 117, 117–129.
- de Andrade, L.R.M., Barros, L.M.G., Echevarria, G.F., Velho do Amaral, L.I., Cotta, M.G., Rossatto, D.R., Haridasan, M., Franco, A.C., 2011. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environ. Exp. Bot.* 70, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.013>
- de la Goublaye, D., Franclet, A., 1978. Bouturage du Douglas: rétablissement de l'orthotropie.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L. V., 1998. Aluminum Resistance in the Arabidopsis Mutant alr -104 Is Caused by an Aluminum-Induced Increase in Rhizosphere pH . *Plant Physiol.* 117, 19–27. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.19>
- Delhaize, E., Gruber, B.D., Ryan, P.R., 2007. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett.* 581, 2255–2262. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.057>
- Delhaize, E., Ma, J.F., Ryan, P.R., 2012. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends Plant Sci.* 17, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.008>
- Delhaize, E., Ryan, P., 1995. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiol.* 107, 315–321. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8899-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8899-9_10)
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Hebb, D.M., Yamamoto, Y., Sasaki, T., Matsumoto, H., 2004. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene 101, 15249–15254.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Randall, P.J., 1993. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices). *Plant Physiol.* 103, 695–702. <https://doi.org/10.1104/pp.103.3.695>
- Dellus, V., Mila, I., Scalbert, A., Chimle, L. De, Inra, B., Thiverval-grignon, N.A.P., 1997. Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry* 45, 1573–1578. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00245-8)
- Deng, W., Luo, K., Li, D., Zheng, X., Wei, X., Smith, W., Thammina, C., Lu, L., Li, Y., Pei, Y., 2006. Overexpression of an Arabidopsis magnesium transport gene, AtMGT1, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance. *J. Exp. Bot.* 57, 4235–4243. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl201>
- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonens, A.N., Gollack, D., 2001. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to

- stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.* 52, 1969–1980. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.1969>
- Dipierro, N., Mondelli, D., Paciolla, C., Brunetti, G., Dipierro, S., 2005. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminium stress. *J. Plant Physiol.* 162, 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.06.008>
- Doerksen, A.H., Ching, K.K., 1972. Karyotypes in the Genus *Pseudotsuga*. *For. Sci.* 18, 66–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/forestscience/18.1.66>
- Draaf, 2014. Le Plan Pluriannuel Régional de Développement Forestier du Limousin.
- Driscoll, C.T., Schecher, W.D., 1990. The chemistry of aluminum in the environment. *Environ. Geochem. Health* 12, 28–49. <https://doi.org/10.1007/BF01734046>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Durand, T., Bultel-Poncé, V., Guy, A., Berger, S., Mueller, M.J., Galano, J.M., 2009. New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: The phytoprostanes. *Lipids.* <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3351-1>
- Durzan, D.J., Gupta, P.K., 1987. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in douglas-fir cell suspension cultures 52, 229–235.
- Ebringerova, A., Heinze, T., 2000. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties 556, 542–556.
- El-moneim, D.A., Contreras, R., Silva-navas, J., Gallego, F.J., Figueiras, A.M., Benito, C., 2014. Pectin methylesterase gene and aluminum tolerance in *Secale cereale*. *Environ. Exp. Bot.* 107, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.006>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorani, F., Xie, Y., 2015. Plant Defense Response. *Sci. World J.* 7–9. <https://doi.org/10.1155/2015/756120> Review
- Eticha, D., Stass, A., Horst, W.J., 2005. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: Significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell Environ.* 28, 1410–1420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01375.x>
- FAO, 2007. The State of the Food and Agriculture, FAO Agriculture. Rome, Italie.
- Feng, M., Shan, X., Zhang, S., Wen, B., 2005. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat 59, 939–949. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.056>
- Fengel, D., G. Wegener, 1984. Wood—chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin et New York. <https://doi.org/10.1002/pol.1985.130231112>
- Fleischer, A., Neill, M.A.O., Ehwald, R., Fleischer, A., Neill, M.A.O., Ehwald, R., 2015. The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II' 121, 829–838.
- Foy, C.D., 1996. Tolerance of durum wheat lines to an acid, aluminum - toxic subsoil. *J. Plant Nutr.* 37–41. <https://doi.org/10.1080/01904169609365206>
- Foy, C.D., Duncan, R.R., Waskom, R.M., Miller, D.R., 1993. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminum toxic Tatum subsoil. *J. Plant Nutr.* 37–41. <https://doi.org/10.1080/01904169309364517>
- France Douglas, 2012. Le Douglas, un choix naturel pour la construction.
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. CALCIUM OXALATE IN PLANTS: Formation and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>

- Franck, T., Kevers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Deby, C., Greimers, R., Serteyn, D., Debydupont, G., 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite : a controlled stress response. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.003>
- Franco, C.R., Chagas, A.P., Jorge, R.A., 2002. Ion-exchange equilibria with aluminum pectinates. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 204, 183–192. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01134-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01134-7)
- Frankowski, M., 2016. Aluminum uptake and migration from the soil compartment into *Betula pendula* for two different environments : a polluted and environmentally protected area of Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 1398–1407. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5367-9>
- Fry, S.C., 1989. The Structure and Functions of Xyloglucan 40.
- Fung, K.F., Carr, H.P., Zhang, J., Wong, M.H., 2008. Growth and nutrient uptake of tea under different aluminium concentrations. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1582–1591. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène - Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité Chim. 91–96.
- Germain, A., Gagnon, C., Lind, C.B., 1999. Entry and exposure characterization for aluminum chloride, aluminum nitrate, and aluminum sulphate, Document à l' appui du Programme d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire.
- Gorshkova, T.A., Gurjanov, O.P., Mikshina, P. V, Ibragimova, N.N., Mokshina, N.E., Salnikov, V. V, Ageeva, M. V, Amenitskii, S.I., Chernova, T.E., Chemikosova, S.B., 2010. Specific Type of Secondary Cell Wall Formed by Plant Fibers. *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 328–341. <https://doi.org/10.1134/S1021443710030040>
- Grabski, S., Arnoys, E., Busch, B., Schindler, M., 1998. Regulation of Actin Tension in Plant Cells by Kinases and Phosphatases. *Plant Physiol.* 116, 279–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.116.1.279>
- Grabski, S., Schindler, M., 1995. Aluminum Induces Rigor within the Actin Network of Soybean Cells. *Plant Physiol.* 108, 897–901.
- Grisel, N., Zoller, S., Künzli-Gontarczyk, M., Lampart, T., Münsterkötter, M., Brunner, I., Bovet, L., Métraux, J.P., Sperisen, C., 2010. Transcriptome responses to aluminum stress in roots of aspen (*Populus tremula*). *BMC Plant Biol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-185>
- Guibaud, G., Ayele, J., 2000. pH and ionic strength effect on release of aluminium by limousin acidic brown earth soils - Impact on natural water pollution. *Environ. Technol.* 21, 257–269.
- Guibaud, G., Ayele, J., 1997. Libération d'ions aluminium par des sols limousins. Influence de la nature, de l'âge de la plantation et de quelques facteurs physico-chimiques. Conséquences sur la pollution des eaux naturelles. *J. Eur. d'hydrologie* 28, 235–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/water/19972802235>
- Guibaud, G., Ayele, J., Mazet, M., 1996a. THE INFLUENCE OF SOME PARAMETERS UPON THE ALUMINIUM LEACHING OUT BY LIMOUSIN SOILS THROUGH BATCH REACTOR. *Water Sci. Technol.* 33, 271–277. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00332-0](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00332-0)
- Guibaud, G., Ayele, J., Mazet, M., 1996b. The influence of some parameters upon the aluminium leaching out by limousin soils through batch reactor. *Water Sci. Technol.* 33, 271–277. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00332-0](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00332-0)

- Guibaud, G., Gauthier, C., Ayele, J., 2000. Role of natural organic matter in the mobility of aluminium ions in rivers in the Limousin region ( France ) To cite this version : Role of natural organic matter in the mobility of aluminium ions in rivers in the Limousin region ( France ). *Agronomie* 200, 577–590.
- Gunsé, B., Poschenrieder, C., Barceló, J., 1997. Water Transport Properties of Roots and Root Cortical Cells in Proton- and Al-Stressed Maize Varieties. *Plant Physiol.* 113, 595–602. <https://doi.org/10.1104/pp.113.2.595>
- Guo, T., Zhang, G., Zhou, M., Wu, F., Chen, J., 2004. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant Soil* 258, 241–248. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000016554.87519.d6>
- Hagvall, K., Persson, P., Karlsson, T., 2015. Speciation of aluminum in soils and stream waters: The importance of organic matter. *Chem. Geol.* 417, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.09.012>
- Hajiboland, R., Poschenrieder, C., 2015. Localization and compartmentation of al in the leaves and roots of tea plants. *Phyton (B. Aires)*. 84, 86–100.
- Hakman, I., Arnold, S. Von, 1985. Plantlet Regeneration through Somatic Embryogenesis in *Picea abies* (Norway Spruce). *J. Plant Physiol.* 121, 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80040-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80040-7)
- Hall, J.L., Williams, L.E., 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.* 54, 2601–2613. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg303>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H.V., 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiol.* 153, 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Haydon, M.J., Cobbett, C.S., 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174, 499–506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02051.x>
- He, H., Li, Y., He, L.F., 2019. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. *South African J. Bot.* 123, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.02.008>
- Heim, A., Luster, J., Brunner, I., Frey, B., Frossard, E., 1999. Effects of aluminium treatment on Norway spruce roots: Aluminium binding forms, element distribution, and release of organic substances. *Plant Soil* 216, 103–116. <https://doi.org/10.1023/A:1004728122261>
- Helal, N., 2011. The green revolution via synthetic (artificial) seeds: a review. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 7, 464–477.
- Henri, M.-N., 2017. Métabolites de *Pseudotsuga menziesii* : approche métabolomique et rôle dans la résistance. Université de Limoges.
- Hermann, R.K., Lavender, D.P., 1999. Douglas-fir planted forests. *New For.* 17, 53–70. <https://doi.org/10.1023/A:1006581028080>
- Hirano, Y., Frey, B., Brunner, I., 2012. Contrasting reactions of roots of two coniferous tree species to aluminum stress. *Environ. Exp. Bot.* 77, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.10.007>
- Hopkins, W., 2003. *Physiologie végétale*. De Boeck.
- Horst, W.J., Schmohl, N., 1997. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize 23–30.
- Horst, W.J., Wang, Y., Eticha, D., 2010. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review. *Ann. Bot.* 106, 185–197. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq053>
- Howe, G.T., Cherry, M., Service, U.S.D.A.F., Way, S.W.J., Wheeler, N.C., Breviations, I.A.B.,

2006. Breeding Douglas-fir, in: Janick, J. (Ed.), *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 245–353. <https://doi.org/10.1002/9780470650349.ch6>
- <http://luirig.altervista.org> [WWW Document], n.d. URL <http://luirig.altervista.org> (accessed 7.3.19).
- Huang, C.F., Yamaji, N., Chen, Z., Ma, J.F., 2012. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J.* 69, 857–867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04837.x>
- Huang, J., Grunes, D., Kochian, L., 1992. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta* 188. <https://doi.org/10.1007/bf00192809>
- Hue, N. V, Craddock, G.R., Adams, F., 2010. Effect of Organic Acids on Aluminum Toxicity in Subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 28. <https://doi.org/10.2136/sssaj1986.03615995005000010006x>
- IFN, 2010. *La forêt Française*.
- IFN, 2009. *La forêt française : Les résultats pour la région Limousin*.
- IGN, 2018. *1956 - 2018 : 60 ans d'inventaire Forestier - Édition 2018*.
- IGN, 2014. *Inventaire Forêtier : La forêt en chiffres et en cartes – édition 2014*, IGN.
- Isaac, L., 1930. Seed flight in the Douglas-fir region. *J. For.* 28, 492–499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jof/28.4.492>
- ISO 10390 - Qualité du sol – Détermination du pH eau., 2005.
- ISO 10390 - Qualité du sol – Détermination du pH KCl., 2005.
- Issawi, M., Guillaumot, D., Sol, V., Riou, C., 2018. Responses of an adventitious fast-growing plant to photodynamic stress : comparative study of anionic and cationic porphyrin effect on *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 162, 379–390. <https://doi.org/10.1111/ppl.12666>
- Jamet, E., Boudart, G., Pont-lezica, R.F., 2006. Cell wall proteins : a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.006>
- Jolie, R.P., Duvetter, T., Loey, A.M. Van, Hendrickx, M.E., 2010. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor : a review. *Carbohydr. Res.* 345, 2583–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.002>
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L. V., Gilroy, S., 2006. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell Environ.* 29, 1309–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01509.x>
- Jones, D.L., Kochian, L. V, Gilroy, S., 1998. Aluminum Induces a Decrease in Cytosolic Calcium Concentration in BY-2 Tobacco Cell Cultures 1 81–89.
- Jones, D.L., Ryan, P.R., 2017. Aluminum Toxicity, in: *Plant Nutrition*. Elsevier, pp. 211–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00120-9>
- Joseleau, J.-P., Perez, S., n.d. Secondary Wall Hemicelluloses [WWW Document]. URL <https://www.glycopedia.eu/e-chapters/the-plant-cell-walls/article/secondary-wall-hemicelluloses> (accessed 2.28.20a).
- Joseleau, J.-P., Perez, S., n.d. Cellulose and Pectins [WWW Document]. URL <https://www.glycopedia.eu/e-chapters/the-plant-cell-walls/article/cellulose-pectins>
- Joshi, C.P., Thammannagowda, S., Fujino, T., Gou, J.Q., Avci, U., Haigler, C.H., McDonnell, L.M., Mansfield, S.D., Mengesha, B., Carpita, N.C., Harris, D., Debolt, S., Peter, G.F., 2011. Perturbation of wood cellulose synthesis causes pleiotropic effects in transgenic aspen. *Mol. Plant* 4, 331–345. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq081>



- Júnior, E.M.F., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliva, M.A., Oliveira, J.A., Damatta, F.M., 2014. The effects of aluminium on the photosynthetic apparatus of two rice cultivars. *Exp. Agric.* 50, 343–352. <https://doi.org/10.1017/S0014479713000471>
- Kabel, M.A., Borne, H. Van Den, Vincken, J., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., 2007. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydr. Polym.* 69, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.006>
- Kamerling, B.J.P., Gerwig, G.J., 1975. Characterization by Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Proton- Magnetic-Resonance Spectroscopy of Pertrineethylsilyl Methyl Glycosides obtained in the Methanolysis of Glycoproteins and Glycopeptides 491–495.
- Kariya, K., Demiral, T., Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Turkan, I., Sano, T., Hasezawa, S., Yamamoto, Y., 2013. A novel mechanism of aluminium-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2. *J. Inorg. Biochem.* 128, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.001>
- Keltjens, W.G., 1990. Effects of aluminum on growth and nutrient status of Douglas-fir seedlings grown in culture solution. *Tree Physiol.* 6, 165–175.
- Keltjens, W.G., Loenen, E.V.A.N., 1989. Effects of aluminium and mineral nutrition on growth and chemical composition of hydroponically grown seedlings of five different forest tree species 50, 39–50.
- Khan, A.A., Mcneilly, T., Collins, J.C., 2000. Accumulation of amino acids , proline , and carbohydrates in response to aluminum and manganese stress in maize. *J. Plant Nutr.* 23, 1303–1314.
- Khusboo, J., 2018. Pinus: External Morphology and Different Parts [WWW Document]. URL [http://www.biologydiscussion.com/gymnosperm/pinus-external-morphology-and-different-parts/33923?fbclid=IwAR3yD2Bcrkpc\\_aztYHrewDsiSwbEj7-VZjjRsb3uVfOgZngbgSMg1Q2OB0c](http://www.biologydiscussion.com/gymnosperm/pinus-external-morphology-and-different-parts/33923?fbclid=IwAR3yD2Bcrkpc_aztYHrewDsiSwbEj7-VZjjRsb3uVfOgZngbgSMg1Q2OB0c) (accessed 4.6.18).
- Kinraide, T.B., 1991. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* 134, 167–178. <https://doi.org/10.1007/BF00010729>
- Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., 2016. ChemInform Abstract: When Chemistry Meets Biology: The Case of Aluminum - A Review. *ChemInform* 47, 148–158. <https://doi.org/10.1002/chin.201627247>
- Kochian, L. V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A., 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274, 175–195. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1158-7>
- Kochian, L. V., 2003. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.001321>
- Kochian, L. V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 459–493. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655>
- Konarska, A., 2010. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Acta Physiol. Plant.* 32, 145–151.
- Kopittke, P.M., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W., 2008. Toxicities of soluble Al , Cu , and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea 217–227. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9500-5>
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., 2010. Effect of aluminium uptake on physiology , phenols and amino acids in *Matricaria chamomilla* plants. *J. Hazard. Mater.* 178, 949–955. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.029>

- Krill, A.M., Kirst, M., Kochian, L. V, Buckler, E.S., Hoekenga, O.A., 2010. Association and Linkage Analysis of Aluminum Tolerance Genes in Maize. *PLoS One* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009958>
- Krishna, M.P., Mohan, M., 2017. Litter decomposition in forest ecosystems : a review. *Energy, Ecol. Environ.* 2, 236–249. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0064-9>
- Krizek, B., Foy, C.D., 1988. Role of water stress in differential aluminium tolerance of two barley cultivars grown in an acid soil. *J. Plant Nutr.* 11, 351–368.
- Krzesłowska, M., 2015. The cell wall in plant cell response to trace metals : Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Physiol. Plant.* 35–51. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0581-z>
- Larsen, P.B., Cancel, J., Rounds, M., Ochoa, V., 2007. Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225, 1447–1458. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0452-4>
- Larsen, P.B., Geisler, M.J.B., Jones, C.A., Williams, K.M., Cancel, J.D., 2005. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* 41, 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02306.x>
- Larsen, P.B., Tai, C., Kochian, L. V, Howell, S.H., 1996. Arabidopsis Mutants with Increased Sensitivity to Aluminum. *Plant Physiol.* 110, 743–751. <https://doi.org/10.1104/pp.110.3.743>
- Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80254-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1)
- Lawlor, D., 2001. Photosynthesis, 3rd editio. ed. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Lelu-Walter, M.-A., Klimaszewska, K., Miguel, C., Aronen, T., Hargreaves, C., Teyssier, C., 2016. Somatic Embryogenesis for More Effective Breeding and Deployment of Improved Varieties in Pinus spp. : Bottlenecks and Recent Advances, in: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications.* pp. 319–365. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Lelu-Walter, M.A., Gautier, F., Eliášová, K., Sanchez, L., Teyssier, C., Lomenech, A.M., Le Metté, C., Hargreaves, C., Trontin, J.F., Reeves, C., 2018. High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 132, 137–155. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1318-0>
- Li, Y., Gu, M., Zhang, X., Zhang, J., Fan, H., Li, P., Li, Z., Xu, G., 2014. Engineering a sensitive visual-tracking reporter system for real-time monitoring phosphorus deficiency in tobacco 674–684. <https://doi.org/10.1111/pbi.12171>
- Li, Z., Xing, F., Xing, D., 2012. Characterization of target site of aluminum phytotoxicity in photosynthetic electron transport by fluorescence techniques in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 53, 1295–1309. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs076>
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lindeboom, J., Mulder, B.M., Vos, J.W., Ketelaar, T., Emons, A.M.C., 2008. Cellulose microfibril deposition: Coordinated activity at the plant plasma membrane, in: *Journal of Microscopy.* pp. 192–200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02035.x>
- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., 2017. Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants. *Front. Plant Sci.* 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>
- Ma, B., Gao, L., Zhang, H., 2012. Aluminum-induced oxidative stress and changes in

- antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. *Plant Cell Rep.* 31, 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1187-7>
- Ma, J.F., Hiradate, S., Matsumoto, H., 1998. High Aluminum Resistance in Buckwheat. *Plant Physiol.* 117, 753–759. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.753>
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E., 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6, 273–278. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01961-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01961-6)
- Ma, J.F., Syuntaro, H., 2000. FORM OF ALUMINUM FOR UPTAKE AND TRANSLOCATION IN BUCKWHEAT. *Plant cell Physiol. = Plant cell Physiol.* 41, s78.
- Macêdo, C.E.C., Jan, V.V.S., 2008. Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 12, 363–369. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662008000400005>
- Manrique, G.D., Lajolo, F.M., 2002. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 25, 99–107.
- Mantovanini, L.J., Gonçalves, R., Oliveira, J. De, Silva, L., Rosa, T.M., Maria, D., Zingaretti, S.M., Preto, R., Paulo, S., 2019. Root system development and proline accumulation in sugarcane leaves under aluminum (Al<sup>3+</sup>) stress. *Aust. J. Crop Sci.* 2, 208–213. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.02.p1198>
- Marcus, S.E., Blake, A.W., Benians, T.A.S., Lee, K.J.D., Poyser, C., Donaldson, L., Leroux, O., Rogowski, A., Petersen, H.L., Boraston, A., Gilbert, H.J., Willats, W.G.T., Knox, J.P., 2010. Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls 191–203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04319.x>
- Marienfeld, S., Schmohl, N., Klein, M., Schrade, W.H., Kuhn, A., Horst, W., 2000. Localisation of Aluminium in Root Tips of *Zea mays* and *Vicia faba*. *J. Plant Physiol.* 156, 666–671. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80229-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80229-1)
- Maron, L.G., Kirst, M., Mao, C., Milner, M.J., Menossi, M., Kochian, L. V, Kochian, L. V, 2008. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytol.* 179, 116–128.
- Marshall, K.A., Neale, D.B., 1992. The inheritance of mitochondrial DNA in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 22, 73–75. <https://doi.org/10.1139/x92-010>
- Martin, R., 1992. Aluminum speciation in biology. In *Aluminum in Biology and Medicine*. CIBA Foundation, John Wiley & Sons, New York.
- Matsumoto, H., Motoda, H., 2013. Oxidative stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root. *Plant Soil* 363, 399–410. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1396-z>
- Matsumoto, H., Motoda, H., 2012. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Sci.* 185–186, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.019>
- Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., Neill, M.A.O., 2004. Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. *Plant Physiol.* 134, 339–351. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030072.All>
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Plant Biol.* 96, 8271–8276.
- Mazen, A.M.A., 2004. Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related to accumulation of toxic metals. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 281–285.

<https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000019226.03536.21>

- Micheli, F., 2001. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6, 414–419. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02045-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02045-3)
- Miyasaka, S.C., Kochian, L. V, Shaff, J.E., Foy, C.D., 1989. Mechanisms of Aluminum Tolerance in Wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1188–1196.
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Moldan, B., Cerny, J., 1994. Biogeochemistry of small catchments: a tool for environmental research. Wiley and Sons, New York, USA.
- Montillet, J., Dat, J., Cotte, B. Van De, Chamnongpol, S., Ruste, C., Breusegem, F. Van, Triantaphylide, C., Agnel, J., Battesti, C., Inze, D., 2005. Fatty Acid Hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 138, 1516–1526. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059907>
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., Strecker, G., 1986. Glycoproteins, in: Chaplin MF, Kennedy JF, editors. (Ed.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Oxford, pp. 143–204.
- Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., Scheppler, N., 1963. Methods Of Study Of The Structure Of Glycoproteins. *J. Pharm. Belg.* 18, 529–536.
- Moreno-Alvarado, M., García-morales, S., Trejo-téllez, L.I., 2017. Aluminum Enhances Growth and Sugar Concentration , Alters Macronutrient Status and Regulates the Expression of NAC Transcription Factors in Rice. *Front. Plant Sci.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00073>
- Mossor-Pietraszewska, T., 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochim. Pol.* 48, 673–686.
- Motoda, H., Kano, Y., 2010. Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. *Plant soil* 49–58. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0318-1>
- Moustacas, A., Nari, J., Borel, M., Noat, G., Ricard, J., 1991. Pectin methylesterase , metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem. J.* 279, 351–354. <https://doi.org/10.1042/bj2790351>
- Mujika, J.I., Ruipérez, F., Infante, I., Ugalde, J.M., Exley, C., Lopez, X., 2011. Pro-oxidant activity of aluminum: Stabilization of the aluminum superoxide radical ion. *J. Phys. Chem. A* 115, 6717–6723. <https://doi.org/10.1021/jp203290b>
- Mujika, J.I., Torre, G.D., 2018. Aluminum and Fenton reaction : how can the reaction be modulated by speciation ? A computational study using citrate as a test case 16256–16265. <https://doi.org/10.1039/c8cp02962h>
- Mukhopadhyay, M., Bantawa, P., Das, A., Sarkar, B., Bera, B., Ghosh, P., Mondal, T.K., 2012. Changes of growth , photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defence system of tea [ *Camellia sinensis* ( L . ) O . Kuntze ] seedlings under aluminum stress. *Biometals* 25, 1141–1154. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9576-0>
- Müller, T., 2015. Identification and analysis of a transcriptome of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and population structure inference using different next-generation sequencing techniques. Universität Hohenheim.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Suzuki, T., Fujita, M., 2017. Polyamines-induced aluminum tolerance in mung bean : A study on antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Ecotoxicology* 26, 58–73. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1740-9>

- Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M., Ricard, J., 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. *Eur. J. Biochem.* 155, 199–202. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09477.x>
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, in: *Physiologia Plantarum*. pp. 185–195. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x>
- NBN EN 15104: Biocombustibles solides - Détermination de la teneur totale en carbone, hydrogène et azote - Méthodes instrumentales, 2012.
- Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A.S., Baslé, A., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffetto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R.A., Zhu, Y., Neil, M.A.O., Urbanowicz, B.R., York, W.S., Gideon, J., Abbott, D.W., Ralet, M., Martens, E.C., Henrissat, B., Gilbert, H.J., 2017. Europe PMC Funders Group Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature* 544, 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature21725.Complex>
- Neill, M.A.O., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., Albersheim, P., De, P., Viala, P., Li, R., 1996. Rhamnogalacturonan-II, a Pectic Polysaccharide in the Walls of Growing Plant Cell, Forms a Dimer That Is Covalently Cross-linked by a Borate Ester 271, 22923–22930.
- Neill, M.A.O., York, W.S., 2003. The composition and structure of plant primary cell walls. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0067>
- Nian, H., Yang, Z., Huang, H., Yan, X., Matsumoto, H., 2004. Citrate secretion induced by aluminum stress may not be a key mechanism responsible for differential aluminum tolerance of some soybean genotypes. *J. Plant Nutr.* 27, 2047–2066. <https://doi.org/10.1081/LPLA-200030112>
- O'Brien, I.E.W., Smith, D.R., Gardner, R.C., Murray, B.G., 1996. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. *Plant Sci.* 115, 91–99. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(96\)04356-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(96)04356-7)
- Ofei-Manu, P., Wagatsuma, T., Ishikawa, S., Tawaraya, K., 2001. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47, 359–375. <https://doi.org/10.1080/00380768.2001.10408399>
- Ono, K., Yamamoto, Y., Hachiya, A., Matsumoto, H., 1995. Synergistic Inhibition of Growth by Aluminum and Iron of Tobacco (*Nicotiana glauca* L.) Cells in Suspension Culture 36, 115–125.
- Osaki, M., Watanabe, T., Tadano, T., 1997a. Beneficial Effect of Aluminum on Growth of Plants Adapted to Low pH Soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 551–563.
- Osaki, M., Watanabe, T., Tadano, T., 1997b. Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 551–563. <https://doi.org/10.1080/00380768.1997.10414782>
- Oulehle, F., Hruska, J., 2005. Tree species (*Picea abies* and *Fagus sylvatica*) effects on soil water acidification and aluminium chemistry at sites subjected to long-term acidification in the Ore Mts., Czech Republic. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1822–1829. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.06.008>
- Panda, S.K., 2015. Aluminum Stress Adaptation in Plants. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19968-9>
- Panda, S.K., Baluska, F., Matsumoto, H., 2009. Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 592–597.
- Pandey, P., Srivastava, R.K., Dubey, R.S., 2013. Salicylic acid alleviates aluminum toxicity in

- rice seedlings better than magnesium and calcium by reducing aluminum uptake, suppressing oxidative damage and increasing antioxidative defense. *Ecotoxicology* 22, 656–670. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1058-9>
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2012. Changes in Cell Wall Biomechanical Properties in the Xyloglucan-Deficient xxt1/xtt2 Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 158, 465–475. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189779>
- Pasqualetto, P.-L., Zimmerman, R.H., Fordham, I., 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 40, 31–40.
- Pereira, J.F., Ryan, P.R., 2019. The role of transposable elements in the evolution of aluminium resistance in plants. *J. Exp. Bot.* 70, 41–54. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery357>
- Pereira, L.B., Tabaldi, L.A., Gonçalves, J.F., Jucoski, G.O., Pauletto, M.M., Weis, S.N., Nicoloso, F.T., Borher, D., Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., 2006. Effect of aluminum on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus*). *Environ. Exp. Bot.* 57, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.05.004>
- Perrono, P., 1999. Les micropolluants métalliques des boues de stations d'épuration urbaine et l'épandage agricole. Université Picardie, Amiens.
- Pilon-Smits, E.A., Quinn, C.F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M., 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.009>
- Pineros, M., Shaff, J., Manslank, H., Carvalho Alves, V., Kochian, L., 2005. Aluminum Resistance in Maize Cannot Be Solely Explained by Root Organic Acid Exudation . A Comparative Physiological Study. *Plant Physiol.* 137, 231–241. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047357.resistance>
- Poschenrieder, C., Barceló, J., 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environ. Exp. Bot.* 48, 75–92.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J., 2008. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Sci. Total Environ.* 400, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.003>
- Prabhu, D. V, Bhalerao, S., 2013. Aluminium toxicity in plants. *J. Appl. Chem.* 2, 447–474.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M., 2009. Structure Determination of Organic Compounds - Tables of Spectral Data. Springer.
- Prida, A., Peuch, J.-L., 2006. Influence of Geographical Origin and Botanical Species on the Content of Extractives in American, French, and East European Oak Woods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8115–8126.
- Puspasari, T., Pradeep, N., Peinemann, K.V., 2015. Crosslinked cellulose thin film composite nanofiltration membranes with zero salt rejection. *J. Memb. Sci.* 491, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.05.002>
- Qin, R., Hirano, Y., Brunner, I., 2007. Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. *Tree Physiol.* 27, 313–320. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.2.313>
- Rahman, M.M., Kawamura, O., 2011. Oxalate accumulation in forage plants: Some agronomic, climatic and genetic aspects. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 24, 439–448. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10208>

- Rai, M.K., Harish, N.S.S., 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture : a review of recent progress 179–190. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9923-9>
- Ramos, J., Naya, L., Gay, M., Abian, J., Becana, M., 2008. Functional Characterization of an Unusual Phytochelatin. *Plant Physiol.* 148, 536–545. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121715>
- Reeves, C., Hargreaves, C., François, J., Anne, M., Walter, L., 2018. Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryogenic tissue of Douglas-fir. *Trees* 32, 175–190. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1622-7>
- Rehmus, A., Bigalke, M., Valarezo, C., Mora, J., Wolfgang, C., 2014. Aluminum toxicity to tropical montane forest tree seedlings in southern Ecuador : response of biomass and plant morphology to elevated Al concentrations. *Plant Soil* 382, 301–315. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2110-0>
- Reyer, C., Lasch, P., M.J. Mohren, G., J.Sterck, F., 2010. Original article Inter-specific competition in mixed forests of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and common beech (*Fagus sylvatica*) under climate change – a model-based analysis. *Ann. For. Sci.* 67. <https://doi.org/10.1051/forest/2010041>
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D., 2001. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- Robinson, J., Keating, J.D., Mansfield, S.D., Saddler, J.N., 2003. The fermentability of concentrated softwood-derived hemicellulose fractions with and without supplemental cellulose hydrolysates. *Enzym. Microb. Technol.* 33 33, 757–765. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00192-3)
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2009. Soluble sugars — Metabolism , sensing and abiotic stress A complex network in the life of plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 388–393.
- Rosignol, J.P., 1996. Etude des sols de la pépinière forestière du Fond Forestier National de Peyrat le Château.
- Roy, A.K., Sharma, A., Talukder, G., 1988. Some aspects of aluminum toxicity in plants. *Bot. Rev.* 54, 145–178. <https://doi.org/10.1007/BF02858527>
- Ryan, P.J., Gessel, S.P., Zasoski, R.J., 1986. Acid tolerance o f Pacific Northwest conifers in solution culture. II. Effect of varying aluminim concentration at constant pH. *Plant Soil* 96, 259–272.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., 2010. The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Funct. Plant Biol.* 37, 275–284. <https://doi.org/10.1071/FP09261>
- Ryan, P.R., Ditomaso, J.M., Kochian, L. V., 1993. Aluminium toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44, 437–446. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.2.437>
- Ryan, P.R., Shaff, J.E., Kochian, L. V, 1992. Aluminum Toxicity in Roots. *Plant Physiol.* 99, 1193–1200. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1193>
- Ryan, P.R., Tyerman, S.D., Sasaki, T., Furuichi, T., Yamamoto, Y., Zhang, W.H., Delhaize, E., 2011. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *J. Exp. Bot.* <https://doi.org/10.1093/jxb/erq272>
- Ryder, M., Evans, D.E., Hodson, M.J., 2003. The use of root growth and modelling data to investigate amelioration of aluminium toxicity by silicon in *Picea abies* seedlings. *J. Inorg. Biochem.* 97, 52–58.

- Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., 2016. Toxicity and tolerance of aluminum in plants : tailoring plants to suit to acid soils. *BioMetals* 29, 187–210. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9910-z>
- Saha, B., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Salt, D.E., Prince, R.C., Baker, A.J., Raskin, I., Pickering, I.J., 1999. Zinc Ligands in the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* As Determined Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33, 713–717. <https://doi.org/10.1021/es980825x>
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E., Matsumoto, H., 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37, 645–653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01991.x>
- Sawaki, Y., Kihara-Doi, T., Kobayashi, Yuriko, Nishikubo, N., Kawazu, T., Kobayashi, Yasufumi, Koyama, H., Sato, S., 2013. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. *Planta* 237, 979–989. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1810-z>
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 1871. Hemicelluloses. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schmid, M., Pautasso, M., Holdenrieder, O., 2014. Ecological consequences of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cultivation in Europe. *Eur. J. For. Res.* 133, 13–29. <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0745-7>
- Schmöger, M.E. V, Oven, M., Grill, E., 2000. Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants. *Plant Physiol.* 122, 793–801. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.793>
- Schmohl, N., Horst, W.J., 2000. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* ( L .) cells grown in suspension culture. *Plant, Cell Environ.* 23, 735–742.
- Schmohl, N., Pilling, J., Fisahn, J., Horst, W.J., 2000. Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 109, 419–427. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100408.x>
- Schroeder, J.I., Delhaize, E., Frommer, W.B., Guerinot, M. Lou, Harrison, M.J., Herrera-Estrella, L., Horie, T., Kochian, L. V., Munns, R., Nishizawa, N.K., Tsay, Y.-F., Sanders, D., 2013. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* 497, 60–66. <https://doi.org/doi:10.1038/nature11909>
- Scott, B.J., Ridley, A.M., Conyers, M.K., 2000. Management of soil acidity in long-term pastures of south-eastern Australia: A review. *Aust. J. Exp. Agric.* <https://doi.org/10.1071/EA00014>
- Selvendran, R.R., Neill, M.A.O., 1987. Isolation and Analysis of Cell Walls from Plant Material. *Methods Biochem. Anal.* 32, 25–153.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.* 26, 2027–2038. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0416-6>
- Showalter, A.M., 2001. Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/PL00000784>
- Showalter, A.M., 1993. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *Plant Cell* 5, 9. <https://doi.org/10.2307/3869424>
- Silva, S., 2012. Aluminium Toxicity Targets in Plants. *J. Bot.* 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/219462>
- Singha, S., Townsend, E.C., Oberly, G.H., Sciences, S., 1990. of quince (*Cydonia oblonga* Mill .) shoots in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 135–142.



- Sivaguru, M., Horst, W.J., 1998. The Distal Part of the Transition Zone Is the Most Aluminum-Sensitive Apical Root Zone of Maize. *Plant Physiol.* 116, 155–163.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., 1999. Differential impacts of aluminium on microtubule organisation depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* 107, 110–119. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100115.x>
- Smith, E., Naik, D., Cumming, J.R., 2011. Genotypic variation in aluminum resistance, cellular aluminum fractions, callose and pectin formation and organic acid accumulation in roots of *Populus* hybrids. *Environ. Exp. Bot.* 72, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.03.003>
- Solari, L.I., Pernice, F., Dejong, T.M., 2006. The relationship of hydraulic conductance to root system characteristics of peach (*Prunus persica*) rootstocks 324–333. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00747.x>
- Sorensen, F.C., 1999. Effect of dry storage on germination rate of seeds of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*). *Seed Sci. Technol.* 27, 91–99.
- Stein, W.I., Owston, P.W., 2002. *Pseudotsuga* Carr., Douglas-fir, in: *Woody Plant Seed Manual*. USDA Forest Service, Washington, D.C, p. 32.
- Steiner, F., Zoz, T., Soares, A., Junior, P., Castagnara, D.D., Alexandre, J., Dranski, L., 2012. Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants. *Semin. CIENCIAS Agrar.* 33, 1779–1788. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n5p1779>
- Steward, F.C., Mapes, M.O., Mears, K., 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *Am. J. Bot.* 45, 705–708. <https://doi.org/10.2307/2439728>
- Sun, P., Tian, Q., Chen, J., Zhang, W., 2010. Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *J. Exp. Bot.* 61, 347–356. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp306>
- Tabaldi, L.A., Nicoloso, F.T., Castro, G.Y., Cargnelutti, D., Gonçalves, J.F., Rauber, R., Skrebsky, E.C., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Bisognin, D.A., 2007. Physiological and oxidative stress responses of four potato clones to aluminum in nutrient solution. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19, 211–222. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000300005>
- Tabuchi, A., Matsumoto, H., 2001. Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiol. Plant.* 112, 353–358.
- Tahara, K., Hashida, K., Otsuka, Y., Ohara, S., Kojima, K., Shinohara, K., 2014. Identification of a Hydrolyzable Tannin, Oenothein B, as an Aluminum-Detoxifying Ligand in a Highly Aluminum-Resistant Tree, *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Physiol.* 164, 683–693. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222885>
- Takabatake, R., Shimmen, T., 1997. Inhibition of Electrogenesis by Aluminum in Characean Cells 38, 1264–1271.
- Thomas, J.R., Mcneil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1987. Structure of Plant Cell Walls, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF WALL POLYSACCHARIDES FROM SUSPENSION- CULTURED DOUGLAS FIR CELLS. *Plant Physiol.* 83, 659–671.
- Thornton, F.G., Schaedle, M., Raynal, D.J., 1987. Effects of Aluminum on Red Spruce seedlings in solution culture. *Environ. Exp. Bot.* 27, 489–498.
- Tomioka, R., Oda, A., Takenaka, C., 2005. Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb. seedlings. *J. For. Res.* 10, 319–324. <https://doi.org/10.1007/s10310-005-0152-0>

- Tomioka, R., Takenaka, C., 2004. Difference in response to aluminum among Japanese coniferous species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 755–761. <https://doi.org/10.1080/00380768.2004.10408532>
- Tsuji, M., Kuboi, T., Konishi, S., 1994. Stimulatory effects of aluminum on the growth of cultured roots of tea. *Soil Sci. Plant Nutr.* ISSN 40, 471–476. <https://doi.org/10.1080/00380768.1994.10413324>
- Van, H. Le, Kuraishi, S., Sakurai, N., 1994. Aluminum-Induced Rapid Root Inhibition and Changes in Cell-Wall Components of Squash Seedlings. *Plant Physiol.* 106, 971–976.
- van Praag, H., Weissen, F., Dreze, P., Cogneau, M., 1997. Effects of aluminium on calcium and magnesium uptake and translocation by root segments of whole seedlings of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). *Plant Soil* 267–273.
- Verma, S et Dubey, R.S., 2003. Lead Toxicity Induces Lipid Peroxidation and Alters the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Plants. *Plant Science.* 164. 645-655. [10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0).
- Verma, R., McDonald, H., Yates, J.R., Deshaies, R.J., 2001. Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell* 8, 439–448. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00308-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00308-2)
- von Uexküll, H.R., Mutert, E., 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171, 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF00009558>
- Wang, H., Chen, R.F., Iwashita, T., Shen, R.F., Ma, J.F., 2015. Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytol.* 205, 273–279. <https://doi.org/10.1111/nph.13011>
- Wang, J., Raman, H., Zhang, G., Mdncham, N., Zhou, M., 2006. mechanisms , genetics and screening methods Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms , genetics and screening methods. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 769–787. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0769>
- Wang, W., Liu, X., Xie, Y., Zhang, H., Yu, W., Xiong, Y., Xie, W., Wang, W., 2006. Microencapsulation Using Natural Polysaccharides for Drug Delivery and Cell Implantation. *Journal of Microencapsulation* 23(3), 207–215. <https://doi.org/10.1039/b603595g>
- Wang, X., Liu, Y., Zeng, G., Chai, L., Song, X., Min, Z., Xiao, X., 2008. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Beckmannia nivea* (L.) Gaud. *Environ. Exp. Bot.* 62, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.014>
- Wardman, P., Candeias, L.P., 2013. Introduction to Fenton Chemistry. *Radiat. Res.* 145, 523–531.
- Watanabe, T., Osaki, M., 2001. Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil* 237, 63–70. <https://doi.org/10.1023/A:1013395814958>
- Waters, D., Jenkins, A., 1992. Impacts of afforestation on water quality trends in two catchments in mid-Wales 77, 167–172.
- Wenzl, P., Patiño, G.M., Chaves, A.L., Mayer, J.E., Rao, I.M., 2001. The High Level of Aluminum Resistance in Signalgrass Is Not Associated with Known Mechanisms of External Aluminum Detoxification in Root Apices. *Plant Physiol.* 125, 1473–1484. <https://doi.org/10.1104/pp.125.3.1473>
- Winandy, J.E., Morrell, J.J., 1993. Relationship between incipient decay , strength , and chemical composition of Douglas-fir heartwood. *WOOD FIBER Sci.* 25, 278–288.

- Xu, Q., Wang, Yu, Ding, Z., Song, L., Li, Y., Ma, D., Wang, Yi, Shen, J., Jia, S., Sun, H., Zhang, H., 2016. Plant Physiology and Biochemistry Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 101, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.001>
- Yaish, M.W., 2015. Proline accumulation is a general response to abiotic stress in the date palm tree ( *Phoenix dactylifera* L .). *Genet. Mol. Res.* 14, 9943–9950. <https://doi.org/10.4238/2015.August.19.30>
- Yamamoto, Y., 2002. Aluminum Toxicity Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *PLANT Physiol.* 128, 63–72. <https://doi.org/10.1104/pp.128.1.63>
- Yamamoto, Y., Hachiya, A., Matsumoto, H., 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 1333–1339. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029126>
- Yamchi, A., Jazii, F.R., Ghobadi, C., Mousavi, A., 2005. Increasing of Tolerance to Osmotic Stresses in Tobacco *Nicotiana tabacum* cv .
- Yang, J.L., Li, Y.Y., Zhang, Y.J., Zhang, S.S., Wu, Y.R., Wu, P., Zheng, S.J., 2008. Cell Wall Polysaccharides Are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminum from the Rice Root Apex. *Plant Physiol.* 146, 602–611. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111989>
- Yang, J.L., Zhu, X.F., Peng, Y.X., Zheng, C., Li, G.X., Liu, Y., Shi, Y.Z., Zheng, S.J., 2011. Cell Wall Hemicellulose Contributes Significantly to Aluminum Adsorption and Root Growth. *Am. Soc. Plant Biol.* 155, 1885–1892. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172221>
- Yang, L.T., Jiang, H.X., Tang, N., Chen, L.S., 2011. Mechanisms of aluminum-tolerance in two species of citrus: Secretion of organic acid anions and immobilization of aluminum by phosphorus in roots. *Plant Sci.* 180, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.011>
- Yang, X., Zhang, X., Yang, X., Zhang, X., 2010. Critical Reviews in Plant Science Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants 2689. <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>
- Yang, Z., Liu, G., Liu, J., Zhang, B., Meng, W., Müller, B., Hayashi, K., Zhang, X., Zhao, Z., De Smet, I., Ding, Z., 2017. Synergistic action of auxin and cytokinin mediates aluminum-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* . *EMBO Rep.* 18, 1213–1230. <https://doi.org/10.15252/embr.201643806>
- York, W.S., Neill, M.A.O., 2008. Biochemical control of xylan biosynthesis — which end is up ? <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.02.007>
- Yoshii, Y., 1937. Aluminium Requirements of Solfatara plants. *Bot. Mag.* 51, 262–270. <https://doi.org/10.15281/jplantres1887.51.262>
- Zaifnejad, M., Clarck, R.B., Sullivan, C.Y., 1997. Aluminum and Water Stress Effects on Growth and Proline of Sorghum. *J. Plant Physiol.* 150, 338–344. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(97\)80130-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80130-7)
- Zarei, S., Ehsanpour, A.A., Abbaspour, J., 2012. The role of over expression of P5CS gene on proline , catalase , ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco ( *Nicotiana tabacum* L .) plant under in vitro drought stress. *J. Cell Mol. Res.* 4, 43–49.
- Zhan, H., Gilmour, K., Chan, L., Farzaneh, F., McNicol, A.M., Xu, J.H., Adams, S., Fehse, B., Veys, P., Thrasher, A., Gaspar, H., Qasim, W., 2013. Production and First-in-Man Use of T Cells Engineered to Express a HSVTK-CD34 Sort-Suicide Gene. *PLoS One* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077106>
- Zhang, X. Bin, Liu, P., Yang, Y.S., Xu, G. Di, 2007. Effect of Al in soil on photosynthesis and

- related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Bot. Stud.* 48, 435–444.
- Zhang, G., Slaski, J.J., Archambault, D.J., Gregory, J., 1997. Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress 302–308.
- Zhang, Huanhuan, Jiang, Z., Qin, R., Zhang, Huaning, Zou, J., Jiang, W., Liu, D., 2014. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *Plant Biol.* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0264-9>
- Zhang, L., Liu, R., Gung, B.W., Tindall, S., Gonzalez, J.M., Halvorson, J.J., Hagerman, A.E., 2016. Polyphenol-Aluminum Complex Formation: Implications for Aluminum Tolerance in Plants. *J. Agric. Food Chem.* 64, 3025–3033. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00331>
- Zhang, X., Liu, P., Yang, Y.S., Xu, G., 2007. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes 435–444.
- Zheng, L., Lan, P., Shen, R.F., Li, W.F., 2014. Proteomics of aluminum tolerance in plants 566–578. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300252>
- Zhou, G., Delhaize, E., Zhou, M., Ryan, P., 2011. Biotechnological Solutions for Enhancing the Aluminium Resistance of Crop Plants, in: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. <https://doi.org/10.5772/25187>
- Zhu, X.F., Shi, Y.Z., Lei, G.J., Fry, S.C., Zhang, B.C., Zhou, Y.H., Braam, J., Jiang, T., Xu, X.Y., Mao, C.Z., Pan, Y.J., Yang, J.L., Wu, P., Zheng, S.J., 2012. XTH31, Encoding an in Vitro XEH/XET-Active Enzyme, Regulates Aluminum Sensitivity by Modulating in Vivo XET Action, Cell Wall Xyloglucan Content, and Aluminum Binding Capacity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4731–4747. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.106039>
- Zhu, X.F., Wan, J.X., Sun, Y., Shi, Y.Z., Braam, J., Li, G.X., Zheng, S.J., 2014. Xyloglucan Endotransglucosylase-Hydrolase17 Interacts with Xyloglucan Endotransglucosylase-Hydrolase31 to Confer Xyloglucan Endotransglucosylase Action and Affect Aluminum Sensitivity in *Arabidopsis* 1 [ OPEN ]. *Plant Physiol.* 165, 1566–1574. <https://doi.org/10.1104/pp.114.243790>

## **Annexe 1 : Valorisation des travaux**

### **Journée GEIST : 20 décembre 2017 – Limoges - France**

Communication affichée : Holm AMARA, Marie-Anne LELU-WALTER, Vincent GLOAGUEN, Céline FAUGERON-GIRARD, “*Aluminum in acidic soils : impact of vegetation on Al<sup>3+</sup> release and tolerance of young Douglas-fir to Al stress*” .

### **2<sup>nd</sup> International Congress of Environmental Science and Technology (ICEST'2018) - du 03 au 05 Mai 2018 – Hammamet – Tunisie**

Communiation orale : Holm AMARA, Marie-Anne LELU-WALTER, Vincent GLOAGUEN, Céline FAUGERON-GIRARD, “*Tolerance of Douglas fir somatic embryos to Aluminum stress and impact of the vegetation cover type on soil characteristics: acidity and Aluminium bioavailability*”.

### **Journée Thèses des Bois: 13 septembre 2018 – Limoges**

Communication affichée: “*Réponse des embryons somatiques et des plantules de sapin de Douglas au stress de l'Aluminium et l'impact du couvert végétal sur l'acidité du sol et la biodisponibilité de l'aluminium*”.

### **Article scientifique - 2020**

Amara H., Lelu-Walter M.A., Gloaguen V., Faugeron-Girard C., (2020), *Tolerance of Douglas-fir somatic plantlets to Aluminum stress: biological, cytological and mineral studies*, Plants, 9:536-553  
DOI: [10.3390/plants9040536](https://doi.org/10.3390/plants9040536)

## **Annexe 2 : Publication scientifique**

Amara, Holm & Lelu-Walter, Marie-Anne & Gloaguen, Vincent & Faugeron, Céline. (2020). Tolerance of Douglas Fir Somatic Plantlets to Aluminum Stress: Biological, Cytological, and Mineral Studies. *Plants*. 9. 536. 10.3390/plants9040536.

Article

# Tolerance of Douglas Fir Somatic Plantlets to Aluminum Stress: Biological, Cytological, and Mineral Studies

Holm Amara <sup>1</sup>, Marie-Anne Lelu-Walter <sup>2</sup>, Vincent Gloaguen <sup>1</sup> and Céline Faugeron-Girard <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratoire Peirene (EA7500), Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges, 123, avenue Albert Thomas, F-87060 Limoges CEDEX, France; holm.amara@unilim.fr (H.A.); vincent.gloaguen@unilim.fr (V.G.)

<sup>2</sup> INRAE, ONF, BioForA, 2163 avenue de la Pomme de Pin, CS 40001 – Ardon, F-45075 Orléans, France; marie-anne.lelu-walter@inrae.fr

\* Correspondence: celine.girard@unilim.fr; Tel.: +33-555-457-476

Received: 23 March 2020; Accepted: 19 April 2020; Published: 21 April 2020



**Abstract:** Aluminum (Al) is well known as a potent inhibitor of plant growth and development. It is notably present in soils in the soluble and bioavailable form  $Al^{3+}$  when the soil pH drops below 5. This situation is frequent, especially in softwood forests when litter decomposition is slow. In the present work, we studied the effects of  $Al^{3+}$  on the growth and development of Douglas fir plantlets. Somatic plantlets, regenerated via somatic embryogenesis, were grown in vitro on media supplemented with different concentrations of aluminum chloride ( $AlCl_3$ ): 0  $\mu M$ , 200  $\mu M$ , 500  $\mu M$ , and 1 mM. We show that a concentration of 500  $\mu M$   $AlCl_3$  in medium significantly reduced root elongation (−21.8%), as well as stem growth (−14.6%). Also, a 25% reduction in dry mass of the plantlets was observed in presence of a concentration of 200  $\mu M$  of  $AlCl_3$ . Histological analysis of root tissues revealed significant damage, especially in conducting vessels. In addition, mineral cation content of plantlets was disturbed under Al exposure. More particularly, the Mg and K contents of needles and the Ca content of stems and needles were significantly reduced in presence of a concentration of 500  $\mu M$   $AlCl_3$  in the culture medium (−35.6%, −33.5%, −24%, and −34% respectively). However, all these damages appeared at relatively high Al concentrations when compared with other herbaceous species. This study shed light on the ability of Douglas fir in vitro plantlets to cope with the acid-driven toxicity of Al.

**Keywords:** aluminum; *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.); tolerance

## 1. Introduction

Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)) is a coniferous species native of the West Coast of North America and is one of the most important worldwide timber species. In Europe, it is frequently used to satisfy an increasing demand for its wood, which presents outstanding mechanical properties and durability. Therefore, this species has been largely planted since the mid-20th century [1]. However, in opposition to deciduous forests, large coniferous plantations might have deleterious effects on woodland, notably because the slow litter decomposition leads to an acidification of the soil, which, in turn, increases the mobility of some elements. Aluminum (Al), as it is often considered as the third most abundant element in the Earth's crust, is particularly affected by this phenomenon. For example, insoluble aluminum hydroxides (e.g.,  $Al(OH)_3$ ), mostly present in neutral soils, give rise to the highly soluble  $Al^{3+}$  free species when pH drops to 5 or below. In addition, other sources such as atmospheric deposition, rainfall, river runoff, and human-driven activities (such as the use of fertilizers or the combustion of fossil fuels giving rise to acid rains) may increase Al content of soils [2].  $Al^{3+}$

is readily bioavailable but it is considered as nonessential for plant growth and might be highly toxic for plants. However, the harmful effects of  $\text{Al}^{3+}$  depend on the plant species. For example, the growth of corn roots is inhibited in presence of a concentration of 75  $\mu\text{M}$  Al [3], while the growth of tea (*Camellia sinensis*) seedlings is only delayed when treated with a concentration of 500  $\mu\text{M}$  of Al and more [4]. Simon et al. [5] showed that Al blocks the development of tomato plantlets at concentrations above 25  $\mu\text{M}$ . Al concentrations as low as 10  $\mu\text{M}$  slowed down the growth of the roots of *Pinus massoniana* seedlings grown under hydroponic conditions [6]. Therefore, Al could be considered as one of the major factors that impede plant growth and development in acidic soils, which represent up to 40% of the total arable land in the world.

One of the major symptoms of Al stress in plants is the inhibition of root elongation, which occurs by the disruption of cell division [7]. Since  $\text{Al}^{3+}$  is highly reactive, it is able to act on the cell wall and the plasma membrane [8,9] where it impairs ion transport and leads to a poor nutrient balance [10]. Moreover, Al promotes oxidative damage, e.g., lipid peroxidation and DNA damage, through excessive generation of reactive oxygen species (ROS) [2,11]. Plants could mitigate Al toxicity via two strategies: Exclusion and intracellular mechanisms. Exclusion defense can be achieved by modification of the pH of the rhizosphere [12], the secretion of organic acids having a chelating ability for  $\text{Al}^{3+}$  [13]. The trapping of  $\text{Al}^{3+}$  within the cell wall also helps the cells to escape from Al toxicity [7]. Intracellular mechanisms include accumulation of a wide array of antioxidant metabolites (proline, polyphenols, tocopherols) and enzymes (peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD), etc.) [13,14].

If the literature about the presence of Al in soil is abundant, studies often address the consequences of acid rains on the release of Al in soil [15–17], but more rarely address the tolerance of trees to Al. Some plant species seem to adapt to acidic soils and to the presence of  $\text{Al}^{3+}$ , for example, coniferous species, which are largely cultivated in such conditions. Douglas fir trees are apparently unaffected by Al stress [18]. However, little is known about their capacity to tolerate high Al concentrations in soil solution. Keltjens et al. [19] have shown that the viability of one-year-old Douglas-fir plants was affected when transferred to an hydroponic culture system in the presence of concentrations of  $\text{AlCl}_3$  higher than 15 mg/L (equivalent to 112  $\mu\text{M}$ ) and that root growth was hampered by a concentration of 8 mg/L  $\text{AlCl}_3$  (60  $\mu\text{M}$ ) [20]. However, the mechanisms involved in the resistance to Al stress are currently unknown. In order to make progress in the understanding of the tolerance of Douglas fir trees to Al, we designed an in vitro study on Douglas fir plantlets obtained from somatic embryos, named somatic plantlets. This strategy offers several advantages, particularly controlled growth conditions (notably the Al concentration in the growth medium), a homogeneous genetic pattern, the avoidance of genetic variations, and the production of a large number of somatic plantlets regardless of seasonal variations. Also, and unlike seedlings obtained after sowing in soil, this method allows a direct and easy monitoring of root growth. This work was aimed at determining the tolerance level of Douglas fir somatic plantlets growing since their germination in the presence of increasing concentrations of Al. In the case of Douglas fir, a forest species of economic interest, our work describes, for the first time, the Al impact on growth by the means of phenotypic observations (root and stem length, number of needles), along with micromorphological and histological analysis of the root apices. The mineral status of Al-exposed plantlets has also been characterized, along with the distribution of Al in somatic plantlets.

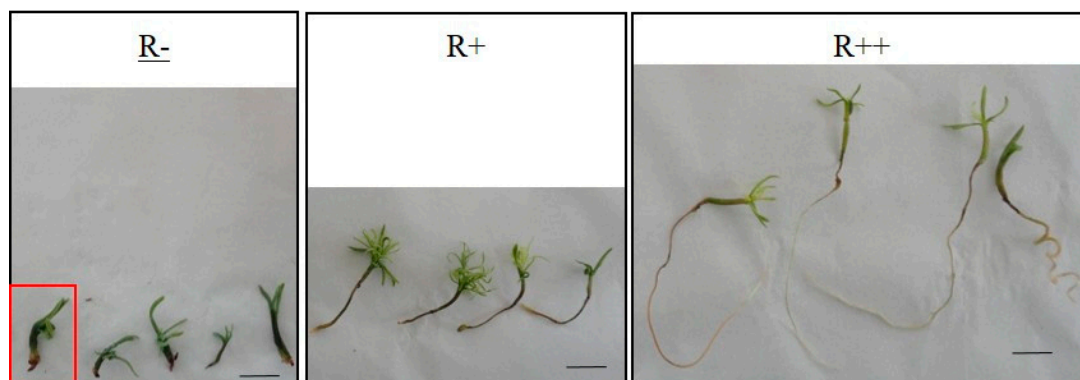
## 2. Results

### 2.1. Effect of Al on the Growth of Douglas Fir Somatic Plantlets

One week after germination, plantlets were transferred on fresh germination media supplemented with different concentrations of  $\text{AlCl}_3$  (up to 1 mM) and incubated for an additional eight weeks. On control medium (i.e., without added  $\text{AlCl}_3$ ), Douglas fir plantlets presented different types of morphology (Figure 1). Three categories of plantlets could be defined depending on the length of the roots. The first one, called “R–”, characterized by an absence of root (Figure 1, R–), represented about



40% of the population; the second category, “R+”, with roots less than 40-mm long, accounted for about 30% of the population; and the last category, called “R++”, presented longer roots (length  $\geq 40$  mm), and totaled about 30% of the population. In addition to the absence of root in the R– category, several anomalies were identified in the R+ group, such as symptoms of hyperhydricity of the needles and hardening of roots and stems (red box, Figure 1). For these reasons, further experiments and assays have only been conducted on plantlets belonging to the R++ category.



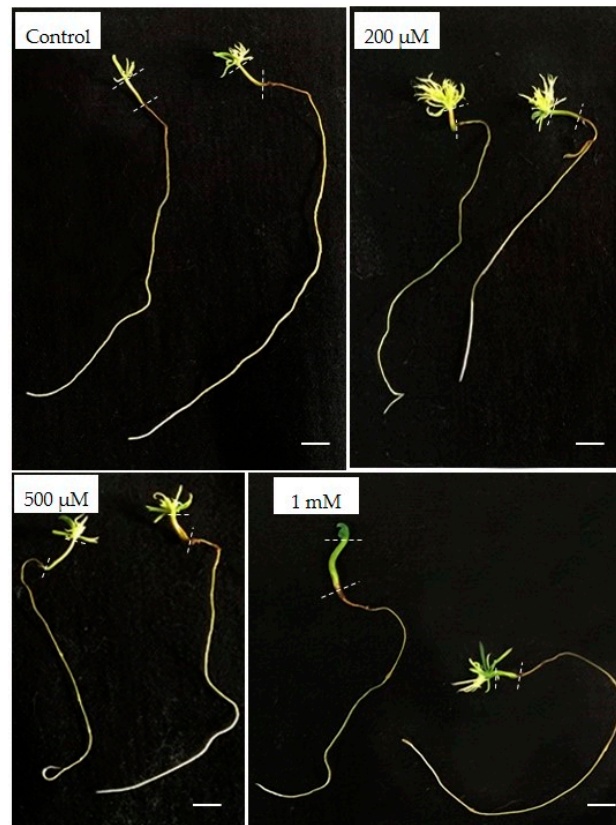
**Figure 1.** Douglas fir somatic plantlets grown on germination medium without addition of  $\text{AlCl}_3$  (control conditions) for eight weeks. Red box: Plantlet showing hyperhydricity symptoms. Bar: 1 cm.

The presence of  $\text{AlCl}_3$ , at a concentration as high as  $100 \mu\text{M}$  in the germination medium, did not affect root or stem growth as shown by the phenotypic observations (supplementary data Figure S2). However, a significant inhibitory effect on root growth was observed in presence of a concentration  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . The average length of root was significantly reduced from 133 mm on the control medium to 104 mm (–21.8%) in the presence of a concentration of  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Figures 2 and 3). Also, a significant decrease in stem length was observed in presence of a concentration of  $500 \mu\text{M}$  of  $\text{AlCl}_3$  (–14.6%) as compared with the control. The average number of needles (12.04 needles per plant in control conditions) significantly dropped in presence of a concentration of  $200 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (9.8 needles per plant; –18.6%) but, surprisingly, an opposite trend was recorded with higher concentrations. Finally, in presence of a concentration of  $1 \text{ mM}$   $\text{AlCl}_3$ , this number was similar to what was seen in control conditions. It can be noticed that in the presence of a concentration of  $1 \text{ mM}$  of  $\text{AlCl}_3$ , essentially, two phenotypes appeared: plantlets with a normal aerial part development (several needles) and plantlets with large and dark-green cotyledons but apparently devoid of developed needles (Figure 2).

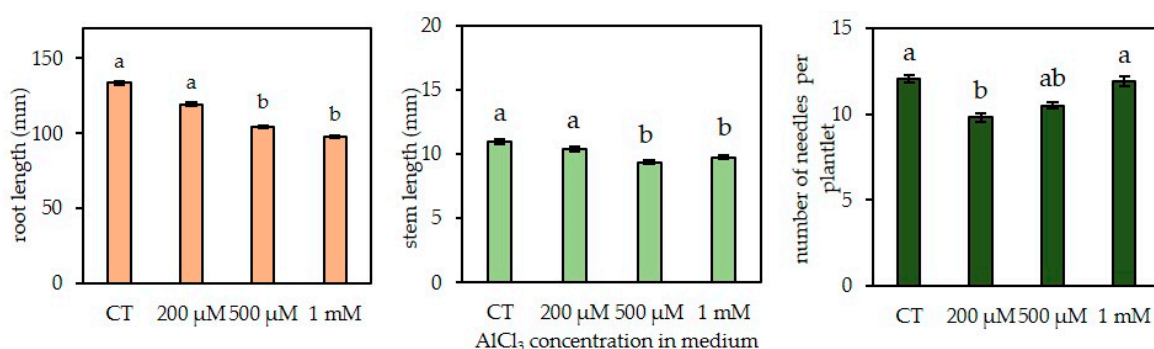
The average dry mass of the roots (Figure 4) decreased by approximately 31% in the presence of a concentration of  $200 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (from 20.3 mg per plant in control condition to 13.9 mg for  $200 \mu\text{M}$ ), and 47% in presence of a concentration of  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (10.8 mg) as compared with plantlets grown in control medium. No significant variation in dry weight was recorded in presence of concentrations of  $10 \mu\text{M}$ ,  $25 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ , and  $100 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (supplementary data Figure S3; one-way ANNOVA  $P < 0.05$ ). However, from  $500 \mu\text{M}$  to  $1 \text{ mM}$ , dry weight increased again to a value of 15.3 mg to finally reach the value observed with a concentration of  $200 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . With regard to the stems, the average dry mass significantly decreased by about 45% in the presence of concentrations of  $200 \mu\text{M}$  and  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (5.3 mg and 5.5 mg per plant, respectively). The average dry mass increased in the presence of a concentration of  $1 \text{ mM}$   $\text{AlCl}_3$  (7.8 mg) but remained lower than the control level (9.7 mg). On the other hand, the average dry mass of the needles gradually increased with  $\text{AlCl}_3$  concentration, to reach, in the presence of a concentration of  $1 \text{ mM}$   $\text{AlCl}_3$ , almost twice the value observed in control conditions (10.7 mg as compared with 5.8 mg).

The dry masses of the roots and the root elongation seemed to follow the same decline up to a concentration of  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . On the contrary, the dry mass of the needles gradually increased with  $\text{AlCl}_3$  concentration, whereas the average number of needles remained almost constant. This increase in mass may have been due to the hyperhydricity and thickening phenomenon encountered more

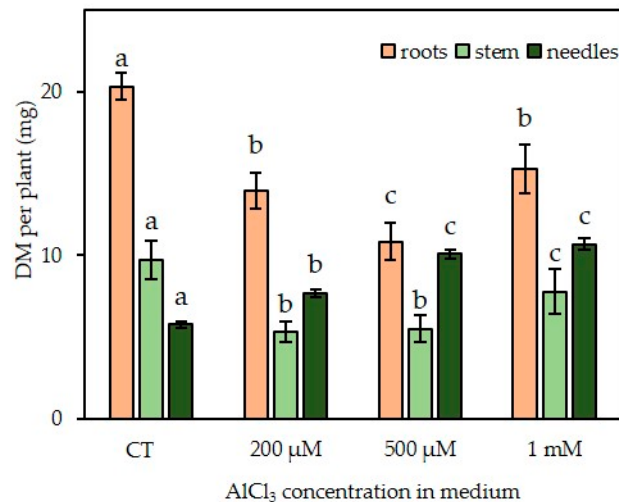
and more frequently with higher concentrations in  $\text{AlCl}_3$ : 20% of the plantlets showed hyperhydricity symptoms with  $500 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  and 35% with 1 mM. In the latter case, needles appeared thicker, longer, and wider, with a trend to curl, and presented a dark-green color, along with being brittle and translucent. This phenomenon was also observed with the stems of 30% of the somatic plantlets grown in presence of a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$  (Figure 5).



**Figure 2.** Effect of Al concentration on the morphology of 8-week-old Douglas fir somatic plantlets. Bar: 1 cm.



**Figure 3.** Effect of  $\text{AlCl}_3$  concentration in culture medium (range: 0–1 mM) on root length and aerial growth of Douglas fir somatic plantlets R ++ *in vitro*. CT: Control treatment, no addition of  $\text{AlCl}_3$  in the medium. Lengths of roots and stems were measured directly after harvest and the needles were counted. Each bar of the histograms represents the average and standard error (SE) of 13 independent experiments, each with 20 somatic plantlets. Different letters indicate significant differences between exposure conditions ( $p < 0.05$ ), KRUSKAL test,  $n = 260$  (mean  $\pm$  SE). R++ plantlets showed a root length  $> 40$  mm after one week of growth on germination medium.



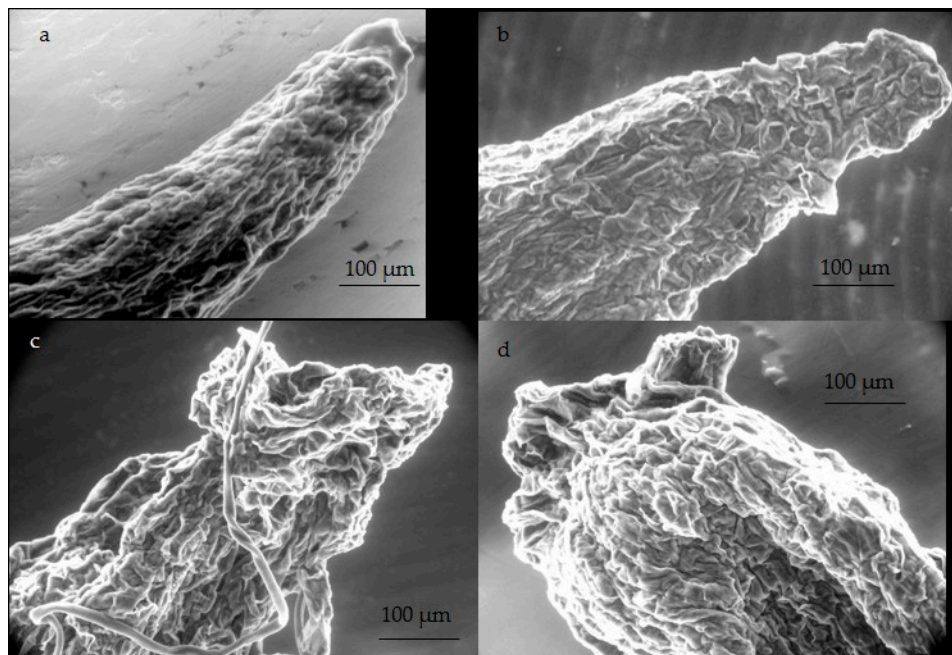
**Figure 4.** Effect of AlCl<sub>3</sub> concentration (range: 0–1 mM) in culture medium on the average dry mass (DM) of various organs of in vitro-grown R++ Douglas fir somatic plantlets. For each harvest, the same organs of all somatic plantlets grown in the same condition were gathered for better accuracy. Organs were then lyophilized and weighed. Each bar of the histogram represents the mean and standard deviation (SD) of 13 independent experiments, each with 20 plantlets. Different letters indicate significant differences between exposure conditions ( $p < 0.05$ ), ANOVA test.  $n = 13$  (mean  $\pm$  SD). R++ plantlets showed a root length  $> 40$  mm after one week of growth on germination medium. CT: Control treatment.



**Figure 5.** Symptoms of hyperhydricity of Douglas fir somatic plantlets cultured in vitro. (A) An R++ plantlet grown in presence of a concentration of 500  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> having a normal appearance. (B) An R++ plantlet at a concentration of 500  $\mu$ M showing vitreous needles and stem. R++ plantlets showed a root length  $> 40$  mm after one week of growth on germination medium. Bar: 1 cm.

## 2.2. SEM Observations of Root Tip Morphology

As the main phenotypic effect of Al toxicity concerned root growth, SEM observations of root tips were performed. Figure 6 shows alterations caused by an exposition to Al: the sharp, tapered shape of the apical zone of the control root (Figure 6a) led to a distorted and cracked ending in presence of a concentration of 1 mM AlCl<sub>3</sub> (Figure 6c). Actually, the overall shape of the root apex was not significantly altered in presence of a concentration of 200  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> (Figure 6b). The root still presented a tapered tip, but started to make a small curl, which was more apparent in presence of a concentration of 500  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> (Figure 6c), along with presenting a rough surface.



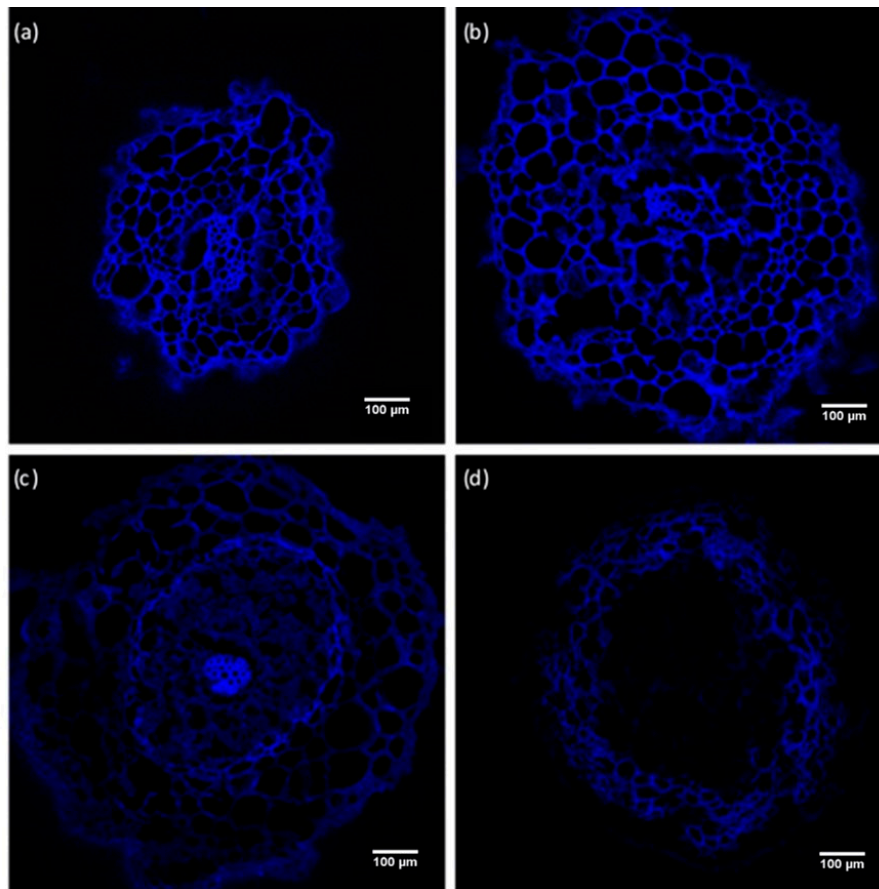
**Figure 6.** SEM observations of root tips of eight-week Douglas fir R++ somatic plantlets grown in absence (a) or presence of concentrations of 200  $\mu\text{M}$  (b), 500  $\mu\text{M}$  (c), and 1 mM (d)  $\text{AlCl}_3$  in culture medium. Several samples have been observed, and the samples presented in this figure are representative of each one of the batches. R++ plantlets showed a root length  $> 40$  mm after one week of growth on germination medium.

Calcofluor staining allowed us to see the morphology of the cells, since this dye binds to cell wall polysaccharides. Confocal microscopy images showed that a distortion of the cellular structure of the root epidermis and cortex occurred in presence of  $\text{AlCl}_3$ . The distortion increased with increasing concentration of  $\text{AlCl}_3$ , as shown by the global decrease of fluorescence intensity of roots exposed to a concentration of 500  $\mu\text{M}$  or 1 mM  $\text{AlCl}_3$  as compared with control conditions (Figure 7). In addition, Al led to damage of the cells of the conductive tissues of the central cylinder, as revealed by the partial disappearance of the fluorescent signal at the center of the root cross section in presence of a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$  (Figure 7d).

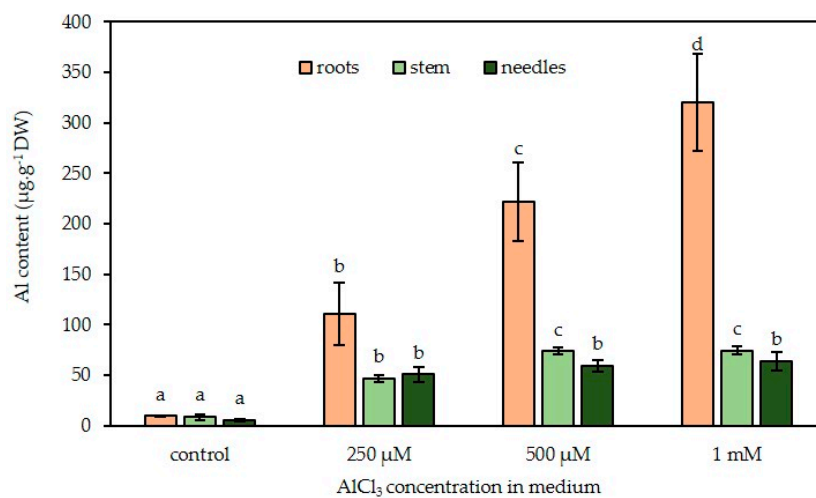
### 2.3. Distribution of Al and Minerals in Different Organs of Douglas Fir Somatic Plantlets

The presence of Al in Douglas fir plantlets was detected by microwave-induced plasma–atomic emission spectrophotometer (MP–AES) analysis. Al was already present in control somatic plantlets at 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (DW), 7  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW, and 4  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in roots, stems, and needles, respectively. Regardless of the concentration of Al in the culture medium, Al content of roots was always higher than the contents of the corresponding stems and needles. Al content decreased by a factor of approximately five in the aerial parts as compared with the roots. For example, at a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$  in the culture medium, roots contained 330  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW, while stems and needles contained 75  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW and 63  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW, respectively (Figure 8).

Also, it can be noticed that Al content of each organ increased with Al concentration in the germination medium. Al content of roots increased from 9.6  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW in control conditions to 320  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW in the presence of a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$ . Under the same conditions, the stem contents varied from 9  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW to 74.7  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW and from 5.2  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW to 63.6  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW for the needles.



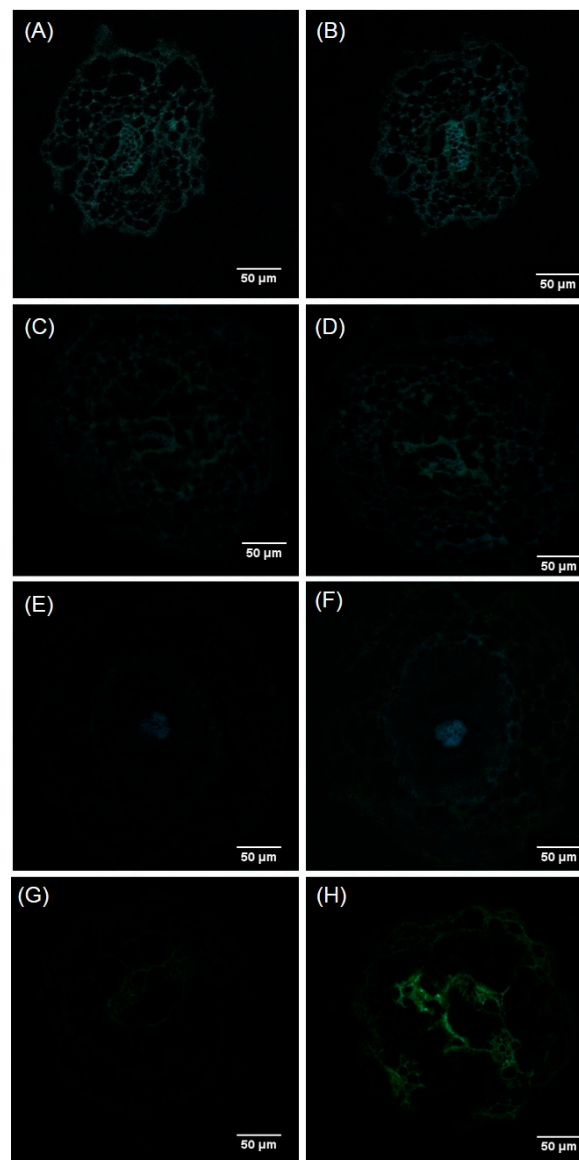
**Figure 7.** Confocal microscopy images of root cross sections of Douglas fir R++ somatic plantlets at 10 mm of root tips, dyed with Calcofluor. Plantlets were grown for eight weeks in germination medium (a: Control), or in germination medium supplemented with different concentrations of  $\text{AlCl}_3$ : (b) 200  $\mu\text{M}$ , (c) 500  $\mu\text{M}$ , (d) 1 mM. Several samples were observed, and the samples presented in this figure are each one representative of their batch. R++ plantlets showed a root length > 40 mm after one week of growth on germination medium.



**Figure 8.** Al content ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ ) in roots, stems, and needles of in vitro Douglas fir somatic plantlets exposed to concentrations of 0–1 mM  $\text{AlCl}_3$  in the culture medium. Each bar of the histogram represents the mean and standard deviation of three independent experiments, each with 10 plantlets per condition. Different letters indicate significant differences between exposure conditions ( $p < 0.05$ ), ANOVA test.  $n = 4$  (mean  $\pm$  SD). CT: Control treatment.

#### 2.4. Localization of Al in the Roots of Douglas Fir Somatic Plantlets

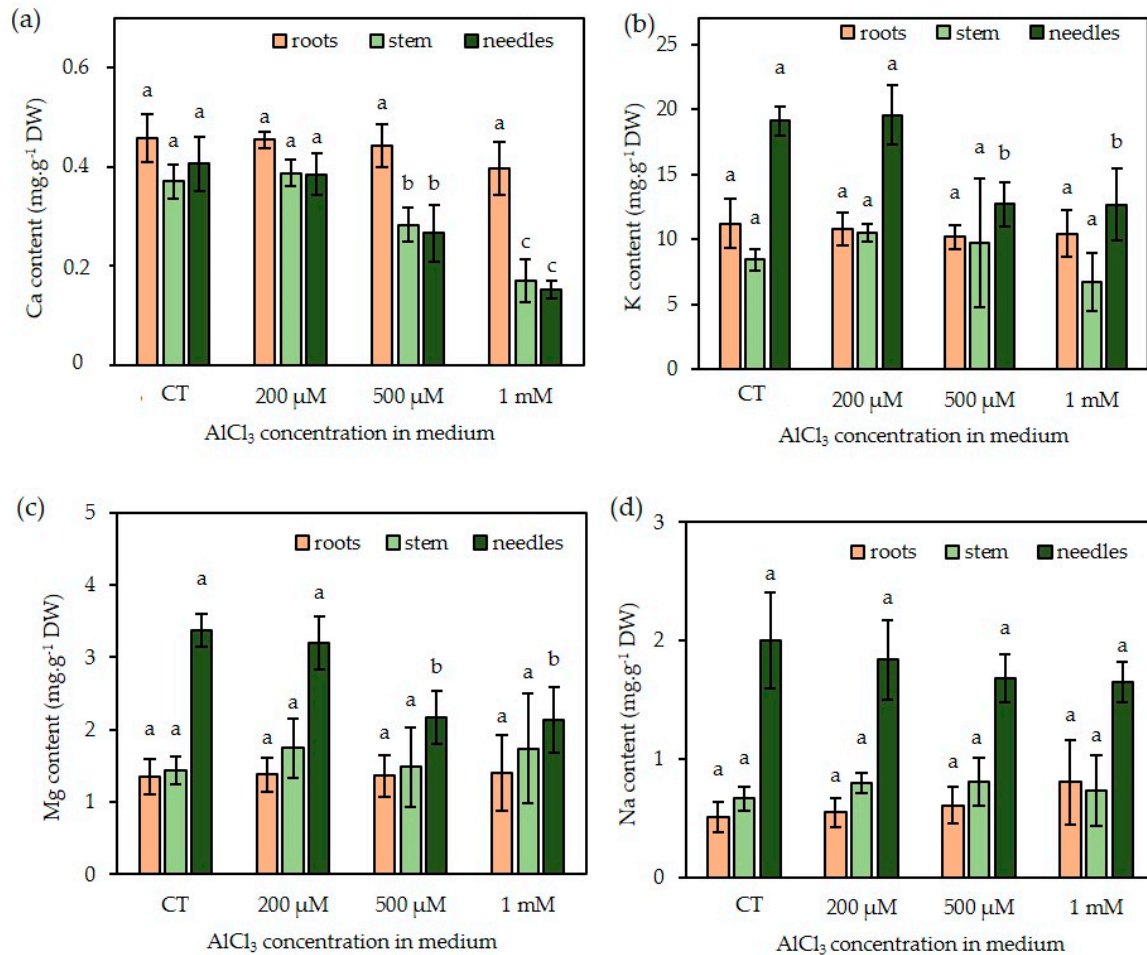
The localization of Al in root tissue was performed with confocal fluorescence microscopy on cross-sections of somatic plantlet roots after Morin staining. Dimming down the autofluorescence signal (AF) through spectral mode allowed us to evidence the fluorescence signal emitted by the Morin-Al<sup>3+</sup> complex. This complex was detected even under the control conditions, although very faint at the level of the pith, more precisely in the cell walls of the conductive cells (Figure 9A). The signal emitted by this complex increased with increasing Al concentration in the culture medium. In presence of a concentration of 1 mM AlCl<sub>3</sub>, Al was located on almost the entire section, and associated to cell walls. Although signal intensities varied, fluorescence emission remained more pronounced at the level of cells of the vascular tissue and cortex (Figure 9H).



**Figure 9.** Al localization with Morin staining of root cross sections of Douglas fir somatic plantlets at 10 mm from the root tip. (A) Autofluorescence of plantlets grown under control conditions, or (C,E,G) in culture media supplemented with different concentrations of AlCl<sub>3</sub> (200 μM, 500 μM and 1 mM, respectively). Fluorescence of Morin-stained samples: (B) Plantlets grown under control conditions, or (D,F,H) in culture media supplemented with different concentrations of AlCl<sub>3</sub> (200 μM, 500 μM and 1 mM, respectively).

### 2.5. Impact of Al on Mineral Content of Douglas Fir Somatic Plantlets

As mineral nutrition could be impaired by Al, some essential mineral nutrient contents were determined (Figure 10).



**Figure 10.** Mineral content of roots, stems and needles of Douglas fir somatic plantlets exposed to concentrations of 0–1 mM AlCl<sub>3</sub>. (a): Ca, (b): K, (c): Mg, (d): Na (contents expressed in mg g<sup>-1</sup> DW). Each bar of the histogram represents the mean and standard deviation of four independent experiments, each with 10 plantlets. Different letters indicate significant differences between exposure conditions ( $p < 0.05$ ), ANOVA test.  $n = 4$  (mean  $\pm$  SD).

The presence of Al did not seem to significantly affect Ca, K, Mg, and Na contents of the roots despite a tendency of increase in Na and a decrease in Ca for the highest Al concentration. On the contrary, in aerial parts, Ca content was significantly reduced in the shoots and needles in the presence of a concentration of 500 μM AlCl<sub>3</sub>. This parameter seemed to be the most affected by Al treatment, since the decrease in Mg and K was observed only in the needles in presence of a concentration of 500 μM AlCl<sub>3</sub>. Finally, Na content was not affected by the presence of Al in the medium in any part of the plants.

### 3. Discussion

Reports on Al toxicity in herbaceous species and crop plants are largely present in the literature, but only few studies have been done to determine the toxicity levels of Al for gymnosperms [6,21–24]. However, softwood forests are known to occupy areas where the acidic characteristic of the soil triggers the release of Al<sup>3+</sup> in the soil solution; Al<sup>3+</sup> is readily bioavailable for vegetation. Douglas

fir is one of the most widely cultured resinous trees, but to our knowledge, its tolerance to Al is not well documented [19,20]. In this study, the tolerance of Douglas fir somatic plantlets was studied under controlled conditions. Somatic plantlets were obtained from somatic embryogenesis in order to benefit from a uniform genetic background. Also, in vitro conditions provided homogenous culture conditions, allowing us to individually test the effects of defined concentrations of  $\text{AlCl}_3$  in the culture medium. First, the biological material was chosen in function of its capacity to develop normal roots, e.g., more than 40-mm long, one week after transfer on the germination medium (R++). Indeed, some somatic plantlets did not show any root growth (called R−) despite their development of aerial parts, or had a very short root (< 4 mm: R+). So far, this observation had not been reported for Douglas fir somatic plantlets [25]. Zhao et al. [26] already described the absence of roots in American ginseng (*Panax quinquefolius*) somatic embryos germinated for six weeks with a rate of 50%. This anomaly has also been mentioned in the case of hybrid larch as one of the characteristics of early germination and as the result of a rapid transition from the embryonic stage to the germinal stage without a sufficiently long maturation phase [27]. This phenomenon could be attenuated, but not completely eliminated, with the addition of 40  $\mu\text{M}$  or 60  $\mu\text{M}$  abscisic acid to the germination medium of hybrid larch [28] or with the addition of active charcoal in the germination medium of American ginseng [29]. Consequently, we had to select somatic plantlets after one week of germination medium in order to obtain a very homogenous plant material for our experiments. Also, one-week-old somatic plantlets presenting hyperhydricity symptoms were discarded (vitreous aspects, thick stem or needles).

When exposed to  $\text{AlCl}_3$ , the growth and development Douglas fir somatic plantlets showed no alteration up to a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . However, in the presence of a concentration of 200  $\mu\text{M}$  and higher concentrations of  $\text{AlCl}_3$ , we observed significant drops in root and stem dry mass, along with a decline in the number of needles. This result is similar to the study on *Pinus thumbergii* seedlings that exhibited no significant reduction in mass when treated with a concentration of less than 500  $\mu\text{M}$  Al over 18 days [21]. Also, no effect on the plant growth of *Picea rubens* plantlets was observed when the concentration of Al was lower than 250  $\mu\text{M}$  [24]. Nevertheless, the majority of the plant models described in the literature did not seem to withstand such high amounts of  $\text{AlCl}_3$ . For example, the inhibition of root elongation of maize plantlets could be observed in the presence of  $\text{AlCl}_3$  concentrations in the culture medium as low as 25  $\mu\text{M}$  [30]. Wheat root structure and growth were significantly altered when exposed to a concentration of 5  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  for four days [31]. A 40% inhibition of root growth was observed in red oak (*Quercus rubra*) in the presence of a concentration of 115  $\mu\text{M}$  Al in hydroponic solution [32].

At the cellular level, the impairment of root growth is often caused by an alteration of the root apex and elongation zone. This impairment has presently been observed with Douglas fir somatic plantlets whose root apex was subjected to distortion and depression in presence of 200  $\mu\text{M}$  and higher concentrations of  $\text{AlCl}_3$  in the culture medium, as shown by histochemical observations. The vascular cylinder seemed to be the most affected, since an important decrease in Calcofluor staining was observed in this part of the roots of plantlets exposed to a concentration of 1mM  $\text{AlCl}_3$ . Al-triggered roughening of the surface of the root tip of plantlets is frequently described in the literature, as reported, for example, with in vitro seed germinations of *Brachiaria decumbens* exposed to a concentration of 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  [33]. Wagatsuma et al. [34] reported the various morphological changes in the root surface of pea seedlings observed by SEM after exposure to a concentration of 3 ppm  $\text{AlCl}_3$  (corresponding to 22.5  $\mu\text{M}$ ) during an in vitro seed culture. Deep transverse cracks in the cortex were visible, mainly in the middle part of the root at 40–70 mm from the root tip. In the same context, intense cellular disorganization has been reported in maize roots, particularly transverse breaks in the protodermal layers and the outer cortex at the end of the root [35]. It has been suggested that ruptures are the result of the increased root diameter due to a tearing of the cells with a ripping of the outer cortex and of the rhizodermal cells of the elongation zone [36–38]. According to these authors, inhibition of root elongation and root breakdown is the consequence of Al binding to cell wall components, leading to increased lignin biosynthesis and stiffening of the cell wall. In the present case, this phenomenon could



explain the hardening of the Douglas fir roots, especially those exposed to a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$ . Parenchyma cells of the cortex are responsible for the storage of the mineral nutrients. Therefore, the exposure to Al would affect the supply in nutrients and thus the plant growth and development.

Concerning the Douglas fir needles, despite a reduction in their number, in the presence of a concentration of 200  $\mu\text{M}$  and higher concentrations of  $\text{AlCl}_3$ , their dry mass increased with increasing concentrations of Al in the culture medium. This result could be explained by the rising proportion of plantlets showing hyperhydricity symptoms during the eight-week exposure to Al, which reached about 30% in the presence of a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$ . Usually, the hyperhydricity of in vitro-cultured plantlets is due to several factors such as the composition of culture medium, notably the concentration of phytohormones [39] and the type of gelling agent [40]. Van den Dries et al. [41] proposed that hyperhydricity is caused by a water logging of the apoplast, leading to an impairment of gas exchanges. Finally, this phenomenon could result in stress conditions that might be due to different factors, notably mineral nutrition disorders [42,43]. Here, we think that the Al-triggered hyperhydricity of Douglas fir somatic plantlets could be the consequence of an alteration of the inorganic nutrient balance.

Al exposure did not significantly change the contents of the major minerals in Douglas fir roots, although the Ca content seemed to decrease in presence of a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$ . Aerial parts also showed a reduced Ca content (shoots and needles) in presence of 500  $\mu\text{M}$  and 1 mM  $\text{AlCl}_3$ . These trends have already been related in studies on wheat [44], and the authors also reported that  $\text{Al}^{3+}$  could displace Ca from homogalacturonan within the cell wall and could consequently reduce Ca uptake. We observed a drop in  $\text{Mg}^{2+}$  content of the needles in the presence of a concentration of 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . A similar result has been reported in a study about tea plants [45]. Also, van Praag et al. [46] have reported that a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$  exerted a much stronger inhibitory effect on the uptake and translocation of Mg in comparison with Ca. The reduced content in Mg might impair chlorophyll biosynthesis and, therefore, the photosynthetic apparatus, and finally the growth capacity of the plantlets. In the present study, the K content of the needles was reduced in the presence of a concentration of 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . In fact, controversial data concerning K has appeared in the literature, in which  $\text{K}^+$  uptake was said to be reduced in many tested plants in response to Al treatment [47], although an increase in K uptake has been reported in another study [48]. Na contents were similar in Al-treated somatic plantlets as compared with the control ones. Unlike  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  is not essential for either growth or development. Hence, reduced growth-dependent Al toxicity will not alter Na level, as already suggested by Maathuis et al. [49]. Taken together, these results proved that structural and functional damage in the roots affects nutrient uptake, leading to reduced growth and mineral deficiency in Douglas fir somatic plants subjected to  $\text{AlCl}_3$  treatment at concentrations higher than 200  $\mu\text{M}$ . This can also suggest an explanation for the needle hyperhydricity observed in presence of 500  $\mu\text{M}$  and higher concentrations of  $\text{AlCl}_3$ . Al intake by somatic plantlets disrupts the absorption of essential minerals, and this imbalance in mineral nutrition could be a major cause of malformation. Moreover, Singha et al. [50] showed that increasing Ca concentration in the culture medium reduced hyperhydricity. In the same context, Pasqualetto et al. [51] reported that a drop in K content led to a significant increase in the percentage of “vitrified” plants.

Measurements of Al distribution in plantlets, as well as confocal microscopy of Morin-stained root cross-sections, revealed the presence of Al, although in low amounts, in plantlets grown in control conditions. This could be due to Al impurities in constituents of the culture medium, since MP-AES analysis of the control culture medium revealed the presence of a concentration of 4.63  $\mu\text{M}$  Al. Similar results were observed in *Pinus massoniana* seedlings by the authors of [6] in control conditions, as roots, stems and needles contained about 23  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW, 18  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW, and 9  $\mu\text{g Al g}^{-1}$  DW, respectively. In Douglas fir plantlets exposed to increasing concentrations of Al, roots appeared to be the richest part compared with the other organs (up to 320  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW for the highest Al concentration). This result is consistent with the fact that the roots are directly exposed to the culture medium. Nevertheless, part of the root-absorbed Al is actually transported to the stems and needles (74  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW and 63  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW, respectively, in the presence of a concentration of 1 mM  $\text{AlCl}_3$ ). The transfer and

storage of Al in the aerial parts of the plant is a common feature of many tropical species. It is a coping strategy, or a response that helps the plant to survive to Al stress [52]. A typical example of a woody plant that accumulates large amounts of Al ( $>15 \mu\text{g g}^{-1}$ ) in its leaves is *Richeria grandis* (Euphorbiaceae, dicotyledon). This result was obtained with mature leaves taken from trees planted on an Al-rich soil [53]. Al content in scots pine needles steadily increased with increasing external Al and reached values of about  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  DW [19]. Moreover, the accumulation of Al in *Pinus massoniana* was mainly detected in roots ( $374 \mu\text{g g}^{-1}$ ), and only small amounts of Al were detected in the aerial parts ( $24.2 \mu\text{g g}^{-1}$  DW and  $87.8 \mu\text{g g}^{-1}$  DW of stems and leaves, respectively) when treated with a concentration of  $10 \mu\text{M AlCl}_3$  over 40 days [6]. These results are equivalent to the data herein reported.

Taken together, these results suggest that a concentration of  $200 \mu\text{M AlCl}_3$  can be defined as the tolerance threshold for Douglas fir somatic plantlets, as higher concentrations lead to a drop in dry weight accompanied with a reduction in root elongation. This threshold value is equivalent to that causing significant reductions in root elongation of *Pinus thunbergii* seedlings after an 18 day-exposure to a concentration of (at least)  $0.5 \text{ mM Al}$  [21]. However, in comparison with tolerance thresholds of other plants such as maize [3] ( $25 \mu\text{M}$ ), tobacco [54] ( $25 \mu\text{M}$ ), wheat ( $7.5 \mu\text{M}$ ) [55], and cowpea ( $30 \mu\text{M}$ ) [47], Douglas fir somatic plantlets clearly showed a higher resistance to Al stress, similar to that of *Pinus thunbergii*, which leads us to suppose that gymnosperms could be more tolerant to Al than herbaceous species.

## 4. Materials and methods

### 4.1. Plant Material and Growth Conditions

*Pseudotsuga menziesii* trees 4440 and 4474 originated from North Bend and Enumclaw (WA, USA), respectively. In 2012, controlled cross  $4474 \times 4440$  (Orléans, France) was performed and somatic embryogenesis was induced from zygotic embryos giving rise to embryogenic lines [56]. Experiments were conducted with the highly embryogenic line TD15-1. Maturation of the somatic embryos was obtained according to Lelu-Walter et al. [25]. After eight weeks, cotyledonary somatic embryos (Figure S1) were isolated and transferred onto germination medium (pH 5.8) modified as follows:  $3 \text{ g L}^{-1}$  gellan gum (phytagel, Sigma),  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  nicotinic acid,  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  pyridoxin-HCl, and  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  thiamine-HCl. Petri dishes containing about 50 somatic embryos were kept at  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  in the dark for seven days and then placed for eight weeks under dim light, at a light intensity of  $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (16-h photoperiod). Somatic embryos were considered germinated as soon as radicle emergence was observed. As soon as germinated somatic embryos developed their aerial part (epicotyl), they were considered as plantlets.

### 4.2. Aluminum Treatment

Aluminum treatments were done by transferring Douglas fir somatic plantlets to germination media containing various concentrations of  $\text{AlCl}_3$  ( $\text{AlCl}_3$ , 6 H<sub>2</sub>O, Duchefa Biochemie):  $0 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$ , and  $1 \text{ mM}$ . After eight weeks, the somatic plantlets were harvested, and roots were carefully rinsed three times with deionized water. Biometric parameters (length of the root, length of the stem, number of needles, fresh mass of each compartment) were measured. Plantlets were then frozen and kept at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until analysis. Dry weights were measured on lyophilized samples.

### 4.3. Micromorphology Analysis of Root Tips by Scanning Electron Microscopy

To visualize the influence of Al supply on root surface structure, fresh roots were randomly selected from different Al conditions and analyzed by scanning electron microscopy (FEI, QUANTA FEG 450).

#### 4.4. Microscopic Examination of Roots

##### 4.4.1. Calcofluor White Staining

To reveal the general morphology of root cells of Douglas fir somatic plantlets, root tissues were stained with Calcofluor White. This fluorochrome binds to cellulose in plant cell walls. Root samples consisting in 10- $\mu$ m cross-sections, cut at a distance of 10 mm to 15 mm from the root tip, were stained with 0.02% Calcofluor White solution (Sigma-Aldrich, St. Louis) for 5 min at room temperature. The sections were then rinsed with distilled water. Samples were observed by laser confocal microscopy (LSM 510-META, ZEISS) (excitation: 254 nm; emission: 430 nm).

##### 4.4.2. Morin Staining

Morin staining was used to reveal the localization of Al in root tissue [57]. A 100- $\mu$ M solution of Morin (Sigma-Aldrich) in 5 mM of ammonium acetate buffer pH 5 was used for the staining of Al in plant tissues. First, 10- $\mu$ m-thick sections were rinsed with 5 mM of ammonium acetate buffer pH 5, then stained with Morin solution for 60 min and finally rinsed with buffer and deionized water for 5 min each. Sections (marked or not) were mounted in a few drops of Mowiol solution. The Al-Morin complex fluorescence emission was observed with a laser confocal microscope (excitation: 420 nm; emission: 510 nm). Spectral mode was used to check autofluorescence on control roots with and without staining, and Al-treated roots without staining (LSM 510-META, ZEISS).

#### 4.5. Mineral Content and Al Quantification

Samples of roots, stems, and needles from somatic plantlets were first lyophilized and ground. Then, for each sample, the plant powder (200 mg) was mixed with 2 mL of nitric acid (68%, Normapur) and 1 mL of hydrochloric acid (37%, Normapur) in a reactor according to Astier et al. [58] and then subjected to microwave digestion (Mars One, CEM) using a two phase-program: A ramp from 0 °C to 200 °C in 20 min followed by a 10-min plateau at 200 °C before cooling. The final volume was adjusted to 20 mL with ultrapure water. Al, Ca, K, Mg, and Na were then quantified using a microwave plasma-atomic emission spectrometer at 396.2 nm, 422.6 nm, 769.9 nm, 285.2 nm, and 589.5 nm, respectively (4100 MP-AES, Agilent Technologies).

#### 4.6. Statistical Analysis

Biological experiments were performed at least three times independently and results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis consisted of one-way ANOVA test using the PAST free software (Version 2.17c).

Biometric measurements of root length and aerial growth of Douglas fir somatic plantlets were performed on 260 plantlets independently and results were expressed as mean  $\pm$  standard error (SE). As the data was not normally distributed, statistical analysis was tested with a nonparametric test of one-way ANOVA, the Kruskal–Wallis test, using the R software (Version 3.6.2).

## 5. Conclusions

This study showed, for the first time, that in vitro-grown Douglas fir somatic plantlets, exposed since germination to Al stress, tolerate relatively high Al concentration in the culture medium in comparison with crop species. Indeed, a concentration of 200  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> was the threshold value to observe a drop in needle development and reduction in the dry mass of all plant parts. These impairments of plant development could be explained by a perturbation of mineral nutrition. Notably, Ca and Mg contents were reduced in aerial parts. Al could possibly disturb the supply in Mg, leading to a lesser photosynthetic activity and to the displacement of Ca from the cell wall, potentially causing alterations of mechanical properties and finally a collapse in tissue structure, as evidenced in root apex. Additionally, damages of the conductive cells of root could explain mineral disorders.

The mechanism by which Douglas fir somatic plantlets could tolerate such high Al concentrations is currently under investigation, notably focusing on the cell wall modifications, as this compartment could act as a barrier against toxic elements, but also because it constitutes the main component of the wood, the most valorized part of the tree. Further investigations will be conducted on young Douglas fir trees grown on acidic forest soils (with high level of bioavailable Al<sup>3+</sup>) to validate the observations made here in vitro on plantlets and to determine the impact of Al on the building and the biochemical composition of Douglas fir wood.

**Supplementary Materials:** The following documents are available online at <http://www.mdpi.com/2223-7747/9/4/536/s1>, Figure S1: Cotyledonary somatic embryos of Douglas-fir after 8 weeks of maturation, Figure S2: Effect of AlCl<sub>3</sub> concentration in culture medium (range 0–100 µM AlCl<sub>3</sub>) on root and aerial growth of Douglas fir somatic plantlets in vitro, Figure S3: Effect of AlCl<sub>3</sub> concentration in culture medium (range 0–100 µM) on the average dry mass of various organs of in vitro Douglas fir somatic plantlets R ++.

**Author Contributions:** Conceptualization and methodology, H.A., M.-A.L.-W., V.G. and C.F.-G.; investigation, H.A., M.-A.L.-W. and C.F.-G.; writing—original draft preparation, writing—review and editing, H.A., M.-A.L.-W., V.G. and C.F.-G.; funding acquisition, V.G. and C.F.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** H.A. was funded by a grant from Région Nouvelle Aquitaine.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Patrice Fondanèche for absorption spectrometry measurements (Peirene laboratory, Limoges University, France), to Yann Launay for SEM analysis (CarMaLim platform, Limoges University, France), to Claire Carrion for confocal microscope analysis (Bissem platform, Limoges University, France) and Lisa Fourtune for her help in statistical analysis. Dr Michel Guilloton is also acknowledged for manuscript editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Eckhart, T.; Pötzelsberger, E.; Koeck, R.; Thom, D.; Lair, G.J.; van Loo, M.; Hasenauer, H. Forest stand productivity derived from site conditions: An assessment of old Douglas-fir stands (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*) in Central Europe. *Ann. For. Sci.* **2019**, *76*, 19. [[CrossRef](#)]
2. Bojórquez-Quintal, E.; Escalante-Magaña, C.; Echevarría-Machado, I.; Martínez-Estévez, M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Batista, M.F.; Moscheta, I.S.; Bonato, C.M.; Batista, M.A.; Almeida, O.J.G.d.; Inoue, T.T. Aluminum in corn plants: Influence on growth and morpho-anatomy of root and leaf. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **2013**, *37*, 177–187. [[CrossRef](#)]
4. Fung, K.F.; Carr, H.P.; Zhang, J.; Wong, M.H. Growth and nutrient uptake of tea under different aluminium concentrations. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 1582–1591. [[CrossRef](#)]
5. Simon, L.; Smalley, T.J.; Benton Jones, J.; Lasseigne, F.T. Aluminum toxicity in tomato. Part 1. growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* **1994**, *17*, 293–306. [[CrossRef](#)]
6. Zhang, H.; Jiang, Z.; Qin, R.; Zhang, H.; Zou, J.; Jiang, W.; Liu, D. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Delhaize, E.; Ryan, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 315–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jones, D.L.; Blancaflor, E.B.; Kochian, L.V.; Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ.* **2006**, *29*, 1309–1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zhang, B.; Liu, P.; Yang, Y.S.; Xu, G.D. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Bot. Stud.* **2007**, *48*, 435–444.
10. Bose, J.; Babourina, O.; Rengel, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 2251–2264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Panda, S.K.; Baluska, F.; Matsumoto, H. Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* **2009**, *4*, 592–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Bose, J.; Babourina, O.; Shabala, S.; Rengel, Z. Aluminum-dependent dynamics of ion transport in Arabidopsis: Specificity of low pH and aluminum responses. *Physiol. Plant.* **2010**, *139*, 401–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Brunner, I.; Sperisen, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Imadi, S.R.; Waseem, S.; Kazi, A.G.; Azooz, M.M.; Ahmad, P. Aluminum toxicity in plants: An overview. In *Plant Metal Interaction*; Ahmad, P., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 1–20.
15. Bryant, K.N.; Fowlkes, A.J.; Mustafa, S.F.; O'neil, B.J.; Osterman, A.C.; Smith, T.M.; Shepard, M.R.; Woolsley, R.S.; Butcher, D.J. Determination of aluminum, calcium, and magnesium in fraser fir, balsam fir, and red spruce foliage and soil from the southern and middle appalachians. *Microchem. J.* **1997**, *56*, 382–392. [[CrossRef](#)]
16. Oulehle, F.; Hruska, J. Tree species (*Picea abies* and *Fagus sylvatica*) effects on soil water acidification and aluminium chemistry at sites subjected to long-term acidification in the Ore Mts., Czech Republic. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1822–1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bintz, W.W.; Butcher, D.J. Characterization of the health of southern Appalachian red spruce (*Picea rubens*) through determination of calcium, magnesium, and aluminum concentrations in foliage and soil. *Microchem. J.* **2007**, *87*, 170–174. [[CrossRef](#)]
18. Perry, C.H.; Amacher, M.C. Patterns of soil calcium and aluminum across the conterminous United States. In *Forest Health Monitoring: 2008 National Technical Report. GTR-SRS-158*; Potter, K.M., Conkling, B.L., Eds.; US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station: Asheville, NC, USA, 2012; pp. 119–130.
19. Keltjens, W.G.; van Loenen, E. Effects of aluminium and mineral nutrition on growth and chemical composition of hydroponically grown seedlings of five different forest tree species. *Plant Soil* **1989**, *119*, 39–50. [[CrossRef](#)]
20. Keltjens, W.G. Effects of aluminum on growth and nutrient status of Douglas-fir seedlings grown in culture solution. *Tree Physiol.* **1990**, *6*, 165–175. [[CrossRef](#)]
21. Hirano, Y.; Frey, B.; Brunner, I. Contrasting reactions of roots of two coniferous tree species to aluminum stress. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *77*, 12–18. [[CrossRef](#)]
22. Ryder, M.; Gérard, F.; Evans, D.E.; Hodson, M.J. The use of root growth and modelling data to investigate amelioration of aluminium toxicity by silicon in *Picea abies* seedlings. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *97*, 52–58. [[CrossRef](#)]
23. Prabagar, S.; Hodson, M.J.; Evans, D.E. Silicon amelioration of aluminium toxicity and cell death in suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *70*, 266–276. [[CrossRef](#)]
24. Raynal, D.J.; Joslin, J.D.; Thornton, F.C.; Schaedle, M.; Henderson, G.S. Sensitivity of tree seedlings to aluminum: iii. red spruce and loblolly pine. *J. Environ. Qual.* **1990**, *19*, 180–187. [[CrossRef](#)]
25. Lelu-Walter, M.A.; Gautier, F.; Eliášová, K.; Sanchez, L.; Teyssier, C.; Lomenech, A.M.; Le Metté, C.; Hargreaves, C.; Trontin, J.-F.; Reeves, C.; et al. High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: Two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2018**, *132*, 137–155. [[CrossRef](#)]
26. Zhao, S.J.; Wang, J.H.; Liang, Y.L.; Xu, L.X. Somatic Embryogenesis and plantlet regeneration from hairy roots transformed by agrobacterium rhizogenes in panax quinquefolium L. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* **2012**, *6*, 97–100.
27. Lelu, M.A.; Bastien, C.; Klimaszewska, K.; Ward, C.; Charest, P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1994**, *36*, 107–115. [[CrossRef](#)]
28. Lelu, M.A.; Bastien, C.; Klimaszewska, K.; Charest, P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1994**, *36*, 117–127. [[CrossRef](#)]
29. Tirajoh, A.; Kyung, T.S.; Punja, Z.K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in American ginseng (*Panax quinquefolium* L.). *In Vitro. Cell. Dev. Bio. Plant* **1998**, *34*, 203–211. [[CrossRef](#)]
30. Eticha, D.; Stass, A.; Horst, W.J. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: Significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant Cell Environ.* **2005**, *28*, 1410–1420. [[CrossRef](#)]

31. Zhou, G.F.; Delhaize, E.; Zhou, M.X.; Ryan, P.R. Biotechnological solutions for enhancing the aluminium resistance of crop plants. In *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*; Shanker, A., Venkateswarlu, B., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2011; pp. 119–142. [[CrossRef](#)]
32. DeWald, L.E.; Sucoff, E.I.; Ohno, T.O.; Buschena, C.A. Response of northern red oak (*Quercus rubra*) seedlings to soil solution aluminum. *Can. J. For. Res.* **1990**, *20*, 331–336. [[CrossRef](#)]
33. Arroyave, C.; Barceló, J.; Poschenrieder, C.; Tolrà, R. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, 1477–1483. [[CrossRef](#)]
34. Wagatsuma, T.; Kaneko, M.; Hayasaka, Y. Destruction process of plant root cells by aluminum. *Soil Sci. Plant Nutr.* **1987**, *33*, 161–175. [[CrossRef](#)]
35. Souza, L.T.D.; Cambraia, J.; Ribeiro, C.; de Oliveira, J.A.; da Silva, L.C. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. *Bragantia* **2016**, *75*, 19–25. [[CrossRef](#)]
36. Blamey, F.P.C.; Nishizawa, N.K.; Yoshimura, E. Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminum injuries to mungbean roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2004**, *50*, 67–76. [[CrossRef](#)]
37. Kopittke, P.M.; Blamey, F.P.C.; Menzies, N.W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* **2008**, *303*, 217–227. [[CrossRef](#)]
38. Motoda, H.; Kano, Y.; Hiragami, F.; Kawamura, K.; Matsumoto, H. Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. *Plant Soil* **2010**, *333*, 49–58. [[CrossRef](#)]
39. Lăpădătescu, S.; Petolescu, C.; Lazăr, A.; Bălă, M. Influence of growth regulators on morphogenetic processes under in vitro condition. *J. Hortic. For. Biotechnol.* **2012**, *16*, 197–202.
40. Lebedev, V.; Arkaev, M.; Dremova, M.; Pozdniakov, I.; Shestibratov, K. Effects of growth regulators and gelling agents on ex vitro rooting of raspberry. *Plants* **2018**, *8*, 3. [[CrossRef](#)]
41. van den Dries, N.; Gianni, S.; Czerednik, A.; Krens, F.A.; de Klerk, G.J.M. Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 5221–5230. [[CrossRef](#)]
42. Kevers, C.; Franck, T.; Strasser, R.J.; Dommes, J.; Gaspar, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2004**, *77*, 181–191. [[CrossRef](#)]
43. Dantas, A.K.; Majada, J.P.; Fernández, B.; Cañal, M.J. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. *Plant Growth Regul.* **2001**, *33*, 237–243. [[CrossRef](#)]
44. Huang, J.W.; Grunes, D.L.; Kochian, L.V. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta* **1992**, *188*, 414–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pongrac, P.; Tolrà, R.; Hajiboland, R.; Vogel-Mikuš, K.; Kelemen, M.; Vavpetič, P.; Pelicon, P.; Barceló, J.; Regvar, M.; Poschenrieder, C.; et al. Contrasting allocation of magnesium, calcium and manganese in leaves of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) plants may explain their different extraction efficiency into tea. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *135*, 110974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. van Praag, H.J.; Weissen, F.; Dreze, P.; Cogneau, M. Effects of aluminium on calcium and magnesium uptake and translocation by root segments of whole seedlings of Norway spruce (*Picea abies* Karst). *Plant Soil* **1997**, *189*, 267–273. [[CrossRef](#)]
47. Ribeiro, M.A.Q.; de Almeida, A.A.F.; Mielke, M.S.; Gomes, F.P.; Pires, M.V.; Baligar, V.C. Aluminum effects on growth, photosynthesis, and mineral nutrition of cacao genotypes. *J. Plant Nutr.* **2013**, *36*, 1161–1179. [[CrossRef](#)]
48. Abdalla, M.M. Physiological aspects of aluminium toxicity on some metabolic and hormonal contents of *Hordeum Vulgare* seedlings. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **2008**, *2*, 549–560.
49. Maathuis, F.J.M. Sodium in plants: Perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 849–858. [[CrossRef](#)]
50. Singha, S.; Townsend, E.C.; Oberly, G.H. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1990**, *23*, 135–142. [[CrossRef](#)]
51. Pasqualeto, P.L.; Zimmerman, R.H.; Fordham, I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1988**, *14*, 31–40. [[CrossRef](#)]
52. Ryan, P.R.; Delhaize, E. The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Funct. Plant Biol.* **2010**, *37*, 275–284. [[CrossRef](#)]

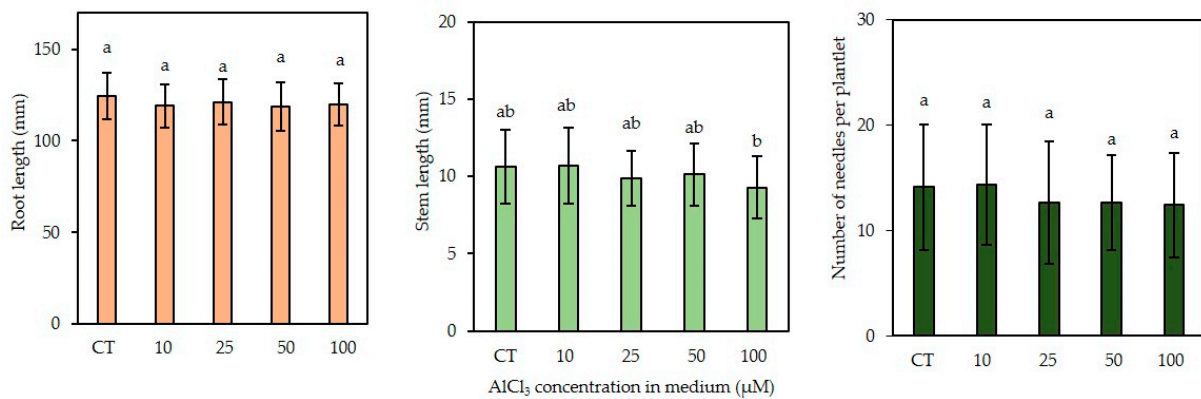
53. Cuenca, G.; Herrera, R.; Medina, E.E. Aluminium tolerance in trees of a tropical cloud forest. *Plant Soil* **1990**, *175*, 169–175. [[CrossRef](#)]
54. Kariya, K.; Demiral, T.; Sasaki, T.; Tsuchiya, Y.; Turkan, I.; Sano, T.; Hasezawa, S.; Yamamoto, Y. A novel mechanism of aluminum-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *128*, 196–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dong, Y.; Wang, H.; Chang, E.; Zhao, Z.; Wang, R.; Xu, R.; Jiang, J. Alleviation of aluminum phytotoxicity by canola straw biochars varied with their cultivating soils through an investigation of wheat seedling root elongation. *Chemosphere* **2019**, *218*, 907–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Reeves, C.; Hargreaves, C.; Trontin, J.F.; Lelu-Walter, M.A. Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryogenic tissue of Douglas-fir. *Trees* **2018**, *32*, 175–190. [[CrossRef](#)]
57. Eticha, D.; Staß, A.; Horst, W.J. Localization of aluminium in the maize root apex: Can morin detect cell wall-bound aluminium? *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 1351–1357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Astier, C.; Gloaguen, V.; Faugeron, C. Phytoremediation of cadmium-contaminated soils by young Douglas fir trees: Effects of cadmium exposure on cell wall composition. *Int. J. Phytoremediation* **2014**, *16*, 790–803. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

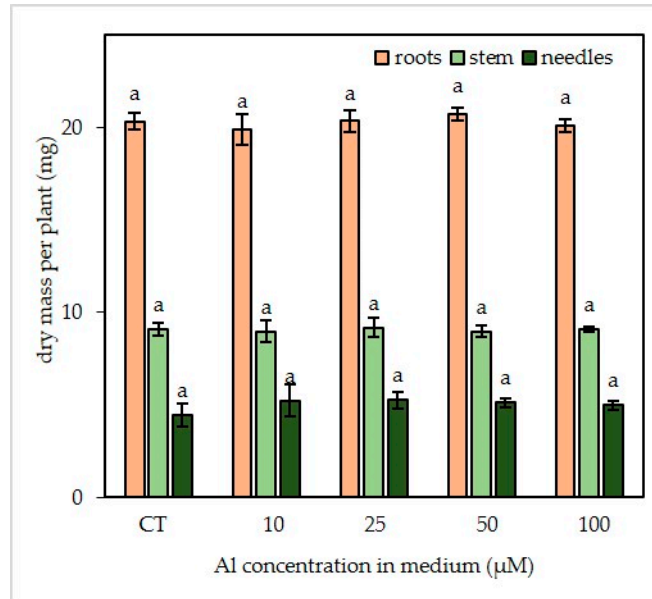


**Figure S1:** Cotyledonary somatic embryos of Douglas-fir after 8 weeks of maturation (bar = 3 mm).



**Figure S2:** Effect of AlCl<sub>3</sub> concentration in culture medium (range 0-100 μM AlCl<sub>3</sub>) on root and aerial growth of Douglas fir somatic plantlets *in vitro*. After one week on germination medium, somatic plantlets were transferred on Al-containing medium. Eight weeks later, plantlets with a root length of at least 40 mm (R++) were kept and analyzed. Directly after harvest, the length of the roots and stems and the number of needles were measured. Each bar of the histogram represents the average and standard deviation (SD) of four independent experiments with each 20 somatic plantlets per condition. Different letters indicate significant differences between exposure conditions ( $p < 0.05$ ), ANOVA test,  $n = 80$  (mean +/- SD). CT: control treatment.





**Figure S3:** Effect of  $\text{AlCl}_3$  concentration in culture medium (range 0-100  $\mu\text{M}$ ) on the average dry mass of various organs of *in vitro* Douglas fir somatic plantlets R++. For one harvest, the same organ of all somatic plantlets of the same condition were grouped to obtain a more accurate average mass. Organs were then lyophilized and weighed. Each bar of the histogram represents the mean and standard deviation (SD) of four independent experiments with each 20 plantlets per condition. Different letters indicate significant differences between exposure conditions ( $p < 0.05$ ), ANOVA test.  $n = 4$  (mean  $\pm$  SD). R++ plantlets showed a root length  $> 40$  mm after one week of growth on germination medium. CT: control treatment.



## Résumé

---

En Europe, les forêts de résineux sont très répandues et connues pour modifier les caractéristiques physicochimiques des sols forestiers, essentiellement en termes d'acidité. A des pH inférieurs à 5,5, l'aluminium naturellement présent dans le sol est solubilisé et se retrouve sous une forme mobile ( $\text{Al}^{3+}$ ), biodisponible et par conséquent toxique pour les plantes. Les travaux menés ont porté plus particulièrement sur le sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), un conifère largement répandu en France et particulièrement dans la région Limousin. Plusieurs conditions de culture différentes (conditions contrôlées *in vitro* et conditions semi contrôlées sous serre sur sols forestiers acides et riches en Al potentiellement phytodisponible), ont été utilisées pour étudier, à des stades de développement différents (stade plantules et stade jeunes arbres) et pour des périodes d'exposition différentes (2 et 11 mois) les réponses du sapin de Douglas suite à son exposition à l'Al. Les résultats ont montré que la croissance du sapin de Douglas et sa nutrition minérale sont perturbées quand les plantules sont exposées à des concentrations élevées en Al (500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  *in vitro* ; environ 1 mg  $\text{Al}\cdot\text{g}^{-1}$  sol sec avec des pH d'environ 5 sur sols forestiers). Les symptômes de toxicité concernent essentiellement les racines qui accumulent la majorité de l'Al absorbé par la plante, l'aluminium étant préférentiellement localisé dans les parois cellulaires des tissus de la pointe racinaire. Face à la toxicité aluminique, le sapin de Douglas développe différentes stratégies. D'une part, la caractérisation chimique de la paroi cellulaire a mis en évidence des modifications quantitatives et qualitatives dans la composition polysaccharidique de la paroi notamment en pectines (plus riches en acides galacturonique et moins ramifiées) suite à une régulation de l'activité pectine méthylestérase, et en hémicelluloses (plus riches en glucomannanes), suggérant un processus de rétention de l'Al dans les structures pariétales. D'autre part, au niveau intracellulaire, les résultats ont montré une stimulation de l'activité guaiacol peroxydase, une enzyme clé dans la réduction des symptômes du stress oxydatif induit dans des conditions de stress aluminique ainsi qu'une accumulation de la proline, potentiellement capable de chélater l'Al à l'intérieur de la cellule. Ainsi, le sapin de Douglas présente un seuil de tolérance à l'Al relativement élevé comparable à celui d'autres conifères. Cette tolérance met en jeu une stratégie à l'échelle cellulaire basée à la fois sur l'exclusion au niveau pariétal mais aussi de façon complémentaire sur des mécanismes de chélation au niveau intracellulaire.

---

Mots-clés : *Pseudotsuga menziesii*, stress aluminique, sols acides, tolérance, paroi cellulaire, pectines

## Abstract

---

In Europe, softwood forests are very abundant and are characterized by an acidic soil profile. In these conditions, when the soil pH drops below 5.5, aluminum is present in soils in a soluble and bioavailable form  $\text{Al}^{3+}$ . This work was carried out on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*), a coniferous tree, widely distributed in France and particularly in the Limousin region. In this study we used different cultivation methods (*in vitro* cultures with controlled conditions, and semi-controlled conditions in greenhouse on naturally acidic forest soils rich in Al). Plants were analyzed at different stages of development (seedling stage and young tree stage) and for different exposure periods (2 and 11 months). The results have shown that the growth of Douglas fir and its mineral nutrition were disturbed when exposed to high Al concentrations (500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  *in vitro*, and about 1 mg  $\text{Al}\cdot\text{g}^{-1}$  at pH 5 on forest soils). We showed that the roots exhibited severe symptoms of toxicity and accumulated the majority of the Al within the cell wall. It has been shown that, to cope with aluminum toxicity, Douglas fir developed different strategies. On one hand, the chemical characterization of the cell wall revealed quantitative and qualitative modifications in the polysaccharidic composition of the wall, in particular pectins (harboring a higher galacturonic acid content with less ramification) following regulation of pectin methylesterase activity, and hemicelluloses (richer in glucomannans), suggesting a trapping process of Al in the cell wall structures. On the other hand, at the intracellular level, the results showed a stimulation of a key enzyme activity involved in the reduction of oxidative stress induced under aluminum stress, as well as an accumulation of proline, potentially capable of chelating Al inside the cell. Therefore, Douglas fir plantlets showed a relative high tolerance level to Al equivalent to other coniferous species which can be explained at the cellular level by an exclusion process involving retention by the cell wall but also a complexation process in the intracellular compartment.

---

Keywords : *Pseudotsuga menziesii*, aluminum stress, acidic soils, cell wall, pectins

