

UNIVERSITÉ DE LILLE – FACULTÉ DES SCIENCES
École doctorale Biologie Santé de Lille

Thèse

Discipline : Biochimie

Réalisée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle
(UGSF, UMR CNRS 8576)

Clémence SIMON

Élucidation des processus de lignification par la stratégie du rapporteur
chimique alliée à la microscopie confocale en fluorescence et à la
résonance paramagnétique électronique

*Thèse dirigée par le Pr. Christophe BIOT
et le Dr. Hervé VEZIN*

Soutenue le 23 octobre 2019

Membres du jury :

Dr. Florence MAHUTEAU

Directeur de Recherche, UMR 9187, Paris

Pr. Arnaud GAUTIER

Professeur des Universités, UMR 7203, Paris

Pr. Sandrine BOUQUILLON

Professeur des Universités, UMR CNRS 7312, Reims

Pr. Christophe BIOT

Professeur des Universités, UMR CNRS 8576, Villeneuve d'Ascq

Dr. Hervé VEZIN

Directeur de Recherche, UMR CNRS 8516, Villeneuve d'Ascq

Dr. Cédric LION

Maître de conférences, UMR CNRS 8576, Villeneuve d'Ascq

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Co-encadrant de thèse

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire :
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, UMR CNRS 8576)
Cité Scientifique, Bâtiment C9, Avenue Mendeleiev
59655, Villeneuve d'Ascq, France

Résumé

La lignine est un polymère polyphénolique présent au niveau de la paroi végétale, qui forme avec la cellulose la biomasse lignocellulosique. Cette dernière est impliquée dans de nombreux processus industriels (biocarburant, pâte à papier, *etc.*). Une meilleure compréhension de sa biosynthèse est donc nécessaire pour améliorer la valorisation de la biomasse. La lignine est composée de trois principaux monomères appelés monolignols (H, G et S) qui sont assemblés par un couplage radicalaire initié par des laccases et/ou peroxydases lors de la lignification. L'émergence récente de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal apparaît comme une technique idéale pour étudier les processus de lignification. Dans cette stratégie, un analogue de la biomolécule d'intérêt modifié avec une étiquette chimique biocompatible est incorporé dans la biomacromolécule cible via les voies métaboliques. Il est ensuite couplé à une sonde grâce à une réaction chimique bioorthogonale pour être détecté. Ces travaux de thèse présentent le développement d'outils chimiques basés sur la stratégie du rapporteur chimique afin d'étudier les processus de lignification. Une stratégie inédite de triple marquage a été mise au point pour étudier la dynamique de lignification dans la paroi végétale par microscopie confocale de fluorescence. Des analogues portant des groupements méthylcyclopropène, azoture, et alcyne ont été conçus pour chaque monolignol (S, H et G respectivement) et ont été incorporés simultanément dans la lignine *de novo*. Ces analogues ont ensuite été liés sélectivement à un fluorophore par des réactions de ligation bioorthogonale spécifiques lors d'un triple marquage séquentiel (DAinv, SPAAC et CuAAC respectivement). La microscopie confocale de fluorescence a permis de visualiser leur incorporation différentielle dans la lignine et d'obtenir des informations sur la dynamique de lignification chez différents systèmes végétaux (sections de tiges et de racines, tiges entières, *etc.*) et chez différentes espèces végétales (lin, *Arabidopsis thaliana*, peuplier, *etc.*). De plus, le triple marquage a pu être réalisé avec deux types de biomolécules pour visualiser la biosynthèse simultanée de la lignine avec des polysaccharides non cellulosiques. Un second axe de recherche novateur a été initié afin de valider l'incorporation métabolique d'un analogue de monolignol dans les tissus végétaux et sa détection à l'aide d'une sonde radicalaire par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. Cette nouvelle méthodologie pourra à terme fournir des informations sur la structure, la concentration et l'environnement de la sonde incorporée détectant spécifiquement la lignine *de novo*.

Mots clés : lignification, stratégie du rapporteur chimique, triple marquage bioorthogonal, microscopie confocale de fluorescence, résonance paramagnétique électronique.

Abstract

Elucidation of lignification process by chemical reporter strategy combined with confocal fluorescence microscopy and electron paramagnetic resonance spectroscopy

Lignin is a phenolic polymer of plant cell wall which forms with cellulose the lignocellulosic biomass, involved in a variety of industrial applications (biofuel, paper making, *etc.*). A better understanding of its formation within plant cell walls is needed to improve the valorization of this biomass. Lignin is mainly composed of three monomers called monolignols (H, G and S) that are assembled by a radical polymerization process initiated by laccases and/or peroxydases during lignification. The recent emergence of the bioorthogonal chemical reporter strategy appears as a powerful tool to study lignification processes. In this strategy, an analogue of the biomolecule of interest modified with a biocompatible chemical tag is metabolically incorporated into the target biomacromolecule. It is then detected by fluorophore tagging initiated by a bioorthogonal chemistry reaction. The current work presents the development of chemical tools based on the chemical reporter strategy for the study of lignification process. A novel triple labeling strategy has been developed to study lignification dynamics in plant cell wall by confocal fluorescence microscopy. Analogs bearing methylcyclopropenyl-, azido-, and alkynyl tags were synthesized for each monolignol (S, H and G respectively) and incorporated into the *de novo* lignin. These analogs were then selectively linked to a fluorophore by a specific bioorthogonal ligation reaction during a sequential triple labeling (DAInv, SPAAC, and CuAAC respectively). Fluorescence confocal microscopy allowed visualization of their differential incorporation into lignin. It gave informations about lignification dynamics in different plant systems (stem and root cross sections, whole stems, *etc.*) and to various plant species (flax, *Arabidopsis thaliana*, poplar, *etc.*). In addition, this triple labeling could be done with two types of biomolecules to simultaneously monitor the biosynthesis of lignin and non-cellulosic polysaccharides. A second innovative research axis was initiated to validate the metabolic incorporation of a monolignol analog in plant tissues with its detection using a radical probe by electronic paramagnetic resonance spectroscopy. This new methodology could ultimately provide informations about the structure, concentration and environment of the incorporated probe specifically by detection of *de novo* lignin.

Keywords: lignification, chemical reporter strategy, bioorthogonal triple labeling, fluorescence confocal microscopy, electronic paramagnetic resonance.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au **Pr. Arnaud Gautier** et au **Pr. Sandrine Bouquillon** pour avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également le **Dr. Florence Mahuteau** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le **Pr. Christophe D'Hulst**, Directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. De même, j'adresse mes plus vifs remerciements au **Dr. Yann Guérardel** pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de recherche au sein de son équipe « Glycobiologie Structurale des Interactions Hôtes-Pathogènes » et également pour sa bienveillance et ses conseils.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance au **Pr. Christophe Biot**, mon directeur de thèse, pour sa confiance, sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements. Merci d'avoir autant contribué à ma réussite en me poussant à développer mes compétences, en m'impliquant dans de nombreux événements et en m'encourageant toujours lors de mes moments de doute.

Je remercie grandement le **Dr. Hervé Vezin**, Directeur du Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, d'avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse. Merci de m'avoir permis de découvrir la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique, en faisant preuve de patience et de bienveillance.

Je remercie très chaleureusement le **Dr. Cédric Lion**, mon co-encadrant de thèse, pour m'avoir suivie depuis le stage de master 1, pour toutes les connaissances pratiques et théoriques ainsi que la rigueur scientifique qu'il m'a transmises, pour ses conseils et son regard critique qui m'ont permis de m'améliorer.

J'adresse mes remerciements les plus vifs au **Pr. Simon Hawkins** pour avoir également participé à mon encadrement et m'avoir permis de découvrir les joies de travailler sur un modèle végétal, pour sa disponibilité, ses conseils et sa grande implication dans ce projet transdisciplinaire.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont participé à ce projet :

Le **Pr. Patrice Lerouge** pour sa bienveillance et ses conseils prodigués lors de mes comités de suivi de thèse.

Le **Dr. Christian Slomianny** et **Elodie Richard** de la plateforme d'imagerie BICeL, pour avoir réalisé les premières analyses par microscopie confocale lors de mon stage de master 2 et mes premiers mois de thèse.

Le **Dr. Corentin Spriet**, responsable de la plateforme d'imagerie TISBio, pour m'avoir formée à la microscopie confocale, pour l'apport de son expertise en traitement d'image et pour sa bonne humeur.

Les membres de l'équipe « **Fibres Végétales** », qui m'ont toujours accueillie à bras ouverts et ont toujours répondu à mes questions avec bienveillance. Je remercie plus particulièrement le **Dr. Anne-Sophie Blervarcq** et le **Dr. Brigitte Huss** pour m'avoir formée aux techniques de biologie végétale, pour leur aide et leurs conseils. Merci également au **Dr. Fabien Baldacci** pour nos collaborations lors de cette dernière année de thèse.

Les membres de l'équipe « **Glycobiologie Structurale des Interactions Hôtes-Pathogènes** » et de la plateforme **PAGés**, avec qui ce fut un plaisir de travailler au quotidien. Je remercie plus particulièrement le **Dr. Christophe Mariller** pour ses nombreux conseils procurés au cours de ces trois années et pour m'avoir formée à la chromatographie HPLC. Merci aussi à **Shin-Yi** de m'avoir formée en spectrométrie de masse avec une grande gentillesse.

Le **Dr. Pierre-André Gilormini**, ancien doctorant « chemobiologiste » de l'équipe, pour m'avoir initiée à de nombreuses techniques, pour ses conseils toujours bienvenus et son empathie.

Marc Martel, pour m'avoir permis de travailler sur la chromatographie HPLC du bâtiment C5 à de nombreuses reprises.

Les membres de l'équipe RPE du LASIR, **Hania Ahouari** et **Giuseppe Sicoli**, pour leurs conseils et leur aide précieuse. Un merci tout particulier à Hania d'avoir pris sur son temps afin de me former à la spectroscopie RPE.

Léa Dugrosprez que j'ai encadrée lors d'un stage.

Les enseignants du parcours Biochimie avec qui j'ai pris plaisir à travailler.

Je remercie les anciens doctorants de l'équipe, **Thomas, Clément, Alexandre** et **James**. Merci aux copines de thèse avec qui j'ai passé ces trois années, **Lin, Camille** et **Violaine**, et aux copines de laboratoire, **Angelina** et **Anne-Sophie**.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du bâtiment C9 pour leur accueil sympathique et pour avoir participé à l'ambiance conviviale de ces trois années.

Pour finir, je remercie **mes amis** « hors laboratoire », pour leur présence et pour m'avoir permis de décompresser et de relativiser à travers nos moments de détente. Je remercie sincèrement **mes parents, mon frère** et **ma famille** pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études. Et bien sûr, merci à **Florian** qui m'a toujours soutenue, avec qui j'ai traversé les périples de la thèse et grâce à qui j'en suis arrivée là.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Remerciements	9
Table des matières	11
Liste des figures	17
Liste des abréviations	23
Introduction générale	27
Première partie : généralités	29
I. La chimie <i>click</i> bioorthogonale pour le marquage des biomolécules	30
1. <i>La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal</i>	30
a. Les origines.....	30
b. La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal	32
2. <i>Le concept de chimie click</i>	34
3. <i>Les principales réactions bioorthogonales</i>	35
a. La réaction de Staudinger	35
b. La réaction de type CuAAC	37
c. La réaction de type SPAAC.....	40
d. La réaction de DAinv	47
e. Conclusion	57
4. <i>Autres réactions bioorthogonales</i>	58
a. Oxydes de nitrile et nitrones	58
b. Sydnones et diazoalcanes	59
c. Cycloadditions photoactivées	59
5. <i>Les sondes fluorogéniques</i>	61
6. <i>Les marquages métaboliques chez les végétaux</i>	64
7. <i>Conclusion</i>	68
II. La paroi cellulaire végétale, structure et composition	71

1. Organisation de la paroi.....	71
2. Composition de la paroi.....	72
a. Composés polysaccharidiques.....	72
b. Protéines structurales et enzymatiques.....	75
c. Composés phénoliques	76
3. Généralités sur la lignine.....	77
a. Rôle de la lignine et principaux types cellulaires lignifiés	77
b. Composition et plasticité.....	78
c. Enjeux économiques de la lignine	80
4. Biosynthèse de la lignine.....	81
a. Biosynthèse des monolignols	81
b. Régulation transcriptionnelle.....	84
c. Plasticité de la lignine, une composition plus large.....	86
d. Transport des monolignols	88
e. Polymérisation des monolignols.....	93
5. Conclusion.....	100
III. Caractérisation et imagerie de la lignine	101
1. Quantification et caractérisation de la lignine.....	101
a. Méthodes de dégradation chimique	101
b. Méthodes spectroscopiques et spectrométriques.....	103
2. Imagerie de la lignine.....	106
a. Histochimie.....	106
b. Immunolocalisation	108
c. Autofluorescence	109
d. Spectroscopie vibrationnelle	111
e. Autres approches et technologies émergentes	113
f. Conclusion et limites.....	116
3. Imagerie de la lignine par la chimie dans le vivant	116
Deuxième partie : objectifs.....	121
Troisième partie : résultats et discussion.....	123
I. Stratégie du rapporteur chimique appliquée à chaque monolignol.....	124
1. Elaboration de la stratégie générale.....	124

2. Conception des rapporteurs chimiques	125
3. Synthèse des rapporteurs chimiques	127
a. Synthèse de G _{ALK}	127
b. Synthèse de H _{AZ}	128
c. Synthèse de S _{ALKE} et S _{CP}	130
4. Mise au point des réactions de ligation bioorthogonale par HPLC	132
a. Choix des fluorophores.....	132
b. Suivi de la réaction SPAAC	133
c. Suivi de la réaction de DA _{inv}	134
d. Conclusion.....	136
5. Application sur modèle végétal	136
a. Le lin comme modèle d'étude de la lignification	136
b. Protocole de mono-marquage sur coupes végétales	138
c. Optimisation du protocole	138
d. Protocole standard sur coupes de tiges de lin	139
e. Signification biologique	140
f. Spécificité de l'incorporation métabolique	142
II. Double marquage des unités G_{ALK} et H_{AZ}.....	145
1. Le double marquage dans la littérature	145
2. Choix des rapporteurs chimiques.....	145
3. Compatibilité de la séquence 1.SPAAC 2.CuAAC in vitro.....	146
4. Double marquage sur modèle végétal : stratégie BLISS.....	148
a. Protocole standard	148
b. Applicabilité sur modèle végétal	148
c. Choix de la séquence réactionnelle.....	149
5. Apport de la stratégie BLISS pour l'étude de la dynamique de lignification des tiges	151
a. A l'échelle du tissu	151
b. Selon le type cellulaire	152
c. Au sein d'un type cellulaire : les fibres trachéides	154
d. Hypolignification des fibres périphloémiennes.....	155
6. Apport de la stratégie BLISS pour l'étude de la dynamique de lignification des racines	156
a. Lignification du xylème secondaire.....	156
b. Lignification de l'endoderme	158

7. Marquage métabolique sur tiges entières	159
III. Triple marquage des unités G_{ALK}, H_{AZ} et S_{CP}	162
1. Le triple marquage dans la littérature	162
2. Conception du triple marquage.....	162
3. Compatibilité de la séquence 1.DA _{inv} 2.SPAAC 3.CuAAC en solution.....	162
4. Application sur coupes de tiges de lin.....	164
5. Application à d'autres espèces d'intérêt biologique	165
6. Marquage métabolique sur tiges entières	168
IV. Marquage simultané de deux polymères pariétaux	171
1. Choix du rapporteur monosaccharidique	171
2. Choix du système expérimental	171
3. Triple marquage Ac ₄ FucAl, H _{AZ} , S _{CP}	171
V. Vers la microscopie de super-résolution.....	174
VI. RPE, résultats préliminaires	176
1. Principe de la RPE.....	176
a. Interactions magnétiques	176
b. Marquage de spin : sonde TEMPO	177
2. La RPE appliquée aux modèles végétaux.....	179
3. Objectifs	180
4. Stratégie générale.....	181
5. Conception et synthèse des sondes radicalaires	181
6. Vérification de l'efficacité du couplage de DA _{inv} par spectrométrie de masse.....	183
7. Spectroscopie RPE	184
a. Analyse des sondes en solution	184
b. Analyse des sondes sur tissus végétaux.....	185
8. Conclusion et perspectives	188
Conclusion générale	191
Partie expérimentale	193
I. Synthèse et caractérisation des rapporteurs chimiques	193

1. Généralités	193
2. Synthèse et caractérisation du rapporteur G_{ALK} (analogue de l'alcool coniférylique).....	193
3. Synthèse et caractérisation du rapporteur H_{AZ} (analogue de l'alcool p-coumarylique).....	195
4. Synthèse et caractérisation des rapporteurs chimiques S_{ALKE} et S_{CP} (analogues de l'alcool sinapylique).....	198
a. Synthèse du composé intermédiaire 15	198
b. Synthèse du rapporteur chimique S_{ALKE}	200
c. Synthèse du rapporteur chimique S_{CP}	202
II. Expériences HPLC	205
1. Généralités	205
2. Suivi cinétique de la réaction de ligation SPAAC.....	205
3. Suivi cinétique de la réaction de ligation de DA_{inv}	206
4. Compatibilité de la séquence 1.SPAAC 2.CuAAC	206
5. Compatibilité de la séquence 1. DA_{inv} 2.SPAAC 3.CuAAC	206
III. Evaluation de la toxicité des rapporteurs chimiques.....	207
IV. Expériences d'imagerie sur modèles végétaux	208
1. Matériel végétal.....	208
a. Lin.....	208
b. Autres espèces végétales	208
2. Mono-marquages sur coupes transversales de tige de lin	209
a. Incorporation métabolique des rapporteurs chimiques H_{AZ} , G_{ALK} ou S_{CP}	209
b. Réaction de ligation avec le fluorophore.....	209
3. Double et triple marquages.....	210
a. Incorporation métabolique des rapporteurs chimiques	210
b. Réactions de ligation bioorthogonale	211
4. Triple marquage Ac_4FucAl , S_{CP} et H_{AZ}	212
5. Imagerie	212
V. Spectroscopie RPE.....	214
1. Synthèse des sondes paramagnétiques	214
a. Synthèse de la sonde méthyl-tétrazine-TEMPO (CS093)	214
b. Synthèse de la sonde méthyl-tétrazine-PEG ₄ -TEMPO (CS094).....	215

c. Synthèse de la sonde tétrazine-PEG ₅ -TEMPO (CS095).....	215
2. Suivi de la ligation de DA _{inv} en solution par spectrométrie de masse	216
3. Marquage radicalaire des unités S _{CP} sur modèle végétal	216
4. Spectroscopie RPE	217
Annexes	219
<i>Annexe 1 : optimisation des conditions réactionnelles de la réaction de Williamson pour la synthèse du composé 10.</i>	<i>219</i>
<i>Annexe 2 : structure chimique des fluorophores</i>	<i>219</i>
<i>Annexe 3 : rapporteur H_{AZ}, suivi de la réaction de ligation SPAAC en solution</i>	<i>220</i>
<i>Annexe 4 : rapporteur S_{ALKE}, suivi de la réaction de ligation de DA_{inv} en solution.....</i>	<i>221</i>
<i>Annexe 5 : rapporteur S_{CP}, suivi de la réaction de ligation de DA_{inv} en solution.....</i>	<i>222</i>
<i>Annexe 6 : évaluation de la toxicité des rapporteurs S_{CP} et H_{AZ}.....</i>	<i>222</i>
<i>Annexe 7 : marquage métabolique sur coupes de tiges de lin, contrôles négatifs</i>	<i>223</i>
<i>Annexe 8 : mono-marquage des unités G_{ALK}, optimisation de la réaction de ligation CuAAC... 224</i>	<i>224</i>
<i>Annexe 9 : mono-marquage des unités H_{AZ}, optimisation de la réaction de ligation SPAAC.....</i>	<i>225</i>
<i>Annexe 10 : mono-marquage des unités S_{CP}, optimisation de la réaction de ligation de DA_{inv} 225</i>	<i>225</i>
<i>Annexe 11 : spécificité de l'incorporation métabolique des rapporteurs H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP}</i>	<i>226</i>
<i>Annexe 12 : triple marquage H_{AZ}/G_{ALK}/S_{CP} sur modèles végétaux.....</i>	<i>227</i>
<i>Annexe 13 : spectroscopie RPE des sondes radicalaires en solution</i>	<i>229</i>
<i>Annexe 14 : détermination de la concentration en sonde radicalaire incorporée dans les tissus végétaux par spectroscopie RPE.....</i>	<i>230</i>
<i>Annexe 15 : production scientifique.....</i>	<i>231</i>
Bibliographie	233

Liste des figures

Figure 1 : première application de la stratégie du rapporteur chimique.	32
Figure 2 : représentation schématique de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal	33
Figure 3 : réaction de Staudinger originelle.	35
Figure 4 : mécanisme de la ligation de Staudinger-Bertozzi.....	35
Figure 5 : mécanisme de la ligation "traceless" de Staudinger.	36
Figure 6 : évolution de la cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne	37
Figure 7 : mécanisme de la CuAAC.....	38
Figure 8 : exemple de ligands tétravalents du cuivre (I)	39
Figure 9 : marquage métabolique <i>in vivo</i> des phospholipides par la CuAAC.....	40
Figure 10 : réaction de type SPAAC	41
Figure 11 : marquage bioorthogonal des acides sialiques à l'aide de la SPAAC.....	42
Figure 12 : structure chimique des principaux cyclooctynes développés pour la réaction de ligation bioorthogonale SPAAC.....	43
Figure 13 : utilisation du cyclooctyne DIFO 1 pour l'imagerie <i>in vivo</i> des glycanes chez l'embryon de poisson-zèbre.....	44
Figure 14 : influence de la structure de l'azoture sur la cinétique de réaction SPAAC	46
Figure 15 : mécanisme de la réaction de Diels-Alder	47
Figure 16 : réactivité des cycloadditions de Diels-Alder	48
Figure 17 : cycloaddition de Diels-Alder classique	49
Figure 18 : mécanisme de la cycloaddition de DAinv.....	50
Figure 19 : première application du couplage de DAinv	50
Figure 20 : utilisation d'un rapporteur de type méthylcyclopropène pour le marquage des phospholipides	52
Figure 21 : structure chimique des premiers diénophiles	53
Figure 22 : structure chimique de différents diènes	53
Figure 23 : structure chimique des rapporteurs monosaccharidiques les plus efficaces pour la ligation bioorthogonale de DAinv	54

Figure 24 : principe schématique de l'approche de radioimmunothérapie pré-ciblée	56
Figure 25 : réactions bioorthogonales les plus utilisées pour des applications de bioconjugaison	57
Figure 26 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre un oxyde de nitrile généré <i>in situ</i> et un alcène ou un alcyne.	58
Figure 27 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre une nitronne et un cyclooctyne.	58
Figure 28 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre une phényl-sydnone et un bicyclononyne	59
Figure 29 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre un diazo et un cyclooctyne.....	59
Figure 30 : cycloaddition 1,3 dipolaire photoactivée entre une nitrilimine et un alcène terminal.	60
Figure 31 : cycloaddition 1,3 dipolaire photoactivée entre un ylure de nitrile et un alcène terminal. ..	60
Figure 32 : structure chimique de sondes fluorogéniques	62
Figure 33 : exemples de marquage fluorogénique par génération spontanée du fluorophore	63
Figure 34 : représentation schématique de la stratégie du rapporteur chimique appliquée aux glycanes chez les végétaux.....	64
Figure 35 : incorporation spécifique de l'Ac ₄ FucAl au sein de racines de plantules d' <i>Arabidopsis</i>	65
Figure 36 : double marquage du KdoN ₃ et de l'Ac ₄ FucAl.....	66
Figure 37 : structure des rapporteurs monosaccharidiques incorporés chez des modèles végétaux	67
Figure 38 : matrice comparative de la réactivité de différentes réactions bioorthogonales	69
Figure 39 : structure de la paroi cellulaire végétale, représentation simplifiée	72
Figure 40 : structure chimique d'une chaîne linéaire de cellulose	73
Figure 41 : représentation schématique des hémicelluloses.....	74
Figure 42 : représentation schématique des pectines	75
Figure 43 : structure chimique d'un acide cinnamique, d'un acide <i>p</i> -hydroxycinnamique et d'un monolignol constituant le monomère de base de la lignine.	76
Figure 44 : structure chimique d'une partie de polymère de lignine.....	77
Figure 45 : représentation 3D de la structure du xylème secondaire.....	78
Figure 46 : représentation simplifiée des principales étapes de formation de la lignine.....	79
Figure 47 : structure chimique de différents modèles de lignine	80
Figure 48 : voie du shikimate.....	82
Figure 49 : représentation simplifiée de la voie des phénylpropanoïdes.....	83

Figure 50 : représentation simplifiée de la régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de la lignine	85
Figure 51 : structure chimique de monolignols non conventionnels.....	86
Figure 52 : production de structures de type benzodioxane au sein de la lignine	87
Figure 53 : structure chimique d'autres composés phénoliques atypiques retrouvés dans la lignine ...	88
Figure 54 : représentation schématique des mécanismes de transport potentiels des monolignols	89
Figure 55 : étude du transport des monolignols	90
Figure 56 : mécanisme de glycosylation des monolignols chez les gymnospermes.	92
Figure 57 : absorption sélective et ATP-dépendante des monolignols libres ou glycosylés.....	93
Figure 58 : polymérisation oxydative de l'alcool coniférylique	94
Figure 59 : principales liaisons inter-unités retrouvées dans le polymère de lignine	95
Figure 60 : implication des laccases dans la lignification	98
Figure 61 : localisation des phénoloxydases PRX64 et LAC4.....	99
Figure 62 : mécanisme de solubilisation de la lignine	102
Figure 63 : spectres IRTF d'échantillons de lignine	104
Figure 64 : localisation histochimique de la lignine.....	106
Figure 65 : localisation histochimique de la lignine par la fuchsine basique et la safranine.....	107
Figure 66 : immunomarquage des épitopes syringyliques de la lignine.....	109
Figure 67 : autofluorescence de la lignine.....	110
Figure 68 : composition chimique des types cellulaires trachéïdes chez <i>Zinnia elegans</i> caractérisée par microscopie IRTF.....	112
Figure 69 : représentation de la distribution spatiale de la lignine par imagerie Raman.....	113
Figure 70 : distribution différentielle des groupements aldéhyde et alcool de la lignine visualisée par imagerie Raman hyperspectrale	113
Figure 71 : apport de la microscopie STED pour l'imagerie de la lignine.....	114
Figure 72 : utilisation de la spectrométrie de masse TOF-SIMS pour l'imagerie de la lignine.	115
Figure 73 : structure chimique de l'alcool coniférylique et de ses analogues fluorescents.....	117
Figure 74 : rapporteurs chimiques développés pour l'étude de la lignine.....	118
Figure 75 : stratégie du rapporteur chimique appliquée aux trois monolignols de la lignine.....	125

Figure 76 : polymérisation radicalaire des monolignols.	126
Figure 77 : conception des rapporteurs chimiques analogues des monolignols.....	127
Figure 78 : stratégie de synthèse de l'analogue de l'alcool coniférylique G_{ALK}	128
Figure 79 : stratégie de synthèse de l'analogue de l'alcool <i>p</i> -coumarylique H_{AZ}	129
Figure 80 : stratégie de synthèse de l'intermédiaire 15	130
Figure 81 : stratégie de synthèse de l'analogue S_{ALKE}	131
Figure 82 : stratégie de synthèse de l'analogue S_{CP}	132
Figure 83 : réaction de ligation SPAAC réalisée en solution.	133
Figure 84 : suivi de la réaction de ligation SPAAC	134
Figure 85 : réaction de DA_{inv} réalisée en solution	135
Figure 86 : suivi de la réaction de ligation de DA_{inv}	136
Figure 87 : observation d'une coupe transversale de tige de lin en microscopie confocale.....	137
Figure 88 : mono-marquage des unités H_{AZ}	140
Figure 89 : mono-marquage des unités G_{ALK} et S_{CP}	141
Figure 90 : mise en évidence de l'activité des phénoloxydases par la syringaldazine.	142
Figure 91 : spécificité de l'incorporation métabolique des unités S_{CP}	143
Figure 92 : incorporation dose-dépendante de chaque rapporteur chimique.....	144
Figure 93 : vérification de la compatibilité 1.SPAAC 2.CuAAC en solution.....	147
Figure 94 : représentation schématique de la stratégie de double marquage BLISS.....	148
Figure 95 : double marquage BLISS sur coupe transversale de tige de lin	149
Figure 96 : double marquage BLISS, choix de la séquence réactionnelle.	150
Figure 97 : double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK} incorporées selon différents ratios.....	152
Figure 98 : incorporation des rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} spécifique du type cellulaire.	154
Figure 99 : dynamique de lignification des fibres trachéides en cours de différenciation	155
Figure 100 : double marquage BLISS des fibres de lin hypolignifiées.....	156
Figure 101 : application de la stratégie BLISS sur racines de lin.....	157
Figure 102 : double marquage BLISS au niveau du jeune xylème racinaire de lin.	157
Figure 103 : stades de différenciation successifs de l'endoderme racinaire.....	158

Figure 104 : double marquage BLISS au niveau de l'endoderme.....	159
Figure 105 : double marquage BLISS sur tige entière de lin	160
Figure 106 : vérification de la compatibilité 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC par HPLC	163
Figure 107 : représentation schématique de la stratégie de triple marquage H _{AZ} /G _{ALK} /S _{CP}	164
Figure 108 : triple marquage H _{AZ} /G _{ALK} /S _{CP} sur coupe transversale de tige de lin	165
Figure 109 : triple marquage H _{AZ} /G _{ALK} /S _{CP} appliqué à d'autres espèces végétales.	167
Figure 110 : triple marquage H _{AZ} /G _{ALK} /S _{CP} sur tige entière de lin.....	168
Figure 111 : triple marquage Ac ₄ FucAl, H _{AZ} , S _{CP} sur tige entière de lin.....	172
Figure 112 : mesure des profils d'intensité de fluorescence	173
Figure 113 : apport de la microscopie de super-résolution Airyscan	175
Figure 114 : principe théorique de la spectroscopie RPE.....	177
Figure 115 : signature RPE de la sonde TEMPO.	178
Figure 116 : ensemble de spectres RPE d'un radical nitroxyde en fonction de sa mobilité.....	178
Figure 117 : stratégie mise au point pour l'étude de la lignification par la stratégie du rapporteur chimique combinée à la spectroscopie RPE.....	181
Figure 118 : structure chimique des trois sondes radicalaires synthétisées.....	182
Figure 119 : stratégie de synthèse des trois sondes radicalaires.....	183
Figure 120 : identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF du cycloadduit formé.....	183
Figure 121 : spectre RPE de la sonde CS093 en solution.	184
Figure 122 : spectres radicalaires obtenus après la stratégie du rapporteur chimique.....	186
Figure 123 : structure chimique des trois fluorophores.....	219
Figure 124 : identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF du cycloadduit 25	220
Figure 125 : suivi cinétique de la réaction de ligation SPAAC.....	220
Figure 126 : couplage de DAinv entre le fluorophore tétrazine-Cy5 26 et le rapporteur S _{ALKE}	221
Figure 127 : identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF du produit conjugué 27	222
Figure 128 : évaluation de la toxicité des rapporteurs S _{CP} et H _{AZ}	222
Figure 129 : contrôles négatifs des mono-marquages des unités G _{ALK} et S _{CP}	223
Figure 130 : contrôles négatifs du triple marquage.....	223

Figure 131 : mono-marquage des unités G_{ALK} , utilisation du BTTAA	224
Figure 132 : mono-marquage des unités G_{ALK} , optimisation des concentrations	224
Figure 133 : mono-marquage des unités H_{AZ} , optimisation du temps de ligation et de la concentration en fluorophore.	225
Figure 134 : mono-marquage des unités S_{CP} , optimisation de la concentration en fluorophore.	225
Figure 135 : expérience de dénaturation thermique,	226
Figure 136 : incorporation durée-dépendante des trois rapporteurs chimiques.....	226
Figure 137 : triple marquage sur coupe longitudinale de tige de lin	227
Figure 138 : triple marquage sur coupe transversale de racine de lin.	227
Figure 139 : triple marquage appliqué au peuplier.....	228
Figure 140 : triple marquage sur plantules de lin.	228
Figure 141 : droite d'étalonnage	229
Figure 142 : spectres RPE des sondes CS094 et 95 en solution.....	229

Liste des abréviations

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
4CL	4-coumarate-CoA-ligase
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (transporteur protéique)
ABPP	<i>activity based protein profiling</i>
Ac ₄ FucAl	6-alkynyl fucose péracétylé
Ac ₄ GalNAz	<i>N</i> -azidoacétylgalactosamine péracétylée
Ac ₄ GlcNAz	<i>N</i> -azidoacétylglucosamine
Ac ₄ ManNAz	<i>N</i> -azidoacétylmannosamine péracétylée
AGP	arabinogalactane-protéine
ATP	adénosine triphosphate
azide fluor 545	5-carboxytétraméthylrhodamine-azide
BARAC	biarylazacyclooctyne
BCN	bicyclononyne
BLISS	<i>bioorthogonal labeling imaging sequential strategy</i>
BODIPY	bore-dipyrométhène
BTAA	acide 2-[4-((bis[(1- <i>tert</i> -butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amino)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl] acétique
C	cortex
C3H	<i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase
C4H	cinnamate 4-hydroxylase
CAD	cinnamyl alcool déshydrogénase
CC	coin cellulaire
CCoAOMT	cafféoyl-CoA <i>O</i> -méthyltransférase
CCR	<i>p</i> -coumaroyl CoA réductase
COMBO	carboxyméthylmonobenzocyclooctyne
COMT	cafféate <i>O</i> -méthyltransférase
couche G	couche gélatineuse
CuAAC	<i>copper(I)-catalysed azide alkyne cycloaddition</i>
d	doublet
DA	Diels-Alder
DAinv	Diels-Alder à demande électronique inverse
DBCO-PEG ₄ -Rhodamine Green	dibenzylcyclooctyne-PEG ₄ -5/6-carboxyrhodamine 110
DCM	dichlorométhane
DHP	<i>deshydrogenation polymer</i>
DIBAC (ou DBCO)	dibenzoazacyclooctyne
DIBAL-H	hydrure de diisobutylaluminium
DIBO	dibenzocyclooctyne
DIEA	<i>N, N</i> -diisopropyléthylamine
DIFBO	difluorobenzocyclooctyne
DIFO	cyclooctyne difluoré
DIMAC	diméthoxyazacyclooctyne

DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
E	endoderme
EA	groupement électroattracteur
ED	groupement électrodonneur
F5H	férulate-5-hydroxylase
FA	acide férulique
FaTr	facteur de transcription
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FI-DIBO	dibenzocyclooctyne fluorogénique
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging</i>
fp (FP)	fibre périphloémienne
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FT	fibre trachéide
G _{ALK}	rappoteur chimique analogue de l'alcool coniférylique
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
G _{NAT}	alcool coniférylique naturel
GRP	protéine riche en glycine
H _{AZ}	rappoteur chimique analogue de l'alcool <i>p</i> -coumarylique
HCT	hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransférase
HG	homogalacturonane
H _{NAT}	alcool <i>p</i> -coumarylique naturel
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HRGP	glycoprotéine riche en hydroxyproline
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
IRTF	infrarouge à transformée de Fourier (spectroscopie)
<i>J</i>	constante de couplage (RMN)
Kdo	acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonique
KO	<i>knock-out</i>
lbf	<i>lignified bast fiber</i> (lignée mutante de lin)
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
m	multiplet
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
ManLev	<i>N</i> -levulinoyl-D-mannosamine
ManNAc	<i>N</i> -acétyl-D-mannosamine
ManNAz	<i>N</i> -azidoacétylmannosamine
ML	lamelle moyenne (<i>middle lamella</i>)
MOE	<i>metabolic oligosaccharide engineering</i>
MOFO	cyclooctyne monofluoré
monolignol G	alcool coniférylique
monolignol H	alcool <i>p</i> -coumarylique
monolignol S	alcool sinapylique

MS ½	Murashige et Skoog dilué au demi
n.d.	non déterminé
NADPH oxydase	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NST	<i>NAC secondary wall thickening promoting factor</i>
OCT	cyclooctyne
P	péricycle
pa	premières assises cellulaires
PAL	phénylalanine ammonia lyase
pBA	acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
pCA	acide <i>p</i> -coumarique
PEG	polyéthylène glycol
PeT	<i>photo-induced electron transfer</i>
Ph	phloème
PRP	protéine riche en proline
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazol- 1-yl-oxytrypirrolidinophosphonium
Py-GC/MS	(pyrolyse - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse
q	quadruplet
R	rayon parenchymateux
RGI	rhamnogalacturonane I
RGII	rhamnogalacturonane II
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	espèces réactives de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	résonance paramagnétique électronique
s	singulet
S _{ALKE}	rapporteur chimique analogue de l'alcool sinapylique portant un alcène terminal
S _{CP}	rapporteur chimique analogue de l'alcool sinapylique portant un méthylcyclopropène
sl	singulet large
S _{NAT}	alcool sinapylique naturel
SND	<i>secondary wall-associated NAC domain protein</i>
SPAAC	<i>strain promoted [3+2] alkyne-azide cycloaddition</i>
SPANC	<i>strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
T	tricine
t	triplet
ta	température ambiante
TAL	tyrosine ammonia lyase
TBAB	bromure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBAF	fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBET	<i>through bond electron transfer</i>
tBuOK	<i>tert-butylate de potassium</i>
TCO	<i>trans</i> -cyclooctène

TEA	triéthylamine
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl
tétrazine-Cy5	3-(<i>p</i> -benzylamino)-1,2,4,5-tétrazine-Cy5
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TIPSCI	chlorure de triisopropylsilyle
TMDIBO	tétraméthoxydibenzocyclooctyne
TMTH	thiacycloheptyne
TOF-SIMS	<i>time-of-flight secondary ion mass spectrometry</i>
Tris-HCl	tris(hydroxyméthyl)aminométhane-acide chlorhydrique
u.a.	unité arbitraire
UDP	uridine diphosphate
UGT	UDP-glycosyltransférase
unité C	unité catéchyle
unité G	unité guaiacyle
unité H	unité <i>p</i> -hydroxyphényle
unité S	unité syringyle
UV	ultraviolet
V	vaisseau
va	tissu vasculaire
VM	vaisseau mature
VND	<i>vascular-related NAC-domain</i>
XGA	xylogalacturonane
XM	xylème mature
xy	xylème secondaire
λ_{Em}	longueur d'onde d'émission
λ_{Exc}	longueur d'onde d'excitation

Introduction générale

Les cellules végétales se distinguent des cellules animales par la possession d'une structure semi-rigide située à l'extérieur de la membrane plasmique de la cellule : la paroi cellulaire végétale. Chez les plantes terrestres, cette structure est composée d'un assemblage de polysaccharides associés à un polymère polyphénolique nommé lignine. Ce polymère présente un intérêt à la fois au niveau fondamental et industriel. D'un point de vue physiologique, il forme une matrice pariétale hydrophobe et rigide qui remplit de nombreuses fonctions essentielles au développement de la plante (résistance mécanique, transport de l'eau et protection contre les pathogènes). D'un point de vue économique, la lignine forme avec la cellulose et les hémicelluloses la biomasse lignocellulosique, utilisée comme matière première pour de nombreux processus agro-industriels (matériaux composites, biocarburants, *etc.*). Dans ce contexte, elle présente un double enjeu : d'une part, elle piège les polysaccharides de cellulose et freine leur conversion en énergie par les industries. D'autre part, sa transformation en produits à haute valeur ajoutée (fibres de carbone, produits chimiques, *etc.*) est une thématique prometteuse dans un contexte de développement durable. Les recherches sur la biosynthèse de la lignine représentent donc un enjeu économique et écologique majeur pour pouvoir, à terme, améliorer la qualité de la biomasse lignocellulosique.

Ce projet de thèse, situé à l'interface de la chimie et de la biologie, porte sur le développement et l'utilisation d'outils chimiques afin de visualiser la dynamique de la lignification. Ce manuscrit de thèse peut ainsi être divisé en deux grandes parties. La première partie est un état de l'art du sujet de thèse. Les différents aspects de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal, méthode sur laquelle sont basés ces travaux, seront d'abord abordés. L'organisation de la paroi végétale sera ensuite évoquée et débouchera sur une description plus précise des connaissances actuelles sur la biosynthèse de la lignine. Enfin, les méthodes traditionnelles et plus récentes permettant de caractériser et de visualiser le polymère dans les tissus seront présentées.

La seconde partie de ce manuscrit sera dédiée aux travaux effectués durant ces trois années de thèse. Elle portera principalement sur le développement de stratégies de marquage, simple ou multiple, pour visualiser le processus de lignification par microscopie confocale de fluorescence, puis par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique.

Première partie : généralités

I. La chimie *click* bioorthogonale pour le marquage des biomolécules

1. La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal

a. Les origines

Les systèmes vivants sont composés d'un réseau complexe de biopolymères, ions et métabolites. L'étude de ces molécules directement dans leur environnement naturel est nécessaire afin de mieux appréhender les processus biologiques. Ces vingt dernières années, des avancées considérables à l'interface de la chimie et de la biologie ont permis le développement d'outils pour étudier les processus cellulaires de la manière la moins invasive possible. Parmi les différentes classes de biomolécules, les protéines ont bénéficié les premières de la création de sondes fluorescentes permettant de les marquer sélectivement afin de les suivre spécifiquement au sein d'une cellule ou d'un organisme vivant. La *Green Fluorescent Protein* (GFP) et ses analogues permettent effectivement de localiser précisément les protéines d'intérêt dans le système vivant en créant une protéine de fusion fluorescente par recombinaison génétique^{1,2}. Cette innovation technologique a eu un tel impact sur le monde de la recherche biologique qu'elle fut récompensée par le prix Nobel de Chimie en 2008³. Cependant, la taille imposante de la partie protéique fluorescente peut modifier les propriétés physico-chimiques de la protéine à laquelle elle est attachée. De plus, les autres classes de biomolécules (acides nucléiques, lipides, glycanes, métabolites) ne peuvent bénéficier de cette approche génétique pour être étudiées *in vitro* ou *in vivo*.

La première solution pour visualiser ces molécules a été la bioconjugaison classique. Cette technique consiste à l'origine en la formation d'une liaison covalente stable entre une biomolécule et un autre composé chimique, généralement une sonde moléculaire (fluorophore, biotine, *etc.*). Après la réalisation de l'expérience biologique, la molécule bioconjuguée peut être détectée à l'aide de la sonde par des techniques d'imagerie par exemple. Cette stratégie présente néanmoins des inconvénients majeurs : la taille et le caractère hydrophobe des sondes utilisées peuvent limiter la capacité de la molécule bioconjuguée à imiter les propriétés physico-chimiques de l'analogue naturel. Elle risque de ne pas pénétrer dans la cellule, de ne pas être reconnue ou d'être reconnue différemment par les enzymes des voies de biosynthèse ou par les transporteurs, ne reflétant alors pas la réalité des processus biologiques.

Pour contourner ces limites, une méthodologie efficace a été développée il y a une vingtaine d'années afin de visualiser les biomolécules dans leurs environnements biologiques naturels : la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal. Composée de deux étapes distinctes, cette méthodologie consiste brièvement à incorporer dans la cellule un analogue de la molécule d'intérêt fonctionnalisé avec une petite étiquette chimique. Il est ensuite couplé à une sonde grâce à une réaction bioorthogonale, permettant de détecter la molécule cible dans son environnement natif. La réaction de ligation est dite bioorthogonale car elle doit se dérouler de manière très sélective dans le système biologique et sans

interférer avec les processus biochimiques. Si le terme de ligation bioorthogonale n'a réellement été défini qu'en 2003 par Bertozzi⁴, plusieurs méthodes mises en place précédemment peuvent être considérées comme les précurseurs historiques de ce concept.

Le système tétracystéine-biarsenic

En 1998, le groupe de Tsien a proposé une alternative aux GFPs encombrées en fusionnant à la protéine d'intérêt un hexapeptide composé de quatre cystéines (de formule CCXXCC ou X n'est ni une proline ni une glycine). Une fois cette dernière exprimée en milieu biologique, les atomes de soufre des cystéines reconnaissent sélectivement deux atomes d'arsenic présents sur des sondes fluorogéniques de type fluorescéine, permettant ainsi de visualiser la protéine marquée⁵. Si le motif tétracystéine peut être considéré comme le précurseur du rapporteur chimique, cette stratégie de marquage ne s'applique encore une fois qu'aux protéines. De plus, la présence des arsenics sur les fluorophores est cytotoxique et limite les applications *in vivo*.

Les ligations hydrazide-carbonyle

Dès 1981, le groupe de Reutter a montré que des analogues non naturels de *N*-acétylmannosamine (ManNAc) peuvent être reconnus par les enzymes de la voie de biosynthèse des acides sialiques pour être convertis en acides correspondants, démontrant ainsi la tolérance de ces enzymes pour incorporer des dérivés monosaccharidiques portant une modification chimique⁶. En 1986, Rideout a quant à lui décrit un couplage entre deux groupements chimiques artificiels dans des conditions physiologiques pour former des cytotoxines *in situ*⁷. Pour cela, deux précurseurs non toxiques (le décanal possédant un groupement aldéhyde et une guanidine fonctionnalisée par une hydrazide) ont été mis en présence de différents modèles biologiques (lysats d'érythrocytes, cultures cellulaires ou colonies bactériennes). Ils se sont spontanément assemblés par ligation chimique sélective entre leurs groupements chimiques pour former une hydrazone cytotoxique, conduisant à la lyse des cellules ou à l'inhibition de la croissance bactérienne.

Dix ans plus tard, l'équipe de Bertozzi a repris cette ligation hydrazide-carbonyle sélective en milieu physiologique et s'est inspirée des conclusions de Reutter pour proposer une méthodologie inédite de visualisation des biomolécules dans leur système natif⁸. Les auteurs ont synthétisé un analogue non naturel du ManNAc portant un groupement cétone : la *N*-levulinoyl-mannosamine (ManLev). Trois lignées cellulaires différentes ont été incubées avec le dérivé ManLev, permettant sa conversion métabolique en acide sialique incorporé dans les glycoconjugués des cellules. Les groupements cétones disponibles en surface ont alors été couplés avec des groupements hydrazides portés par des sondes biotines pour créer une liaison covalente entre les deux partenaires à travers la formation de groupements hydrazones. La biotine liée de manière covalente aux glycoconjugués sialylés a alors été détectée avec une avidine portant une fluorescéine, permettant au final d'analyser la fluorescence des cellules par cytométrie en flux (figure 1A). Pour chaque lignée cellulaire, le signal de

fluorescence détecté est significatif uniquement en présence des deux partenaires réactifs (cétone et hydrazide), démontrant la spécificité du couplage (figure 1B). Des ligations de type cétone-aminoxy formant des adduits de type oxime ont également été effectuées avec le ManLev⁹.

Ces techniques d'incorporation métabolique et de détection spécifique des glycanes prennent le nom de *metabolic oligosaccharide engineering* (MOE). De manière plus générale, elles posent les bases de ce qui sera nommé par la suite stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal. Cependant, les ligations cétone-hydrazide ne sont pas réellement bioorthogonales puisque les cétones sont retrouvées en abondance dans les cellules et dans les fluides biologiques. Ce type de ligation présente donc une bioorthogonalité très restreinte, car il est sélectif uniquement à la surface des cellules ou en milieu extracellulaire où les groupements carbonyles sont *a priori* absents⁸.

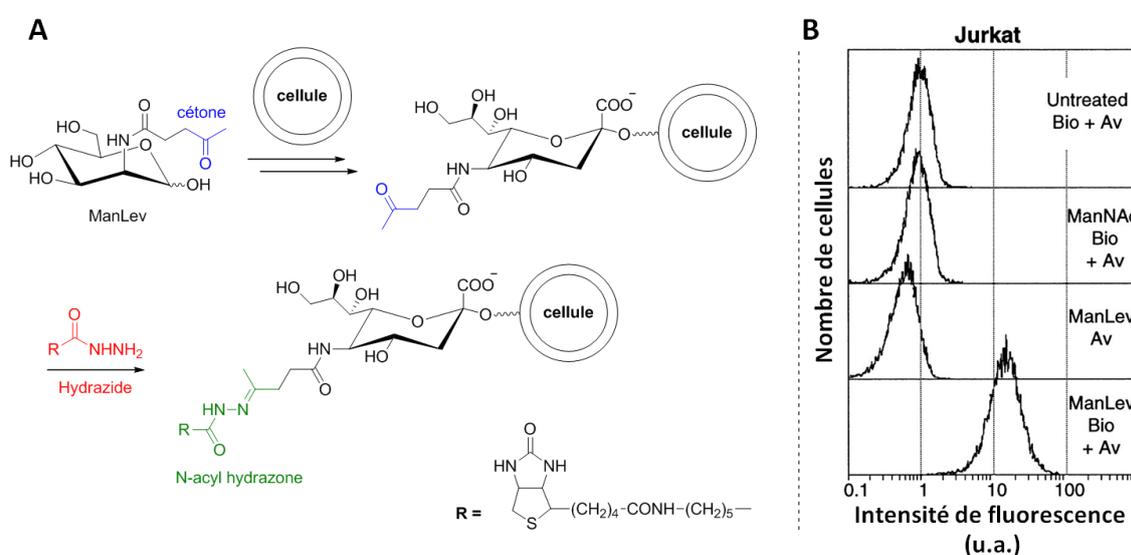


Figure 1 : première application de la stratégie du rapporteur chimique.

A) Le ManLev est métabolisé en acide sialique à la surface des cellules puis une sonde de détection est couplée au ManLev incorporé grâce à une réaction de ligation de type cétone-hydrazine. B) L'intensité de fluorescence exhibée par les cellules est analysée par cytométrie en flux. Seule la quatrième condition qui regroupe les deux étapes de la stratégie présente un marquage significatif. L'absence de l'un des deux réactifs (ManLev ou biotine-hydrazide) entraîne une diminution significative de la fluorescence (trois premières conditions). Adapté de [8].

b. La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal

Utilisée pour la première fois par C. Bertozzi en 1997⁸ puis officiellement décrite en 2003⁴, la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal consiste à exploiter la machinerie métabolique de la cellule ou de l'organisme étudié au moyen d'une molécule non naturelle, analogue à celle que l'on désire suivre *in situ*. Cette méthodologie comporte deux étapes distinctes : l'incorporation métabolique d'un rapporteur chimique, suivie de sa ligation bioorthogonale à une sonde de détection. Ces étapes sont représentées au niveau de la figure 2 :

A) Un analogue de la biomolécule d'intérêt portant une étiquette chimique simple (le rapporteur chimique), est synthétisé. La modification structurale doit modifier au minimum les propriétés physico-chimiques de la molécule d'intérêt afin que celle-ci soit reconnue par la machinerie cellulaire et

incorporée dans les biomolécules via les voies métaboliques naturelles. L'étiquette chimique doit donc être de petite taille, non toxique, absente des systèmes vivants et inerte vis-à-vis des groupements fonctionnels inhérents aux molécules biologiques. En revanche, elle doit réagir de manière spécifique et sélective avec un second partenaire de réaction non endogène, qui sera introduit lors de la seconde étape. Ces critères définissent le caractère bioorthogonal du rapporteur, dont l'incorporation métabolique doit se faire au sein d'un système biologique *in vivo* (s'il s'agit d'un organisme entier) ou *ex vivo* (s'il s'agit de cultures cellulaires).

B) Une fois la molécule modifiée incorporée dans le système biologique, une sonde est fixée de manière covalente sur le rapporteur chimique. Selon sa nature, elle permet de détecter ou d'isoler les biomolécules d'intérêt. Par exemple, une sonde fluorescente permettra de localiser directement les biomolécules marquées par microscopie confocale de fluorescence, tandis qu'une sonde d'affinité de type biotine permettra de les isoler au sein d'un lysat cellulaire à l'aide du complexe avidine-biotine. La sonde doit présenter une fonction bioorthogonale non toxique, qui va réagir de manière rapide et sélective avec le rapporteur chimique au moyen d'une réaction dite bioorthogonale et ce en présence des diverses fonctions chimiques constitutives des systèmes vivants.

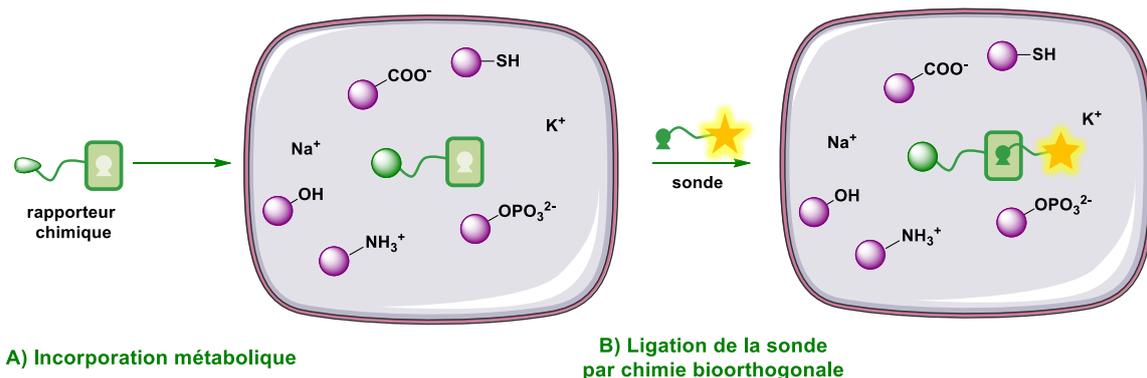


Figure 2 : représentation schématique de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal. A) Incorporation métabolique d'un analogue de la biomolécule d'intérêt fonctionnalisé avec une étiquette chimique. B) Fixation covalente d'une sonde au rapporteur chimique à l'aide d'une réaction de ligation bioorthogonale.

Le terme de ligation bioorthogonale caractérise une réaction à la fois très sélective et qui peut être réalisée dans un système biologique sans interférer avec les processus biochimiques. Une réaction doit remplir de nombreux critères pour être bioorthogonale, si bien qu'il existe finalement plusieurs degrés de bioorthogonalité. Elle doit être biocompatible, c'est-à-dire réalisable en conditions physiologiques et avec des réactifs non toxiques. La cinétique doit être très favorable pour que le couplage se déroule avant l'élimination des réactifs par le système biologique et pour qu'ils puissent être utilisés à de faibles concentrations. Le rendement doit être élevé et les produits formés doivent être inertes et stables vis-à-vis des interactions avec le milieu¹⁰.

Les principales réactions bioorthogonales développées à partir de cette définition répondent également aux critères du concept de chimie *click* présenté dans la même période.

2. Le concept de chimie *click*

Introduit en 2001 par l'équipe de Sharpless¹¹, le concept de chimie *click* désigne un ensemble de réactions « idéales » permettant de créer des liaisons hétéroatomiques (de type C-X-C). Le principe initial est de générer de larges molécules semblables aux substances naturelles, en reliant de petites unités chimiques entre elles à l'aide de liaisons carbone-hétéroatome. Ces réactions doivent être efficaces, sélectives et respecter les critères suivants :

- les réactifs de départ doivent être facilement disponibles ;
- la réaction doit être régiosélective (voire stéréosélective selon les applications), présenter une forte économie d'atome et être réalisée dans un solvant non toxique (de préférence dans l'eau) ;
- une force motrice thermodynamique importante (idéalement supérieure à 20 kcal.mol⁻¹) doit mener à un produit préférentiellement unique et avec un rendement très élevé ;
- si des sous-produits sont formés ils doivent être minimes, non toxiques et inoffensifs pour l'environnement ;
- le produit doit être facilement isolable et si une purification est requise, celle-ci doit être simple (de type cristallisation ou distillation).

Parmi les réactions chimiques les plus connues remplissant ces critères et recensées par l'équipe de Sharpless se trouvent : les cycloadditions d'espèces insaturées (réactions 1,3-dipolaires, réactions de Diels-Alder), les additions nucléophiles d'ouverture d'hétérocycles (ouverture d'époxydes, d'aziridines), certaines réactions impliquant des carbonyles (formation d'oximes, d'hydrazones ou d'amides) ou encore les additions sur des liaisons multiples carbone-carbone (époxydation, dihydroxylation, addition de Michael).

L'introduction du concept de chimie *click* a largement inspiré les chimistes pour développer des réactions chimiques respectant ces critères, tout en étant compatibles avec les systèmes vivants. Ainsi, de nombreuses réactions de ligature chimique développées par la suite pour des applications biologiques peuvent être qualifiées à la fois de « *click* » et de « bioorthogonales ». En général, elles permettent la ligature d'une molécule de détection (fluorophore, nanoparticule, isotope, étiquette protéique, *etc.*) sur une biomolécule préalablement modifiée. Cependant, il ne faut pas oublier que certaines réactions de chimie *click* ne répondront pas aux critères de la bioorthogonalité inhérents aux applications biologiques, tandis que certaines réactions bioorthogonales ne respecteront pas les critères de la chimie *click*, comme la ligature de Staudinger.

3. Les principales réactions bioorthogonales

a. La réaction de Staudinger

Apparue au début du XX^e siècle, la réaction de Staudinger originelle consiste à faire réagir un azoture avec une phosphine pour le convertir en intermédiaire iminophosphorane, hydrolysé par la suite en amine primaire et oxyde de phosphine¹² (figure 3). Cette réaction répond déjà à certains critères de bioorthogonalité : elle est chimiosélective, réalisable dans l'eau à température ambiante et les deux réactifs impliqués sont absents des systèmes vivants et généralement non réactifs envers les groupements chimiques naturels. Cependant il ne s'agit pas d'une réaction de ligation car l'intermédiaire iminophosphorane instable est hydrolysé en deux produits distincts.

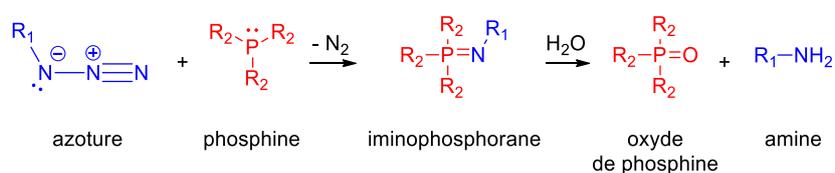


Figure 3 : réaction de Staudinger originelle¹².

En 2000, Bertozzi a proposé une alternative aux couplages de type cétone-hydrazide/aminooxy en adaptant la réaction de Staudinger à des applications bioorthogonales. La stratégie consiste à ajouter un groupement méthoxycarbonyle en tant que piège électrophile sur l'un des groupements aryles portés par la phosphine. Cela permet un réarrangement intramoléculaire de l'imino-phosphorane en un adduit stable dans l'eau, via une liaison amide covalente¹³. L'utilité biologique de la réaction a directement été démontrée sur cellules : un analogue du ManNAc portant une fonction azoture (la *N*-azidoacétylmannosamine, ManNAz) a été incorporé dans les voies de sialylation, puis lié à une sonde biotinyllée portant un groupement arylphosphine. Le mécanisme a ensuite été élucidé sur la base d'une analyse RMN des intermédiaires de réaction¹⁴ (figure 4).

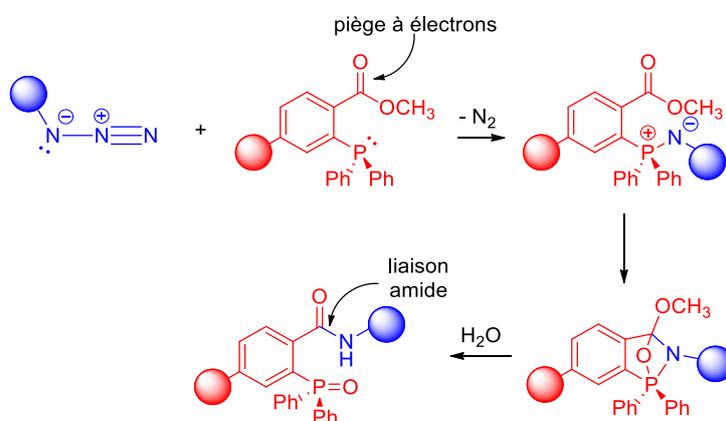


Figure 4 : mécanisme de la ligation de Staudinger-Bertozzi¹⁴.

Quelques mois plus tard, deux équipes ont simultanément adapté la ligation de Staudinger-Bertozzi en faisant réagir l'azoture avec un thioester porté par la phosphine. Le but est de former une liaison peptidique tout en supprimant l'oxyde de phosphine du produit final lors de l'étape d'hydrolyse. Cette réaction proposée dans le cadre de la synthèse chimique des protéines a pris le nom de *traceless Staudinger ligation*¹⁵ (figure 5).

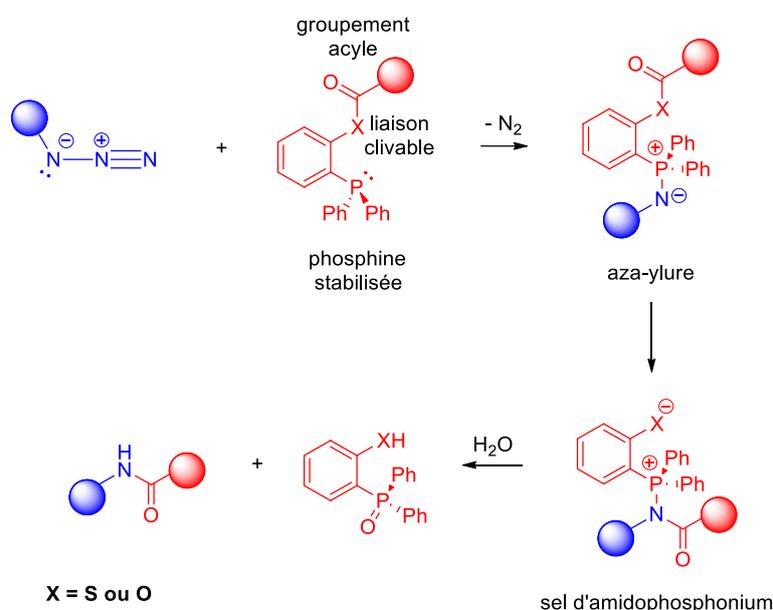


Figure 5 : mécanisme de la ligation "traceless" de Staudinger¹⁵.

La ligation de Staudinger a été employée dans un large domaine d'applications comprenant le marquage de biomolécules (glycanes, ADN, protéines, *etc.*) *in vitro* et *in vivo*, la détection sélective d'enzymes directement dans le protéome (approche ABPP pour *Activity Based Protein Profiling*), l'assemblage peptidique ou encore l'immobilisation de protéines sur support solide. Si cette ligation chimique incarne l'une des premières réactions de couplage bioorthogonales, elle possède cependant des limites : d'une part, les phosphines riches en électrons sont sujettes à oxydation ; d'autre part, la cinétique de réaction est relativement lente en comparaison aux réactions bioorthogonales développées par la suite (de l'ordre de $10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)¹⁶. Autre fait notable, les groupements thiols présents chez certaines molécules naturelles comme le glutathion peuvent réduire les azotures en amines¹⁴. Néanmoins, ces réductions sont très lentes en conditions physiologiques, non significatives à l'échelle des expériences de marquage et peuvent se produire chez les autres réactions bioorthogonales impliquant des fonctions azotures.

Suite à la ligation de Staudinger se sont développées des réactions de couplage plus performantes, appartenant notamment aux cycloadditions 1,3-dipolaires.

b. La réaction de type CuAAC

Origines et définition

Dans les années 60, Huisgen a présenté une description systématique des cycloadditions 1,3-dipolaires, par la suite appelées cycloadditions de Huisgen, entre deux réactifs insaturés pour former des hétérocycles à cinq atomes¹⁷. Il a notamment repris la réaction entre un azoture et un alcyne donnant naissance à un 1,2,3-triazole disubstitué, décrite pour la première fois par A. Michael en 1893 entre un acétylènedicarboxylate de diéthyle et un azoture de phényle¹⁸. Cette cycloaddition [3+2], procédant selon un mécanisme péricyclique, ne répond toutefois pas aux conditions de chimie *click* bioorthogonale. En effet, elle nécessite un chauffage à reflux, l'utilisation de solvants organiques et sa cinétique est lente (durée réactionnelle de plusieurs heures voire plusieurs jours). De plus, elle n'est pas régiosélective car elle génère un mélange de 1,2,3-triazoles disubstitués en position 1,4 ou 1,5 (figure 6a).

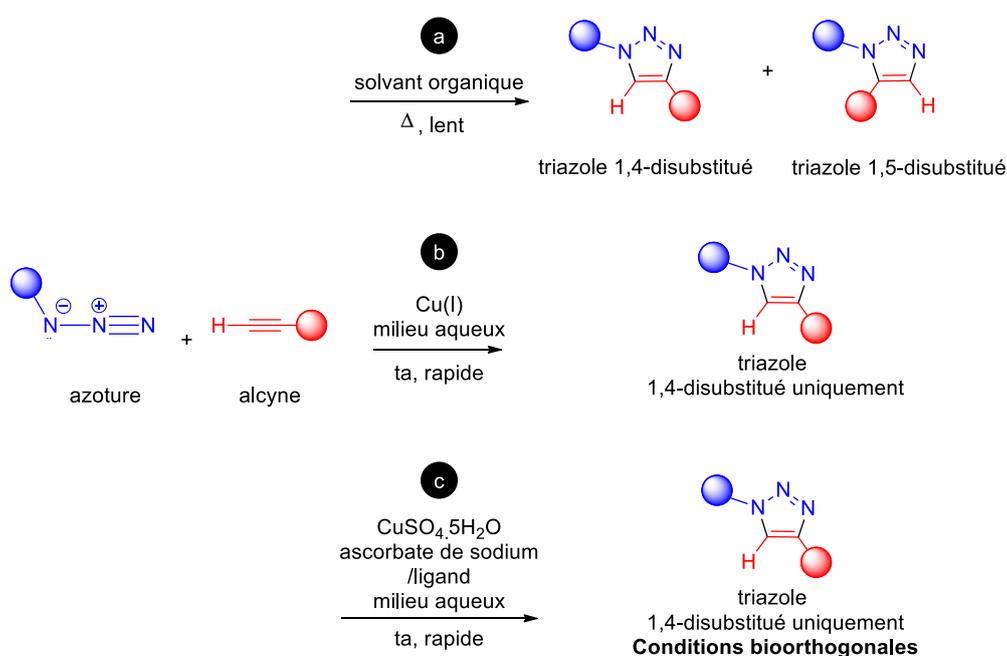


Figure 6 : évolution de la cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne. a) La cycloaddition de Huisgen nécessite des températures élevées pour une cinétique lente et n'est pas compatible avec les systèmes vivants. b) L'ajout de Cu (I) permet d'activer la réaction et de la réaliser à température physiologique, mais ce dernier reste toxique pour les cellules. c) L'utilisation de sels de Cu (II) réduits *in situ* limite la toxicité du métal afin de réaliser la réaction en milieu biologique.

En 2002, deux équipes ont montré en parallèle que le cuivre (I) peut être utilisé comme un catalyseur très efficace de la cycloaddition azoture-alcyne. Tornøe *et al.* ont directement utilisé les sels de Cu(I) dans une optique de synthèse peptidique en phase solide¹⁹. L'équipe de Sharpless a quant à elle privilégié la formation *in situ* des ions Cu(I) à partir d'ions Cu(II) moins toxiques, à travers le système sulfate de cuivre/ascorbate de sodium²⁰. Les avantages de la catalyse au cuivre sont multiples : en accélérant la réaction jusqu'à 10⁶ fois par rapport à sa version non catalysée, le catalyseur métallique

permet de s'affranchir du chauffage mais également d'effectuer le couplage en milieu aqueux. De plus, le métal permet de contrôler la régiosélectivité de la réaction pour ne générer que le triazole 1,4-disubstitué (figure 6b). Cette cycloaddition catalysée par le cuivre prend le nom de *Copper(I)-catalysed azide alkyne cycloaddition* (CuAAC). Elle devient rapidement la réaction phare de la chimie *click*, dont elle respecte tous les critères, avec une large gamme d'applications (bioconjugaison *in vitro*, synthèse de polymères et de dendrimères, synthèse organique combinatoire).

En 2013, l'équipe de Fokin a prouvé l'implication de deux atomes de cuivre dans le mécanisme réactionnel de la CuAAC grâce à des expériences de suivi de la réaction *in situ* par calorimétrie et par l'utilisation de métaux isotopiques²¹ (figure 7). Dans le mécanisme proposé, le premier atome de cuivre forme une liaison π avec l'alcyne terminal, puis le second atome de cuivre forme une liaison σ avec ce même alcynes après déprotonation. Les deux cuivres du complexe obtenu catalysent alors la cycloaddition avec l'azoture, menant à la formation du triazole 1,4-disubstitué.

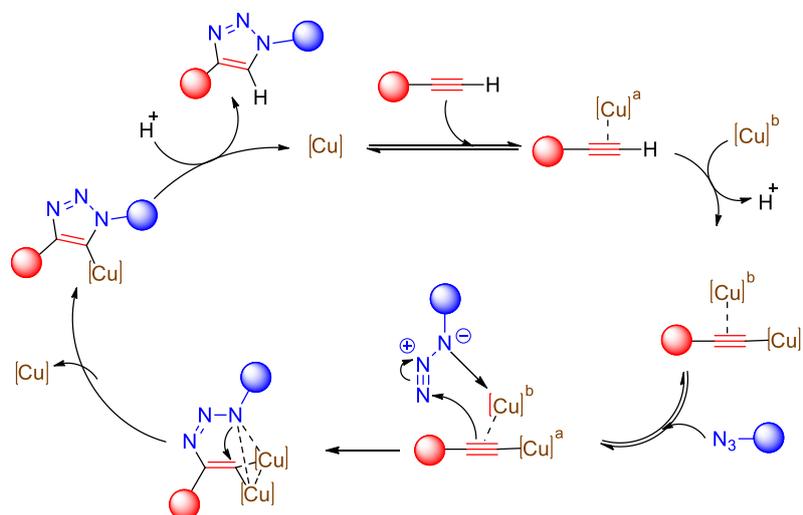


Figure 7 : mécanisme de la CuAAC. Adapté de [21].

Aspects bioorthogonaux de la CuAAC

La CuAAC est également considérée comme une réaction bioorthogonale selon plusieurs critères. L'azoture et l'alcyne sont deux fonctions chimiques non toxiques, de petite taille, absentes des systèmes vivants et généralement inertes vis-à-vis des groupements fonctionnels constituant les biomolécules. Pouvant être effectuée à température ambiante et en milieu aqueux, cette réaction présente ainsi l'avantage d'être biocompatible et réalisable dans les milieux biologiques. Enfin, le 1,4-triazole formé est stable et non réactif envers les autres molécules. Deux autres avantages de la CuAAC par rapport à la ligation de Staudinger résident dans le fait de pouvoir choisir entre l'azoture et l'alcyne comme étiquette à insérer sur le rapporteur chimique, ainsi que dans la cinétique de réaction beaucoup plus élevée ($k = 10-100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)²².

Néanmoins, l'inconvénient majeur de la CuAAC qui entrave sa définition de réaction bioorthogonale est l'emploi du cuivre (I) comme catalyseur. C'est un métal toxique pour les systèmes vivants car ses changements d'état d'oxydation catalysent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont les radicaux hydroxyles²³. Pour les applications biologiques, la première solution afin de limiter la toxicité des ions Cu(I) est de les générer *in situ* à partir d'ions Cu(II) moins toxiques et en présence d'un agent réducteur. Ainsi, l'utilisation du sulfate de cuivre pentahydraté réduit *in situ* par l'ascorbate de sodium (ou par l'acide ascorbique) a fait ses preuves dès 2002²⁰ et reste à ce jour le complexe catalytique le plus utilisé pour les applications biologiques (figure 6c). Des ligands tétravalents du cuivre (I), dérivés de la tris(triazolyl)amine présentée en 2003²⁴ (figure 8A), ont aussi été développés afin de chélater le métal et d'empêcher ses interactions avec l'oxygène. Ils ont également pour but d'augmenter la cinétique de la réaction. Le BTTAA (acide 2-[4-((bis[(1-*tert*-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amino)méthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl] acétique) constitue ainsi l'un des ligands les plus utilisés à l'heure actuelle²⁵ (figure 8B). Il convient toutefois de rappeler que sa présence ne s'avère pas toujours nécessaire pour une utilisation bioorthogonale de la CuAAC et dépend de chaque cas d'étude.

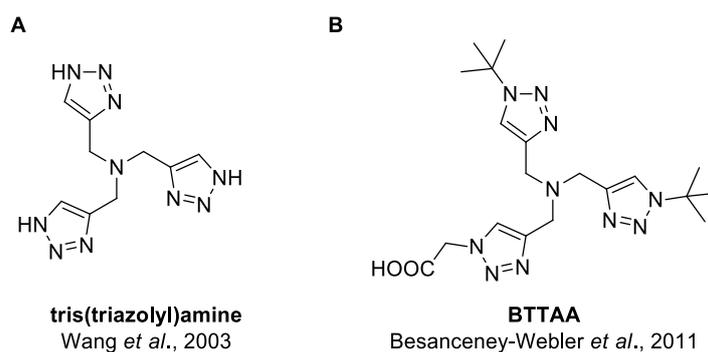


Figure 8 : exemple de ligands tétravalents du cuivre (I).

Applications bioorthogonales de la CuAAC

La première application bioorthogonale de la CuAAC a été proposée par l'équipe de Finn en 2003²⁴ : des capsides virales ont été fonctionnalisées avec un azoture ou un alcyne, puis la cycloaddition a été effectuée avec des dérivés de la fluorescéine respectivement de type alcyne ou azoture. Depuis, la CuAAC a développé une large gamme d'applications biologiques chez le modèle animal en couvrant toutes les classes de biomolécules : marquage des glycanes²⁶, des protéines²⁷ ou des acides nucléiques²⁸. Les lipides ont également été visualisés avec par exemple le marquage des phosphatidylcholines en 2009²⁹. Un analogue de choline modifié avec un groupement propargyle a été injecté dans des souris afin d'être incorporé au niveau des phospholipides des membranes cellulaires. Après le sacrifice des rongeurs, la CuAAC a été effectuée sur des sections tissulaires de différents organes à l'aide d'un fluorophore portant une fonction azoture. Les phospholipides membranaires ont pu être visualisés

directement dans les tissus par microscopie confocale de fluorescence, démontrant que l'incorporation métabolique de la propargylcholine peut se faire *in vivo* (figure 9).

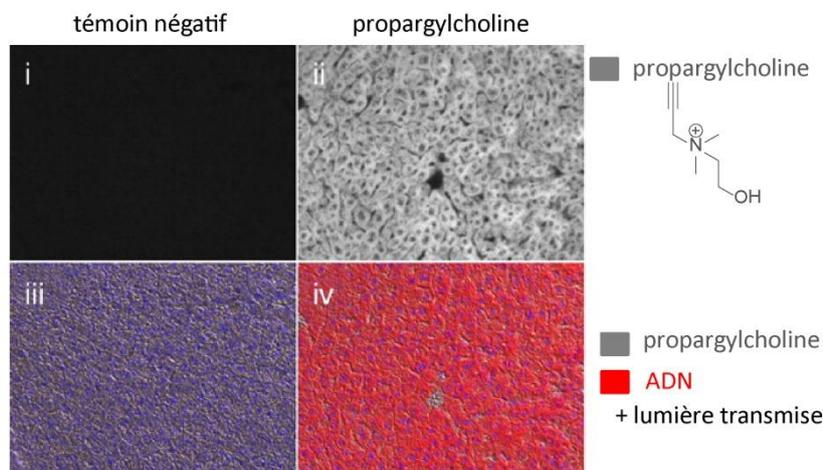


Figure 9 : marquage métabolique *in vivo* des phospholipides par la CuAAC. La propargylcholine (ii, iv) est injectée dans des souris vivantes, puis la CuAAC est effectuée à l'aide d'un fluorophore portant un azoture sur des sections de tissus de foie. D'après [29].

Chez les végétaux, la CuAAC a été employée plus tardivement. En effet, Anderson *et al.* l'ont utilisée en 2012 afin de visualiser l'incorporation métabolique d'un analogue du fucose dans un polysaccharide présent au niveau de la paroi cellulaire végétale³⁰.

La CuAAC est à ce jour la réaction bioorthogonale la plus utilisée le marquage sélectif des biomolécules. Cependant, elle n'est pas parfaitement bioorthogonale à cause de la cytotoxicité potentielle des ions Cu(I), qui diffère selon chaque cas d'étude. C'est pour répondre à cet inconvénient que la cycloaddition suivante a été développée.

c. La réaction de type SPAAC

Origines et définition

La SPAAC, ou *Strain Promoted [3+2] Alkyne-Azide Cycloaddition*, est une cycloaddition entre un azoture et un alcyne cyclique, généralement un cyclooctyne, qui permet de s'affranchir du cuivre et de sa toxicité (figure 10). Initialement, cette réaction a été évoquée pour la première fois par Blomquist *et al.* en 1953 qui ont observé une « réaction explosive » entre un azoture de phényle et un cyclooctyne³¹. Quelques années plus tard, Wittig *et al.* ont élucidé la structure du triazole comme produit de cette cycloaddition³². La réaction a ensuite été reprise par l'équipe de Bertozzi en 2004 en tant que nouvelle ligation bioorthogonale réalisable en milieu biologique dans des conditions physiologiques et sans nécessiter de catalyseur³³. En effet, l'angle de la liaison alcyne portée par le cyclooctyne est de 163°, alors qu'il est normalement de 180° pour les alcynes linéaires hybridés sp³⁴. Cette déformation angulaire provoque une tension de cycle importante qui accroît la réactivité de l'alcyne cyclique et permet

d'activer sa cycloaddition avec l'azoture selon le mécanisme péricyclique originel. Toutefois, contrairement à la CuAAC, le produit formé est un mélange des deux triazoles 1,4 et 1,5-disubstitués, même si cela n'a *a priori* aucune importance dans le cas de ligations bioorthogonales où la cycloaddition n'a pour but que la détection ou la visualisation de la molécule modifiée.

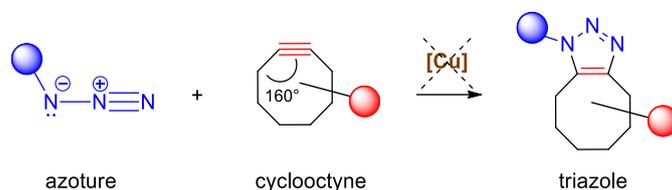


Figure 10 : réaction de type SPAAC : cycloaddition [3+2] entre un azoture et un cyclooctyne pour former un triazole.

En 2004, l'équipe de Bertozzi a employé pour la première fois la SPAAC en tant que réaction bioorthogonale, pour le marquage de biomolécules présentes dans des lysats cellulaires et directement dans des cellules vivantes³³. Des cellules Jurkat ont pour cela été incubées en présence de *N*-azidoacétylmannosamine péricétylée (Ac₄ManNAz), entraînant leur incorporation au niveau des acides sialiques des glycoprotéines de surface. La ligation SPAAC a ensuite eu lieu avec un cyclooctyne biotinylé préalablement synthétisé, puis le cycloadduit formé a été détecté de manière indirecte, par cytométrie en flux, grâce à une avidine-FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Les résultats présentent la SPAAC comme une réaction de couplage fonctionnelle avec un marquage spécifique à la surface des cellules (figure 11A,B). Cependant, cette première cycloaddition sans cuivre est très lente car elle nécessite des réactifs en large excès (100 μM de sonde cyclooctyne) et car le marquage obtenu est deux fois moins efficace que la ligation de Staudinger-Bertozzi réalisée dans les mêmes conditions (figure 11C).

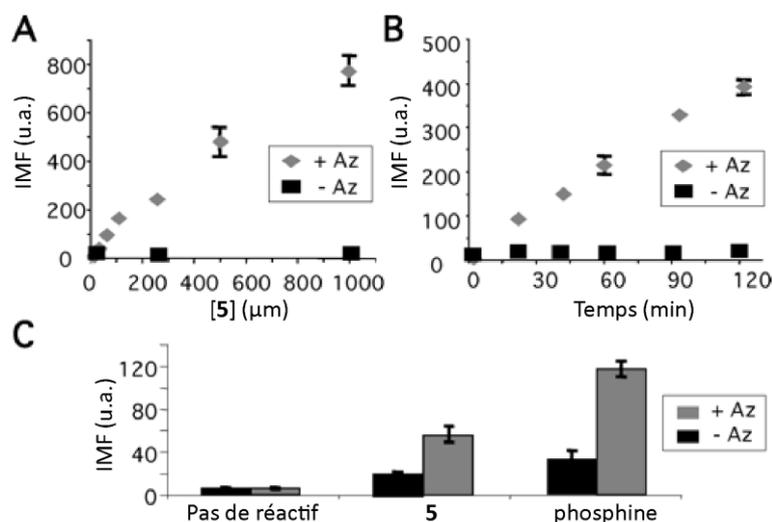


Figure 11 : marquage bioorthogonal des acides sialiques à l'aide de la SPAAC. Mesure de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) par cytométrie en flux des cellules Jurkat, après l'incorporation de l'Ac₄ManAz, sa ligation SPAAC au cyclooctyne porté par la sonde biotinylée (5), puis la détection du cycloadduit par l'avidine-FITC. (A) Variation de la concentration en sonde cyclooctyne 5. (B) Variation du temps de ligation SPAAC. (C) Comparaison du couplage SPAAC avec la ligation de Staudinger-Bertozzi. Adapté de [33].

Optimisation des cyclooctynes

Entre 2006 et 2010, de nombreux dérivés de la sonde cyclooctyne initiale (OCT) ont été conçus et synthétisés dans le but d'améliorer sa réactivité et/ou sa solubilité en solution aqueuse. En effet, la réaction SPAAC doit être efficace dans des conditions biologiques où la biomolécule étiquetée par l'azoture est présente en quantités relativement faibles, c'est pourquoi sa vitesse doit être élevée. De plus, l'alcyne cyclique portant la sonde de détection doit être suffisamment soluble en conditions aqueuses afin d'éviter un marquage aspécifique aux membranes cellulaires, ce qui augmenterait le bruit de fond. Enfin, la taille ainsi que la facilité de synthèse sont des critères non négligeables qui sont parfois pris en compte lors de la mise au point d'un nouveau type de cyclooctyne. La structure de l'ensemble des alcynes cycliques évoqués ci-dessous est présentée en figure 12. Concernant la suite de ce paragraphe, il convient toutefois de préciser que les réactivités des molécules étudiées ne sont pas toujours directement comparables entre elles. En effet, les constantes de vitesse n'ont pas forcément été mesurées dans le même solvant réactionnel, celui-ci dépendant de la solubilité du composé chimique.

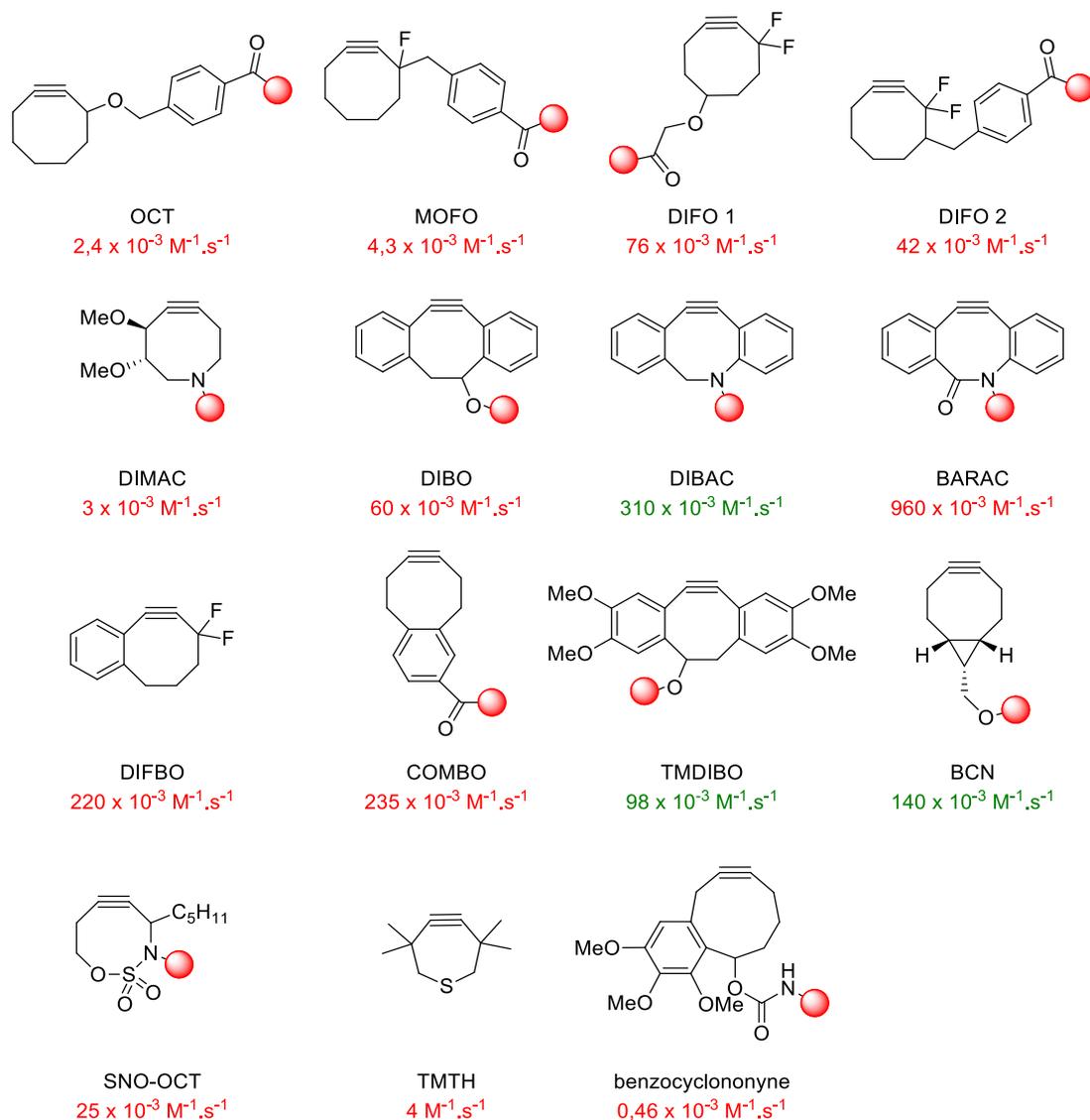


Figure 12 : structure chimique des principaux cyclooctynes développés pour la réaction de ligand bioorthogonale SPAAC, accompagnée de leur constante de vitesse respective déterminée dans l'acétonitrile (rouge) ou le méthanol (vert).

En 2006, Agard *et al.* ont d'abord ajouté un atome de fluor électro attracteur en position propargylique de l'OCT (cyclooctyne monofluoré appelé MOFO), permettant de doubler sa réactivité³⁵. Deux années plus tard, l'équipe de Bertozzi a ajouté un deuxième atome de fluor et créé deux générations successives de sondes difluorées (cyclooctynes difluorés appelés DIFOs), dont la réactivité est de 20 à 30 fois supérieure à celle de l'OCT initial^{36,37}. Les auteurs ont d'ailleurs constaté une efficacité de marquage sur cellules similaire à celle obtenue par la CuAAC en microscopie confocale de fluorescence. De plus, l'imagerie *in vivo* de la *N*-azidoacétylgalactosamine péricétylée (Ac₄GalNAz), incorporée dans des embryons de poisson-zèbre et liée à une sonde DIFO fluorescente, a fait l'objet d'une publication au sein de la revue *Science*³⁸ (figure 13). La même année, Sletten *et al.* ont présenté la sonde DIMAC (diméthoxyazacyclooctyne) : la présence d'un atome d'azote hétérocyclique et de deux groupements méthoxys permet d'accroître la solubilité aqueuse et de diminuer ainsi le marquage aspécifique³⁹.

Néanmoins, ce premier azacyclooctyne offre une faible réactivité qui reste proche de celle de l'OCT initial.

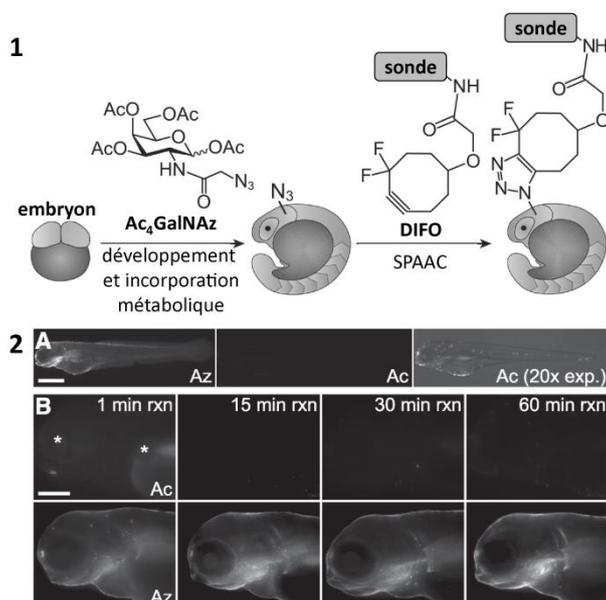


Figure 13 : utilisation du cyclooctyne DIFO 1 pour l'imagerie *in vivo* des glycanes chez l'embryon de poisson-zèbre par microscopie confocale de fluorescence. 1) Stratégie appliquée. 2A) Observation d'un marquage significatif en présence du rapporteur Ac₄GalNAz (Az) par rapport à son analogue naturel Ac₄GalNAc (Ac). 2B) Augmentation du signal de fluorescence en fonction du temps de ligation SPAAC. Adapté de [38].

Pour tous les cyclooctynes présentés jusqu'ici, c'est la présence de groupements électroattracteurs qui améliore la vitesse de la SPAAC. La majorité des sondes développées par la suite fait parti de la classe des « mono- ou dibenzocyclooctynes ». Le premier dibenzocyclooctyne (DIBO) a été proposé par l'équipe de Boons en 2008⁴⁰ : la fusion du cyclooctyne avec deux groupements phényles a pour effet d'augmenter significativement sa réactivité en ajoutant une tension supplémentaire à l'alcyne cyclique, mais cela accroît en contrepartie son caractère lipophile et peut conduire à des marquages aspécifiques. Deux années plus tard, deux équipes ont simultanément présenté un réactif possédant à la fois un azote hétérocyclique et deux groupements phényles^{41,42}. Appelé DIBAC (ou DBCO), ce dibenzoazacyclooctyne est une molécule « hydride », combinant la cinétique favorable du DIBO et la solubilité accrue du DIMAC. Toujours en 2010, l'équipe de Bertozzi a développé le cyclooctyne de type biarylazacyclooctynone (BARAC), doté d'un amide endocyclique. Sa cinétique surpasse celle de toutes les autres sondes développées jusqu'à présent pour la SPAAC, avec une constante de vitesse d'environ $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ⁴³. Les auteurs ont ainsi démontré un marquage significatif des acides sialiques chez des cellules de mammifères sans besoin de lavage post-réaction du cyclooctyne BARAC en excès. Basé sur la même stratégie de composé « hybride », le difluorobenzocyclooctyne (ou DIFBO), résulte de la fusion du DIBO et du DIFO en combinant à la fois un benzocyclooctyne et l'ajout de deux fluors en position propargylique⁴⁴. Le produit formé n'est cependant pas stable et doit être complexé avec la β -cyclodextrine, ce qui empêche son utilisation en milieu biologique. Son dérivé, le

COMBO (carboxyméthylmonobenzocyclooctyne), possède un noyau benzénique non conjugué à l'alcyne, qui lui confère une réactivité similaire au DIFBO sans problème de stabilité⁴⁵. D'autres sondes analogues du DIBO ont été développées en ajoutant des fonctions polaires avec pour but d'augmenter leur solubilité en milieu aqueux, comme par exemple la sonde tétraméthoxydibenzocyclooctyne (TMDIBO)⁴⁶. Leur constante de vitesse reste néanmoins faible et limitée à celle du DBCO initial.

Parallèlement au développement de dérivés de DBCOs, Dommerholt *et al.* ont synthétisé le bicyclononyne (BCN), un cyclooctyne moins commun puisque sa tension de cycle est accrue non pas grâce à la fusion d'un noyau benzénique, mais grâce à celle d'un cyclopropyle⁴⁷. Ses avantages sont une synthèse rapide et une solubilité accrue en milieu aqueux par rapport aux molécules précédentes. Enfin, l'équipe de Schomaker a récemment mis au point une nouvelle classe d'OCTs contenant un sulfamate cyclique (classe des SNO-OCT) et présentant des réactivités similaires à celle du BCN⁴⁸.

Si ce sont les cycloalcynes à huit carbones qui ont principalement fait l'objet d'optimisations, quelques articles scientifiques ont également proposé des approches différentes visant à diminuer (synthèse d'un cycloheptyne⁴⁹) ou à augmenter (synthèse d'un cyclononyne⁵⁰) la taille du cyclooctyne. Ainsi, l'équipe de Bertozzi a exposé en 2012 une série de cycloalcynes possédant un atome de soufre hétérocyclique. Parmi eux, le thiacycloheptyne (TMTH) présente la cinétique de réaction la plus élevée parmi les cycloalcynes de la SPAAC ($4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette réactivité perturbe néanmoins fortement sa stabilité et entrave son utilisation dans des milieux biologiques.

Finalement, si la SPAAC offre une meilleure compatibilité en milieu biologique que la CuAAC du fait de l'absence de catalyse au cuivre, elle présente en contrepartie une cinétique plus faible, ceci malgré les efforts faits pour améliorer la réactivité des groupements cyclooctynes ($k = 10^{-2} - 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). De plus, ses groupements réactifs ne sont plus interchangeables : l'encombrement stérique du cycloalcyne pouvant perturber les voies métaboliques, il est le plus souvent placé sur la sonde de détection et non pas sur le rapporteur chimique.

Influence de la structure des azotures sur la stabilité

De nombreux efforts ont été fournis pour optimiser la structure du cyclooctyne et ainsi améliorer la cinétique de la SPAAC dans le cadre d'applications bioorthogonales. *A contrario*, peu d'études ont été menées sur l'influence de l'azoture impliqué dans cette cycloaddition. Pour la majorité des développements de sondes cyclooctynes, la cinétique de réaction a été mesurée avec l'azoture de benzyle, soit un azoture aliphatique simple. Il a d'ailleurs été prouvé que le DIBAC réagit 7 fois plus vite avec un azoture aliphatique (l'azidométhylphénylalanine) qu'avec son analogue aromatique (l'azidophénylalanine)⁵¹. L'équipe de van Delft a mené une étude comparative sur la réactivité des azotures aliphatiques et aromatiques : contrairement au DIBAC, le cyclooctyne BCN qui est riche en électrons présente une meilleure réactivité avec les azotures aromatiques tels que l'azoture de benzyle plutôt qu'avec leurs analogues aliphatiques⁵² (figure 14A). Plus récemment, la réactivité des

groupements azotures selon leur degré de substitution a été comparée à l'aide de méthodes expérimentales et théoriques⁵³. Il en résulte que les trois classes de molécules donnent des constantes de vitesse similaires avec le cyclooctyne BCN car ce dernier ne présente pas de gêne stérique. En revanche, l'encombrement stérique provoqué par la sonde DIBAC est conséquent du fait de ses deux groupes aryles et entraîne une chute de la réactivité des azotures III^{aires} par rapport aux I^{aires} et II^{aires} (figure 14B).

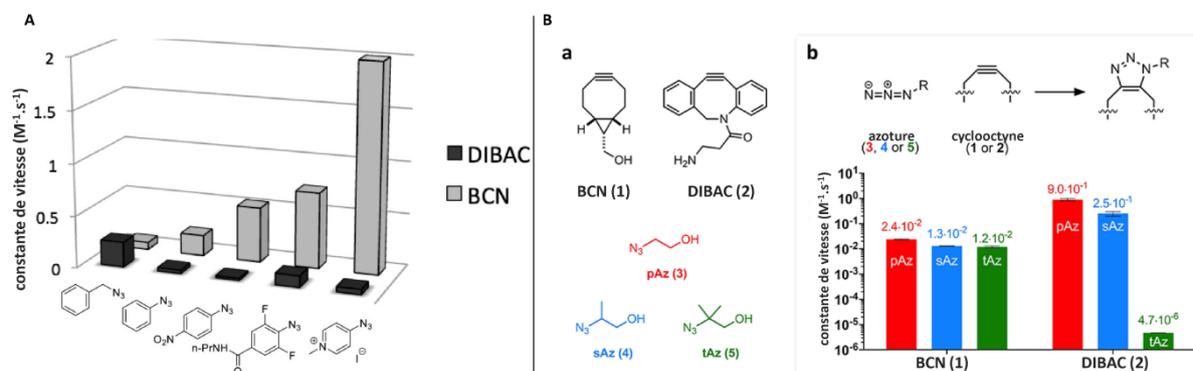


Figure 14 : influence de la structure de l'azoture sur la cinétique de réaction SPAAC. A) Relation entre la nature de l'azoture (aliphatique ou aromatique), la structure du cyclooctyne et les constantes de vitesse de réaction. Adapté de [54]. B) Relation entre le degré de substitution de l'azoture (primaire (p), secondaire (s) ou tertiaire (t)), la structure du cyclooctyne (BCN ou DIBAC) et les constantes de vitesse de réaction. Adapté de [53].

Applications bioorthogonales de la SPAAC

Grâce aux nombreuses optimisations concernant sa cinétique de couplage, la SPAAC est devenue l'une des réactions les plus employées avec la CuAAC pour les marquages bioorthogonaux. Elle présente depuis 2004 une large gamme d'applications biologiques avec par exemple la détection des protéines^{33,55}, des glycanes³⁶, des lipides⁵⁶ ou encore de l'ADN⁵⁷ sur des modèles cellulaires. L'absence de catalyseur cytotoxique a en outre permis d'utiliser cette cycloaddition pour le marquage des glycanes sur des organismes vivants tels que le poisson-zèbre³⁸ ou encore la souris⁵⁸. Chez les végétaux, la SPAAC a également été appliquée au marquage des glycanes au sein de la paroi végétale de plantules d'*Arabidopsis thaliana*⁵⁹.

La SPAAC et la CuAAC appartiennent toutes les deux à la famille des cycloadditions [3+2]. La troisième réaction bioorthogonale la plus utilisée et qui fait l'objet d'un succès grandissant appartient quant à elle aux cycloadditions [4+2]. Il s'agit de la cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse.

d. La réaction de DAinv

i. Origine des cycloadditions de Diels-Alder

La cycloaddition de Diels-Alder (DA) est tout d'abord une réaction utilisée en chimie organique : l'addition d'un diénophile (alcène ou alcyne substitué) à un diène conjugué entraîne la formation d'un dérivé du cyclohexène (figure 15). Cette réaction a été élucidée en 1928 par O. Diels et K. Alder qui ont identifié les produits précis du couplage entre un cyclopentadiène et une quinone⁶⁰. Cette réaction appartient à la classe des cycloadditions [4+2] : les quatre électrons π du diène conjugué et les deux électrons π présents sur la double liaison du diénophile sont impliqués dans la formation du cyclohexène correspondant. La réaction procède selon un mécanisme péricyclique concerté où le mouvement simultané des six électrons entraîne la formation de deux nouvelles liaisons carbone-carbone après un état de transition aromatique. La conversion des deux liaisons π du diène en deux liaisons σ plus stables rend la thermodynamique de la réaction favorable.

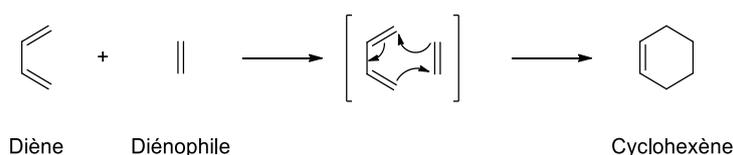


Figure 15 : mécanisme de la réaction de Diels-Alder.

La réaction de DA peut être divisée en deux catégories selon le comportement électronique des réactifs : DA à demande électronique normale ou inverse.

ii. Diels-Alder à demande électronique normale

La réaction de DA à demande électronique normale (ou réaction de DA classique) a lieu entre un diène riche en électrons et un diénophile pauvre en électrons. En effet, cette cycloaddition est contrôlée par deux orbitales moléculaires particulières : l'orbitale moléculaire occupée la plus haute en énergie (HOMO pour *highest occupied molecular orbital*) et l'orbitale moléculaire vacante la plus basse en énergie (LUMO pour *lowest unoccupied molecular orbital*). D'après la théorie des orbitales frontières, la réaction est favorisée lorsque la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO est la plus faible possible⁶¹. Ici, le couplage de DA classique dépend de la différence d'énergie entre les orbitales LUMO du diénophile et HOMO du diène. D'après la figure 16A l'ajout de groupements électroattracteurs sur le diénophile va diminuer son énergie LUMO tandis que les groupements électrodonneurs sur le diène vont augmenter son énergie HOMO, facilitant la réaction de DA classique.

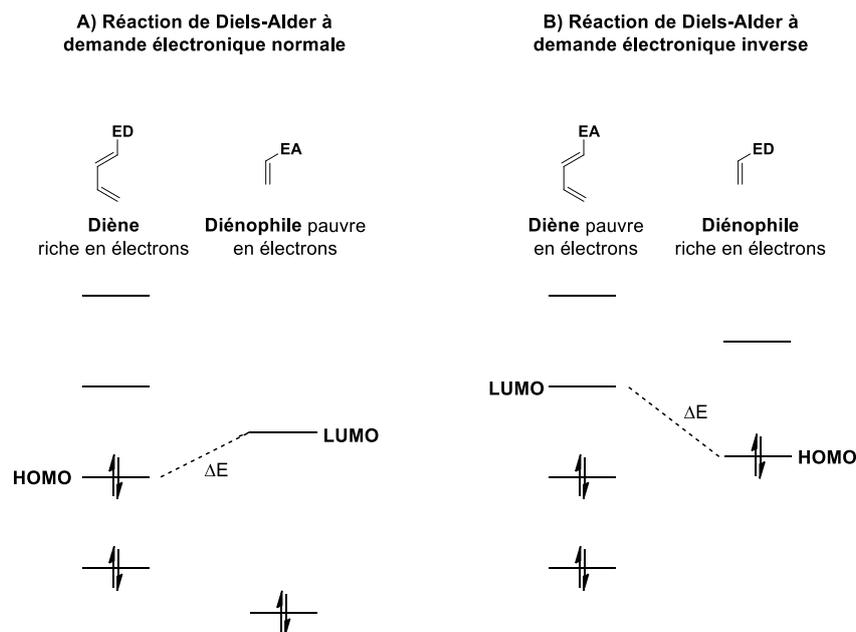


Figure 16 : réactivité des cycloadditions de Diels-Alder à demande électronique normale (A) ou inverse (B), expliquée par la théorie des orbitales moléculaires frontières. ED = groupement électrodonneur, EA= groupement électroattracteur.

En 1950, O. Diels et K. Alder ont été récompensés par le prix Nobel de Chimie pour l'importance de leurs travaux sur la réaction éponyme⁶². En effet, la réaction de DA classique est devenue l'une des réactions fondamentales pour la synthèse totale de produits naturels^{63,64}, car elle permet de construire des liaisons carbone-carbone, de former des cycles à six carbones mais aussi car elle est régiosélective et stéréospécifique. De plus, la réaction de DA remplit certains critères de la chimie *click* bioorthogonale puisqu'elle est chimiosélective, très rapide et compatible avec les milieux aqueux. La cycloaddition effectuée dans l'eau est d'ailleurs accélérée par rapport aux solvants organiques grâce aux effets hydrophobes⁶⁵. La DA classique a par exemple été utilisée pour le marquage *in vitro* des oligonucléotides⁶⁶ et des protéines⁶⁷. En général, la biomolécule étudiée porte le groupement diène tandis que des dérivés de maléimide sont employés comme diénophiles (figure 17A). Cependant, ces derniers peuvent réagir avec des nucléophiles naturels tels que les thiols présents dans les cystéines via des additions de Michael (figure 17B). De plus, la cycloaddition classique est relativement lente et le produit est formé de manière réversible, la réaction inverse dite de rétro-Diels-Alder pouvant avoir lieu dans certaines conditions comme lors d'une augmentation de la température. L'apparition de la cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse a notamment permis de résoudre ce problème en générant un cycloadduit thermiquement stable.

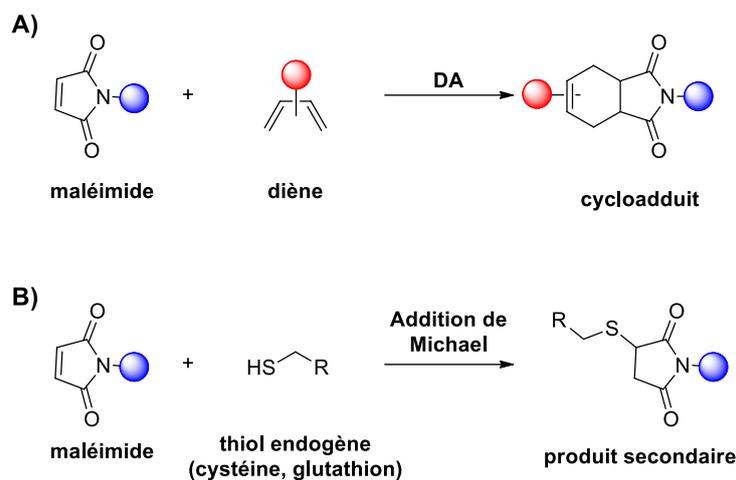


Figure 17 : A) Cycloaddition de Diels-Alder classique entre une sonde maléimide et un diène porté par la biomolécule étudiée. B) Les maléimides peuvent aussi réagir avec les thiols endogènes via des additions de Michael.

iii. Diels-Alder à demande électronique inverse

La Diels-Alder à demande électronique inverse (DA_{inv}) a lieu entre un diène pauvre en électrons (énergie LUMO basse) et un diénophile riche en électrons (énergie HOMO haute). La réactivité de la réaction est donc gouvernée par la différence entre les orbitales LUMO du diène et HOMO du diénophile (figure 16B). En 1959, Carboni *et al.* ont apporté la preuve expérimentale de cette cycloaddition [4+2] entre des diènes de type tétrazine et différents diénophiles (styrènes, oléfines aliphatiques, *etc.*). Les produits obtenus sont des pyridazines 3,6-disubstituées⁶⁸. La tétrazine est immédiatement devenue le diène de choix car elle est pauvre en électrons. Il a toutefois fallu attendre quelques années pour que cette cycloaddition soit qualifiée de réaction de Diels-Alder « à demande électronique inverse » par J. Sauer⁶⁹. En 1990, ce dernier a d'ailleurs mené une étude comparative pionnière sur la réactivité de plus de 40 diénophiles réagissant avec une 1,2,4,5 tétrazine⁷⁰. Il en résulte que le *trans*-cyclooctène est l'alcène tendu le plus réactif.

Le mécanisme de la DA_{inv} entre une tétrazine et un diénophile est expliqué au niveau de la figure 18. Une cycloaddition [4+2] entre la tétrazine **1** et le diénophile forme dans un premier temps le cycloadduit bicyclique **2**. Très réactif, celui-ci est rapidement converti en 4,5-dihydropyridazine **3** lors d'une étape de rétro-cycloaddition [4+2] possédant une grande force motrice grâce à la libération d'une molécule de N₂. L'isomérisation 1,3-prototropique de la 4,5-dihydropyridazine conduit au 1,4 dihydroisomère **4** correspondant. Ce dernier peut constituer la molécule finale lors du couplage avec des diénophiles de type alcène. En revanche, lorsque ce sont des alcynes, la dihydropyridazine **4** est oxydée en pyridazine **5**. La libération de la molécule de diazote permet d'obtenir une réaction irréversible avec la formation d'un cycloadduit stable.

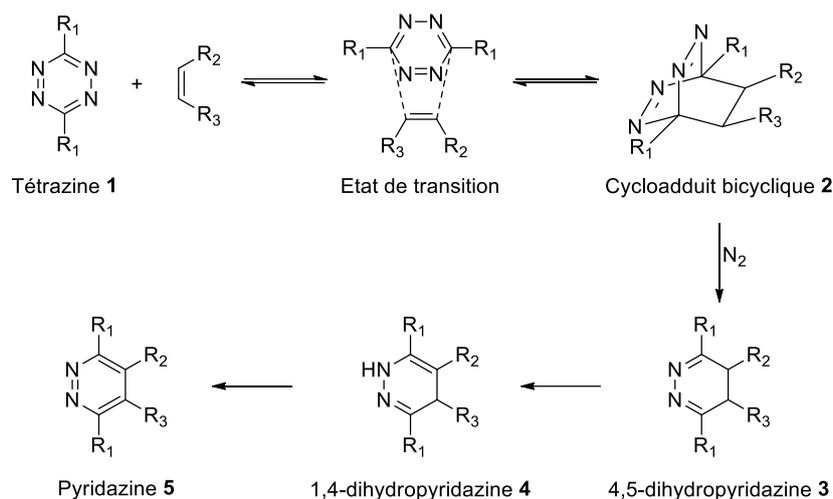


Figure 18 : mécanisme de la cycloaddition de DAinv.

Il faut attendre 2008 pour que deux équipes emploient la réaction de DAinv dans un contexte bioorthogonal. Pour le diénophile, l'équipe de Blackman a fonctionnalisé la thioredoxine avec un *trans*-cyclooctène, puis elle a suivi sa ligation à une tétrazine par spectrométrie de masse⁷¹. Si la cinétique de réaction mesurée est exceptionnelle par rapport à la CuAAC ($k = 2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), l'inconvénient majeur du *trans*-cyclooctène est son isomérisation potentielle en *cis*-cyclooctène beaucoup moins réactif. Quelques mois plus tard, le groupe de Devaraj s'est servi d'un norbornène comme diénophile et a appliqué la ligation de DAinv sur cellules vivantes⁷². Après la fixation spécifique sur son récepteur d'un anticorps bifonctionnalisé avec une rhodamine et un norbornène, la réaction a été effectuée avec une tétrazine émettant dans le proche infrarouge (figure 19A). La colocalisation des deux signaux de fluorescence émis par l'anticorps bioconjugué a permis aux auteurs de prouver la spécificité de la réaction et de démontrer sa pertinence pour le marquage des biomolécules (figure 19B).

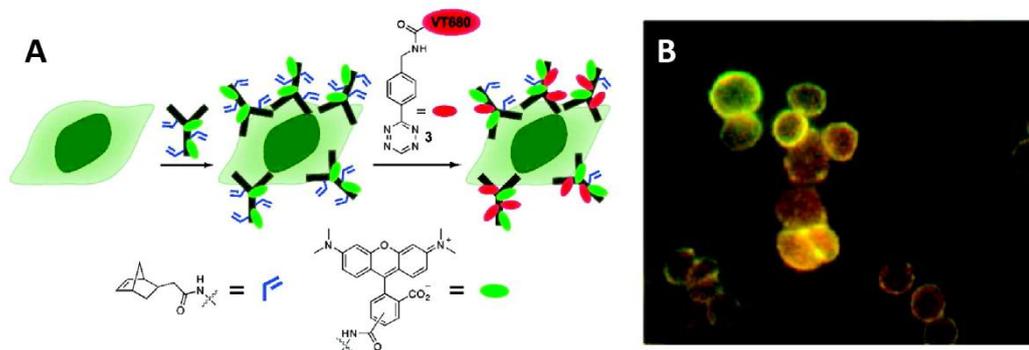


Figure 19 : première application du couplage de DAinv par Devaraj *et al.*⁷².

A) Incubation de cellules avec l'anticorps bifonctionnalisé par le norbornène et la tétraméthylrhodamine. Ligation bioorthogonale entre le norbornène de l'anticorps fixé à son récepteur et une tétrazine fluorescente dans le proche infrarouge.
 B) Visualisation de la colocalisation des signaux par microscopie de fluorescence. Echelle non indiquée.

Développement de diénophiles

Suite au norbornène et au *trans*-cyclooctène, d'autres diénophiles abiotiques ont été proposés comme partenaires de réaction avec les 1,2,4,5-tétrazines pour des études de bioconjugaison. En 2012, l'équipe de Wang s'est basée sur le théorème des orbitales frontières pour choisir le cyclooctyne le plus réactif parmi ceux initialement développés pour la SPAAC. Il en a résulté un couplage chimique efficace entre un bicyclononyne et une tétrazine⁷³. Plass *et al.* ont d'ailleurs démontré que des acides aminés portant un cyclooctyne, un *trans*-cyclooctène ou un norbornène pouvaient être incorporés dans des protéines puis liés à des sondes fluorescentes par couplage de DAinv chez la bactérie *E. coli* ou chez des cellules de mammifères⁷⁴. Cependant, la large taille de ces trois diénophiles constitue un inconvénient majeur dans la conception de rapporteurs chimiques pour des applications de marquage métabolique.

En 2012, l'équipe de Devaraj a décrit l'utilisation d'un méthylcyclopropène comme rapporteur chimique⁷⁵. En plus de sa petite taille minimisant son impact stérique sur la molécule modifiée, il est suffisamment réactif de par sa tension de cycle. Les auteurs ont ainsi employé la réaction de DAinv au marquage des biomolécules : des cultures cellulaires de cancer du sein ont été incubées avec des phospholipides préalablement fonctionnalisés avec des 2-méthylcyclopropènes, puis le couplage de DAinv s'est déroulé avec une sonde fluorogénique de type tétrazine-BODIPY. L'imagerie par microscopie confocale a révélé un marquage fluorescent au niveau des membranes cellulaires (figure 20). Peu après, le groupe de Prescher a également employé des rapporteurs de type méthylcyclopropène pour le marquage des glycoconjugués. Il a notamment présenté l'un des premiers doubles marquages impliquant la SPAAC et la DAinv pour visualiser des acides sialiques modifiés par un azoture ou par un méthylcyclopropène⁷⁶. Si ces « mini-étiquettes » demeurent moins réactives que les *trans*-cyclooctènes, le choix du substituant en position 3 du méthylcyclopropène peut permettre d'accélérer la vitesse de réaction de 2 ordres de grandeur en jouant sur les effets électroniques^{75,76}. Les cyclopropènes présentent cependant leurs propres inconvénients : d'une part leur caractère volatil peut compliquer leur synthèse, d'autre part ils peuvent afficher des problèmes de stabilité avec une polymérisation potentielle à forte concentration. L'ajout d'un groupement méthyle en position C1 permet notamment d'améliorer leur stabilité.

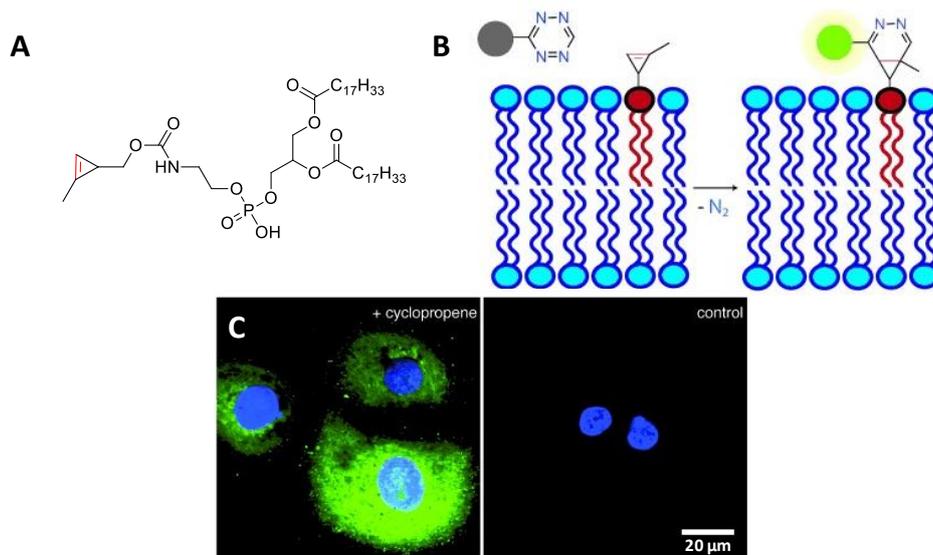


Figure 20 : utilisation d'un rapporteur de type méthylcyclopropène pour le marquage des phospholipides⁷⁵.
 A) Structure du rapporteur phospholipide-méthylcyclopropène. B) Stratégie utilisée. C) Observation d'un marquage spécifique par microscopie confocale de fluorescence. Adapté de [75].

D'autres « mini-étiquettes » ont été développées à la même période que les méthylcyclopropènes. En 2013, Niederwieser *et al.* ont démontré l'efficacité de l'alcène terminal comme diénophile pour le marquage métabolique des glycanes. Plusieurs dérivés de ManNAc ont été synthétisés en ajoutant un alcène terminal relié à la position 2 du glycanes par une liaison amide ou carbamate. Après leur incorporation dans la voie de biosynthèse des acides sialiques, ils ont été couplés à une tétrazine biotinyllée, puis détectés par un fluorophore porté par une streptavidine. Ces alcènes terminaux présentent une réactivité plus faible que leur analogue cyclique, mais leur constante de vitesse est comparable à la SPAAC avec des dibenzocyclooctynes⁷⁷. Un an plus tard, Engelsma *et al.* ont utilisé une sonde fonctionnalisée avec une acylazétine en tant que diénophile pour l'étude de l'activité d'une protéine (technique ABPP) et l'ont comparé à son analogue norbornène⁷⁸.

La réactivité des six types de diénophiles évoqués précédemment est résumée dans la figure 21 : selon le choix du diénophile, la cycloaddition de DAinv peut être jusqu'à 1000 fois plus rapide que la SPAAC et elle peut également facilement surpasser la cinétique de la CuAAC.

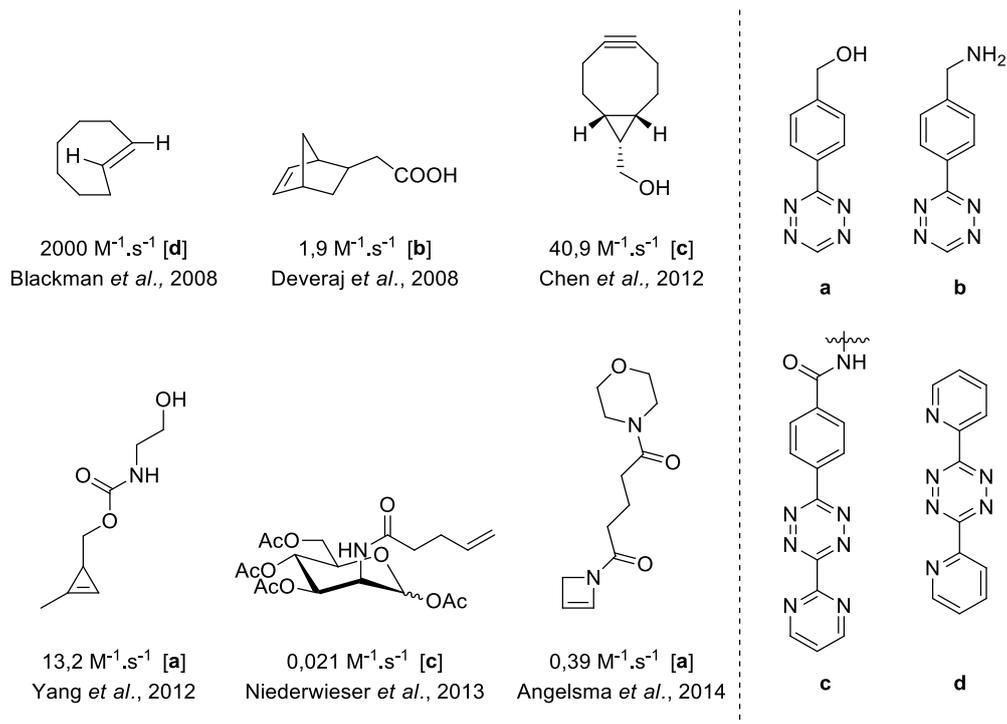


Figure 21 : structure chimique des premiers diénophiles conçus pour les réactions de DAinv, accompagnée des constantes de vitesse obtenues avec leur tétrazine respective (a,b,c ou d).

Développement des diènes

Si la réactivité des diénophiles impliqués dans la réaction de DAinv a été beaucoup étudiée, peu d'attention a été prêté aux effets de la structure des tétrazines sur la cinétique de la réaction, du fait de leur synthèse relativement complexe. La figure 22A présente la structure de plusieurs tétrazines classées selon leur réactivité.

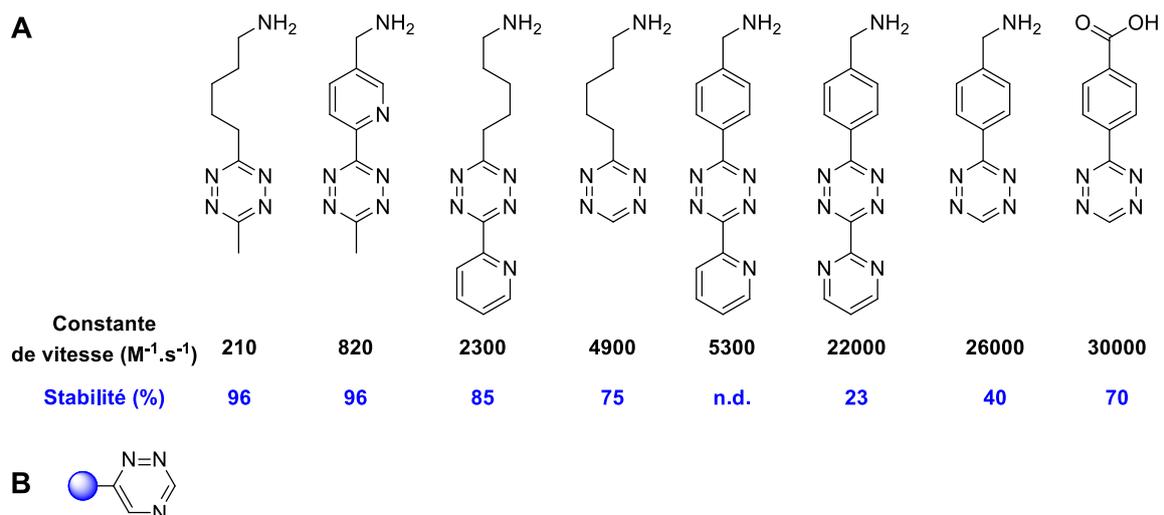


Figure 22 : structure chimique de différents diènes.

A) Sélection de tétrazines classées selon leur constante de vitesse calculée lors de leur ligation de DAinv avec un *trans*-cyclooctène dans du tampon phosphate salin. La stabilité de chaque tétrazine a été évaluée en les incubant à 37°C pendant 10 h dans du tampon phosphate salin. Adapté de [79]. B) Structure d'une 1,2,4-triazine comme diène alternatif.

Récemment, les 1,2,4-triazines ont été présentées comme des azadiènes alternatifs aux tétrazines du fait de leur synthèse plus aisée et de leur meilleure stabilité en conditions physiologiques (figure 22B). Kamber *et al.* ont notamment constaté à l'aide d'analyses informatiques que les 1,2,4-triazines sont plus réactives que les 1,2,3-triazines. Toutefois, elles peuvent uniquement réagir avec les alcènes cycliques de type *trans*-cyclooctène⁸⁰ ou avec les bicyclononynes⁸¹. Ces azadiènes ont été utilisés lors du couplage de DAinv pour la production et le marquage de protéines recombinantes⁸⁰, le marquage d'acides nucléiques en solution⁸² et plus récemment pour l'imagerie de l'ADN sur cellules vivantes⁸³. Ces études récentes suggèrent un avenir prometteur pour les 1,2,4-triazines.

Applications bioorthogonales de la DAinv pour le marquage des biomolécules

Bien que la réaction de DAinv soit relativement récente, son caractère fortement bioorthogonal a favorisé son application à toutes les classes de biomolécules. En 2014, de nombreuses études de marquage métabolique ont été réalisées sur les glycanes en utilisant un 1-méthylcyclopropène comme rapporteur chimique^{75,76,84-87}. Ces molécules ont d'ailleurs servi de modèle pour améliorer l'efficacité de la réactivité et/ou de l'incorporation des rapporteurs chimiques. Une analyse comparative a ainsi exposé les différences de réactivité entre différents méthylcyclopropènes selon le choix du groupement chimique en position 3⁸⁸. Plus récemment, des dérivés de la mannosamine ont été comparés selon la présence ou l'absence d'un groupement méthyle en position 1 du cyclopropène et selon le type de liaison qui relie ce dernier au carbone 2 du monosaccharide⁸⁹. Les résultats indiquent comme attendu que le groupement méthyle augmente la stabilité du cyclopropène mais qu'il diminue la cinétique de la réaction. En ce qui concerne le choix des liaisons, l'ajout d'un lien amide provoque une meilleure incorporation métabolique de l'analogue monosaccharidique alors que la liaison carbamate lui confère une meilleure réactivité lors du couplage bioorthogonal (figure 23A).

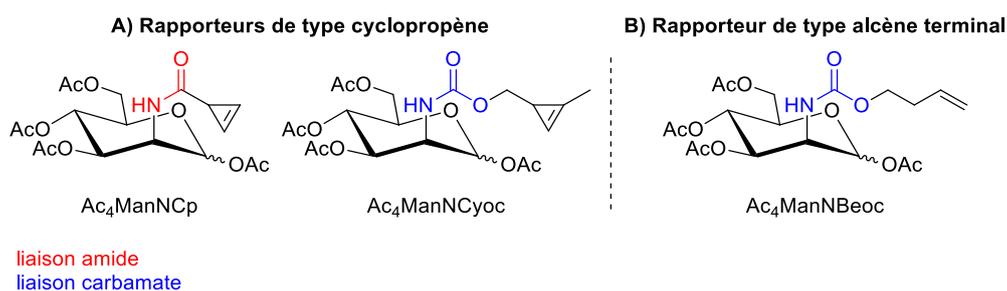


Figure 23 : structure chimique des rapporteurs monosaccharidiques les plus efficaces pour la ligation bioorthogonale de DAinv. Adapté de [89] et [90].

Les alcènes terminaux ont également été utilisés dès 2014 comme étiquettes chimiques pour le marquage des glycanes. En effet, l'équipe de Wittmann a synthétisé une série de mannosamines péracétylées portant, via une liaison carbamate en C2, une chaîne carbonée avec le diénophile à son extrémité⁹⁰. Dans son étude, le groupe a étudié l'impact de la taille de la chaîne carbonée sur l'efficacité de marquage final. Puisque la réaction de DAinv est favorisée lorsque le diénophile est riche en électrons, il en résulte expérimentalement que plus la taille de la chaîne carbonée augmente, plus la vitesse de réaction augmente, mais plus l'efficacité de l'incorporation métabolique diminue. Parmi les composés testés, c'est la mannosamine possédant un groupement butenyloxy-carbonyle qui offre le meilleur compromis entre efficacité d'incorporation et réactivité (figure 23B). En 2017, la même équipe a démontré que pour un même nombre de carbones reliant l'alcène à la position C2 de la mannosamine, la liaison carbamate donne un composé mieux accepté dans les voies de biosynthèse des acides sialiques que la liaison amide⁹¹.

Les cyclopropènes et les alcènes terminaux sont actuellement les diénophiles les plus utilisés pour le marquage métabolique des glycanes. Il convient néanmoins de noter que les norbornènes ont aussi été utilisés avec succès comme étiquettes chimiques portées par des mannosamines dans des expériences de MOE⁹². Toutefois, du fait de leur encombrement stérique important, la durée de leur incorporation métabolique est 12 fois plus longue que leurs analogues cyclopropènes pour obtenir un marquage significatif équivalent.

Concernant les autres biomolécules naturelles que les glycanes, la DAinv a été employée pour le marquage acides aminés⁹³, des lipides⁷⁵ et des acides nucléiques, avec par exemple l'incorporation d'un analogue de la thymidine portant un alcène terminal dans l'ADN de cellules HeLa, puis sa fixation à une tétrazine couplée à un fluorophore. Un double marquage a par ailleurs été réalisé entre deux analogues orthogonaux de la thymidine grâce aux réactions DAinv et CuAAC⁹⁴.

Chez les végétaux, il faudra attendre 2016 puis 2017 pour que des analogues monosaccharidiques portant un groupement méthylcyclopropène soient incorporés dans des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, puis couplés à des tétrazines portées par des fluorophores^{59,95}.

Autres applications bioorthogonales

Outre les biomolécules, le couplage de DAinv peut être utilisé dans le domaine biomédical pour étudier la dynamique de distribution de molécules bioactives et/ou identifier leurs cibles. Par exemple, Devaraj *et al.* ont pu suivre la distribution spatiale intracellulaire d'un analogue de type *trans*-cyclooctène du taxol, un agent anticancéreux capable de stabiliser les microtubules cellulaires⁹⁶. Enfin, la cycloaddition n'est pas uniquement utilisée pour des marquages biologiques puisqu'elle a permis de nombreuses avancées dans le développement de la radioimmunothérapie pré-ciblée^{97,98}. Le principe consiste à incorporer dans le système biologique un anticorps fonctionnalisé avec un *trans*-cyclooctène et interagissant de manière spécifique avec un antigène présent au niveau des cellules cancéreuses. La

ligation est ensuite réalisée avec une tétrazine radioactive pour que l'irradiation ne cible que la tumeur (figure 24).

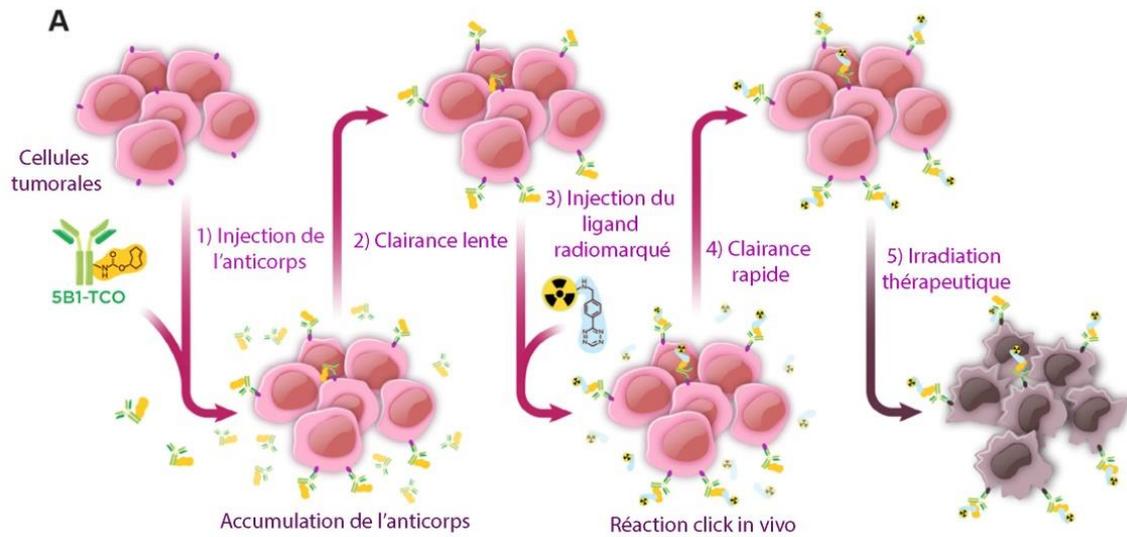


Figure 24 : principe schématique de l'approche de radioimmunothérapie pré-ciblée réalisée à l'aide de la cycloaddition de DAinv. Adapté de [98].

e. Conclusion

La CuAAC, la SPAAC et la DAinv sont finalement les trois réactions de chimie *click* bioorthogonale les plus utilisées pour des applications de marquage métabolique, comme résumé au niveau de la figure 25. La CuAAC est la réaction la plus populaire malgré la cytotoxicité du cuivre qui peut empêcher certaines applications biologiques. Grâce à l'absence de catalyseur, la SPAAC est davantage compatible avec les systèmes vivants, mais elle présente une cinétique réduite par rapport à la CuAAC et un bruit de fond plus important dû à l'encombrement stérique du cyclooctyne. La DAinv, dont les applications sont plus récentes, est elle aussi compatible avec les milieux vivants. Sa cinétique surpasse celle de la CuAAC de plusieurs ordres de grandeur selon le choix du diénophile et la structure du diène.

	Cycloaddition	Constante de vitesse k	Remarques
SPAAC		$10^{-2} - 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Sans catalyseur ⊖ Réactif envers les thiols
CuAAC		$10 - 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> ⊖ Réactif envers les thiols ⊖ Cu(I) ⊕ Cu(II) moins toxique réduit <i>in situ</i> ⊕ Ligands tétravalents du Cu(I) : <ul style="list-style-type: none"> - réduisent sa toxicité - accélèrent la réaction
DAinv		$1 - 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Sans catalyseur ⊕ Rapide ⊕ Fluorogénique

Figure 25 : réactions bioorthogonales les plus utilisées pour des applications de bioconjugaison, classées selon leur constante de vitesse. Adapté de [79].

Outre ces trois principales réactions bioorthogonales, d'autres réactions ont été développées en parallèle pour des applications biologiques. Ainsi, il existe d'autres cycloadditions 1,3-dipolaires pour lesquelles l'utilisation de dipôles alternatifs aux azotures a pour but d'améliorer leur cinétique et/ou leur biocompatibilité.

4. Autres réactions bioorthogonales

a. Oxydes de nitrile et nitrones

Parmi les dipôles développés, l'oxyde de nitrile peut réagir avec le norbornène comme alcène tendu pour former l'isoxazoline, ce qui a notamment été appliqué au marquage *in vitro* d'oligonucléotides⁹⁹. Ce dipôle donne également un isoxazole en réagissant avec un alcyne cyclique¹⁰⁰ (figure 26). L'inconvénient des oxydes de nitrile réside dans leur tendance à dimériser en l'absence de partenaires réactifs, c'est pourquoi ils doivent être générés *in situ* à partir d'un précurseur stable.

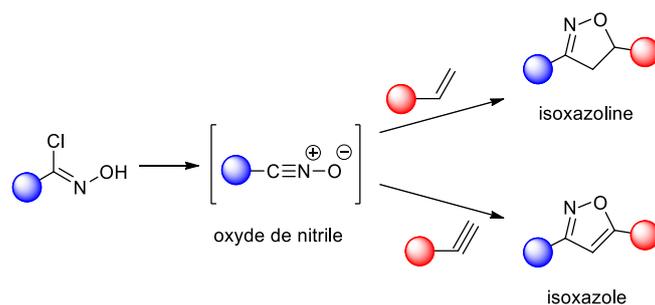


Figure 26 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre un oxyde de nitrile généré *in situ* et un alcène ou un alcyne.

Les nitrones ont été également présentées comme dipôles réactifs en 2010 pour la cycloaddition SPANC ou *strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition* (figure 27). McKay *et al.* ont constaté que la cycloaddition entre une nitrone cyclique et un dibenzocyclooctyne est 60 fois plus rapide que la SPAAC analogue, permettant ainsi un marquage de la surface de cellules cancéreuses¹⁰¹.

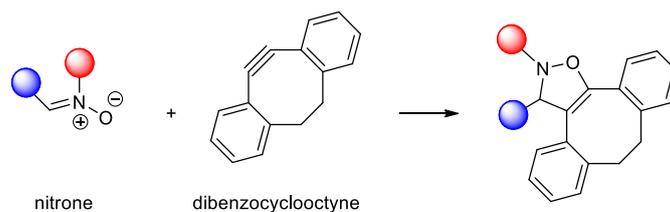


Figure 27 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre une nitrone et un cyclooctyne.

b. Sydnones et diazoalcanes

En 2013, une étude de criblage à haut débit a montré que les sydnones peuvent réagir en tant que 1,3-dipôles avec des alcynes terminaux en présence de cuivre¹⁰². L'année suivante, des protéines fonctionnalisées avec des bicyclononynes ont été couplées à des arylsydnones en l'absence de catalyseur métallique¹⁰³ (figure 28).

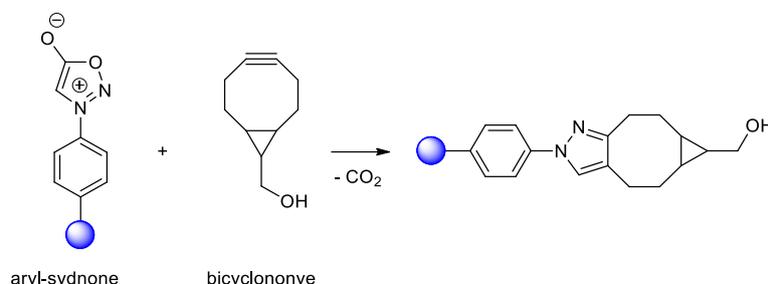


Figure 28 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre une phényl-sydnone et un bicyclononyne. D'après [103].

Les groupements diazos ont depuis peu été employés comme rapporteurs chimiques réactifs avec des sondes cyclooctynes pour la stratégie de MOE par exemple¹⁰⁴. Leur application récente dans le domaine de la bioconjugaison a été permise grâce au développement d'une méthode de synthèse douce consistant à transformer un azoture en son analogue diazo sous l'action de phosphinoesters activés¹⁰⁵ (figure 29).

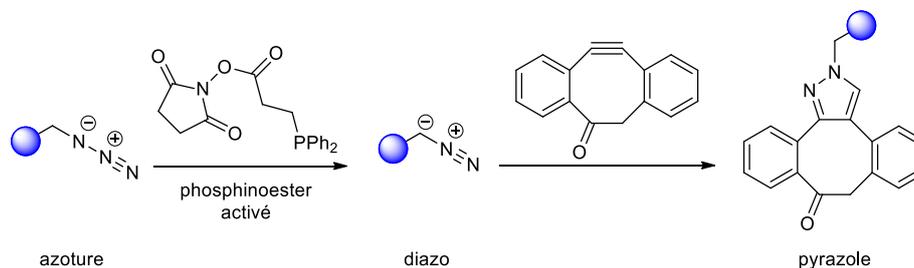


Figure 29 : cycloaddition 1,3 dipolaire entre un diazo, généré *in situ* à partir d'un azoture, et un cyclooctyne.

c. Cycloadditions photoactivées

Les réactions photoactivées occupent une position spéciale dans la lignée des réactions bioorthogonales puisqu'elles permettent de contrôler plus précisément l'initiation et la durée de la réaction de couplage. Une source de lumière de longueur d'onde et d'intensité connues permet effectivement de générer *in situ* l'espèce réactive, qui réagit ensuite avec son partenaire directement dans le milieu biologique. La réaction peut également être contrôlée dans l'espace en appliquant l'irradiation lumineuse à un endroit précis dans l'échantillon.

Les réactions photoactivées décrites ci-dessous appartiennent toujours à la classe des cycloadditions 1,3-dipolaires.

Nitrilimines

La cycloaddition 1,3 dipolaire entre un alcène et une nitrilimine est également connue sous le nom de « réaction *click* du tétrazole ». Il s'agit d'une cycloaddition entre un alcène et une nitrilimine générée *in situ* par photolyse d'un précurseur tétrazole. Sous l'effet d'une irradiation UV, le diaryltétrazole libère une molécule de diazote et génère *in situ* le dipôle nitrilimine, qui réagit alors spontanément avec l'alcène partenaire pour former une pyrazoline comme cycloadduit (figure 30). La réaction peut en outre être fluorogénique selon la structure du réactif alcène, ce qui représente un avantage certain pour certaines applications biologiques qui nécessitent une étude dynamique. Le caractère bioorthogonal de ce couplage a été démontré lors de la modification chimique de protéines avec des tétrazoles, suivie par leur photoinduction en présence d'alcènes substitués, conduisant à la détection finale de cycloadduits fluorescents¹⁰⁶.



Figure 30 : cycloaddition 1,3 dipolaire photoactivée entre une nitrilimine, générée *in situ* par photolyse d'un diaryltétrazole, et un alcène terminal.

Ylures de nitrile

La possibilité de générer *in situ* des 1,3-dipôles grâce à une irradiation lumineuse a été étendue aux ylures de nitrile par l'équipe de Lin en 2010 (figure 31). Ces derniers peuvent être générés *in situ* par la photoactivation de rapporteurs azirines. Ils réagissent alors rapidement avec des alcènes substitués, comme cela a pu être démontré pour la bioconjugaison de protéines¹⁰⁷.

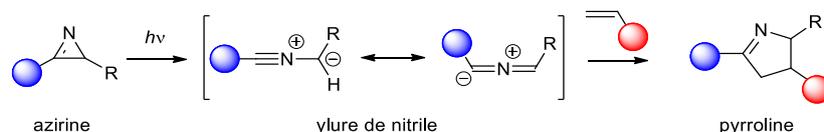


Figure 31 : cycloaddition 1,3 dipolaire photoactivée entre un ylure de nitrile, généré *in situ* par photolyse d'une azirine, et un alcène terminal.

Les exemples ci-dessus illustrent les nombreux développements réalisés ces dix dernières années pour obtenir de nouvelles réactions bioorthogonales. La liste présentée n'est toutefois pas exhaustive car il existe une myriade d'autres réactions bioorthogonales, comme par exemple les réactions de couplage radicalaire¹⁰⁸ ou les réactions catalysées par le palladium¹⁰⁹. Outre le développement et l'optimisation de ces réactions, la mise au point de réactifs fluorogéniques constitue une autre facette prospère de la chimie *click* bioorthogonale.

5. Les sondes fluorogéniques

Le marquage des biomolécules avec des fluorophores est une technique couramment employée pour visualiser leur dynamique au sein des cellules. L'approche classique consiste à coupler au rapporteur chimique métabolisé une molécule constitutivement fluorescente, puis à laver l'échantillon pour enlever l'excès de fluorophore et ainsi diminuer le bruit de fond. La conception de sondes fluorogéniques a permis dans certains cas d'obtenir un marquage plus efficace. Ce sont en général des fluorochromes dont la fluorescence est « éteinte » (ou « quenchée ») en conditions normales, jusqu'à ce qu'une réaction ou un changement d'environnement entraîne leur activation (variation de pH, balance hydrophile-hydrophobe, *etc.*). Cela permet la production d'un signal de fluorescence élevé, combiné à un bruit de fond minimal. L'obtention d'un très bon rapport signal sur bruit et l'absence de lavage rendent les molécules fluorogéniques idéales pour certains marquages *in vivo* ou intracellulaires, offrant la possibilité de suivre certains processus biologiques en temps réel.

Il existe deux types d'extinction de fluorescence selon l'interaction entre le fluorochrome et une deuxième molécule. Le premier type est l'extinction statique ou extinction « sans diffusion » : le fluorochrome va établir un complexe avec une deuxième molécule à l'état fondamental. Ce complexe est non fluorescent et ne peut pas être excité à la longueur d'onde du fluorophore. Le second type d'extinction de fluorescence est dit dynamique et correspond à une extinction avec diffusion. En effet, le fluorophore peut être excité mais il va transmettre son énergie à un motif chimique accepteur qui va ainsi inhiber la fluorescence. Le motif chimique accepteur est alors appelé « quencheur ». De nombreuses sondes fluorogéniques activées par des réactions bioorthogonales ont vu le jour ces quinze dernières années. Elles reposent sur trois principales méthodes physico-chimiques qui appartiennent à la classe de l'extinction dynamique. Ces méthodes comprennent : un transfert d'énergie par résonance de fluorescence (phénomène FRET pour *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) ou à travers les liaisons chimiques si les deux partenaires appartiennent à un système conjugué rigide (phénomène TBET pour *Through Bond Electron Transfer*). Le dernier cas est le transfert d'électron photoinduit (phénomène PeT pour *Photo-induced electron Transfer*).

Les coumarines substituées représentent le premier exemple de molécules fluorogéniques activées par une réaction de chimie *click* bioorthogonale. En effet, l'ajout de substituant en position 3 ou 7 peut facilement influencer leurs propriétés de fluorescence, comme l'atteste la conception d'une coumarine-7-phosphine pro-fluorescente dans le cadre de la ligation de Staudinger-Bertozzi en 2003¹¹⁰.

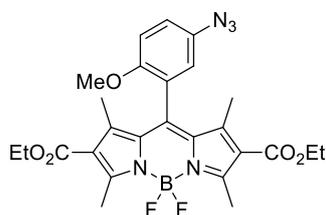
Concernant la CuAAC, Sivakumar *et al.* ont décrit une 3-azidocoumarine pour laquelle la fonction azoture inhibe la fluorescence de la molécule. Une fois la conversion de l'azoture en triazole par la cycloaddition catalysée au cuivre avec un alcyne terminal, la fluorescence est libérée¹¹¹. La stratégie inverse a été proposée en parallèle avec une coumarine dont la fluorescence est inhibée par un groupement alcyne¹¹². La sonde fluorogénique azido-BODIPY a ensuite été développée et utilisée lors

du marquage des glycoprotéines sur cellules¹¹³ (figure 32A). Le rendement quantique du cycloadduit formé après la CuAAC est alors 52 fois supérieur à celui de la sonde éteinte.

Pour la réaction de type SPAAC, la sonde coumBARAC, résultant de la fusion entre un biaryl cyclooctyne et une coumarine, constitue le premier cyclooctyne fluorogénique, bien que son intensité de fluorescence ne soit pas très élevée¹¹⁴. L'équipe de Boons a ensuite conçu le FI-DIBO, un dibenzocyclooctyne fluorogénique beaucoup plus efficace puisque son cycloadduit est 1000 fois plus lumineux que le réactif de départ¹¹⁵ (figure 32B).

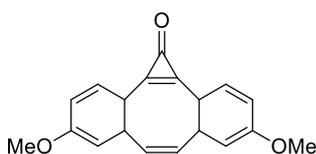
Pour les cycloadditions de DAinv, les tétrazines possèdent une grande fluorogénicité intrinsèque, les rendant attractives pour les stratégies de marquage métabolique. En effet, ce sont des chromophores naturels qui absorbent la lumière à 500-530 nm. Ils ont ainsi été utilisés comme quencheurs vis-à-vis d'une large gamme de fluorophores par des phénomènes de FRET ou de TBET. Les chromophores qui ont pu être « éteints » par l'ajout d'une tétrazine sont tout d'abord les BODIPY^{116,117} suivis des coumarines⁹⁶ puis de la famille des xanthènes¹¹⁸⁻¹²¹ (figure 32C). Certaines de ces sondes présentent une fluorogénicité remarquable avec une augmentation du rendement quantique de plus de 1000 fois après la cycloaddition^{96,117}.

A) CuAAC



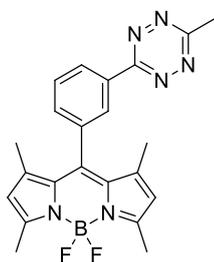
Shie *et al.*, 2014
Dérivé de BODIPY

B) SPAAC

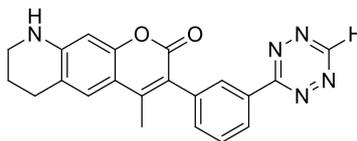


Boons *et al.*, 2012
FI-DIBO

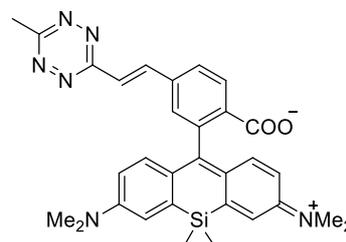
C) DAinv



Carlson *et al.*, 2013
Dérivé de BODIPY



Meimetis *et al.*, 2010
Dérivé de coumarine



Kozma *et al.*, 2017
Dérivé de xanthène

Figure 32 : structure chimique de sondes fluorogéniques développées dans le cadre de réactions de ligation bioorthogonale.

En plus de pouvoir inhiber la fluorescence d'un chromophore, les tétrazines peuvent également fournir une fluorescence intrinsèque selon le choix de leurs substituants. Cette propriété est exploitée lorsque c'est la réaction chimique qui va construire le fluorophore de manière spontanée. Cette seconde méthodologie de marquage fluorogénique, moins commune que le quenching, présente l'avantage de ne pas nécessiter de profluorophore parmi les réactifs et permet de diminuer davantage le bruit de fond. Elle a été appliquée à la cycloaddition de DAinv ces deux dernières années. Par exemple, le couplage d'une tétrazine avec certains diénophiles (l'isomère axial du *trans*-cyclooctène et l'*aza-trans*-cyclooctène) donne une dihydropyridazine fluorescente permettant de réaliser l'imagerie de compartiments intracellulaires ou de glycoconjugués cellulaires^{122,123} (figure 33A,B). Les futures recherches concernant les réactions bioorthogonales de construction fluorogénique pourront consister à améliorer les rendements quantiques des fluorophores formés car ils sont relativement faibles dans certains cas (de 0,05 à 0,5).

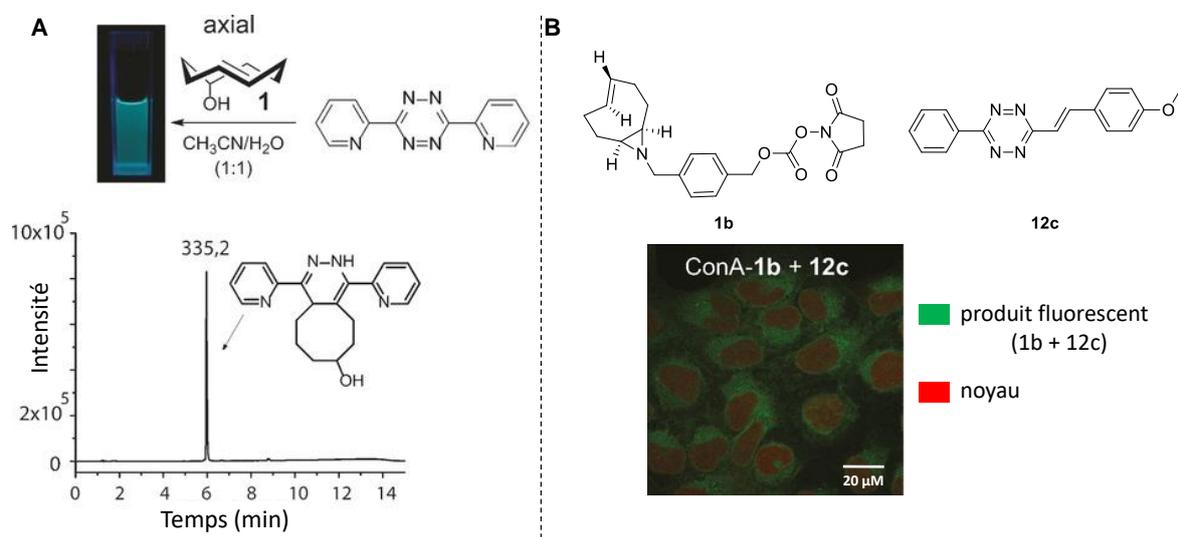


Figure 33 : exemples de marquage fluorogénique par génération spontanée du fluorophore. A) La réaction de DAinv entre la dipyriddyltétrazine et l'isomère axial de l'hydroxy-*trans*-cyclooctène donne une dihydropyridazine fluorescente détectée par HPLC-MS. Adapté de [122]. B) Marquage fluorogénique de glycoconjugués sur des cellules cancéreuses. La concanavaleine A est fonctionnalisée avec un *aza-trans*-cyclooctène pour donner l'analogue 1b. Après sa ligation spécifique aux α -D-mannoses et α -D-glucoses des glycoconjugués cellulaires, la ligation fluorogénique est effectuée avec la tétrazine 12c. Adapté de [123].

Pour clore cette partie, il convient de préciser que des sondes fluorogéniques peuvent être créées par d'autres stratégies que les réactions bioorthogonales, telles que les méthodologies d'ingénierie génétique chez les protéines¹²⁴.

6. Les marquages métaboliques chez les végétaux

La stratégie du rapporteur chimique permet de suivre les principales classes de biomolécules ainsi que certains métabolites, en utilisant les cycloadditions de type CuAAC, SPAAC ou DAinv comme principales réactions de ligation bioorthogonale. Bien que cette méthodologie ait été couramment employée sur cellules animales, peu d'études ont été dédiées à des modèles végétaux. Ces études concernent principalement les glycanes.

Marquage métabolique des glycanes

Les glycanes sont principalement impliqués dans la régulation des processus développementaux chez les végétaux. D'un point de vue économique, ils forment avec la lignine la biomasse lignocellulosique qui constitue une source d'énergie renouvelable. Biosynthétisés par des glycosyltransférases au niveau de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique, les glycanes sont majoritairement présents au niveau des polysaccharides pariétaux que sont la cellulose, les hémicelluloses et la pectine. Ils sont aussi retrouvés sous forme de *N*- et de *O*-glycanes dans plus de 50 % des protéines végétales. Les monosaccharides végétaux les plus courants sont : le glucose, la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), le galactose, le L-arabinose, le xylose, le L-fucose et l'acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo).

Alors que l'ingénierie génétique permet de visualiser les protéines, les méthodes pour étudier la dynamique des glycanes végétaux sont longtemps restées limitées. En effet, les techniques habituelles de visualisation de ces molécules (microscopie à transmission électronique, microscopie Raman, anticorps spécifiques des carbohydrates, modules de liaison aux carbohydrates) souffrent de nombreuses limites : des temps de préparation relativement longs, des artefacts de fixation, un manque de spécificité, une perte d'information temporelle, *etc.* La stratégie du rapporteur chimique a permis de surmonter ces difficultés en appliquant séquentiellement les étapes d'incorporation métabolique du rapporteur chimique et de ligation bioorthogonale à une sonde de détection (figure 34).

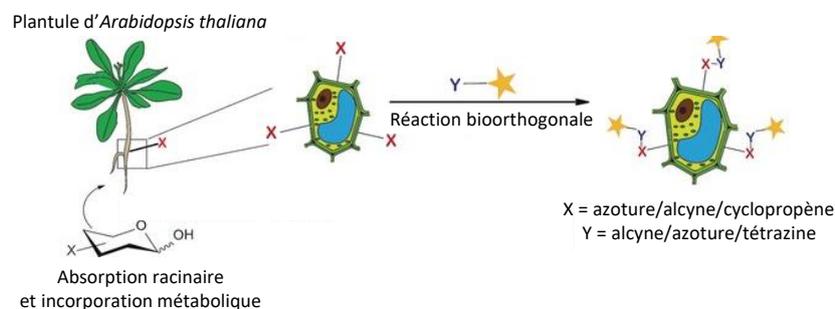


Figure 34 : représentation schématique de la stratégie du rapporteur chimique appliquée aux glycanes chez les végétaux. L'analogue monosaccharidique est absorbé via les racines puis métabolisé dans les cellules végétales. Une réaction bioorthogonale permet ensuite de le lier à une sonde pour pouvoir le détecter. Adapté de [95]

En 2012, Anderson *et al.* ont appliqué pour la première fois la technique MOE : ils ont procédé à l'incorporation métabolique d'un analogue du fucose portant un groupement alcyne (l'Ac₄FucAl) dans les parois végétales de plantules d'*Arabidopsis thaliana*, puis à sa ligation de type CuAAC à un fluorophore³⁰. L'observation des échantillons en microscopie de fluorescence a révélé une incorporation spécifique des rapporteurs monosaccharidiques au sein des parois cellulaires de racines (figure 35). Des expériences de compétition entre le fucose modifié et son analogue naturel ont permis de montrer que le marquage n'est pas dû à une diffusion passive du rapporteur chimique, mais qu'il nécessite bien son incorporation métabolique sous contrôle enzymatique. De plus, des expériences d'extraction et de caractérisation des composés fluorescents ont permis d'affirmer que l'Ac₄FucAl est principalement incorporé dans la pectine et plus précisément dans le domaine rhamnogalacturonane I.

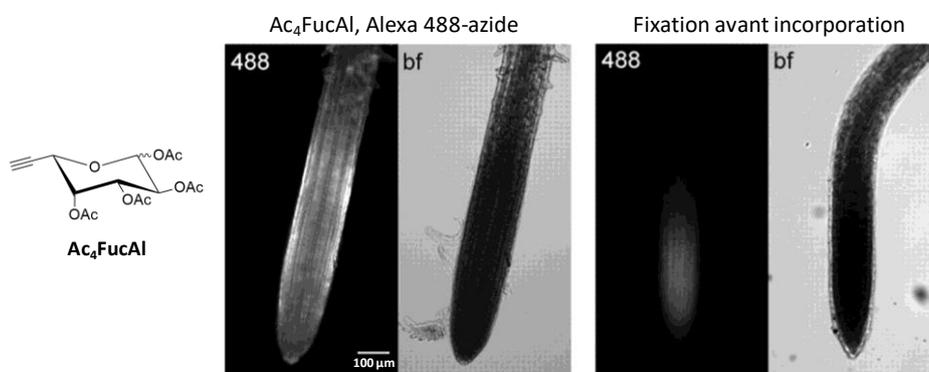


Figure 35 : incorporation spécifique de l'Ac₄FucAl au sein de racines de plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Visualisation du canal de fluorescence (488) et de la lumière transmise (bf). La fixation des tissus en amont de l'incubation avec l'Ac₄FucAl entraîne une diminution significative de la fluorescence, confirmant que son incorporation se fait sous contrôle enzymatique. Adapté de [30].

Quatre années plus tard, Dumont *et al.* ont proposé un plan expérimental similaire en incorporant un analogue du Kdo portant une fonction azoture (KdoN₃) dans la paroi de plantules d'*Arabidopsis thaliana*, puis en le couplant à un alcyne porté par un fluorophore lors de la CuAAC¹²⁵. Les auteurs ont démontré l'incorporation spécifique du KdoN₃ au sein des chaînes rhamnogalacturonane II de la pectine. Ils ont par ailleurs réalisé le premier double marquage sur cellules végétales pour visualiser la pectine, à travers le marquage de l'Ac₄FucAl et du KdoN₃ au moyen de deux CuAAC consécutives (figure 36).

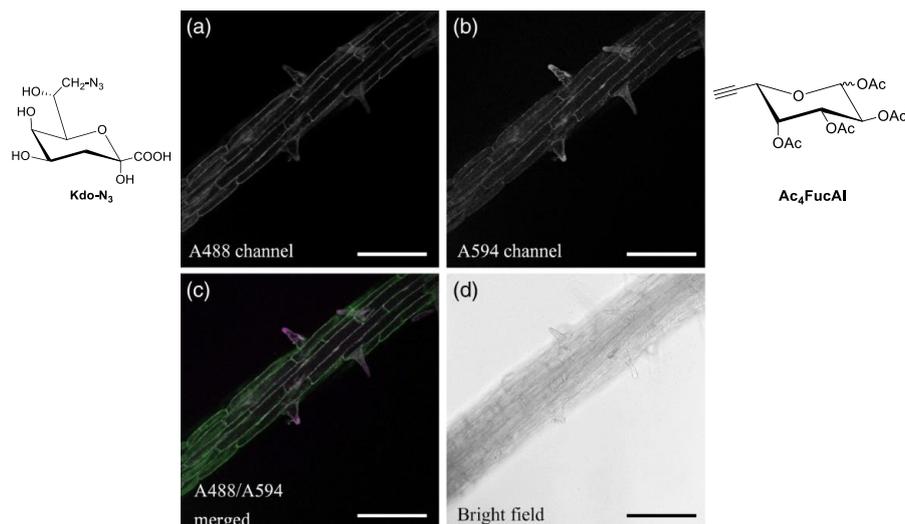


Figure 36 : double marquage du KdoN₃ et de l'Ac₄FucAl au sein de la pectine pariétale de racine d'*Arabidopsis thaliana*. Incubation de plantules avec les deux rapporteurs chimiques suivie de la ligation aux fluorophores à l'aide de deux CuAAC consécutives. Visualisation du KdoN₃ (a), de l'Ac₄FucAl (b), de la superposition des deux canaux (c) et de la lumière transmise (d) au niveau de la zone d'élongation racinaire. Adapté de [125]

Un nombre important de nouveaux rapporteurs monosaccharides a été incorporé au sein de racines d'arabette en 2016 : des analogues du GalNAc, du L-fucose et du L-arabinose⁵⁹, du GlcNAc¹²⁶ et du glucose¹²⁷. Après la visualisation de la pectine, l'équipe de Chen a étudié le processus de *N*-glycosylation avec un dérivé du GlcNAc portant une fonction azoture : la *N*-azidoacétylglucosamine (Ac₄GlcNAz). Les auteurs ont démontré l'incorporation de l'Ac₄GlcNAz dans les *N*-glycoprotéines pariétales ou membranaires, puis ils ont regardé la dynamique de *N*-glycosylation selon le stade de développement des racines¹²⁶. Parallèlement, Hoogenboom *et al.* ont employé pour la première fois la SPAAC et la DAinv comme réactions bioorthogonales chez les végétaux, avec l'incorporation de rapporteurs monosaccharidiques de type azoture ou cyclopropène⁵⁹. Enfin, Zhu *et al.* ont récemment comparé l'incorporation métabolique d'une dizaine de dérivés glycaniques. Parmi eux, seulement deux nouveaux analogues structuraux ont été métabolisés : des dérivés du GlcNAc (Ac₄GlcNCp) et du Kdo (Ac₄Me₈AzKdo)⁹⁵.

Les expériences de MOE menées ces dernières années chez les végétaux ont permis d'étendre la gamme de rapporteurs monosaccharidiques disponibles pour l'étude de la régulation de la biosynthèse des glycanes (figure 37). L'ensemble des expériences citées ci-dessus a été réalisé à la surface de plantules d'*Arabidopsis thaliana* avec très souvent l'utilisation de la CuAAC comme réaction de couplage. Les efforts doivent donc être poursuivis pour étendre cette méthodologie de marquage à d'autres espèces végétales pertinentes pour l'étude de la dynamique de glycosylation et à d'autres réactions de ligation bioorthogonale.

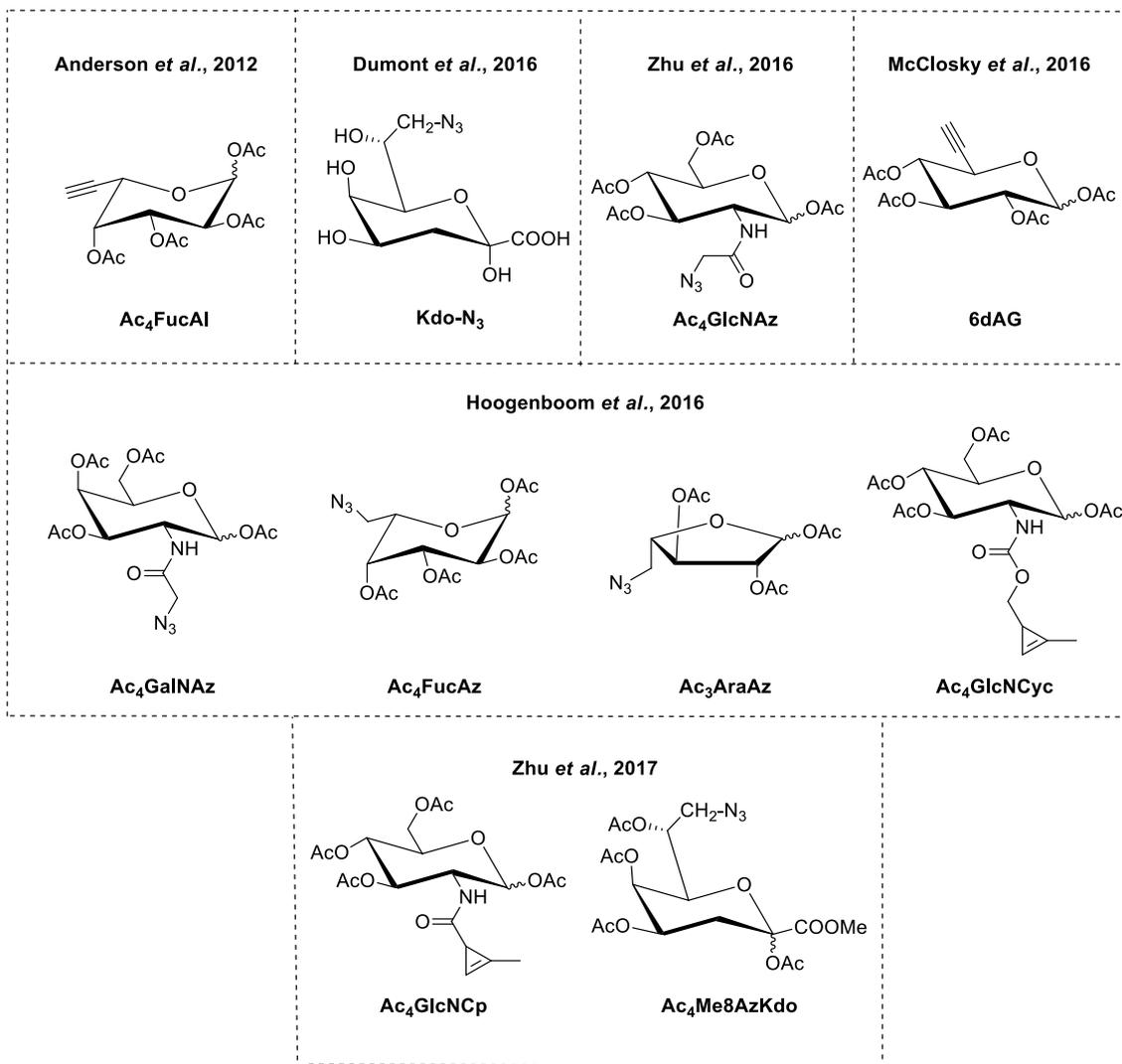


Figure 37 : structure des rapporteurs monosaccharidiques incorporés chez des modèles végétaux avec succès.

Autres applications de ligation bioorthogonale

Les stratégies de ligation bioorthogonale ont été appliquées à quelques autres biomolécules végétales que les glycanes. Les exemples les plus récents concernent un analogue de l'auxine¹²⁸, une hormone pariétale impliquée dans la régulation des processus de développement, et un analogue de la choline¹²⁹, un précurseur des lipides de type phosphatidylcholine présents dans les membranes cellulaires. L'ADN nucléaire¹³⁰ ainsi que certaines formes d'acylation des protéines¹³¹ ont aussi été visualisés chez *Arabidopsis thaliana* et des expériences d'ABPP ont été effectuées pour détecter des protéines végétales¹³². Enfin, le polymère polyphénolique de lignine, présent au niveau de la paroi végétale, a également fait l'objet de quelques études de marquage métabolique qui seront détaillées dans la partie III.3 de cette introduction.

7. Conclusion

Ces quinze dernières années, le concept de chimie bioorthogonale a inspiré les chimistes et biologistes qui tentent de trouver comment des réactions organiques classiques peuvent permettre de répondre à des questions biologiques. Parmi les réactions développées, la CuAAC, la SPAAC et la DAinv se sont démarquées comme les réactions les plus utilisées pour des applications de marquage métabolique, avec de nombreux efforts accomplis pour augmenter leur réactivité. Il existe néanmoins une myriade d'autres réactions bioorthogonales toujours en cours de développement, telle que d'autres cycloadditions 1,3-dipolaires, des réactions photoactivées ou encore des couplages catalysés par des métaux. Pour plus de précision, l'ouvrage de M. Vrabel dépeint les principales réactions de cycloaddition utilisées en chimie bioorthogonale ainsi que leurs applications²².

Finalement, chaque réaction possède ses avantages et inconvénients, lui conférant un certain degré de bioorthogonalité. Les principales limites rencontrées sont : une vitesse de réaction trop faible, un manque de biocompatibilité, un rapporteur chimique trop imposant ou encore un risque de réactions secondaires au sein du système biologique. Ces contraintes poussent les chemobiologistes à explorer de nouvelles réactions chimiques affichant une utilité biologique, à l'aide d'expériences physico-chimiques mais également d'analyses informatiques. Les calculs informatiques se sont effectivement avérés très utiles pour prédire la réactivité et la sélectivité des réactions bioorthogonales développées au cours de la dernière décennie, comme l'explique le groupe de Houk dans une revue récente¹³³. Les auteurs ont d'ailleurs créé une matrice prédictive représentant la cinétique de différentes cycloadditions bioorthogonales selon la structure des réactifs impliqués. Cela permet de choisir la réaction la plus pertinente selon l'application biologique (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*) (figure 38).

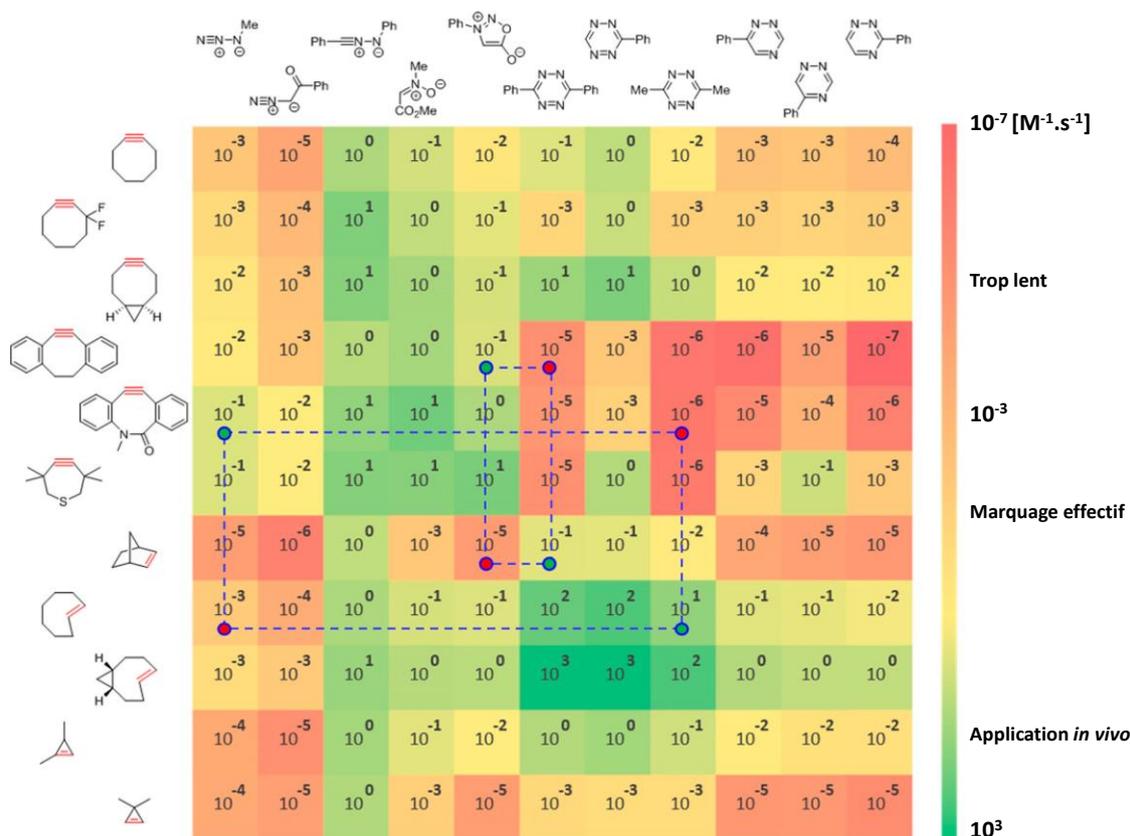


Figure 38 : matrice comparative de la réactivité de différentes réactions bioorthogonales selon la structure chimique des réactifs impliqués. Dans chaque case est notée la constante de vitesse prédite par calcul informatique. Les cases vertes représentent des réactions rapides tandis que les cases rouges représentent des réactions trop lentes pour être réalisables. Extrait de [133].

Les futurs challenges à relever pour la chimie bioorthogonale appliquée au marquage des biomolécules sont les suivants : les réactions développées doivent être suffisamment rapides pour pouvoir être effectuées dans les systèmes vivants, avec une concentration de réactifs minimale. Les groupements chimiques doivent toujours être le plus petit possible et suffisamment stables en milieu intracellulaire pour pouvoir réaliser des expériences *in vivo*. De plus, de nombreuses réactions biocompatibles ont déjà été développées par les chimistes mais n'ont pas été propagées par les biologistes, notamment à cause de réactifs non disponibles commercialement et/ou nécessitant une synthèse complexe. Les sondes développées doivent donc être facilement accessibles afin de favoriser la transition de la mise au point chimique vers l'utilisation biologique. Enfin, les réactions de demain doivent être à la fois bioorthogonales et orthogonales entre elles afin de pouvoir effectuer des marquages multiples. Cela permet de suivre plusieurs substrats métaboliques ou de visualiser plusieurs processus biologiques simultanément. Plusieurs articles publiés ces dernières années évoquent les critères que les réactions bioorthogonales devront remplir pour des applications de marquage métabolique, mais également pour des utilisations biomédicales^{134,135}.

La stratégie du rapporteur chimique a été largement utilisée avec la majorité des réactions bioorthogonales existantes et pour les différentes grandes classes de biomolécules. Dans le cadre de ce sujet de thèse, cette méthodologie va être appliquée à un biopolymère particulier situé dans la paroi cellulaire végétale : la lignine.

II. La paroi cellulaire végétale, structure et composition

1. Organisation de la paroi

Les cellules végétales se distinguent des cellules animales par la possession d'une structure semi-rigide située à l'extérieur de la membrane plasmique de la cellule : la paroi cellulaire végétale. Cette structure est composée d'un assemblage de réseaux de biopolymères dont des polysaccharides (cellulose, hémicelluloses, pectines), des polymères phénoliques formant la lignine ainsi que des protéines structurales et enzymatiques. Cette paroi joue le rôle de soutien structurel mécanique, apportant une rigidité essentielle au port de la plante, ainsi qu'une protection contre les pathogènes.

L'organisation de la paroi varie selon l'âge et le type cellulaire. Chez les plantes terrestres, elle est constituée de la lamelle moyenne, de la paroi primaire puis de la paroi secondaire dans certains tissus spécialisés (figure 39A). Chaque couche a une structure et une composition chimique uniques qui varient selon l'espèce végétale, le tissu et le stade développemental de la plante. La lamelle moyenne est majoritairement composée de pectines, qui assurent la cohésion entre les cellules et leur permettent de s'associer en tissus. C'est un support sur lequel se déposeront successivement la paroi primaire puis la paroi secondaire. La paroi primaire est caractéristique des cellules végétales jeunes en croissance ou en division. C'est une structure fine principalement constituée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines) et également de glycoprotéines (figure 39B). Elle assure une rigidité et un soutien mécanique suffisants pour résister à la pression osmotique, tout en étant suffisamment élastique pour permettre la croissance et la division cellulaire. Enfin, la paroi secondaire est spécifique à certains types cellulaires et se forme chez les cellules qui ont terminé leur élongation et qui sont en cours de différenciation. Généralement lignifiée, cette matrice secondaire est plus épaisse et solide que la paroi primaire afin de rigidifier les cellules différenciées des tissus de soutien et de conduction. Elle est généralement composée de cellulose, d'hémicelluloses, de lignine et de glycoprotéines, mais leurs proportions relatives varient selon l'espèce végétale (figure 39C).

La paroi secondaire lignifiée constitue une adaptation évolutive à l'origine de l'apparition des plantes terrestres (ou plantes vasculaires) et des tissus conducteurs. Ses propriétés de rigidité ont facilité le transport de l'eau et des nutriments et ont permis aux végétaux de croître de manière verticale. De plus, elle présente un rôle économique majeur en tant que composante principale des matériaux (fibres, textile, papier, bois), source de nutrition pour le bétail ou encore comme source d'énergies renouvelables (bioéthanol). La paroi secondaire est composée de couches distinctes qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, les couches S1, S2 et parfois S3. Ces couches diffèrent par l'orientation des microfibrilles de cellulose qui les composent (figure 39A). La lignine est présente dans la majorité des parois secondaires, bien qu'il existe quelques exceptions. Par exemple, elle est peu présente dans les fibres périphloémiennes du lin et du chanvre, dites hypolignifiées¹³⁶.

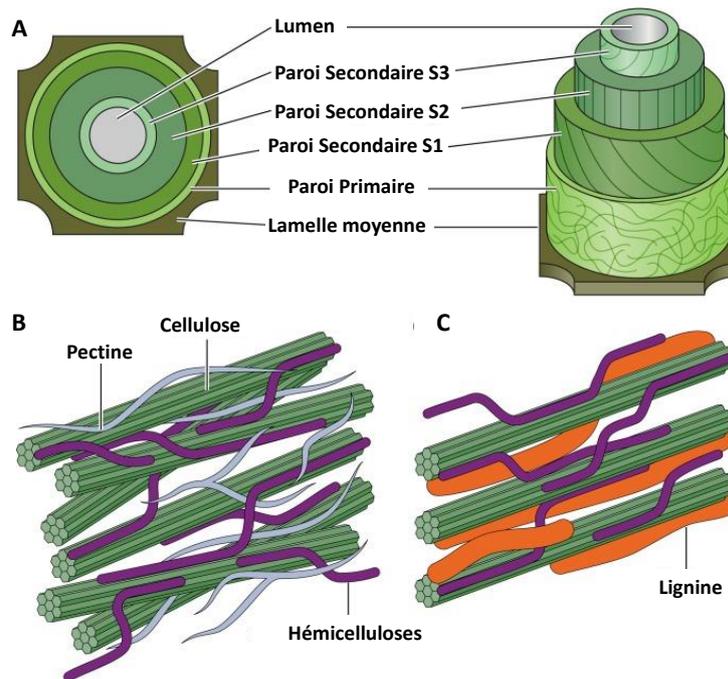


Figure 39 : structure de la paroi cellulaire végétale, représentation simplifiée. A) La paroi est constituée de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et de la paroi secondaire. La paroi secondaire est constituée de plusieurs couches distinctes (S1, S2 et parfois S3) qui diffèrent selon l'orientation des microfibrilles de cellulose qui les composent. B) La paroi primaire est principalement formée de polysaccharides (pectines, cellulose et hémicelluloses). C) La paroi secondaire est formée de cellulose, hémicelluloses et de lignine. Les illustrations ne sont pas à l'échelle. Adapté de [137].

Les plantes vasculaires dites « supérieures » peuvent être classées en deux groupes : les angiospermes, dont les organes reproducteurs sont portés par des fleurs, et les gymnospermes chez qui ils sont portés par des cônes (conifères, cycas, *etc.*). Au sein des angiospermes, les embryons des monocotylédones portent un seul cotylédon (riz, maïs, blé, *etc.*), alors que les dicotylédones en portent deux (lin, peuplier, tabac, arabette, *etc.*).

2. Composition de la paroi

a. Composés polysaccharidiques

La cellulose

La cellulose constitue le polysaccharide le plus abondant de la biomasse végétale (40 à 45 % de la masse sèche). A la fois présente dans les couches primaire et secondaire de la paroi, elle est à l'origine de sa rigidité. Ce polymère est constitué d'une répétition de D-glucoses reliés entre eux par des liaisons β -(1-4) pour former des chaînes linéaires (figure 40). Ces chaînes sont disposées en parallèle les unes des autres et sont maintenues ensemble par des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires, permettant la formation de structures linéaires cristallines appelées microfibrilles de cellulose. Les microfibrilles tapissent différemment les couches S1, S2 et S3 de la paroi végétale secondaire et sont à l'origine de l'élongation et de l'orientation correcte des cellules en croissance. La cellulose est

synthétisée par des celluloses synthases, une famille multigénique appartenant aux enzymes de type glycosyltransférase. Elles s'associent pour former un complexe enzymatique transmembranaire en forme de rosette, qui induit la polymérisation et la formation des chaînes de cellulose à l'extérieur de la membrane plasmique¹³⁸.

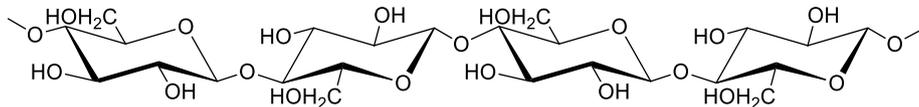


Figure 40 : structure chimique d'une chaîne linéaire de cellulose.
Addition de D-glucoses reliés entre eux par des liaisons β -(1-4) et inversés de 180° les uns par rapport aux autres.

Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent 20 à 30 % de la masse sèche de la paroi. Présentes dans les parois primaire et secondaire, elles renforcent la structure des microfibrilles de cellulose à travers des liaisons non covalentes. Ces polysaccharides possèdent un squelette composé de glucoses, xyloses ou mannoses liés en β -(1-4). Les carbones C1 et C4 de chaque unité sont en position équatoriale. Il existe quatre types d'hémicelluloses classés selon la nature de la chaîne polysaccharidique principale¹³⁹ (figure 41) :

- les xylanes possèdent un squelette de D-xyloses et constituent l'hémicellulose le plus courant ;
- les xyloglucanes sont principalement composés de D-glucoses ;
- les mannanes ont un squelette de D-mannoses alors que les glucomannanes comportent une alternance de D-glucoses et D-mannoses ;
- les β -glucanes sont des chaînes non ramifiées de D-glucoses liés en β -(1-4) ou β -(1-3). Contrairement aux autres hémicelluloses, ils ne sont pas présents chez toutes les plantes terrestres et sont notamment absents des dicotylédones.

Les squelettes des xylanes, xyloglucanes et mannanes sont ramifiés par des monomères ou de petits oligomères représentés au niveau de la figure 41. Par exemple, le fucose est présent sur certaines chaînes secondaires des xyloglucanes.

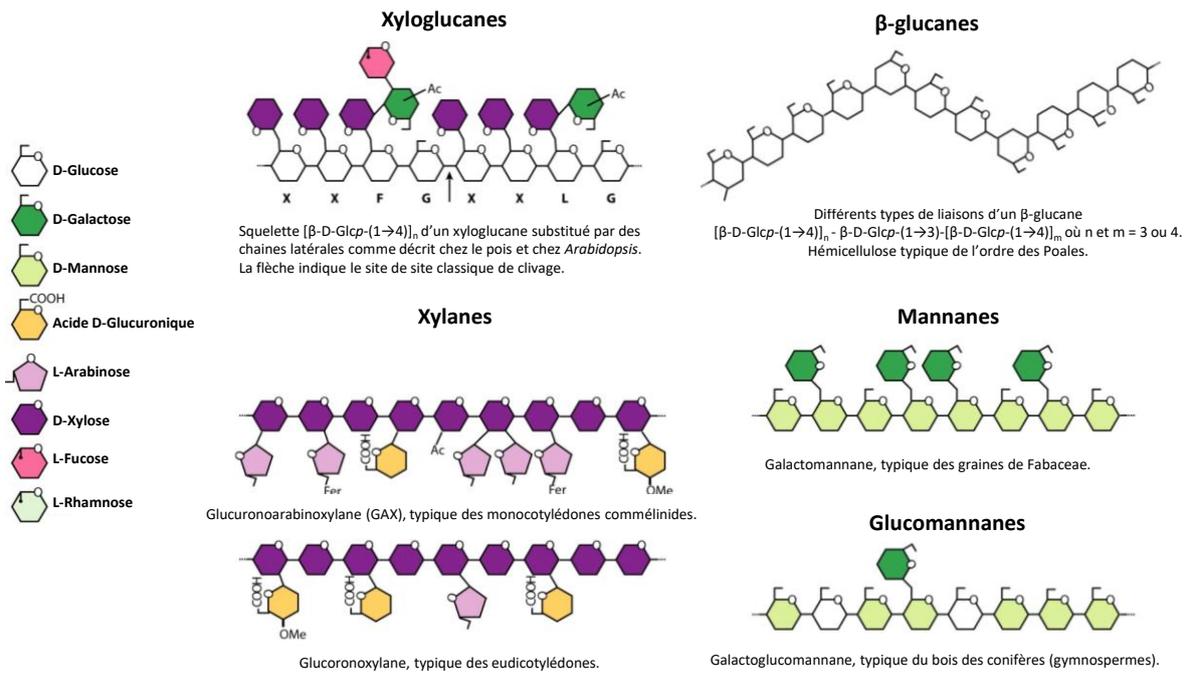


Figure 41 : représentation schématique des hémicelluloses. Le symbole "Fer" représente une estérification avec l'acide férulique caractéristique des xylanes chez les commélinidés. Adapté de [139].

Ces quatre types d'hémicelluloses sont présents dans les parois végétales de toutes les plantes terrestres, à l'exception des β -glucanes qui sont restreints à quelques classes. Leur structure ramifiée et leur quantité varient selon l'espèce végétale et aussi le type cellulaire. Les hémicelluloses sont synthétisées à partir de nucléotide-sucres par des glycosyltransférases localisées dans les membranes de l'appareil de Golgi¹³⁹.

Les pectines

Les pectines sont les polysaccharides non cellulosiques présentant la structure la plus complexe. Ils interviennent au niveau de l'adhésion, de la signalisation cellulaire et également dans les mécanismes de défense. Ces polymères sont prédominants au niveau de la lamelle moyenne et sont aussi retrouvés dans la paroi primaire des plantes terrestres. Les pectines sont principalement composées d'acides galacturoniques et peuvent être divisées en quatre classes selon leur composition : les homogalacturonanes (HG), les xylogalacturonanes (XGA) et les rhamnogalacturonanes I et II (RGI et RGII), (figure 42). Si les proportions entre les différents types de pectines varient, les HG suivi des RGI sont les plus abondants. Ils représentent respectivement 65 % et 30 % du polymère global.

L'HG est un polymère linéaire d'acides galacturoniques liés en α -(1-4) et pouvant être méthylés en C6 et acétylés en O2 ou O3. Le XGA est également un galacturonane, mais des résidus de xylose viennent se brancher en β -(1-3) des acides galacturoniques. Pour le RGI, son squelette est composé d'une alternance d'acides galacturoniques et de L-rhamnosés liés en α -(1-2), auxquels viennent se greffer un grand nombre de chaînes latérales. Certains résidus d'acides galacturoniques sont également

acétylés. Enfin, le RGII est un galacturonane branché à la structure très complexe. Il est substitué par quatre complexes glucidiques distincts qui comportent douze sucres différents dont le Kdo, le fucose ou l'acide acérique^{140,141}.

Comme les hémicelluloses, les pectines sont synthétisées à partir de nucléotide-sucres par des glycosyltransférases au niveau de l'appareil de Golgi, avant d'être transportées dans la paroi.

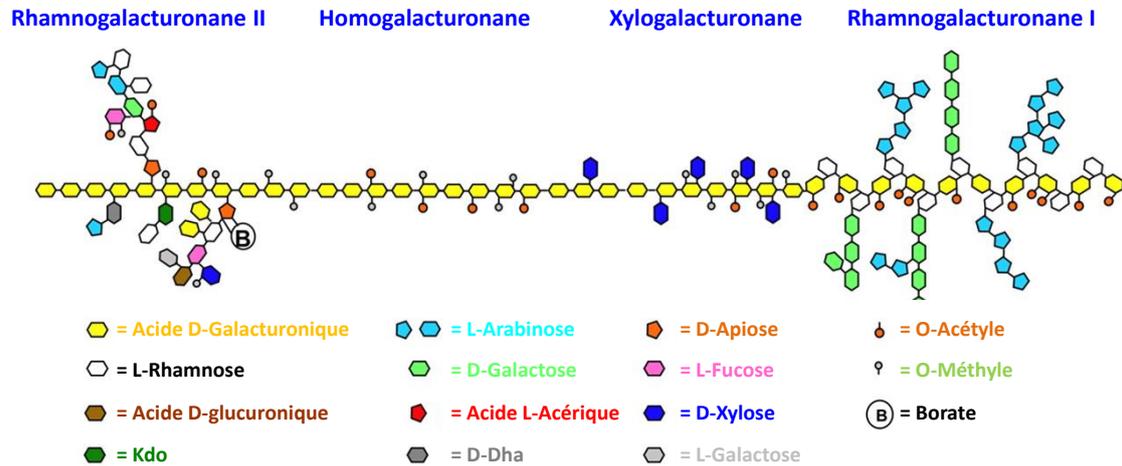


Figure 42 : représentation schématique des pectines. Adapté de [141].

b. Protéines structurales et enzymatiques

Les parois végétales contiennent également une faible proportion de protéines qui représentent entre 1 et 10 % de la masse sèche. Elles peuvent avoir un rôle structural direct ou posséder une activité enzymatique afin de remodeler la paroi si besoin. Elles contribuent également aux processus de signalisation cellulaire. Les protéines structurales peuvent être regroupées en trois classes selon l'acide aminé majoritaire : les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP), les protéines riches en glycine (GRP) et les protéines riches en proline (PRP)^{142,143}.

Les HRGPs

Les HRGPs sont les principales protéines structurales de la paroi. Elles peuvent être elles-mêmes classées en deux catégories selon leur *O*-glycosylation : les extensines et les arabinogalactane-protéines (AGP). Les extensines constituent les HRGPs majoritaires et sont les protéines structurales les plus retrouvées chez les dicotylédones. Ce sont des protéines glycosylées très riches en hydroxyprolines et sérines. Elles sont impliquées dans les mécanismes de croissance cellulaire, de défense de la plante (protection contre les attaques pathogènes, les blessures mécaniques, *etc.*) et participent également à la rigidité pariétale. Les AGPs sont des protéines fortement glycosylées : leur squelette protéique ne représente que 10 % de la molécule pour 90 % de glycanes. Ces protéines sont sécrétées en grandes quantités lors de blessures afin de former un gel servant de barrière physique contre les invasions

pathogènes. Toutefois, elles possèdent d'autres fonctions qui n'ont pas été entièrement élucidées (différenciation cellulaire, élasticité de la paroi, *etc.*).

Les GRPs

Les GRPs contiennent jusqu'à 70 % de glycines. Elles participent au développement des tissus vasculaires et sont impliquées dans les réponses au stress (cicatrisation, résistance au froid).

Les PRPs

Les PRPs sont des protéines riches en prolines qui sont peu ou pas glycosylées. Elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques (germination, différenciation tissulaire, *etc.*), et dans certains mécanismes de réponse au stress.

Hormis ces protéines structurales, la paroi végétale contient des protéines enzymatiques impliquées dans la modification des composants de la paroi. Elles interviennent par exemple dans leur modelage et leur recyclage (glycanases, glucuronidases, *etc.*) ou dans la formation de certains polymères (laccases, peroxydases, *etc.*).

c. Composés phénoliques

Pour finir, certaines parois végétales comportent des composés phénoliques et plus précisément des phénylpropanoïdes. Ces molécules sont constituées d'un phénol substitué en *para* par une chaîne propène. Selon la nomenclature chimique, elles appartiennent aux composés hydroxycinnamiques car elles dérivent de l'acide cinnamique (figure 43). Ces molécules phénoliques peuvent exister sous deux principales formes au sein de la paroi. Les formes mono- ou dimériques sont des acides *p*-hydroxycinnamiques ou acides phénoliques, alors que les formes polymériques forment la lignine.

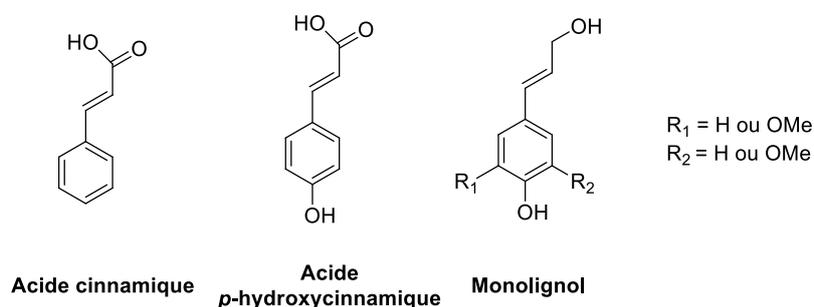


Figure 43 : structure chimique d'un acide cinnamique, d'un acide *p*-hydroxycinnamique et d'un monolignol constituant le monomère de base de la lignine.

3. Généralités sur la lignine

a. Rôle de la lignine et principaux types cellulaires lignifiés

Chez les plantes vasculaires, la paroi de certains types cellulaires est sujette au dépôt de substances d'incrustation à la fin de leur croissance. Ces cellules vont en particulier biosynthétiser de grandes quantités de lignine, un polymère polyphénolique insoluble formant une matrice hydrophobe (figure 44). Fortement associée aux polysaccharides pariétaux, la lignine augmente la résistance mécanique à la compression et participe ainsi au renforcement structural. Son dépôt a en effet pour conséquence de rigidifier la paroi. De plus, son caractère hydrophobe permet de l'imperméabiliser et constitue une protection contre les pathogènes.

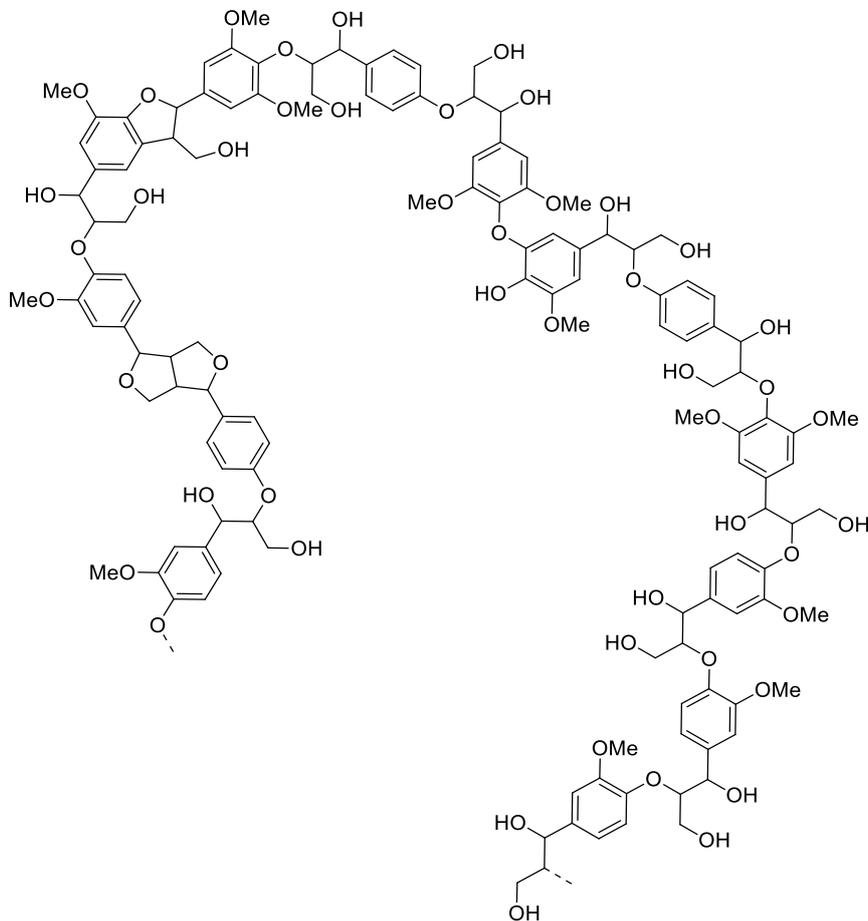


Figure 44 : structure chimique d'une partie de polymère de lignine.

La lignine est majoritairement retrouvée au niveau des tissus conducteurs formés par le xylème. Ce dernier joue le rôle de transport de la sève brute (eaux et sels minéraux) des racines vers les feuilles où a lieu la photosynthèse et de soutien mécanique de la tige. Une grande partie des types cellulaires du xylème comportent donc des parois secondaires épaisses et lignifiées : les vaisseaux assurent la

conduction de la sève ; les rayons contrôlent le transport latéral des nutriments entre les cellules ; les fibres trachéides assurent à la fois la conduction de la sève et le soutien mécanique (figure 45).

D'autres tissus que le xylème sont également lignifiés. C'est le cas des sclérenchymes, des tissus dédiés au soutien mécanique et retrouvés dans différentes parties de la plante. De même, les cadres de Caspary sont des structures retrouvées spécifiquement au niveau des racines (dans l'endoderme) et dont la lignification permet un passage sélectif des nutriments absorbés par les racines. Enfin, les téguments recouvrant certaines graines végétales peuvent aussi être lignifiés afin de protéger l'embryon¹⁴⁴.

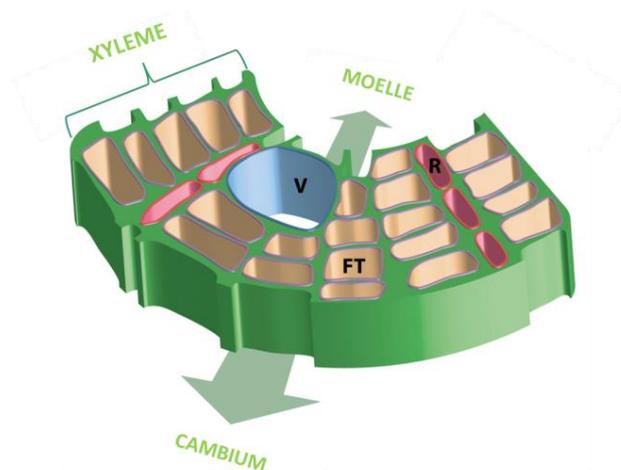


Figure 45 : représentation 3D de la structure du xylème secondaire dans une coupe transversale de tige de lin (angiosperme dicotylédone). Les vaisseaux (V), les fibres trachéides (FT) et les rayons parenchymateux (R) sont typiquement lignifiés. Adapté de Lion *et al.*¹⁴⁵.

Le dépôt de lignine a lieu lorsque l'expansion cellulaire est terminée et que la paroi secondaire commence son épaissement. Il s'effectue en deux phases successives et intervient après le dépôt des polysaccharides¹⁴⁶. La lignine se dépose d'abord au niveau des jonctions tricellulaires, de la lamelle moyenne et de la paroi primaire lors de la première phase. La deuxième phase concerne la lignification des couches S1, S2 et S3 si elle est présente, de la paroi secondaire. Si une couche S3 est effectivement présente, le dépôt de lignine dans cette couche constitue alors l'étape principale de la lignification. La formation de la paroi secondaire et sa lignification s'achèvent par la mort cellulaire programmée chez la plupart des cellules (trachéides et vaisseaux).

b. Composition et plasticité

La lignine est issue de la polymérisation oxydante de trois principaux monomères phénoliques, appelés alcools cinnamyls ou monolignols, et qui diffèrent par leur degré d'oxydation : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique ainsi que l'alcool sinapylique (figure 46). Ils sont synthétisés dans le cytosol par une voie enzymatique appelée voie des phénylpropanoïdes. Ils sont ensuite transportés jusqu'à la paroi par des mécanismes de transport encore peu connus, pour être polymérisés lors d'un couplage radicalaire initié par deux familles enzymatiques : les laccases et/ou les peroxydases. Une fois

polymérisés, les monolignols prennent respectivement le nom d'unités H (unités *p*-hydroxyphényles dérivées de l'alcool *p*-coumarylique), unités G (unités guaiacyles dérivées de l'alcool coniférylique) et unités S (unités syringyles dérivées de l'alcool sinapylique)^{147,148}.

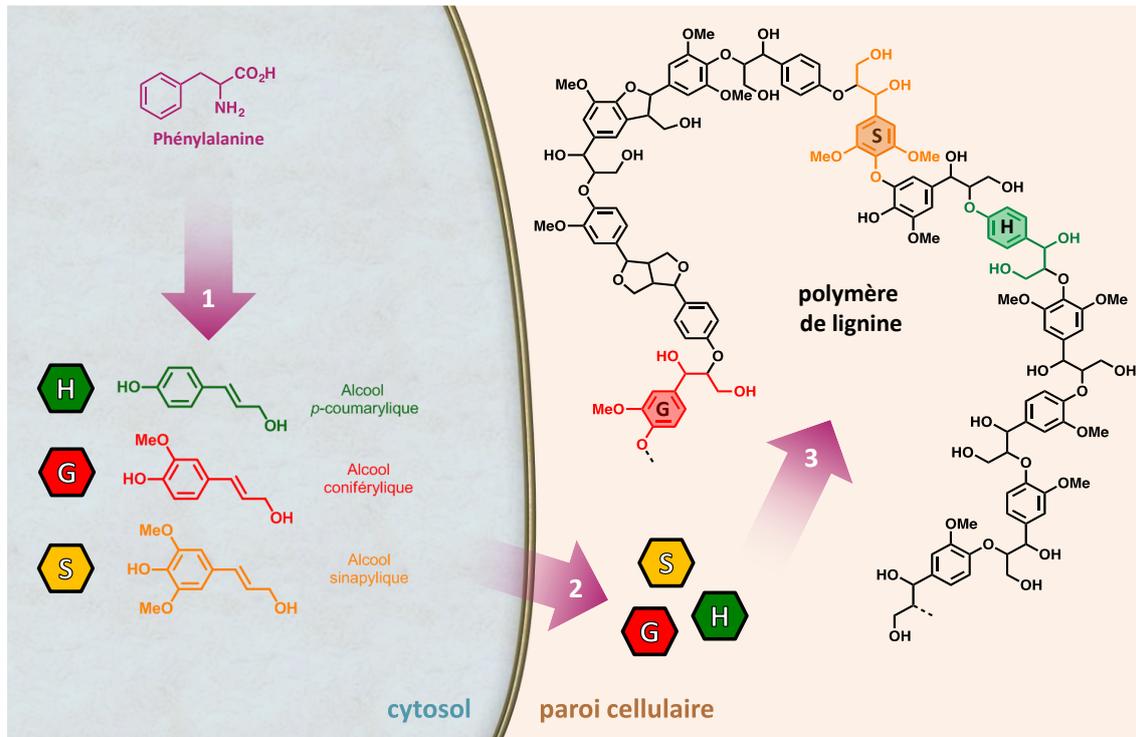


Figure 46 : représentation simplifiée des principales étapes de formation de la lignine.

1) Les monolignols (alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique) sont synthétisés dans le cytosol à partir de la phénylalanine. 2) Ils sont exportés dans la paroi végétale à travers la membrane plasmique. 3) Ils forment alors la lignine à travers une polymérisation chimique radicalaire initiée par des laccases et/ou peroxydases. Une fois incorporés dans le polymère, les monolignols forment respectivement les unités H, G et S. Adapté de Simon *et al.*¹⁴⁹.

La lignine est en réalité une macromolécule très complexe car sa composition en monolignols varie selon l'espèce végétale, l'organe, le tissu, le type cellulaire ou encore les conditions environnementales¹⁵⁰. Chez les gymnospermes (pin et autres conifères), elle est typiquement composée d'unités G (environ 90 %) avec une faible proportion d'unités H et zéro unités S. Chez les angiospermes dicotylédones, elle comporte des unités G et S en proportions relativement similaires avec très peu d'unités H. En revanche, elle incorpore davantage d'unités H chez les monocotylédones de type herbacé (figure 47). Par exemple, au niveau de certains tissus lignifiés, les proportions relatives des unités H/G/S sont de : 0-5/95-100/0 chez les gymnospermes, 0-8/25-50/46-75 chez les dicotylédones et 5-33/33-80/20-54 chez les herbacés¹⁵¹.

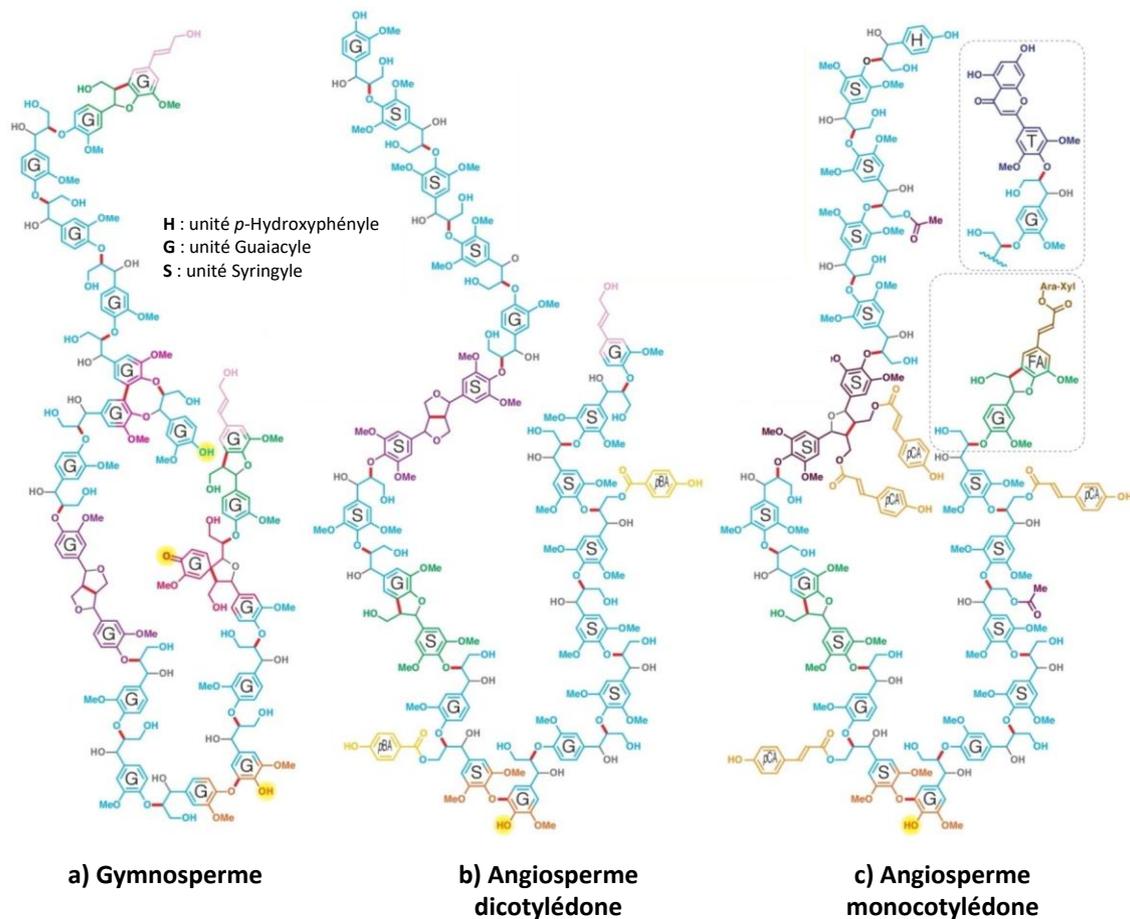


Figure 47 : structure chimique de différents modèles de lignine pouvant être retrouvés chez a) un gymnosperme, b) un angiosperme dicotylédone ou c) un angiosperme monocotylédone. La taille de chaque polymère (limitée à 20 monomères) ne permet pas de respecter les proportions exactes des différentes unités présentées. Les fonctions hydroxyles surlignées en jaune représentent des unités phénoliques libres. *pCA* = acide *p*-coumarique, *pBA* = acide *p*-hydroxybenzoïque, *FA* = acide férulique, *Ac* = acétate, *T* = tricène. Adapté de [152].

Outre ses trois principaux monomères constitutifs, la lignine peut également incorporer de faibles quantités d'acides phénoliques tels que l'acide *p*-coumarique. Cette plasticité de la lignine explique pourquoi il est également possible de parler des lignines au pluriel et sera évoquée plus en détail dans la partie II.4.c.

c. Enjeux économiques de la lignine

La lignine forme avec la cellulose la biomasse lignocellulosique, utilisée comme matière première pour de nombreux processus agro-industriels (production de biocarburants, fabrication de pâte à papier, matériaux composites, matériaux de construction, *etc.*). Dans ce contexte, la lignine a un fort impact économique, positif ou négatif. D'une part, c'est sa présence dans le bois qui contribue aux performances mécaniques élevées de ce matériau et engendre son exploitation dans l'industrie de construction (charpente, *etc.*). De plus, la lignine permet d'utiliser le bois comme combustible grâce à sa composition élevée en carbones.

D'autre part, elle piège les polysaccharides et rend la paroi récalcitrante à la dégradation par des processus enzymatiques, ce qui entrave la valorisation des glycanes lors de la saccharification¹⁵³. Le rendement de ce processus est d'ailleurs inversement proportionnel à la teneur en lignine. Les prétraitements des parois végétales (chimiques, thermiques ou enzymatiques) constituent une étape essentielle pour altérer la structure et/ou la composition de la lignine, favoriser l'accès des enzymes hydrolytiques à la paroi et augmenter le rendement de production de sucres simples^{154,155}. D'autres approches expérimentales pour augmenter ce rendement reposent sur l'ingénierie de la lignine. Elles consistent à produire des plantes transgéniques dans lesquelles le polyphénol est présent en plus faibles quantités ou avec une structure altérée, conduisant à une saccharification enzymatique plus efficace¹⁵⁶. Malgré ces avancées, la lignine reste toujours un facteur limitant dans la valorisation énergétique des polysaccharides, c'est pourquoi une meilleure compréhension de l'architecture physico-chimique des parois végétales est nécessaire.

Enfin, les chercheurs s'intéressent depuis quelques années à la valorisation directe de la lignine. Du fait de son caractère fortement aromatique, elle constitue une matière première potentielle pour la production de produits chimiques ou de biocarburants. En 2007, la loi américaine sur la sécurité et l'indépendance énergétique a estimé que la lignine générée en tant que sous-produit représentait 62 millions de tonnes par an lors de la production de biocarburant cellulosique et 50 millions de tonnes lors de la production de papier¹⁵⁷.

Les recherches sur la biosynthèse et le dépôt de la lignine représentent donc un enjeu majeur pour pouvoir à terme améliorer la qualité de la biomasse lignocellulosique. Malgré nos connaissances relativement avancées sur les enzymes responsables de la lignification, de nombreux points restent à éclaircir quant à la régulation spatio-temporelle du transport et de la polymérisation des monolignols.

4. Biosynthèse de la lignine

a. Biosynthèse des monolignols

La biosynthèse des monolignols peut être divisée en deux parties successives : la voie de biosynthèse du shikimate au niveau des plastes et la voie des phénylpropanoïdes au niveau du cytosol.

Voie du shikimate

La voie de biosynthèse du shikimate est à l'origine de la formation de certains acides aminés aromatiques. Elle comprend une série de réactions enzymatiques permettant de convertir le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate en phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Elle est présente chez les bactéries, les champignons et les plantes, mais pas chez les animaux qui se procurent ces acides aminés via leur nourriture. Chez les végétaux, les trois acides aminés formés sont à l'origine de divers métabolites secondaires aromatiques tels que les flavonoïdes, les phytoalexines et surtout la

lignine (figure 48). Le flux de carbone de la voie du shikimate est d'ailleurs coordonné avec la synthèse de ce polymère en réponse à de nombreux *stimuli* (lumière, attaques pathogènes, blessures, *etc.*)¹⁵⁸.

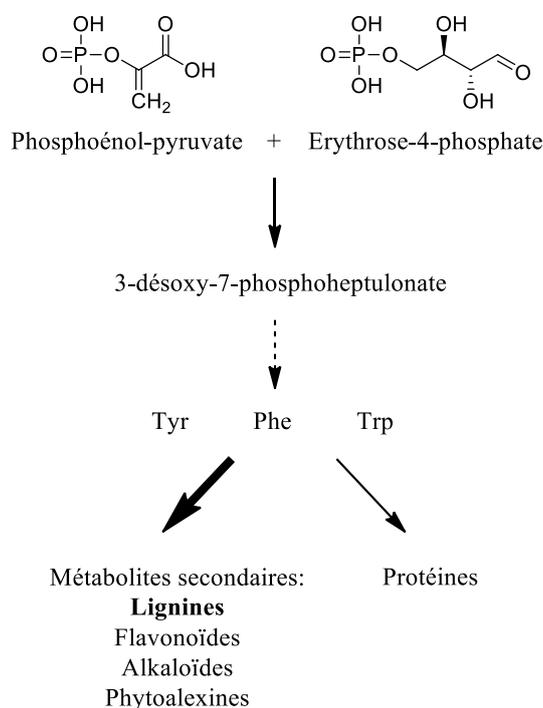


Figure 48 : voie du shikimate. Formation de trois acides aminés aromatiques qui sont des intermédiaires de la biosynthèse de métabolites secondaires. Adapté de [158].

Voie des phénylpropanoïdes

La voie des phénylpropanoïdes est la deuxième voie métabolique impliquée dans la biosynthèse des monolignols. A partir de la désamination de la phénylalanine, elle forme l'ensemble des acides hydroxycinnamiques et de leurs dérivés, les esters de Coenzyme A. La première partie de cette voie métabolique n'est pas spécifique aux monolignols, les dérivés esters jouant un rôle central dans la formation de divers métabolites secondaires impliqués dans la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques et abiotiques ou encore la signalisation (figure 49A). Le métabolisme des phénylpropanoïdes comprend ensuite une deuxième partie spécifique à la biosynthèse des monolignols, où les esters de Coenzyme A sont réduits en alcools (figure 49B).

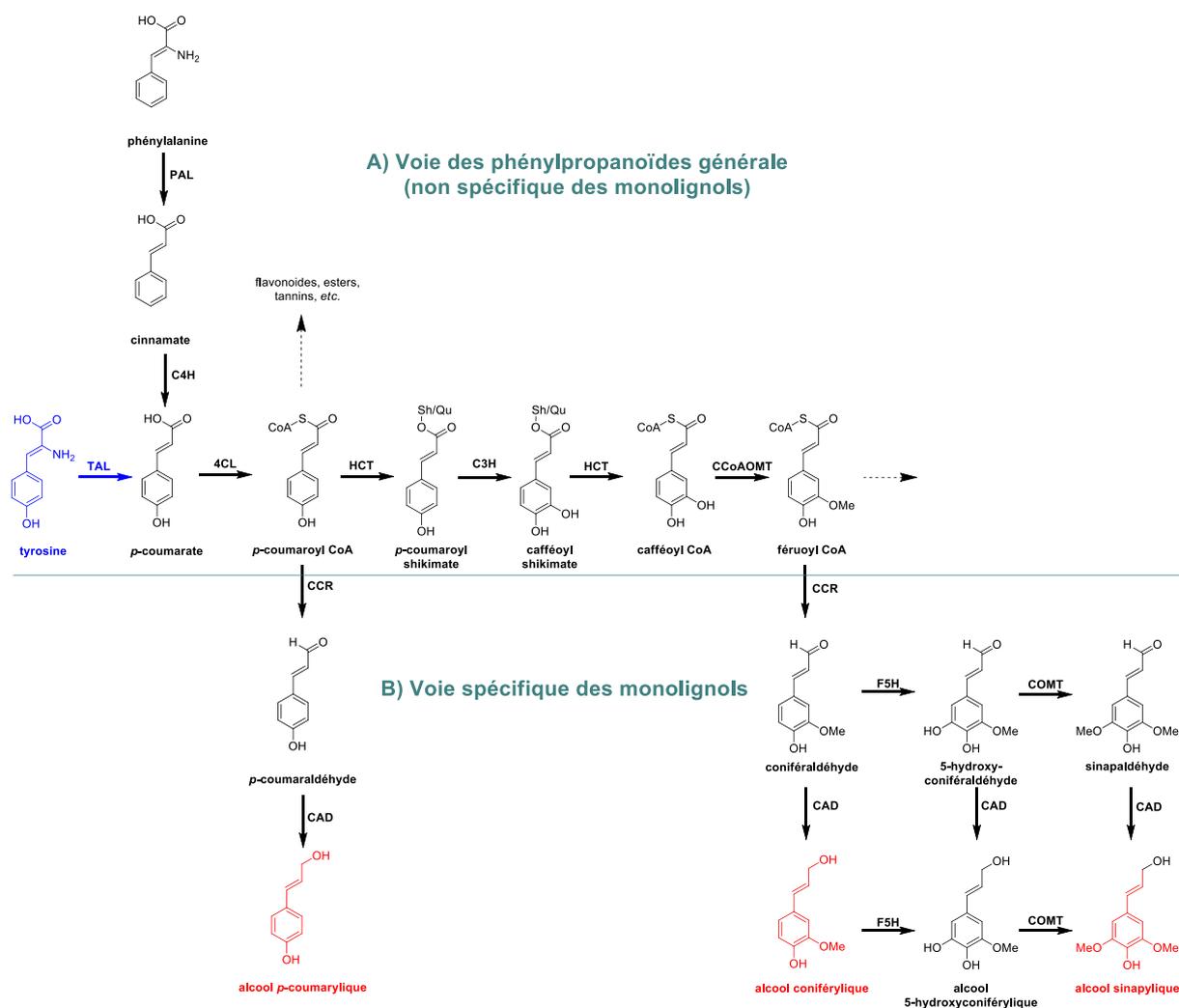


Figure 49 : représentation simplifiée de la voie des phénylpropanoïdes permettant la synthèse des trois principaux monolignols (en rouge). La partie A n'est pas spécifique aux monolignols et permet la synthèse de nombreux métabolites secondaires. La désamination de la tyrosine par la TAL est spécifique aux monocotylédones. Adapté de [144,159].

La lignine comprend trois principaux monolignols qui diffèrent par leur degré de méthylation : les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique. Ces monolignols sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes à partir de la phénylalanine. Les gènes et enzymes impliqués dans cette voie ont été relativement bien identifiés et caractérisés au fil des années à l'aide d'essais enzymatiques *in vitro*, de précurseurs radiomarqués ou encore d'analyses de la lignine chez des plantes transgéniques pour des gènes de biosynthèse des monolignols^{147,148}. D'après de nombreuses études, des modulations génétiques de ces enzymes peuvent d'ailleurs altérer de manière significative la quantité et/ou la composition du polymère.

Les principales étapes de la voie des phénylpropanoïdes sont représentées au niveau de la figure 49 et permettent d'aboutir aux trois monolignols. La première étape est la désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) pour donner le cinnamate. Son carbone C4 est ensuite hydroxylé par une cinnamate 4-hydroxylase (C4H) pour donner le *p*-coumarate. La 4-coumarate-CoA-ligase (4CL) greffe alors un groupement Coenzyme A au niveau de l'acide

carboxylique pour donner le *p*-coumaroyl CoA. Ce dernier peut suivre deux voies distinctes : il peut soit être converti en alcool *p*-coumarylique (futures unités H), soit subir une nouvelle série d'hydroxylation, de méthylation et de réduction pour donner les futures unités G puis S.

Alcool *p*-coumarylique

Dans le premier cas, le *p*-coumaroyl CoA est réduit en aldéhyde par une *p*-coumaroyl CoA réductase (CCR), puis en alcool par une cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD). Il forme alors l'alcool *p*-coumarylique.

Alcool coniférylique

Pour l'unité G, une hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinatate hydroxycinnamoyltransférase (HCT) remplace le groupement CoA du *p*-coumaroyl CoA par un groupement shikimate afin d'obtenir le *p*-coumaroyl shikimate. Celui-ci est hydroxylé en position C3 par la *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3H) pour donner le cafféoyl shikimate. Une HCT remplace ensuite le groupement shikimate par le groupement CoA. L'hydroxyle en position C3 du cafféoyl CoA est alors estérifié en méthoxy par une cafféoyl-CoA *O*-méthyltransférase (CCoAOMT) pour produire le féruoyl CoA. Comme pour le *p*-coumaroyl CoA, il est finalement réduit en aldéhyde par une CCR puis en alcool par une CAD afin de former l'alcool coniférylique final.

Alcool sinapylique

La synthèse des futures unités S se poursuit par l'hydroxylation en position C5 de la coniféraldéhyde à l'aide d'une férulate-5-hydroxylase (F5H). La 5-hydroxyconiféraldéhyde obtenue est estérifiée par une cafféate *O*-méthyltransférase (COMT) et donne le sinapaldéhyde. Cet aldéhyde est finalement réduit par la CAD et donne l'alcool sinapylique.

Il convient de préciser que la voie des phénylpropanoïdes représentée ici est une voie simplifiée pouvant connaître différentes variations selon les espèces. Par exemple, chez les monocotylédones, la tyrosine peut également servir de précurseur des monolignols : sa désamination par la tyrosine ammonia lyase (TAL) permet d'obtenir directement l'acide *p*-coumarique, alors que cela nécessite deux étapes à partir de la phénylalanine¹⁶⁰.

b. Régulation transcriptionnelle

La voie de biosynthèse des monolignols est régulée par une cascade de facteurs de transcription (FaTr) plus ou moins spécifiques. En effet, les gènes nécessaires à la formation des différents polymères constituant la paroi végétale secondaire (lignine, cellulose et hémicelluloses) sont régulés de manière pyramidale selon le réseau transcriptionnel NAC-MYB¹⁶¹. Les premiers niveaux de régulation sont

communs à la biosynthèse générale de la paroi secondaire, alors que les derniers niveaux sont spécifiques de la lignine (figure 50).

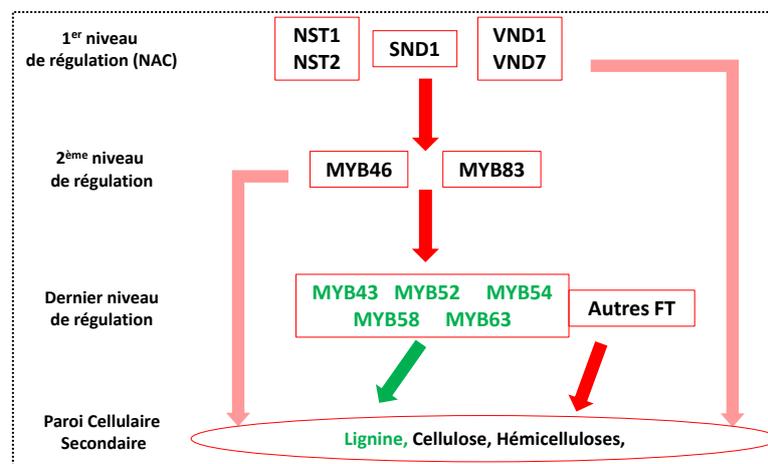


Figure 50 : représentation simplifiée de la régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de la lignine. D'après Nakano *et al.*¹⁶¹.

Le premier niveau de régulation de la formation générale de la paroi secondaire correspond à une sous-famille de FaTr à domaine NAC. Découverts en 2005, ils sont nommés VND1 et VND7¹⁶² (*vascular-related NAC-domain*), NST1-2 (*NAC secondary wall thickening promoting factor*)¹⁶³ et SND1 (*secondary wall-associated NAC domain protein*)¹⁶⁴. Leur surexpression active les gènes de biosynthèse de la cellulose, de la lignine et des hémicelluloses, alors que leur sous-expression inhibe la formation de la paroi.

Les FaTr à domaine NAC peuvent activer d'autres FaTr appartenant au deuxième niveau de régulation : les MYB. Ces derniers permettent un contrôle plus fin de la biosynthèse de la lignine et des autres polymères. Parmi eux, les FaTr MYB46 et MYB83 activent l'expression de la quasi-totalité des gènes de biosynthèse de la lignine chez *Arabidopsis thaliana* (*pal1, c4h, 4cl1, c3h1, hct, etc.*)^{165,166}, mais également chez le pin ou l'eucalyptus.

MYB46 et MYB83 gouvernent à leur tour l'expression d'une quarantaine de gènes correspondant au dernier niveau de régulation de la paroi secondaire. Certains de ces régulateurs sont spécifiques de la biosynthèse de la lignine et peuvent soit activer, soit inhiber les gènes de biosynthèse des monolignols (MYB43, 52, 54, 58 et 63 par exemple).

La régulation de la biosynthèse de la lignine est principalement gouvernée par les FaTr NAC et MYB selon un réseau hiérarchique lui-même sous le contrôle d'hormones végétales. Ce réseau s'inscrit dans un schéma complexe impliquant les autres polymères composant la paroi secondaire. Il convient néanmoins de préciser qu'il s'agit ici d'une représentation simplifiée, de nombreux autres FaTr pouvant intervenir à différents niveaux. De plus, les enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes peuvent également être régulées par des mécanismes post-traductionnels tels que l'ubiquitination ou la phosphorylation. Enfin, les données obtenues sont souvent issues d'études sur l'espèce *Arabidopsis*

thaliana. Or, il est nécessaire de poursuivre les recherches sur d'autres plantes ayant un cycle de vie plus long et donc un génome plus complexe.

c. Plasticité de la lignine, une composition plus large

Hormis les trois monolignols classiques formant ses unités H, G et S, le polymère de lignine peut incorporer une grande variété d'autres composés phénoliques dans la paroi. En effet, toutes les lignines comportent de faibles quantités d'unités non traditionnelles, provenant soit d'une biosynthèse des monolignols incomplète (incorporation de précurseurs aldéhydiques par exemple), soit de réactions secondaires. A partir des années 1995, les avancées en ingénierie génétique ont permis de perturber la voie enzymatique de biosynthèse des monolignols et d'augmenter les proportions en monomères non classiques. Leur structure a ainsi pu être caractérisée plus facilement chez des plantes mutantes à l'aide de la RMN en 2 dimensions (2D).

Parmi les composés non conventionnels pouvant être polymérisés dans la paroi se trouvent les monolignols estérifiés par des acides phénoliques. Chez les plantes herbacées, des acides *p*-coumariques peuvent en effet être ajoutés aux hydroxyles des unités S^{167,168}. De même, les monolignols G et S peuvent être couplés aux férulates provenant des hémicelluloses selon un mécanisme radicalaire, entraînant la formation de complexes lignine-férulate-hémicellulose¹⁶⁹. De même, les monolignols peuvent être acétylés (figure 51A).

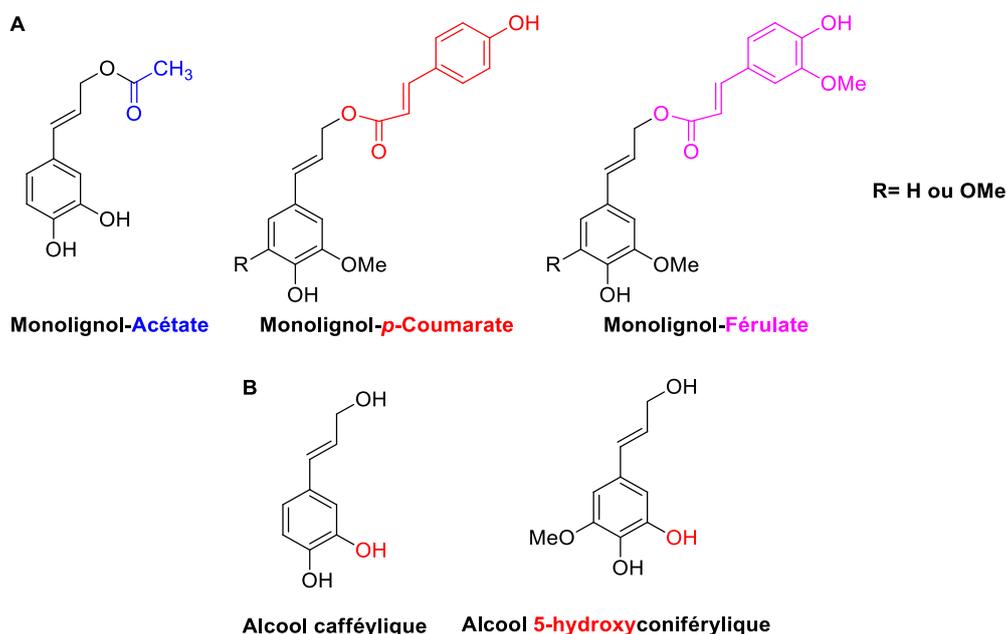


Figure 51 : structure chimique de monolignols non conventionnels. A) Monolignols acétylés ou conjugués à des acides phénoliques via une liaison ester. B) Intermédiaires de la voie de biosynthèse des monolignols.

Des intermédiaires de la voie de biosynthèse des monolignols peuvent aussi être polymérisés, tels que l'alcool 5-hydroxyconiférylique ou l'alcool cafféylique (figure 51B).

L'alcool 5-hydroxyconiférylique a été identifié dans la lignine de mutants de peupliers déficients en enzyme COMT¹⁷⁰. Il est également retrouvé de manière quasiment exclusive au niveau de la lignine naturelle de certaines graines de la famille des cactus¹⁷¹. Ce monomère peut former des structures de type benzodioxane avec les unités G, par couplage radicalaire de type β -O-4 entre la position β du monomère et la position 4-O de l'unité G à l'extrémité du polymère (figure 52). L'intermédiaire méthide-quinone obtenu subit ensuite un réarrangement aromatique pour former le benzodioxane. L'alcool cafféylique présente des similarités avec l'alcool 5-hydroxyconiférylique. S'il peut être incorporé par ingénierie génétique chez les gymnospermes, il est aussi présent de manière quasiment exclusive au niveau du tégument des graines de certaines espèces de la famille des orchidées et des cactus^{171,172}. Il forme alors un homopolymère de lignine uniquement composé d'unités catéchyles ou unités C. La lignine C contient elle aussi un grand nombre de structures benzodioxanes, formées cette fois-ci à partir de liaisons β -O-4 entre l'alcool cafféylique monomérique et le polymère C. Ces liaisons éthers constituent un avantage d'un point de vue économique car elles sont clivables et permettent de dépolymériser facilement le polymère en monomères simples, contrairement à la lignine traditionnelle qui contient également des liaisons carbone-carbone¹⁷³.

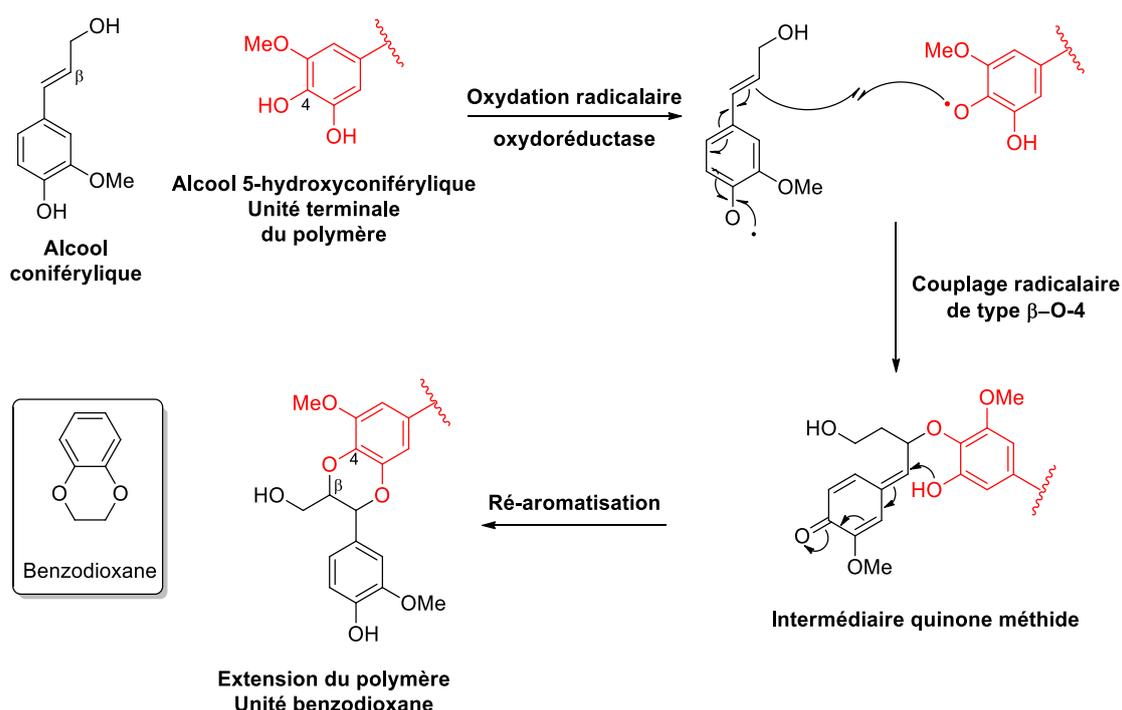


Figure 52 : production de structures de type benzodioxane au sein de la lignine, via l'incorporation de l'alcool 5-hydroxyconiférylique au niveau d'une lignine de type guaiacyle. Adapté de [170].

Enfin, des études récentes ont montré que la lignine peut également incorporer des monomères phénoliques atypiques car ne provenant pas de la voie de biosynthèse des monolignols (figure 53). Parmi eux, la tricine est un métabolite de la classe des flavonoïdes retrouvé dans la lignine des herbacés monocotylédones (le blé, le maïs ou le bambou). Elle se situe toujours à l'extrémité du polymère de

lignine et pourrait servir de site de nucléation de la lignification¹⁷⁴. De même, l'équipe de Ralph a récemment mis en évidence la présence de certains composés de la classe des hydroxystilbènes dans la lignine des fruits de palme¹⁷⁵

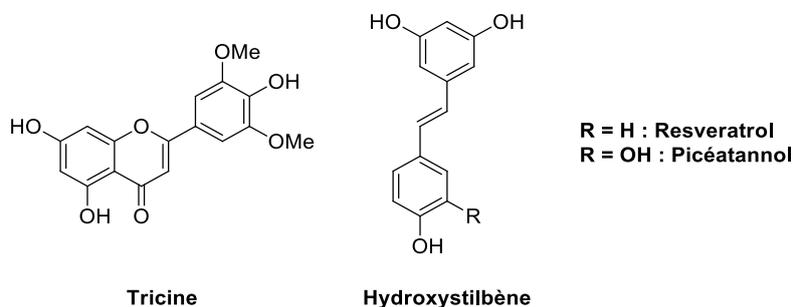


Figure 53 : structure chimique d'autres composés phénoliques atypiques retrouvés dans la lignine et ne provenant pas de la voie classique de biosynthèse des monolignols.

L'ensemble de ces découvertes récemment détaillées par W. Boerjan met en évidence la plasticité du polymère de lignine¹⁵². Elle constitue un atout majeur dans un contexte industriel afin de modifier les propriétés physico-chimiques du polymère ou de faciliter sa dégradation.

d. Transport des monolignols

Une fois synthétisés au niveau du cytosol, les monolignols doivent être exportés vers la paroi pour être polymérisés en lignine. Bien que les mécanismes de transport impliqués restent à ce jour peu connus, deux règles sont admises. D'une part, la plasticité de la lignine évoquée précédemment prouve que ces mécanismes doivent être suffisamment flexibles pour pouvoir exporter une grande variété de monomères en plus des trois principaux monolignols. D'autre part, ces modes de transport doivent également être rapides car l'accumulation cytosolique des monolignols libres venant d'être synthétisés est minimale¹⁷⁶. En outre, il s'avère que chez certaines espèces, la glycosylation des monolignols est étroitement liée à leur transport.

Trois hypothèses principales se confrontent pour expliquer l'export des monolignols : i) une diffusion passive à travers la membrane, ii) une exportation à l'aide de vésicules golgiennes ou iii) un transport actif via des transporteurs (figure 54).

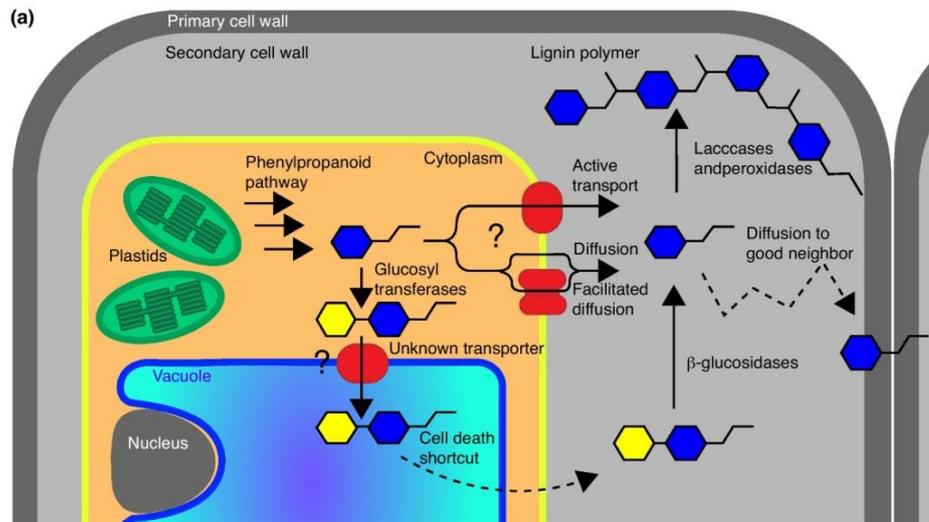


Figure 54 : représentation schématique des mécanismes de transport potentiels des monolignols. Les monolignols sont synthésisés dans le cytoplasme par la voie des phénylpropanoïdes. Différentes routes permettent ensuite leur export à l'extérieur de la cellule : un transport actif via des transporteurs ABC (*active transport*), une diffusion passive à travers la membrane (*diffusion*) ou une diffusion facilitée par des canaux membranaires (*facilitated diffusion*). Chez les gymnospermes, des quantités importantes de monolignols glycosylés peuvent s'accumuler au sein de vacuoles grâce à un transporteur, potentiellement de type ABC, qui va faciliter leur absorption. Lors de leur mort cellulaire programmée, certaines cellules vont libérer leur contenu cellulaire (*cell death shortcut*). Les monolignols glycosylés stockés dans la vacuole sont alors libérés dans la paroi où des β -glucosidases clivent la molécule de glucose. Les monolignols libres peuvent alors soit être polymérisés dans la paroi de la cellule qui les a biosynthésisés, soit diffuser vers les parois adjacentes. Extrait de [176].

i. Diffusion passive

La première hypothèse mise en avant suggère un transport des monolignols par diffusion passive à travers la bicouche lipidique membranaire, avant qu'ils ne soient piégés dans la matrice pariétale et polymérisés dans la lignine. La membrane cellulaire serait en effet perméable aux composés hydrophobes que sont les monomères phénoliques, ce qui expliquerait également l'importante diversité monomérique de la lignine. Cette théorie a été modélisée par Boija *et al.* en 2007 à l'aide d'expériences chromatographiques avec des membranes lipidiques artificielles immobilisées sur colonne. Les auteurs ont montré que des analogues de monolignols peuvent diffuser de manière passive à travers des liposomes ou des disques lipidiques mimant la composition de la membrane végétale^{177,178}. Des études supplémentaires et notamment des expériences *in vivo* restent cependant nécessaires pour confirmer cette théorie de transport passif. De plus, les cellules végétales synthésisent une grande variété de composés au noyau aromatique hydrophobe qui restent tout de même localisés dans le cytosol. Une sélection doit donc forcément se faire entre les précurseurs de la lignine et les dérivés phénoliques ayant une fonction différente.

ii. Transport par des vésicules Golgiennes

L'idée de sécrétion des monolignols dans la paroi par des vésicules golgiennes provient d'études assez anciennes qui ont par la suite été remises en cause. Dès 1968, des tissus végétaux ont été incubés avec la phénylalanine marquée au tritium comme précurseur de la lignine. Le marquage radioactif

observé par autoradiographie dans le xylème en cours de lignification a été attribué à des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que les précurseurs de la lignine pouvaient être exportés vers la paroi végétale via l'exocytose de vésicules golgiennes^{179,180}. Ces études comportent cependant deux faiblesses. Après l'incorporation des précurseurs radiomarqués, les tissus ont été fixés de manière chimique. Or, la pénétration lente des agents chimiques peut altérer les tissus et conduire à des biais d'interprétation. De plus, la phénylalanine n'est pas un précurseur spécifique aux monolignols puisqu'elle est impliquée dans la synthèse des protéines. En 2008, Kaneda *et al.* ont appliqué le même protocole de marquage radioactif, mais en remplaçant la fixation chimique par la technique de cryofixation qui est une méthode plus fiable¹⁸¹. Grâce à l'utilisation de divers inhibiteurs de la biosynthèse des phénylpropanoïdes ou des protéines, ils ont constaté que le marquage métabolique visible dans les vésicules golgiennes provient en réalité de protéines et non pas de monolignols.

iii. Transport Actif

Si la lignine est dotée d'une composition très flexible en incorporant différents précurseurs monomériques, ces derniers se déposent tout de même de manière différentielle selon le tissu, le type cellulaire ou encore les différentes couches de la paroi cellulaire. Cette incorporation sélective des monolignols suggère une lignification très régulée et pourrait s'expliquer en partie par des mécanismes de transport actif. A partir de 2010, des études ont effectivement établi un transport actif des monolignols par des transporteurs protéiques de type *ATP-binding cassette* (transporteurs ABC). Tout d'abord, l'équipe de Liu a réalisé des analyses biochimiques *in vitro* sur des vésicules de membrane plasmique internalisée issue de feuilles d'*Arabidopsis* et de racines de peupliers. Les résultats obtenus révèlent un transport des alcools coniférylique et sinapylique dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) (figure 55). En absence d'ATP ou en présence d'inhibiteurs de l'activité ATPase, le transport est fortement réduit, ce qui suggère l'implication de transporteurs ABC¹⁸². D'ailleurs, certains membres de cette famille protéique avaient été détectés auparavant dans des tissus lignifiés par des études de génomique^{183,184}.

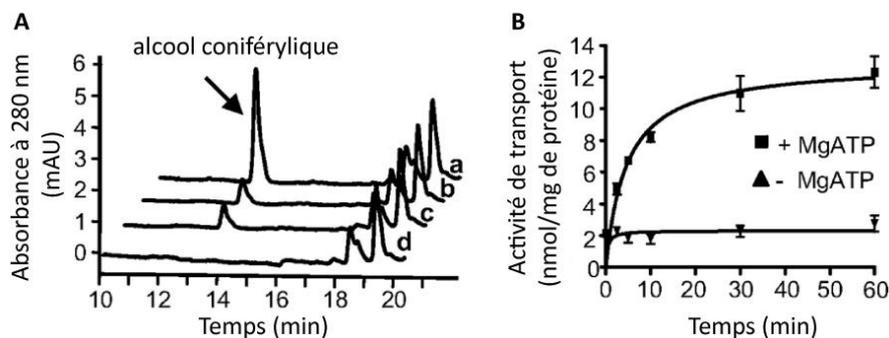


Figure 55 : étude du transport des monolignols au sein de vésicules de membrane plasmique internalisée. A) Détection par HPLC de l'alcool coniférylique absorbé au sein de la vésicule : a) en présence d'ATP, b) en absence d'ATP, c) en présence de sodium vanadate (inhibiteur de l'activité ATPase) ou d) en absence d'alcool coniférylique. B) Transport de l'alcool coniférylique par les vésicules en fonction du temps, en présence ou en absence d'ATP. Adapté de [182].

Deux ans plus tard, Alejandro *et al.* ont identifié la protéine AtABCG29 comme transporteur spécifique à l'alcool *p*-coumarylique¹⁸⁵. Après avoir localisé le transporteur dans des tissus typiquement lignifiés, les auteurs ont montré que des levures exprimant la protéine d'intérêt ne peuvent excréter que l'alcool *p*-coumarylique parmi les trois monolignols. De plus, l'analyse structurale de la lignine chez des lignées mutantes d'*Arabidopsis* déficientes pour le gène *abc29* a révélé une diminution des unités H mais également des unités G et S. Cet effet plus global sur les trois unités de la lignine suggère une régulation complexe de la biosynthèse et/ou du transport des monolignols. Cela signifie également que les différents précurseurs de la lignine seraient exportés dans la paroi soit par d'autres transporteurs, soit par d'autres mécanismes de transport. Récemment, une équipe a analysé l'expression des gènes de lignification chez des cultures cellulaires en cours de différenciation. La co-expression de certains gènes *abcg* (*abcg11*, *abcg22*, *abcg29*, and *abcg36*) avec MYB58, le FaTr régulant la voie de biosynthèse des monolignols, suggère que ces derniers sont également impliqués dans le transport des monomères¹⁸⁶.

Les différentes hypothèses présentées précédemment montrent la complexité des mécanismes de transport des monolignols. Ces mécanismes pourraient par ailleurs différer selon l'espèce végétale, le tissu ou encore le stade de développement. De plus, chez les gymnospermes, le transport des monolignols est également étroitement lié à leur glycosylation.

iv. Glycosylation des monolignols

Les monolignols venant d'être synthétisés sont des composés toxiques pour la cellule à cause de leur noyau phénolique. Ils ne peuvent donc pas être stockés dans le cytosol sous forme libre en attendant les étapes de transport et de polymérisation dans la paroi. De nombreuses études suggèrent l'existence d'un système de stockage et de transport des monolignols sous forme glycosylée chez les gymnospermes. En effet, la glycosylation est un moyen de les rendre moins réactifs et de diminuer leur cytotoxicité en les stockant dans des compartiments spécialisés. Par ailleurs, leur solubilité accrue faciliterait leur transport vers la paroi cellulaire par l'intermédiaire de vésicules golgiennes ou de transporteurs. La glycosylation se fait par des UDP-glycosyltransférases (UGT) cytoplasmiques, transférant une molécule de glucose à partir de l'UDP-glucose afin de former des monolignols 4-*O*- β -D-glucosides (figure 56). Les alcools coniférylique et sinapylique glycosylés prennent alors le nom de coniférine et de syringine. Lorsque ces monolignols-glucosides sont transportés dans la paroi pour être polymérisés en lignine, des β -glucosidases pariétales permettent de cliver la molécule de glucose.

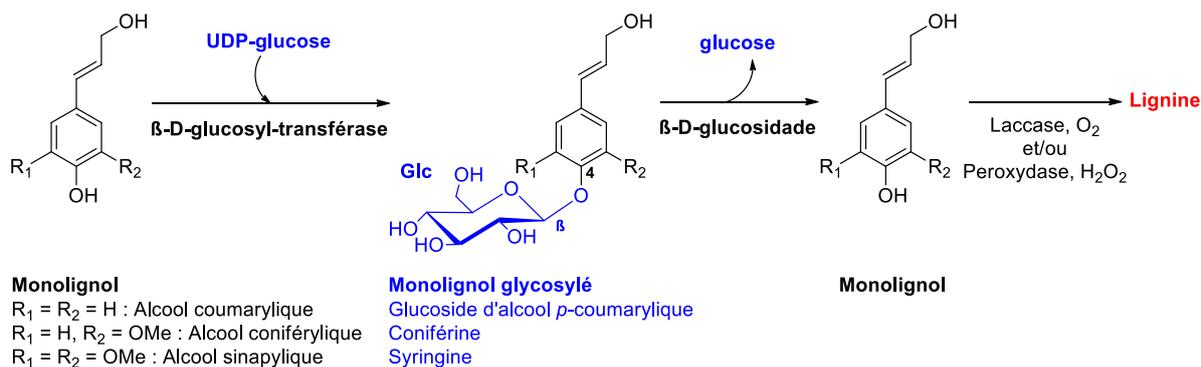


Figure 56 : mécanisme de glycosylation des monolignols chez les gymnospermes.

Le rôle des monolignols glycosylés dans le stockage et le transport de leur forme libre fait l'objet d'un débat depuis plus d'une cinquantaine d'années. Des analogues marquées au tritium des futures unités H, G et S glycosylées ont été incorporés dans la lignine de tissus vasculaires chez le pin ou le magnolia, prouvant que ces formes glycosylées peuvent servir de précurseurs pour la lignification¹⁴⁶. De plus, des études chez les gymnospermes ont montré que la coniférine peut s'accumuler dans des vacuoles cytosoliques comme forme de stockage de l'alcool coniférylique^{187,188}. Récemment, l'équipe de Fukushima a confirmé cette localisation vacuolaire en étudiant la distribution de la coniférine par combinaison de la spectrométrie de masse à la microscopie électronique à balayage¹⁸⁹.

Tout comme pour les monolignols aglycones, les mécanismes de transport de leurs formes glycosylées restent obscurs. En 2010, Liu *et al.* ont démontré que les transporteurs de type ABC sont impliqués à la fois dans le transport des monolignols glycosylés et non glycosylés. Ils ont également présenté une incorporation préférentielle de ces derniers selon le type de vésicule¹⁸². En effet, les vésicules formées à partir de la membrane plasmique absorbent exclusivement les formes aglycones, tandis que celles formées à partir du tonoplaste (membrane de la vacuole) sont spécifiques des formes glycosylées (coniférine et syringine) (figure 57). Des antiports pourraient également être impliqués dans le transport des monomères glycosylées. Ces résultats consolident l'hypothèse suivante : les monolignols libres seraient soit directement transportés et polymérisés au sein de la paroi végétale après avoir traversé la membrane plasmique, soit stockés dans des vacuoles cytosoliques sous forme glycosylée.

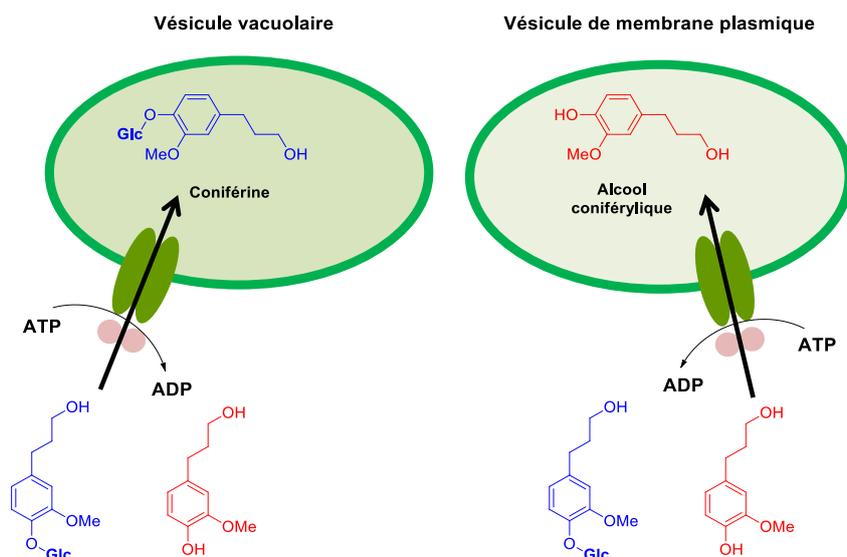


Figure 57 : absorption sélective et ATP-dépendante des monolignols libres ou glycosylés par des vésicules. La vacuole incorpore sélectivement la coniférine alors que la vésicule formée à partir de membrane plasmique absorbe sélectivement l'alcool coniférylique libre. L'absorption se fait via des transporteurs ATP-dépendants de type ABC. Adapté de Liu *et al.*¹⁹⁰.

Certaines enzymes impliquées dans la glycosylation des monolignols ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* par une approche de génomique fonctionnelle (*i.e* à l'aide de plantes transgéniques). Concernant les glycosyltransférases, les UGT72E1, E2 et E3 sont principalement responsables de la glycosylation de l'alcool sinapylique et coniférylique chez *Arabidopsis thaliana*¹⁹¹. Une étude récente a également montré l'implication de l'enzyme l'UGT72B1¹⁹². Concernant les β -glucosidases, les enzymes BGLU45 et BGLU46 sont responsables de l'hydrolyse de la coniférine et de la syringine¹⁹³.

A l'heure actuelle, les mécanismes d'export des monolignols dans la paroi n'ont pas été totalement élucidés. La diffusion passive et les transporteurs semblent être privilégiés mais ne sont pas exclusifs. Il semble en effet que différents mécanismes puissent prédominer selon le tissu, l'espèce végétale et le stade de développement. Concernant la glycosylation des monolignols chez les angiospermes, elle ne semble pas impliquée dans leur transport et serait juste une forme de stockage. Une description exhaustive de ces mécanismes de transport a récemment été publiée par L. Samuels¹⁷⁶.

e. Polymérisation des monolignols

Une fois les monolignols transportés dans la paroi cellulaire végétale, leur polymérisation constitue la dernière étape de biosynthèse de la lignine. Il s'agit d'un couplage combinatoire très flexible qui permet à la plante d'incorporer les trois principaux monolignols mais aussi les autres monomères moins traditionnels. Cette composition en monomères associée à la variabilité des liaisons inter-unités permet d'assembler différents polymères de lignine aux structures chimiques variables selon les types cellulaires.

i. Formation de la lignine par chimie combinatoire

Une fois exportés dans la paroi végétale, les monolignols sont directement polymérisés en lignine grâce à un processus radicalaire faisant intervenir deux étapes. Tout d'abord, les monomères sont activés en radicaux phénoxyles par des phénoloxydases (laccases et/ou peroxydases). Pour chaque monolignol oxydé, le radical libre formé peut se délocaliser dans un système π -conjugué étendu faisant intervenir le cycle aromatique, l'alcène exocyclique et la fonction phénol (figure 58A). Ces formes activées sont capables de diffuser dans la paroi pour atteindre le polymère de lignine. Les monomères activés sont ensuite assemblés par un mécanisme purement chimique appelé « *end-wise polymerization* » pour polymérisation « bout à bout ». Selon ce processus, chaque monolignol radicalaire va réagir avec les radicaux formés aux extrémités phénoliques libres du polymère de lignine croissant (figure 58B).

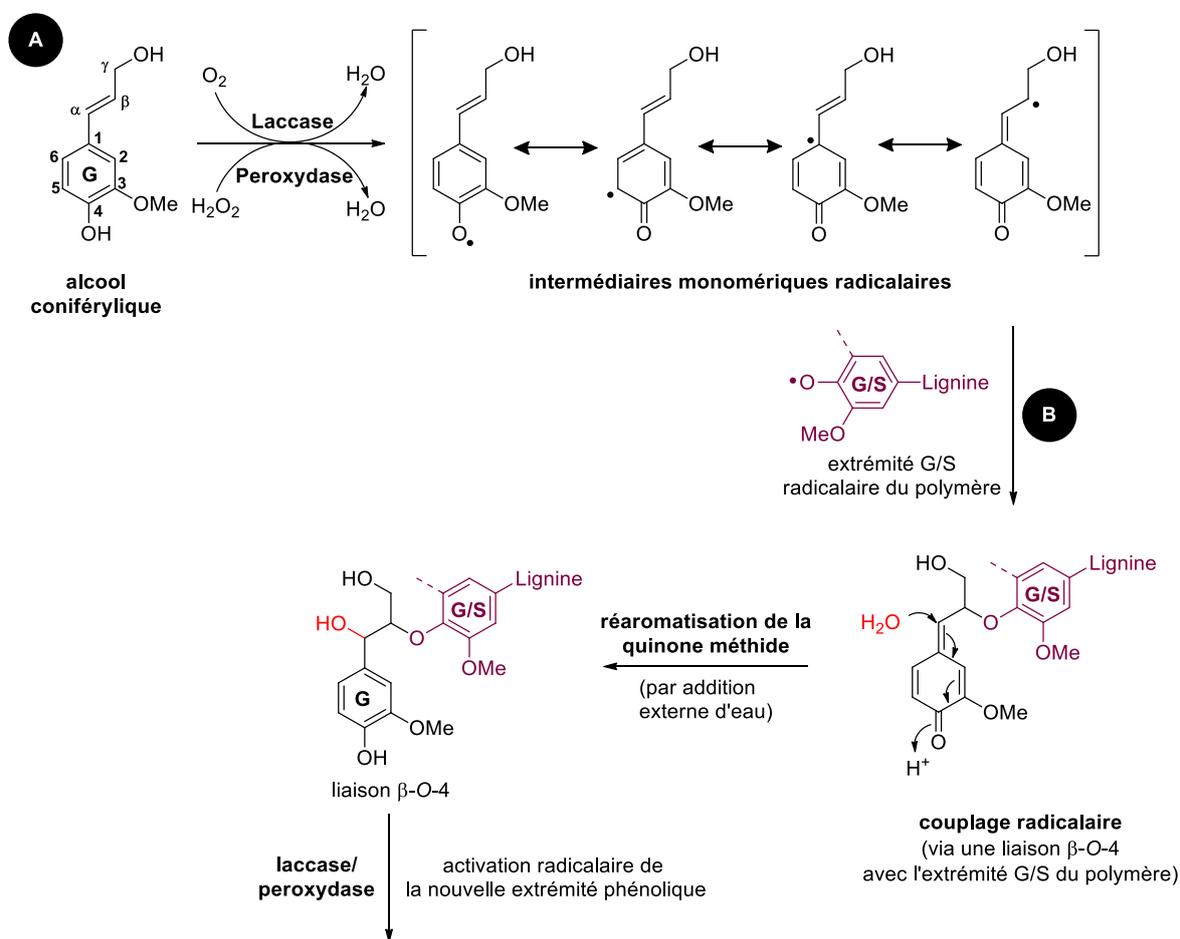


Figure 58 : polymérisation oxydative de l'alcool coniférylique.

Le monolignol est oxydé par une phénoloxydase pour former un radical phénoxyle dont l'électron libre peut se délocaliser dans un système conjugué. L'extension de la chaîne polymérique selon la polymérisation « bout à bout » est illustrée par un couplage de type β -O-4 entre l'alcool coniférylique et une unité G ou S à l'extrémité du polymère. Adapté de [194].

Selon leur réactivité et leur encombrement stérique, les monomères radicalaires peuvent former différentes liaisons au sein du polymère. Ces dernières sont regroupées en deux groupes : les liaisons C-C dites « condensées » (5-5', β -5', β - β' et β -1') et les liaisons C-O-C dites « non condensées » (β -O-4' ou 4-O-5')¹⁴⁶ (figure 59). Les liaisons condensées sont beaucoup plus stables et plus difficiles à dépolymériser à des fins industrielles que celles non condensées. Bien que leurs proportions varient selon les espèces, les liaisons β -O-4' restent les plus fréquentes chez les angiospermes. Elles représentent par exemple 79 % des liaisons totales de la lignine chez la tige d'*Arabidopsis thaliana*¹⁴⁴.

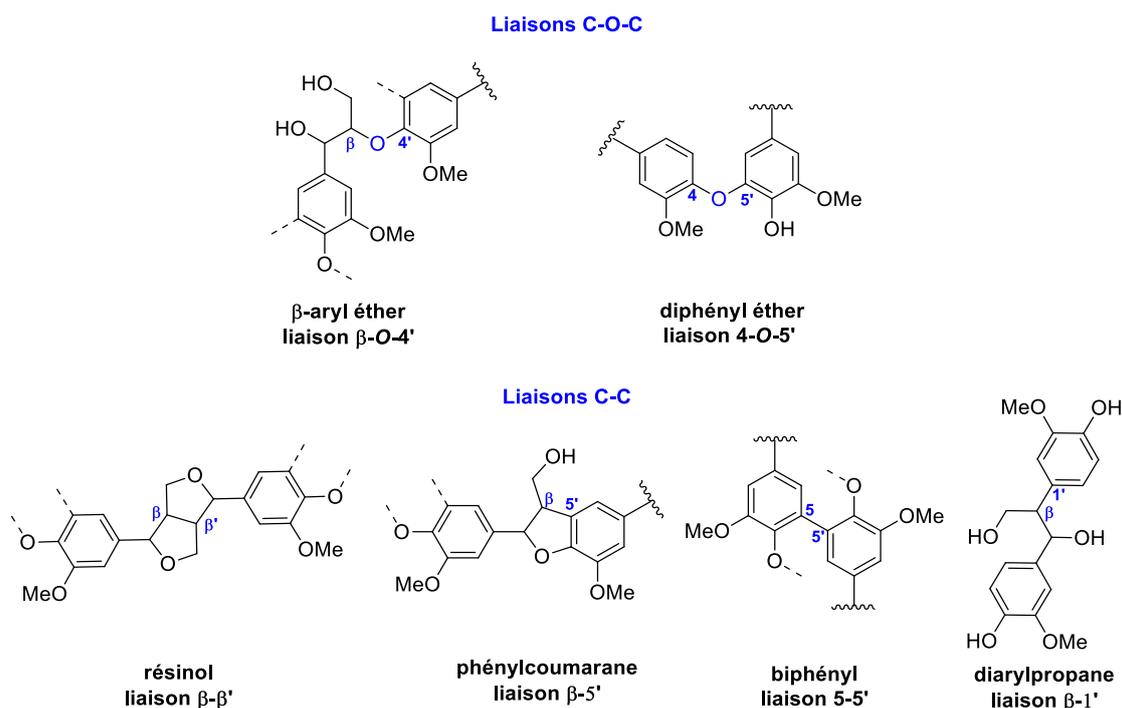


Figure 59 : principales liaisons inter-unités retrouvées dans le polymère de lignine. D'après Ralph *et al.*¹⁹⁵.

ii. Modèle des DHP

La structure chimique de la lignine polymérisée peut être analysée de deux manières : soit à partir de lignine naturelle extraite de tissus végétaux, soit à partir de lignine synthétique. La polymérisation *in vitro* de lignine conduit en effet à la formation de polymères synthétiques appelés DHP pour *deshydrogenation polymers*. Ils sont produits en ajoutant à une solution de monolignols une peroxydase (le plus souvent la peroxydase de Raifort) ainsi que son cosubstrat, le peroxyde d'hydrogène¹⁹⁶. La lignine synthétique obtenue est généralement analysée par RMN 2D afin d'obtenir des informations sur sa structure chimique, c'est-à-dire sur sa composition monomérique et sur les différentes liaisons reliant les monomères. L'utilisation de DHP a permis de démontrer que la longueur du polymère et les proportions de ses différentes liaisons inter-monomériques dépendent principalement de la disponibilité et de la réactivité des monomères impliqués^{197,198}. D'autres facteurs physico-chimiques peuvent influencer la structure des DHP formés : le taux d'approvisionnement en

monolignols, le pH, la force ionique, la concentration des enzymes oxydatives ainsi que leur capacité à polymériser différents substrats.

L'analyse de la lignine synthétique permet d'obtenir des informations clés sur sa structure chimique. Cependant, cela reste un modèle artificiel qui ne prend pas en compte tous les paramètres impliqués dans la lignification naturelle et ne reflète pas forcément la réalité biologique. Par exemple, le processus de polymérisation « bout à bout » entre le monomère activé et l'oligomère est réprimé en solution, car les monolignols dans le milieu sont trop abondants pour polymériser de manière graduelle. Par conséquent, les DHP présentent toujours un nombre plus faible de liaisons β -O-4' que leurs analogues naturels. De plus, la lignine naturelle interagit normalement avec la matrice polysaccharidique car la lignification *in planta* intervient après la déposition des polysaccharides dans les parois en cours de différenciation. Les polysaccharides formeraient un échafaudage sur lequel vient se polymériser la lignine et fourniraient des environnements spécifiques propices au couplage radicalaire¹⁹⁹. Si la synthèse de DHP se fait généralement en milieu aqueux, plusieurs études ont tout de même montré que la distribution de leurs liaisons inter-monomériques peut être affectée par la présence de polysaccharides. La pectine^{200,201} et les xylanes hémicellulosiques²⁰² constitueraient notamment des matrices pour le dépôt des DHP, ce qui valide la présence d'interactions lignine-polysaccharide *in planta*.

iii. Rôle des protéines dirigeantes

A l'heure actuelle, les données accumulées sur la structure de la lignine suggèrent une simple polymérisation par chimie combinatoire sous contrôle physico-chimique. En d'autres termes, après la génération de radicaux par des phényloxydases, aucune protéine n'influencerait directement la stéréochimie de la lignification. Ce premier modèle repose donc sur une polymérisation aléatoire de la lignine.

Néanmoins, un modèle alternatif suggère la présence de protéines dirigeantes favorisant la formation de liaisons spécifiques entre les monomères. En 1997, l'équipe de Lewis a identifié une protéine capable de former préférentiellement des dimères de monolignol (appelés lignanes). Isolée à partir de l'espèce *Forsythia suspensa*, cette protéine ne possède pas d'activité catalytique et contrôle la formation stéréosélective de structures de type pinorésinol (liaisons β - β') à partir d'alcools coniféryliques²⁰³. Cela suggère que certaines protéines dirigeantes sont capables de capturer des monolignols radicalaires et de les orienter dans la bonne configuration, afin de contrôler le type de liaison formée. Les dimères obtenus pourraient alors participer à l'élongation du polymère de manière aléatoire ou à nouveau dirigée. Cette hypothèse nécessite néanmoins davantage de preuves biochimiques et génétiques, même si d'autres protéines dirigeantes impliquées dans une conformation correcte de la lignine ont pu être identifiées²⁰⁴.

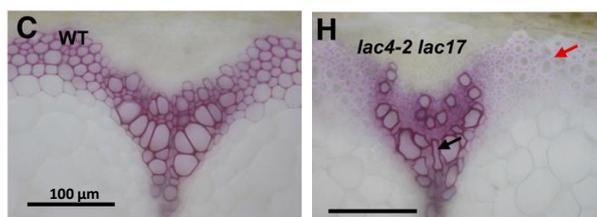
iv. Rôles respectifs des laccases et peroxydases

Le couplage radicalaire des monolignols dans la paroi végétale peut être initié par l'action de deux types d'enzymes oxydatives : des laccases ou des peroxydases. Les laccases sont des métalloenzymes à cuivre qui utilisent le dioxygène comme cosubstrat, alors que les peroxydases sont des métalloenzymes à hème utilisant le peroxyde d'hydrogène. Il a longtemps été difficile d'établir la fonction de ces enzymes *in planta* à cause de leurs activités catalytiques proches et de leur famille multigénique. Quelques études récentes ont cependant permis de mieux comprendre leur rôle spécifique dans la lignification.

Rôle des laccases

Les laccases constituent une famille multigénique constituée de 17 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Leur rôle dans la lignification a tout d'abord été suggéré par des études *in vitro*, démontrant qu'elles sont capables d'oxyder les trois principaux monolignols et de former des DHP en présence d'O₂²⁰⁵. Ces protéines sont également localisées dans des tissus lignifiés et sont coexprimées avec les gènes de biosynthèse des monolignols^{206,207}. Il faut cependant attendre les années 2010 pour que le rôle clé des laccases dans la lignification soit démontré *in vivo*, grâce à la caractérisation de mutants *knock-out* (KO) chez *Arabidopsis thaliana*. En 2011, Berthet *et al.* ont généré des simples mutants déficients en LAC4 et LAC17 ainsi que le double mutant correspondant, puis ils ont analysé leur profil de lignification par des méthodes chimiques et histologiques. Il en résulte que les simples mutants ne possèdent pas de différences très marquées, ce qui laisse supposer une certaine redondance des laccases. Au contraire, le double mutant *lac4 lac17* possède 40 % de lignine en moins et présente des fibres interfasciculaires hypolignifiées ainsi que des vaisseaux collapsés au niveau de la tige²⁰⁸ (figure 60, haut). L'année suivante, l'équipe de Dixon a généré un triple mutant *lac4 lac11 lac17*, entraînant de sévères défauts de croissance dus à une absence de lignification quasiment totale au niveau des tissus vasculaires de la plante²⁰⁹ (figure 60, bas). L'ensemble de ces données suggère que la combinaison des trois laccases LAC4, 11 et 17 est essentielle à la formation de la lignine au sein des tissus de xylème chez *Arabidopsis thaliana*.

Double mutant *lac4 lac17* (Berthet *et al.*, 2011)



Triple mutant *lac4 lac11 lac17* (Zhao *et al.*, 2013)

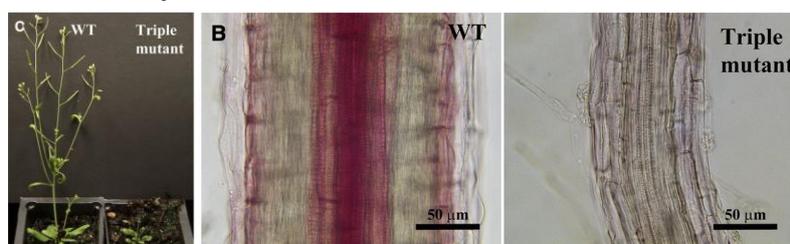


Figure 60 : implication des laccases dans la lignification chez *Arabidopsis thaliana*. Coloration de la lignine au phloroglucinol. Haut : le double mutant *lac4 lac17* présente des fibres hypolignifiées et des vaisseaux collabés au niveau du xylème de la tige. Bas : le triple mutant *lac4 lac11 lac17* présente une lignification quasiment inexistante au niveau des racines. WT = *wild type* (lignée sauvage). Adapté de [208] et [209].

Rôle des peroxydases

Les peroxydases sont également impliquées dans la lignification. Appartenant principalement aux peroxydases de classe III, elles forment une grande famille multigénique composée de 73 gènes chez *Arabidopsis thaliana*. Tout comme les laccases, ces enzymes sont capables de catalyser la formation de DHP *in vitro* en utilisant du peroxyde d'hydrogène comme substrat²¹⁰ et sont exprimées dans les tissus lignifiés. Leur rôle actif durant la lignification a aussi été montré par des approches de génétique inverse chez différentes espèces. Par exemple, la sous-régulation de la peroxydase PRX60 chez le tabac entraîne une diminution de la quantité de lignine de presque 50 % par rapport à la plante sauvage²¹¹. En 2013, Herrero *et al.* ont prouvé leur rôle dans la lignification *in planta* en générant des mutants KO pour PRX72. Ces derniers présentent un retard de croissance lié à un dépôt de lignine plus faible au sein des tissus vasculaires²¹². La même année, l'équipe de Geldner a démontré que la lignification du cadre de Caspary est spécifiquement contrôlée par la peroxydase PRX64²¹³.

Implications respectives

Malgré ces preuves biologiques de l'implication des peroxydases et des laccases dans la lignification, leurs rôles respectifs au niveau spatio-temporel restent flous. Par exemple, l'activité des peroxydases endogènes est insuffisante pour compenser le phénotype d'hypolignification sévère au niveau des tissus vasculaires du mutant *lac4 lac11 lac17* d'*Arabidopsis*²⁰⁹, ce qui signifie que ces enzymes ne sont pas redondantes. D'autre part, le mutant *prx72* présente également une réduction notable de la lignine de 35 %, alors que les laccases sont fonctionnelles²¹². Une hypothèse suggère une intervention spatio-temporelle différente des deux phénoloxydases : elles pourraient intervenir soit à un

stade de développement différent, soit dans des tissus différents. La lignification au niveau de l'endoderme des cadres de Caspary dépendant spécifiquement de la peroxydase PRX64 renforce cette théorie²¹³.

Récemment, l'équipe de Samuels a étudié la localisation et la mobilité des enzymes PRX64 et LAC4 au niveau de tige d'*Arabidopsis*²¹⁴. Pour cela, chaque enzyme a été fusionnée à une protéine fluorescente de type mCHERRY par recombinaison génétique, puis exprimée dans des plantes transgéniques. Des coupes transversales de tiges matures ont ensuite été observées par microscopie confocale. D'après les résultats obtenus, la peroxydase PRX64 n'est localisée que dans les fibres, au niveau des coins cellulaires et de la lamelle moyenne (figure 61A). *A contrario*, la laccase LAC4 est présente dans les couches secondaires des parois de toutes les cellules lignifiées (fibres et vaisseaux), (figure 61D). Les deux enzymes présentent donc des localisations différentes à la fois au niveau des types cellulaires et des couches pariétales. Leur mobilité a également été étudiée par FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*). Il en résulte que les LAC4 sont fortement ancrées à la paroi secondaire, ce qui pourrait participer au contrôle spatial de la lignification.

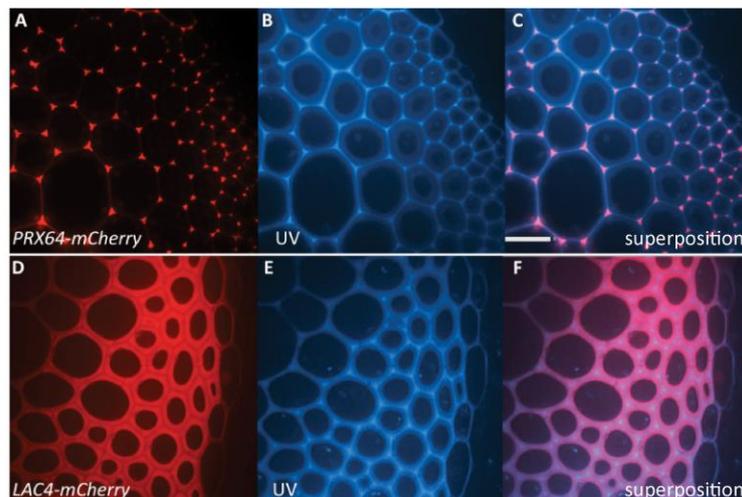


Figure 61 : localisation des phénoloxydases PRX64 et LAC4 fusionnées à des protéines fluorescentes mCHERRY. Sections transversales de tiges d'*Arabidopsis thaliana*, observation des fibres interfasciculaires. La localisation différente des enzymes PRX64 et LAC4 suggère une séparation spatiale de leurs activités respectives lors de la lignification des fibres. Echelle = 40 μm . D'après Chou *et al.*²¹⁴.

Si la polymérisation des monolignols se fait par un simple processus de chimie combinatoire, la manière dont les monolignols sont assemblés et activés pour former la lignine se fait sous contrôle biologique étroit¹⁹⁴. Les avancées récentes suggèrent que des laccases et peroxydases spécifiques sont sécrétées de manière à favoriser le contrôle de la lignification selon le type cellulaire et/ou le domaine pariétal. Cependant, les connaissances sur la régulation spatio-temporelle de la polymérisation des monolignols restent encore très vagues. De plus, on ne sait pas jusqu'à quel niveau la spécificité des enzymes pour leur substrat va influencer l'assemblage des monolignols. La manière dont l'environnement pariétal influence la lignification dans les différents types cellulaires reste également à déterminer (influence de la matrice polysaccharidique, des protéines génératrice d' H_2O_2 , *etc.*).

5. Conclusion

La lignine constitue un polymère végétal important, présent en grandes quantités dans les parois secondaires de certains tissus végétaux. Elle est retrouvée dans différents types cellulaires aux propriétés diverses, ce qui peut expliquer la complexité du mécanisme de lignification. De manière générale, ses rôles biologiques comprennent le transport de l'eau, le support mécanique et la résistance au stress. La lignification implique des enzymes d'oxydation et des substrats monomériques spécifiques selon le type cellulaire. Cependant, des études ont également montré la grande plasticité de la lignine et la complexité des processus de lignification.

Le concept de lignification autonome ou coopérative illustre un autre aspect de cette complexité : les monolignols incorporés dans la lignine de la paroi d'une cellule peuvent être biosynthétisés par cette même cellule lors d'un processus dit de « lignification autonome », comme c'est le cas pour les fibres interfasciculaires. Mais pour d'autres types cellulaires, ce sont les cellules voisines qui vont leur fournir les monolignols nécessaires à leur lignification lors d'un processus dit de « lignification coopérative ». Ce modèle dit des « *good neighbours* » explique comment certaines cellules très lignifiées, comme par exemple les vaisseaux, continuent à l'être après leur mort cellulaire²¹⁵.

Si la biosynthèse des monolignols dans le cytosol est relativement bien connue, de nombreuses questions persistent quant à la régulation spatio-temporelle de leur polymérisation. Parmi elles : comment les monolignols sont-ils exportés de la cellule ? Et quels sont les rôles respectifs des laccases et peroxydases dans les différents types cellulaires et tissus ?

III. Caractérisation et imagerie de la lignine

1. Quantification et caractérisation de la lignine

Il existe actuellement de nombreuses techniques pour déterminer la teneur en lignine et pour élucider sa structure chimique (nature et proportions des monolignols, fréquence des liaisons inter-unités) à partir d'extraits de parois végétales. Il peut s'agir de méthodes chimiques, spectroscopiques ou spectrométriques²¹⁶. Certaines techniques caractérisent la lignine extraite et isolée, tandis que d'autres techniques analysent le polymère directement dans les parois végétales. Cependant, ces méthodes sont presque toutes destructives, ce qui entraîne une perte des informations spatiales sur la distribution du polymère dans les différentes parois.

Les techniques de quantification et de caractérisation de la lignine les plus utilisées vont être rapidement évoquées.

a. Méthodes de dégradation chimique

Les méthodes de dégradation chimique des parois végétales, également appelées méthodes de « *wet chemistry* », ont été les premières solutions pour accéder à la structure de la lignine. Elles comportent généralement une étape de broyage du matériel végétal suivie d'étapes d'extraction à l'aide de différents solvants afin d'isoler les parois végétales. Ces étapes d'isolation du résidu pariétal entraînent par conséquent une perte des informations spatiales.

Les techniques de dégradation chimique comprennent notamment l'hydrolyse, la solvolysse, les dégradations oxydantes ou encore le clivage réductif et permettent d'isoler la lignine sous forme poly- ou monomérique afin d'analyser sa structure. Elles sont parfois couplées à des méthodes chromatographiques.

Quantification de la lignine

Trois principales techniques peuvent être utilisées pour quantifier la lignine d'un échantillon végétal : la méthode de Klason, la méthode au bromure d'acétyle et la méthode du thioglycolate²¹⁷.

La méthode de Klason est basée sur une dégradation chimique acide des parois végétales : celles-ci sont incubées dans de l'acide sulfurique à 72 % pour dissoudre les polysaccharides pariétaux, alors que la lignine va former un résidu insoluble qui est ensuite récupéré pour être dosé par gravimétrie²¹⁸. La mesure de l'absorbance de la partie soluble est parfois réalisée car cette dernière peut contenir une faible proportion de lignine acide solubilisée. Dans ce cas, la teneur en lignine initiale est déterminée en additionnant les valeurs obtenues pour la lignine soluble et insoluble. La méthode de Klason est appropriée pour des échantillons présentant de grandes quantités de lignine tels que le bois mature (*i.e.* le xylème secondaire). Cependant, elle peut surestimer les quantités dans des tissus moins

lignifiés (chez les espèces herbacées ou dans le bois immature)²¹⁷. Dans ce cas, la méthode au bromure d'acétyle est plus appropriée.

Cette méthode consiste à solubiliser la lignine en conditions acides en la faisant réagir avec du bromure d'acétyle dans de l'acide acétique²¹⁹. Il en résulte une acétylation des groupements hydroxyles libres, sauf ceux en position α qui sont remplacés par des bromes (figure 62A). L'absorbance de la lignine en solution est mesurée par spectrophotométrie puis comparée à des standards et permet de déterminer sa concentration.

La méthode du thioglycolate consiste également à solubiliser la lignine pour mesurer son absorbance, mais cette fois-ci en conditions alcalines. Pour cela, le polymère réagit avec de l'acide thioglycolique afin de former des liaisons thioéthers au niveau des alcools benzyliques²¹⁸ (figure 62B). Néanmoins, cette technique sous-estime le contenu en lignine chez les herbacés.

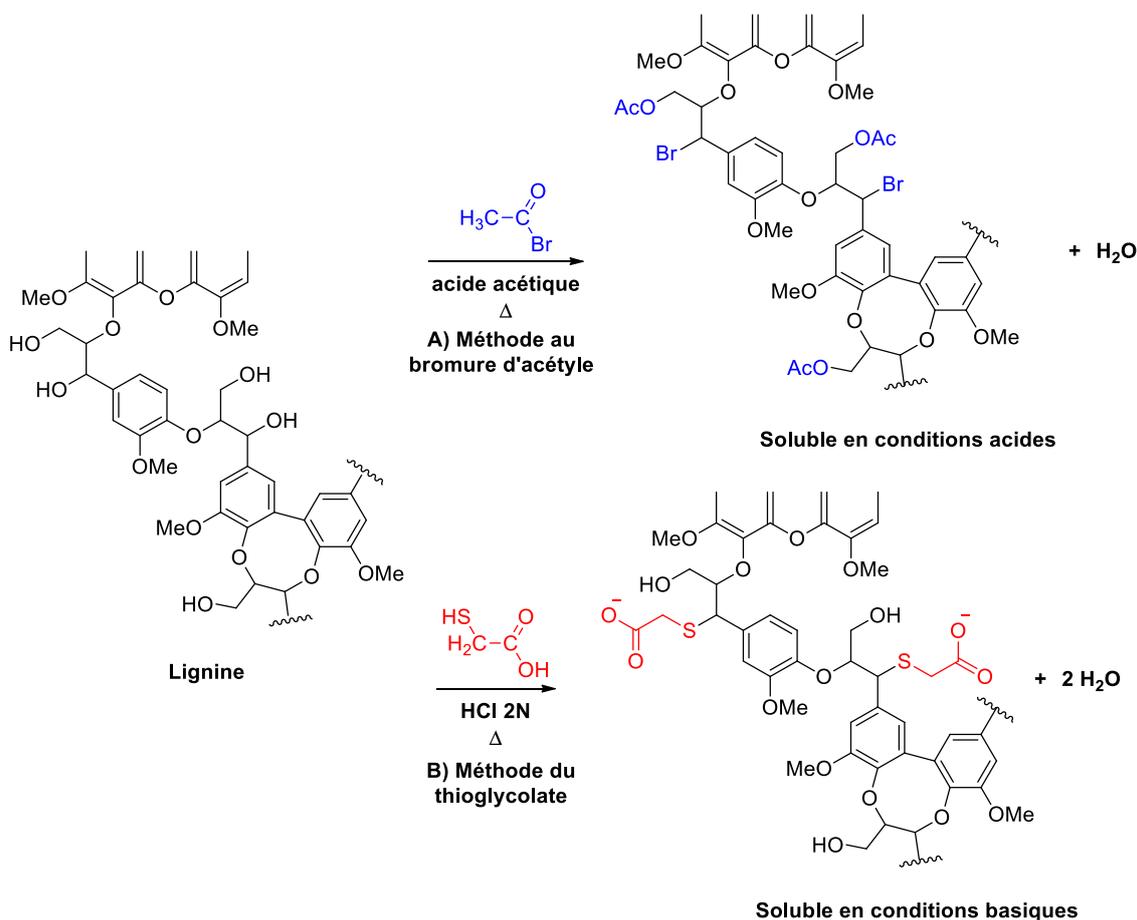


Figure 62 : mécanisme de solubilisation de la lignine par la (A) méthode au bromure d'acétyle et (B) la méthode du thioglycolate.

Analyse structurale de la lignine

D'autres méthodes de dégradation chimique peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la structure de la lignine : nature et proportions des monomères, fréquence des liaisons inter-monomériques. Tout d'abord, l'oxydation au nitrobenzène consiste à oxyder les extraits de parois cellulaires avec du nitrobenzène en présence d'hydroxyde de sodium. Cela entraîne l'hydrolyse des liaisons éthers du polymère (β -O-4 et α -O-4) et la libération de différents résidus phénoliques portant un aldéhyde en position C6 et correspondant aux unités H, G ou S²²⁰. Ces monomères peuvent ensuite être séparés et identifiés par HPLC, puis quantifiés en comparant leur absorption dans l'ultraviolet (UV) à des standards.

La thioacidolyse consiste quant à elle à cliver sélectivement les liaisons de type β -O-4 de la lignine, en incubant les résidus pariétaux avec de l'éthérate de bore trifluoré dans un mélange de dioxane/éthanethiol²²¹. Les monomères libérés sont ensuite extraits et séparés, puis peuvent être quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Les proportions monomériques obtenues sont généralement exprimées en rapport S/G car les quantités d'unités H sont souvent négligeables. Si la quantification réalisée par thioacidolyse ne tient compte que des unités impliquées dans les liaisons β -O-4, cela donne en contrepartie la fréquence exacte de ces liaisons dans l'échantillon pariétal. Toutefois, comme pour l'oxydation au nitrobenzène, ces valeurs ne reflètent pas la partie condensée de la lignine (liaisons C-C).

Si les méthodes de dégradation chimique sont encore utilisées de nos jours, les informations structurales obtenues ne correspondent pas toujours à la structure réelle de la lignine. En effet, l'isolation de cette dernière par des traitements chimiques peut générer des produits secondaires par des réactions de réarrangement et altérer la structure native du polymère. De plus, ces techniques ont tendance à sur- ou sous-estimer la teneur en lignine selon l'espèce végétale et ce malgré l'utilisation de standards. D'autres méthodes de type spectroscopique et spectrométrique se sont développées en parallèle, permettant d'analyser la lignine directement à partir d'échantillons de parois sans besoin d'isoler le polymère au préalable.

b. Méthodes spectroscopiques et spectrométriques

Spectrophotométrie UV

La spectrophotométrie UV peut être utilisée pour quantifier le polymère de lignine du fait de la forte absorption des hydroxyles phénoliques dans la région UV (200-400 nm)²²². Elle est toujours employée pour déterminer la teneur en lignine isolée par la méthode au bromure d'acétyle. Cependant, elle présente plusieurs inconvénients : d'une part, les différents types de monolignols ont des coefficients d'extinction différents et n'absorbent pas de la même manière (maximum d'absorption à 270 nm pour l'alcool coniférylique contre 280 nm pour l'alcool sinapylique). D'autre part, la quantité

de lignine peut être surestimée à cause de l'absorption dans l'UV des acides aminés aromatiques des protéines associées à la paroi.

Spectroscopies vibrationnelles

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et la spectroscopie Raman sont des spectroscopies vibrationnelles basées sur les interactions entre les ondes électromagnétiques et les modes de vibration des liaisons chimiques moléculaires. Les spectres obtenus présentent des signaux caractéristiques assignables aux différentes liaisons chimiques des molécules de l'échantillon à l'aide de tables. Ces méthodes sont principalement semi-quantitatives. Elles permettent notamment de comparer la composition moléculaire des différents biopolymères (lignine et polysaccharides) entre différents échantillons pariétaux ou de classer les différents types de lignine selon leur composition chimique²¹⁶ (figure 63).

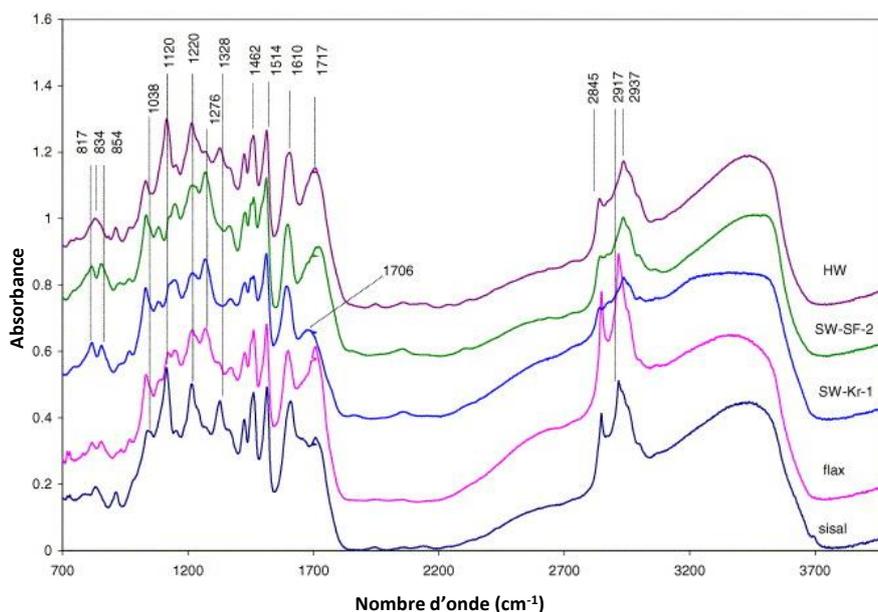


Figure 63 : spectres IRTF d'échantillons de lignine provenant de différentes espèces végétales : une espèce à bois dur (HW), deux espèces à bois tendre (SW), du lin (flax) et du sisal (sisal). Chaque spectre permet d'identifier la structure chimique de la lignine en assignant les bandes spectrales à différents groupements chimiques retrouvés dans des tables. Par exemple, la large bande à 3410-3460 cm^{-1} correspond aux groupements hydroxyles aromatiques et aliphatiques caractéristiques de toutes les lignines. Adapté de [223].

Spectroscopie RMN

La RMN 2D de type HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) est devenue un outil quasiment incontournable pour étudier la structure de la lignine²²⁴. Généralement semi-quantitative, elle apporte des informations sur sa composition monomérique et les types de liaisons inter-monomériques retrouvées. Elle peut aussi être quantitative en intégrant les pics spécifiques de la lignine et en les comparant à un modèle de lignine standard. Le défi de la RMN réside dans la solubilisation correcte du

polymère dans un solvant organique, une acétylation au préalable restant souvent nécessaire. Si les échantillons sont trop complexes à solubiliser, la RMN du solide représente une alternative mais elle fournira des analyses moins résolues.

Spectrométrie de masse

Parmi les techniques de spectrométrie de masse utilisées pour analyser la lignine, la Py-GC/MS (pyrolyse - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse) reste une méthode de choix. La chaleur de la pyrolyse (jusqu'à 500 °C) permet d'abord de décomposer le polymère en clivant les liaisons inter-unités et de libérer des monomères volatiles. Ces derniers sont ensuite séparés par chromatographie en phase gazeuse et analysés par spectrométrie de masse²²⁵. Le spectre de masse obtenu permet d'identifier les dérivés d'unités H, G et S tandis que l'intégration des pics du chromatogramme donne leurs proportions relatives au sein du polymère. Bien qu'il s'agisse d'une méthode destructive, la Py-GC/MS est couramment utilisée car elle permet une analyse simple et rapide de la composition monomérique de la lignine directement à partir d'échantillons de parois végétales.

Conclusion

Elucider la structure de la lignine représente toujours un défi de taille en raison de son hétérogénéité considérable. Si les techniques bien établies de dégradation chimique sont toujours couramment employées, les méthodes spectroscopiques présentent l'avantage d'être non invasives et de conserver la structure chimique de l'échantillon, tout en nécessitant des quantités de matériel plus faibles. Toutefois, elles requièrent l'utilisation d'un standard interne de lignine afin de calibrer les instruments. D'autres techniques telles que la chromatographie d'exclusion stérique permettent de déterminer son poids moléculaire²¹⁶.

Les méthodes présentées jusqu'ici permettent de quantifier la lignine et d'analyser sa structure chimique. Cependant, il s'agit majoritairement de techniques destructives qui ne fournissent pas d'informations spatiales sur la distribution du polymère au sein des parois. Les méthodes d'imagerie de la lignine permettent d'obtenir ces informations.

2. Imagerie de la lignine

De nombreuses techniques d'imagerie peuvent être utilisées pour déterminer la quantité, la composition chimique ou la distribution du polymère de lignine *in situ*. Parmi elles, l'histochimie, l'immunolocalisation, les techniques de fluorescence et les imageries par spectroscopie vibrationnelle sont les plus courantes.

a. Histochimie

L'utilisation de colorants histochimiques représente l'une des méthodes les plus communes pour visualiser la lignine des tissus végétaux. L'incubation de sections végétales ou de plantules entières avec un ou des réactifs particuliers permet d'obtenir une coloration spécifique du polymère polyphénolique. Selon le type de colorant, le marquage peut être visible en lumière transmise ou par microscopie confocale de fluorescence.

Les deux marquages histochimiques de la lignine les plus connus sont les réactions de Weisner et de Mäule (figure 64). Ils permettent de détecter des structures spécifiques au sein du polymère. La coloration de Wiesner consiste à marquer la lignine avec du phloroglucinol en présence d'acide chlorhydrique. La molécule interagit spécifiquement avec les aldéhydes coniféryliques et sinapyliques présents aux extrémités du polymère, générant un chromophore rouge visible en lumière transmise^{226,227} (figure 64B,C).

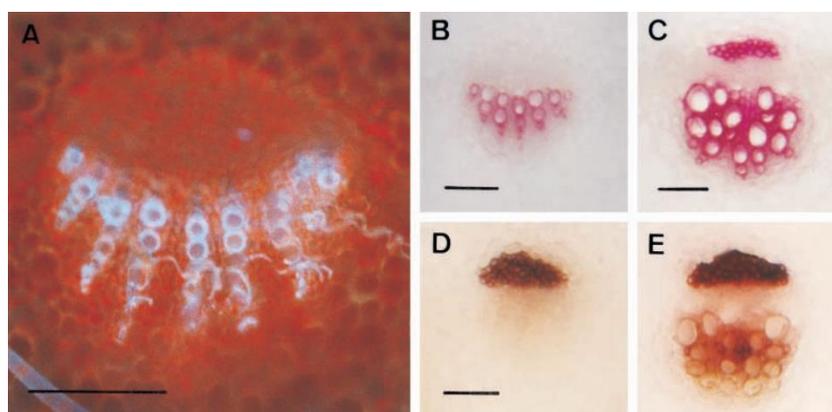


Figure 64 : localisation histochimique de la lignine. Coupes transversales de tiges de *Z. elegans* à différents âges, observation du xylème. A) Autofluorescence de la lignine (en bleu) et de la chlorophylle (en rouge) observée sous lumière UV chez une plante âgée de 15 jours. B,C) Marquage des unités aldéhydiques par le réactif phloroglucinol-HCl chez une plante âgée de (B) 5 et (C) 10 jours. D,E) Marquage des unités syringyles par le réactif de Mäule chez une plante âgée de (D) 10 et (E) 15 jours. Echelle = 100 μ m. Extrait de [227].

La réaction de Mäule est quant à elle spécifique aux unités syringyles. En effet, l'incubation successive des tissus végétaux avec des solutions aqueuses de permanganate de potassium, d'hydrochloride puis d'ammoniac entraîne la formation de structures 3-méthoxy-*o*-quinones à partir des unités S. L'obtention d'une couleur rouge-violette sous lumière blanche permet ainsi de distinguer la lignine riche de celle pauvre en unités S²²⁸ (figure 64D,E). Récemment, l'équipe de Yamashita a mis au point une version

améliorée de la coloration de Mäule en remplaçant le tampon d'ammoniac final par un tampon Tris-HCl (tris(hydroxyméthyl)aminométhane-acide chlorhydrique). Il en résulte d'une part une coloration des tissus plus stable et d'autre part une fluorescence caractéristique sous lumière bleue ($\lambda_{Exc} = 460-495$ nm), permettant de distinguer les unités S des unités G²²⁹.

La fuchsine basique est un autre marqueur histochimique de la lignine couramment utilisé. Elle possède une structure de type triaminotriphénylméthane, capable de former un chromophore fluorescent avec le polymère d'intérêt²³⁰, bien que le mécanisme précis de réaction soit pour le moment inconnu. En 2015, Kapp *et al.* ont montré que la fuchsine basique est sensible aux quantités de lignine entre différents échantillons, mais insensible à la composition du polymère²³¹. Elle a par exemple été utilisée pour révéler des détails subcellulaires de la lignification chez *Brachypodium distachyon* (figure 65.1). Toutefois, ce fluorogène n'est pas totalement spécifique à la lignine puisqu'il est susceptible de se fixer aux acides hydroxycinnamiques associés aux hémicelluloses.

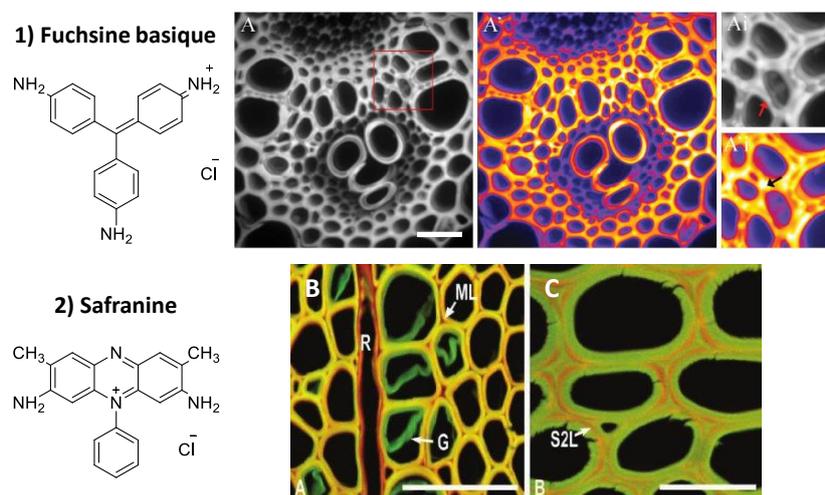


Figure 65 : localisation histochimique de la lignine par la fuchsine basique et la safranine. 1) Coloration à la fuchsine basique de coupes transversales de *Brachypodium distachyon* âgé de 4 semaines. Observation de la fluorescence en échelles de gris (A, Ai) et en fausse couleur (A', A'i). La fluorescence est maximale au niveau de la lamelle moyenne (Ai, flèche rouge) et des coins cellulaires (A'i, flèche noire). Echelle = 20 μ m. Extrait de [231]. 2) Coloration à la safranine du bois de tension de peuplier (B) et du bois de compression de pin (C). La couche gélatineuse (G) est principalement composée de cellulose (marquage vert), tandis que les rayons (R), la lamelle moyenne (ML) et la région externe de la paroi secondaire (S2L) sont riches en lignine (marquage rouge). Echelle = 40 μ m. Extrait de [232].

De même, la safranine est un colorant fluorogénique servant à marquer les tissus lignifiés car elle formerait des interactions π - π avec les molécules aromatiques²³³. Son observation sous lumière blanche nécessite cependant de l'associer à un contre-colorant tel que le bleu Astra car elle n'est pas totalement spécifique à la lignine et marque notamment la cellulose, les nucléoles, la cutine ou la subérine. Par contre, ce colorant peut être utilisé seul en microscopie de fluorescence car il présente une variation d'émission de fluorescence selon la quantité de lignine. Cela permet de distinguer les tissus riches en lignine (rouge-orange) des tissus riches en cellulose (vert-jaune)²³² (figure 65.2). Tout comme la fuchsine basique, la safranine n'apporte pas d'informations sur la structure de la lignine.

En 2018, l'équipe de Geldner a appliqué la méthode *ClearSee* à différents colorants histochimiques de la paroi cellulaire. Il s'agit d'un traitement chimique permettant de diminuer l'autofluorescence de la chlorophylle afin de rendre les tissus végétaux transparents, tout en maintenant les protéines de fusion fluorescentes et les colorations histochimiques stables. Cela permet ainsi de visualiser les tissus végétaux en profondeur par microscopie confocale²³⁴. Les auteurs ont montré d'une part que la fuchsine basique et la safranine sont compatibles avec la procédure *ClearSee* et d'autre part qu'elles peuvent être combinées à des protéines fluorescentes afin d'imager les interactions de la lignine avec d'autres composants de la paroi végétale²³⁵.

Les colorants histochimiques sont très utiles pour l'analyse morphologique des tissus, mais ils fournissent généralement une résolution insuffisante au niveau subcellulaire et posent souvent des problèmes de spécificité. Le phloroglucinol-HCl reste largement utilisé du fait de sa facilité d'utilisation et de son faible coût, mais il existe également d'autres chromophores moins communs.

b. Immunolocalisation

L'immunolocalisation permet de visualiser la distribution des composants pariétaux dans les différentes couches des parois végétales à l'aide d'anticorps marqués. Ces derniers sont versatiles, spécifiques d'une structure particulière et peuvent être générés contre presque n'importe quel fragment macromoléculaire ou molécule. Il existe de nombreux anticorps monoclonaux spécifiques aux glycanes végétaux (pectines, hémicelluloses, protéoglycanes)²³⁶. *A contrario*, le nombre de sondes immunologiques spécifiques de la lignine est limité.

Les premiers anticorps spécifiques du polymère polyphénolique ont été conçus à partir de lignine synthétique. En effet, contrairement à la lignine naturelle extraite qui n'est jamais totalement pure, la polymérisation de DHP *in vitro* permet de contrôler la composition en monomères et de favoriser le type de liaison inter-unité souhaité (condensé ou non condensé) selon le mode de polymérisation. En 1997, Joseleau *et al.* ont créé des anticorps spécifiques d'homopolymères d'unités H ou G et d'hétéropolymères d'unités G et S, chaque modèle pouvant être enrichi en liaisons condensées ou non condensées²³⁷. Une fois administrés à des coupes de tissus de maïs fixés, ces anticorps primaires ont été marqués avec des anticorps secondaires liés à des particules d'or afin de les localiser par microscopie électronique en transmission. La haute résolution de cette technique a permis d'étudier la distribution de chaque type structural de lignine (par exemple la lignine H riche en liaisons β -O-4) au niveau subcellulaire, selon les différents tissus végétaux et selon le stade de développement de la plante. Quelques années plus tard, la même équipe a également conçu un anticorps polyclonal à partir d'homopolymères d'unités S²³⁸. Elle a alors mis en évidence la présence majoritaire d'unités S chez les fibres par rapport aux vaisseaux, mais avec une distribution subcellulaire variable selon l'espèce (figure 66). Les anticorps anti-DHP ont aussi été employés pour étudier la distribution des motifs structuraux de la lignine chez les fibres de tiges de lin¹³⁶, de peuplier²³⁹ ou chez le maïs déficient en enzyme CAD²⁴⁰.

En 2013, Kiyoto *et al.* ont généré des anticorps spécifiques aux motifs structuraux de lignine liés en β -5' ou en β - β ' (nommés respectivement KM1 et KM2)²⁴¹. Les sondes KM1 ont ensuite été utilisées pour analyser la structure du polymère chez les fibres hyperlignifiées des mutants de lin *lbf1* (*lignified bast fiber*)²⁴², puis chez les différents types de bois du cyprès hinoki²⁴³.

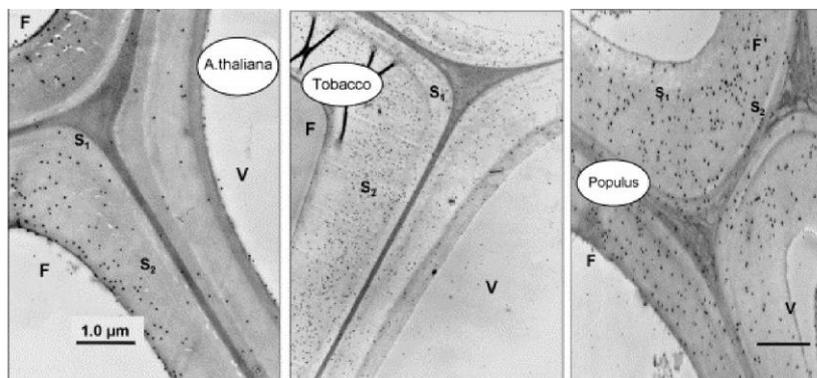


Figure 66 : immunomarcage des épitopes syringyliques de la lignine observé par microscopie électronique en transmission. Pour chaque espèce (*Arabidopsis thaliana*, tabac ou peuplier), les unités S sont distribuées de la même manière dans les couches S2 des fibres (F), avec une incorporation variable dans les couches S1. V = vaisseau. Extrait de [238].

Malgré l'apparition récente des sondes immunologiques KM1 et KM2, la gamme d'anticorps spécifiques de la lignine reste très limitée. Pourtant, leur spécificité structurale combinée à la haute résolution apportée par la microscopie électronique permet d'étudier précisément la distribution des différents motifs composant le polymère dans les différentes couches de la paroi végétale. En fait, la technique d'immunolocalisation présente des désavantages conséquents qui freinent le développement de nouvelles sondes : une préparation des échantillons longue et fastidieuse, des anticorps commerciaux coûteux ou encore une pénétration des sondes dans les tissus limitée en profondeur.

c. Autofluorescence

Du fait de sa nature aromatique, la lignine est un polymère naturellement fluorescent et facilement visible par des techniques microscopiques. Cette autofluorescence est typiquement multimodale, indiquant la présence de multiples structures fluorescentes dans le polymère. En 2010, Donaldson *et al.* ont d'ailleurs séparé par déconvolution spectrale les différents motifs fluorescents présents dans les tissus lignifiés de pin²⁴⁴. La lignine présente donc une large gamme d'émission de fluorescence et peut être excitée notamment par la lumière UV ($\lambda_{Exc} = 240-355$ nm) ou par la lumière bleue ($\lambda_{Exc} = 488$ nm), le tout variant selon le type cellulaire et l'espèce. Fait intéressant, son intensité de fluorescence peut être affectée par le pH et le milieu de montage des tissus²⁴⁵. L'autofluorescence du polymère a été utilisée pour visualiser la distribution de la lignine chez différentes espèces²⁴⁶ ou dans différents types de bois chez le pin^{244,247} (figure 67A). Elle a également permis de comparer les modifications subies par la paroi végétale après différents traitements chimiques, biologiques ou physiques, dans le cadre d'une dépolymérisation de la biomasse²⁴⁸. Cependant, la fluorescence

intrinsèque de la lignine peut parfois être confondue avec celle d'autres polymères pariétaux comportant des composés phénoliques, tels que la subérine ou la cutine.

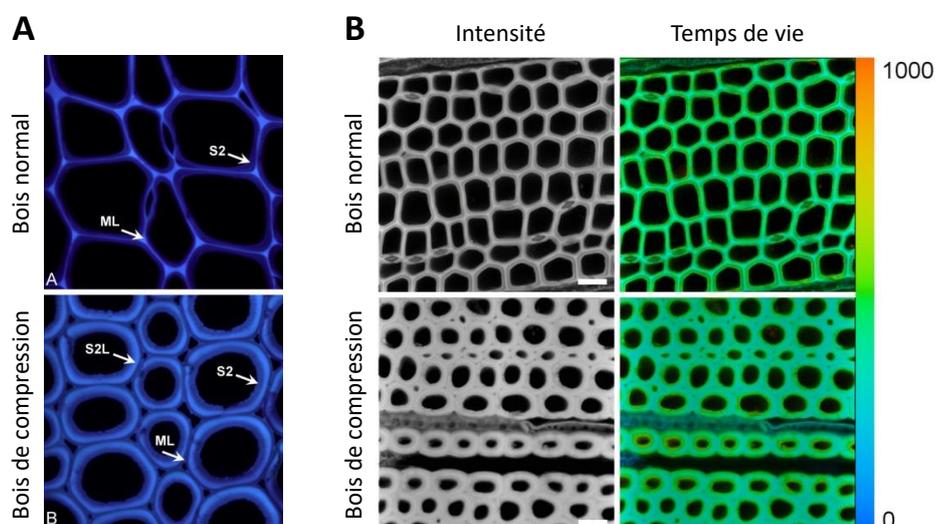


Figure 67 : autofluorescence de la lignine. A) Comparaison de l'autofluorescence entre le bois normal et le bois de compression chez le pin. Acquisition d'images à 420-460, 460-520 et 520-580 nm suivie de leur superposition. ML = lamelle moyenne, S2 = couche S2 de la paroi secondaire, S2L = région externe de la paroi secondaire. Taille = 79 x 79 μm . Adapté de [244]. B) Comparaison de l'intensité de l'autofluorescence classique de la lignine avec l'intensité reflétant son temps de vie de fluorescence chez le bois de pin normal et compressé ($\lambda_{\text{Exc}} = 405 \text{ nm}$). L'obtention de deux durées de vie distinctes permet de différencier deux fluorophores dans les tissus (visibles en bleu et en vert). Echelle = 30 μm . Adapté de [249].

L'autofluorescence intrinsèque de la lignine se prête également à la technique microscopique FLIM (*fluorescence lifetime imaging*), basée sur l'analyse de la durée de vie des fluorophores. Elle génère à partir d'une coupe de tissus végétaux une image où chaque pixel contient une information sur la décroissance de fluorescence de la lignine. Les variations de fluorescence au niveau des parois végétales peuvent alors être corrélées à la concentration, la composition ou la distribution du polymère. Cette technique a récemment été appliquée pour déterminer des changements de composition entre le bois normal et le bois de compression du pin²⁴⁹ (figure 67B). Elle a également été employée pour déterminer les effets de prétraitements acides ou basiques sur le polymère²⁵⁰. De plus, elle a récemment permis d'établir la relation entre le prétraitement d'explosion à la vapeur et la digestibilité de la biomasse dans des tissus végétaux d'intérêt industriel²⁵¹.

L'autofluorescence de la lignine est une technique d'imagerie idéale pour visualiser les effets des prétraitements sur la paroi lignocellulosique dans un but industriel car elle ne nécessite pas de préparation supplémentaire de l'échantillon déjà fragilisé par ces prétraitements. En outre, la technique d'imagerie FLIM donne des informations spatiales sur le degré de condensation de la lignine. Cependant, l'autofluorescence peut poser des problèmes de spécificité et de sensibilité.

d. Spectroscopie vibrationnelle

Principe

Deux autres techniques spectroscopiques non-destructives et non invasives permettent d'imager la lignine *in situ* lorsqu'elles sont combinées à la microscopie : les spectroscopies IR et Raman²⁵². Ces deux approches détectent les vibrations des liaisons moléculaires et fournissent des informations sur la structure chimique des parois végétales natives : elles peuvent à la fois identifier les composants chimiques et déterminer leur abondance relative. Toutes deux basées sur les interactions entre des ondes électromagnétiques incidentes et les liaisons chimiques des molécules, elles reposent néanmoins sur deux principes physiques différents. En spectroscopie IR, la vibration moléculaire entraîne un changement du moment dipolaire déjà présent dans la molécule, associé à l'absorption d'un photon. L'énergie absorbée est égale à la différence d'énergie entre les deux états vibrationnels de la molécule. Pour la spectroscopie Raman, le rayonnement électromagnétique génère un dipôle induit dans la molécule. La différence d'énergie correspond alors à un décalage de fréquence entre un photon excité et un photon diffusé²⁵². Finalement, les spectroscopies IR et Raman apportent des informations chimiques complémentaires puisque la première est sensible aux vibrations polaires tandis que la seconde détecte les vibrations polarisables. Elles peuvent ainsi être associées pour visualiser les parois végétales^{253,254}.

Le couplage des spectroscopies vibrationnelles à la microscopie permet de combiner les informations sur la composition chimique des molécules à leur localisation spatiale et ainsi de cartographier la structure chimique de la lignine au niveau subcellulaire. Pour cela, des milliers de spectres sont acquis à différentes positions, puis les images chimiques sont calculées pour chaque pixel à partir de méthodes d'analyse de données uni- ou multivariées. La lignine est souvent co-visualisée avec les polysaccharides pariétaux afin d'étudier les interactions entre les différents polymères constituant les parois végétales natives.

Imagerie IR

La spectroscopie IRTF a été couplée à la microscopie au début des années 2000. Par exemple, cette technique a permis de cartographier les différences de composition chimique des biopolymères entre des plantes mutantes et leurs contrôles²⁵⁵, entre plusieurs espèces végétales²⁵⁶ ou entre des tissus à des stades de croissance différents²⁵⁷. En 2010, Lacayo *et al.* ont notamment observé une perte de 80 % de la lignine observée à 1510 cm⁻¹ chez des cellules végétales ayant subi un traitement acide²⁵⁸ (figure 68). Malgré quelques applications récentes²⁵⁹, l'emploi de la microscopie FTIR pour visualiser la lignine a progressivement été devancé par l'utilisation de la microscopie Raman.

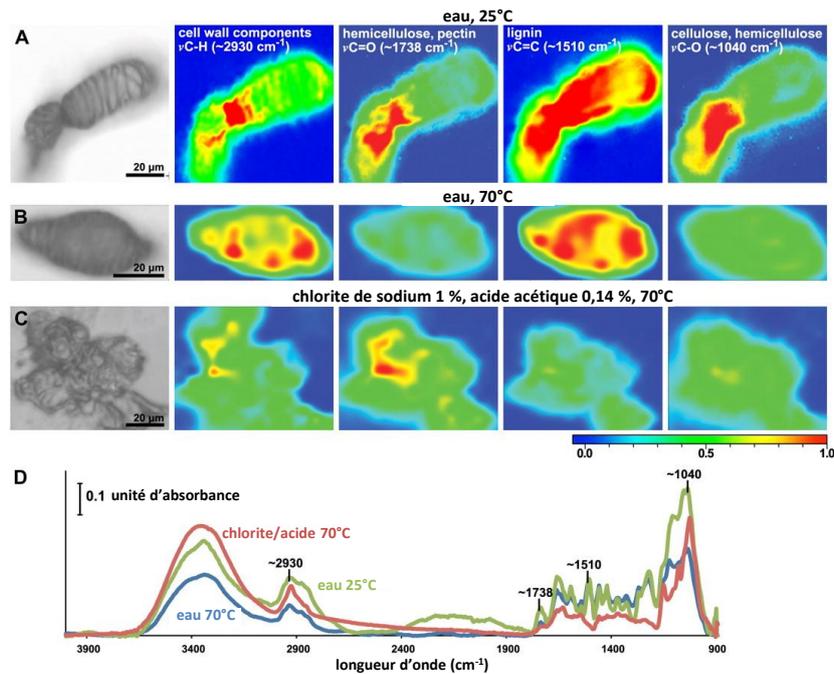


Figure 68 : composition chimique des types cellulaires trachéides chez *Zinnia elegans* caractérisée par microscopie IRTF. Lignes A-C : image en lumière transmise d'une cellule trachéide suivie de ses cartographies thermiques en fausse couleur, représentant l'absorbance des composants de la paroi selon le nombre d'onde spécifié. Les cellules ont préalablement été traitées avec (A) de l'eau à 25°C, (B) de l'eau à 70°C ou (C) du chlorite de sodium acide à 70°C. L'incubation des cellules végétales avec le traitement acide entraîne une perte drastique du signal d'absorbance de la lignine observé à 1510 cm⁻¹. D) Spectre des absorbances moyennes obtenues pour les différents nombres d'onde et selon les différents traitements. Adapté de [258].

Imagerie Raman

L'imagerie Raman s'est révélée plus attractive que la microscopie IR pour visualiser la structure de la lignine du fait de sa meilleure résolution spatiale et grâce à ses nombreuses avancées instrumentales et informatiques. De plus, contrairement au spectre IR qui est très sensible à la présence de l'eau, le spectre Raman n'est pas impacté et permet d'imager les parois végétales dans leur état natif.

Parmi les différentes bandes spectrales assignées à la lignine en spectroscopie Raman, celle à 1600 cm⁻¹ est la plus intense car elle résulte de la vibration des groupements phényles. L'existence d'une bande à 1660 cm⁻¹ indique quant à elle la présence d'alcools coniféryliques ou de coniféraldéhydes. L'intensité des bandes étant proportionnelle à la concentration, l'intégration du signal à 1600 cm⁻¹ a révélé une teneur en lignine plus importante au niveau des coins cellulaires par rapport aux autres couches pariétales chez l'épicéa²⁶⁰ ou chez le peuplier²⁶¹ (figure 69). Parmi les nombreux autres exemples existants, la microscopie Raman a permis de comparer la structure de la lignine au niveau cellulaire entre deux espèces de conifère proches²⁶² ou de comparer la distribution entre la lignine et la cellulose dans différents types cellulaires d'un même échantillon²⁶³. Plus récemment Man *et al.* ont pour la première fois analysé la composition chimique du cadre de Caspary par microscopie Raman, confirmant ainsi la présence simultanée de lignine et de subérine chez les racines de maïs²⁶⁴.

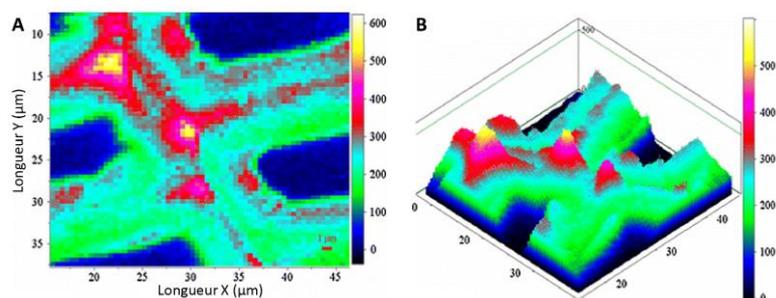


Figure 69 : représentation en fausse couleur de la distribution spatiale de la lignine au niveau d'une paroi cellulaire de pin par imagerie Raman. Représentation (a) en 2D et (b) en 3D. Les zones jaunes indiquant une concentration élevée en lignine correspondent au coin des cellules. Extrait de [260].

Les nombreux développements technologiques réalisés au niveau de l'instrumentation Raman²⁶³ et des méthodes d'analyse des données^{265,266} ont permis de visualiser des distributions plus fines des différents motifs structuraux de la lignine. Par exemple, l'équipe de Cheng a mis au point une méthode d'imagerie hyperspectrale permettant de différencier les fonctions chimiques de la lignine (cycle aromatique, fonction alcool ou aldéhyde) au niveau subcellulaire²⁶⁶ (figure 70).

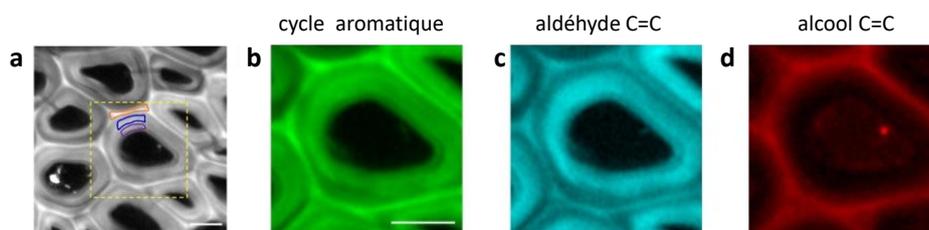


Figure 70 : distribution différentielle des groupements aldéhyde et alcool de la lignine visualisée par imagerie Raman hyperspectrale. a) Observation de plusieurs fibres au niveau d'un faisceau vasculaire chez *Arabidopsis thaliana*. La fibre encadrée au centre de l'image a fait l'objet d'analyses supplémentaires afin de reconstituer les cartes de concentration des fonctions chimiques. (b-d) Concentration spatiale : (b) des cycles aromatiques, (c) des fonctions aldéhydes et (d) des fonctions alcools. Technique : *stimulated Raman scattering*. Extrait de [266].

Néanmoins, bien que les différents composants pariétaux présentent chacun des signaux caractéristiques, des chevauchements entre les bandes de la lignine et celles des polysaccharides ont lieu dans certaines régions du spectre Raman. L'interprétation correcte de la totalité des spectres représente donc toujours un défi à l'heure actuelle, malgré l'utilisation de méthodes d'analyse des données poussées. De plus, l'ajustement des paramètres expérimentaux (puissance laser et temps d'exposition) doit faire l'objet d'une attention particulière, un mauvais réglage pouvant dégrader les tissus ou modifier la composition de la lignine par la génération de réactions photochimiques²⁶⁷.

e. Autres approches et technologies émergentes

Polymères PEG-rhodamine

Les polymères de polyéthylène glycol (PEG) forment avec la lignine des liaisons hydrophobes considérées comme spécifiques. En 2014, Donaldson *et al.* ont montré que des PEG liés à des rhodamines peuvent pénétrer dans la paroi de tissus de pin fragmentés, se lier aux polymères de lignine

et être visualisés par microscopie de fluorescence. De plus, la mesure des transferts d'énergie (technique FRET) entre la lignine et la rhodamine a permis de déterminer la force de leurs interactions selon les différentes couches de la paroi végétale²⁶⁸. Plus récemment, des polymères PEG fluorescents de différentes tailles ont été utilisés pour comparer les effets de deux prétraitements (chimique et thermique) sur la porosité de la paroi chez le pin et le peuplier²⁶⁹. Enfin, la mobilité des sondes PEG de différentes tailles a aussi été étudiée à l'aide de la technique FRAP afin de comparer l'accessibilité de la paroi après différents prétraitements²⁷⁰.

Microscopie de super-résolution

Bien que la microscopie de super-résolution se soit développée dans les années 1990, les applications aux cellules végétales demeurent rares. Il n'existe d'ailleurs que deux exemples au niveau des parois végétales : le premier porte sur la disposition des microfibrilles de cellulose²⁷¹ et le second concerne la localisation de la lignine²⁷². En 2018, Paës *et al.* ont effectivement associé la technique STED (*Stimulated Emission Depletion*) aux sondes PEG fluorescentes afin de révéler la lignine des parois végétales de peuplier (figure 71). La méthode STED consiste à exciter la sonde fluorescente dans l'échantillon à l'aide d'un premier laser, tandis qu'un second laser en forme de « beignet » inhibe sélectivement la fluorescence en périphérie de la zone visée pour obtenir un point lumineux focalisé plus précis. Les images obtenues combinées à un traitement de déconvolution améliorent la résolution d'un facteur 3 par rapport à la microscopie confocale classique. Elles ont permis d'obtenir des détails supplémentaires sur la quantité de lignine au niveau des coins cellulaires et de la lamelle moyenne.

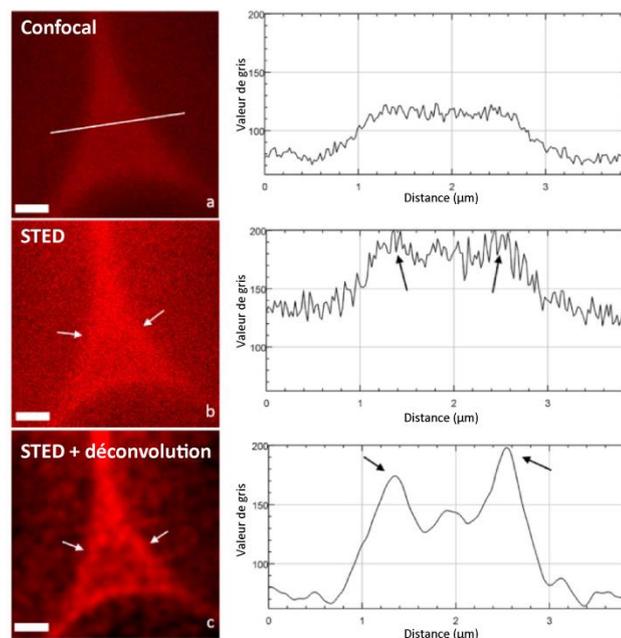


Figure 71 : apport de la microscopie STED pour l'imagerie de la lignine. Marquage de la lignine de xylème de peuplier par des sondes PEG-rhodamines. Visualisation d'un coin cellulaire par a) microscopie confocale classique, b) microscopie STED ou c) microscopie STED puis déconvolution. Les structures fines correspondant à la lamelle moyenne ne sont pas visibles par microscopie confocale classique (a), mais elles peuvent être distinguées en mode STED et de manière plus nette avec la déconvolution (b et c, flèches blanches). Echelle = 1 µm. Extrait de [272].

Imagerie par spectrométrie de masse

L'une des technologies émergentes pour visualiser la lignine est l'imagerie par spectrométrie de masse. Tout comme les microscopies Raman et IR, elle ne nécessite pas de marquage préalable de l'échantillon et permet de mesurer la distribution spatiale des différents motifs chimiques constituant la paroi végétale. Une reconstruction informatique des images est réalisée pour chaque pixel à partir des ions d'intérêt détectés dans les spectres de masse obtenus.

En 2011, l'équipe de Griffis a appliqué pour la première fois l'imagerie TOF-SIMS (*time-of-flight secondary ion mass spectrometry*) au polymère de lignine pour élucider la distribution des unités S et G sur des sections de xylème de peuplier²⁷³. Les auteurs ont d'abord confirmé la présence préférentielle des unités G au niveau des vaisseaux et des unités S au niveau des fibres, comme cela a pu être démontré auparavant par microscopie UV. Ils se sont ensuite intéressés au niveau subcellulaire des fibres et ont montré une localisation préférentielle des unités G dans la lamelle moyenne et des unités S dans les parois primaire et secondaire (figure 72). Une expérience similaire a été réalisée par la suite sur le bois d'érable²⁷⁴.

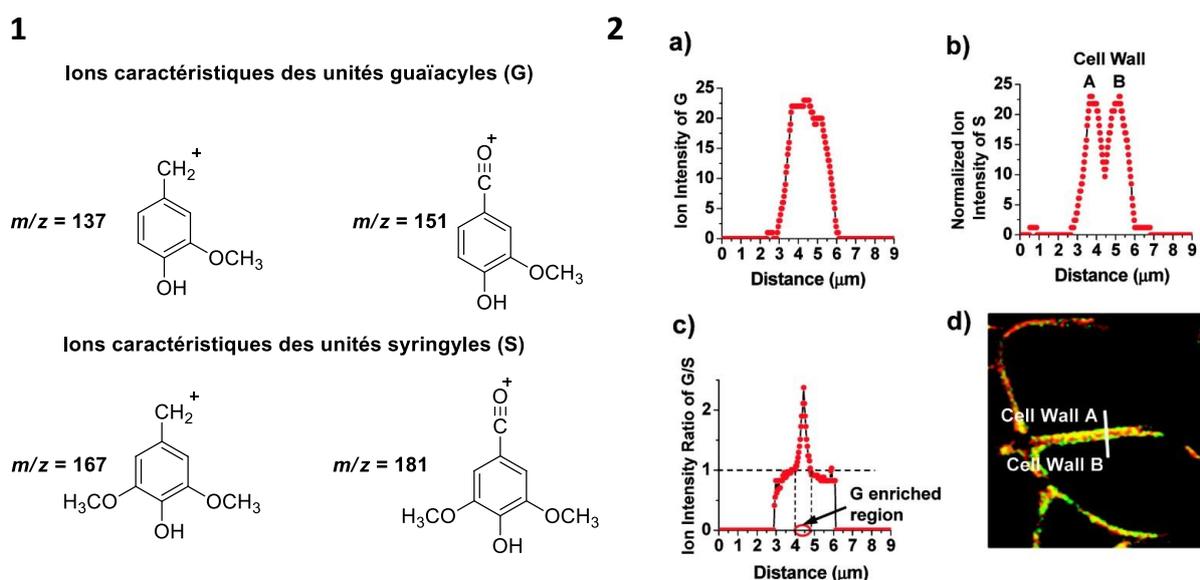


Figure 72 : utilisation de la spectrométrie de masse TOF-SIMS pour l'imagerie de la lignine. 1) Structure chimique des ions obtenus pour les unités G et S par fragmentation du polymère. 2) Distribution spatiale des unités G et S au sein d'une paroi de fibre de peuplier. L'image (d) montre les unités G (rouge) et S (vert). (a-c) Les profils d'intensité des signaux mesurés au niveau de la ligne blanche de l'image (d) montrent une incorporation préférentielle des unités G au niveau de la lamelle moyenne (a), alors que les unités S sont davantage présentes au niveau des parois primaire et secondaire (b). Extrait de [273].

L'imagerie MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*) a quant à elle servi à déterminer la distribution des structures solubles de lignine (monomères et oligomères) sur des sections transversales d'eucalyptus. Parmi les 22 composants identifiés, des quantifications relatives des trois monolignols solubles ont pu être réalisées²⁷⁵. Cette technologie a aussi été appliquée à la localisation des lignanes dans les différents tissus constituant les graines de lin²⁷⁶.

Du fait de sa grande sélectivité et sensibilité, l'imagerie par spectrométrie de masse représente une technique prometteuse pour l'analyse *in situ* de la lignine et plus généralement des polymères pariétaux. Cependant, des contaminations de la surface des tissus peuvent avoir lieu lors de la préparation des échantillons et affecter la qualité de l'image, l'ionisation des molécules d'intérêt ou la reproductibilité. De plus, la résolution latérale est pour le moment inférieure à celle des spectroscopies vibrationnelles (entre 10 et 50 μm pour l'imagerie MALDI) et limite la caractérisation détaillée de la paroi au niveau subcellulaire. Les futures avancées technologiques concernant l'instrumentation et les logiciels de traitement de données devraient permettre de surmonter ces limites.

f. Conclusion et limites

Les techniques d'imagerie pour visualiser la lignine sont nombreuses et variées afin d'appréhender au mieux sa complexité structurale. Elles sont généralement employées pour comparer la distribution du polymère à différents stades de développement de la plante, entre un mutant et son contrôle ou pour regarder l'impact des traitements physico-chimiques sur la paroi. Souvent utilisées de manière complémentaire, ces techniques donnent des informations spatiales sur la composition chimique et la distribution du polymère *in situ*. Par ailleurs, chaque méthode présente ses propres avantages et inconvénients qui doivent être pris en compte selon l'application à laquelle elle doit servir.

Toutes les techniques citées précédemment permettent de localiser le polymère de lignine de manière plus ou moins précise. Néanmoins, elles peuvent toutes être qualifiées de « statiques », car elles ne permettent pas de distinguer la lignine venant d'être synthétisée à un instant t , de la lignine déposée depuis les premiers stades de développement de la plante. Par conséquent, elles ne sont pas adaptées à l'étude de la dynamique de la lignification puisqu'elles ne permettent pas de visualiser les zones actives de polymérisation des monolignols dans les tissus. Pour surmonter ces limites, des méthodes de chimie dans le vivant basées sur l'incorporation de monolignols synthétiques marqués ont été mises au point.

3. Imagerie de la lignine par la chimie dans le vivant

Les techniques de chimie *in vivo* pour visualiser la lignine nouvellement synthétisée, appelée lignine *de novo*, reposent sur l'incorporation métabolique de précurseurs modifiés du polymère qui sont par la suite détectés de manière directe ou indirecte. Historiquement, les premières expériences de chimie dans le vivant pour visualiser la dynamique de la lignification peuvent être attribuées aux travaux de Terashima et Fukushima basés sur l'autoradiographie. Ils ont pour cela synthétisé des monolignols glycosylés en marquant certaines positions chimiques au tritium. Ces précurseurs ont ensuite été mis en présence de coupes transversales fraîches de différentes espèces de gymnospermes pour être métabolisés dans le xylème en cours de différenciation après clivage du glucose. Les unités H, G et S nouvellement incorporées ont ensuite pu être localisées et quantifiées par autoradiographie. Les auteurs ont ainsi

montré l'hétérogénéité des processus de déposition des trois monolignols selon les stades de différenciation du xylème^{146,277,278}.

La radioactivité étant une technique particulièrement contraignante, l'équipe de Ralph s'est tournée en 2011 vers l'utilisation de fluorophores. Les petites molécules organiques fluorescentes peuvent en effet être utilisées pour l'imagerie *in vitro* et parfois *in vivo*, grâce à leur taille relativement petite et à leur faible toxicité. Les auteurs ont donc synthétisé des monolignols bioconjugués à des fluorophores en générant une liaison covalente entre l'alcool coniférylique et une aminocoumarine ou un nitrobenzofurane²⁷⁹ (figure 73). Ils ont ensuite démontré que ces alcools coniféryliques bioconjugués peuvent pénétrer dans les tissus végétaux d'*Arabidopsis thaliana* et être incorporés de manière spécifique dans le polymère de lignine, permettant l'étude des zones actives de lignification²⁷⁹.

L'avantage des deux méthodologies précédentes réside dans le fait qu'elles comprennent une seule étape d'incorporation métabolique et ne nécessitent pas d'étape supplémentaire de ligation d'une sonde. En effet, une fois incorporé, le monolignol bioconjugué au fluorophore peut être directement visualisé par microscopie de fluorescence, tandis que le monolignol marqué au tritium peut être analysé par autoradiographie. Les travaux de Ralph sur les monolignols bioconjugués à des fluorophores ont ainsi permis de montrer que des modifications structurales importantes peuvent être acceptées par les enzymes de polymérisation de la lignine. Cependant, cette technique a été délaissée car la taille imposante des fluorophores ainsi que leur caractère aromatique hydrophobe peuvent entraîner de fortes perturbations des propriétés physico-chimiques des monolignols, impactant alors leurs activités biologiques et leur distribution au niveau subcellulaire.

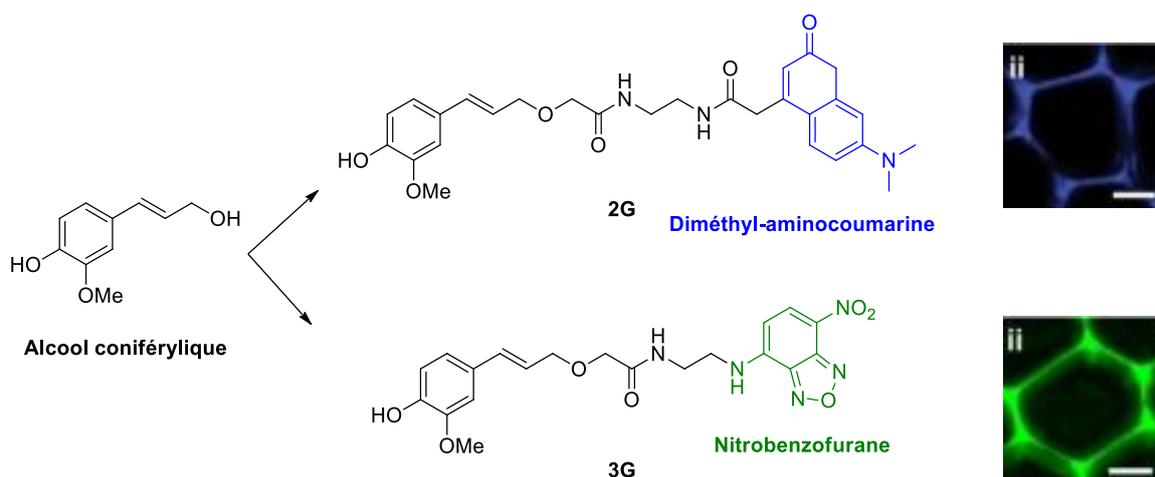


Figure 73 : structure chimique de l'alcool coniférylique et de ses analogues fluorescents. Echelle = 10 µm. Adapté de [280].

La dernière méthode reportée pour visualiser la lignine *de novo* est également la plus pertinente et repose sur l'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal. En effet, modifier les monomères avec des étiquettes plus simples et plus inertes que les fluorophores augmente leur biocompatibilité et leur capacité à refléter avec précision les processus de lignification *in planta*.

En 2014, les équipes de Ralph et de Zhu ont appliqué au même moment cette stratégie à deux analogues de l'alcool coniférylique. L'équipe de Ralph a fonctionnalisé l'alcool primaire avec un alcyne via une liaison peptidique²⁸¹, tandis que l'équipe de Zhu a substitué le groupement méthyle par un groupement propargyle²⁸² (figure 74, composés b et c). L'année suivante, l'équipe d'Anderson a conçu un troisième analogue en remplaçant le groupement méthoxy par un groupement alcyne²⁸³ (composé d). Dans chaque cas, les auteurs ont démontré l'efficacité de polymérisation *in vitro* de leur rapporteur par la formation de DHP en présence d'une peroxydase commerciale, la peroxydase de Raifort. Ils ont ensuite appliqué la stratégie du rapporteur chimique à l'aide de la CuAAC afin de visualiser spécifiquement les zones actives de lignification des parois végétales, d'une part à la surface de racines de plantules d'*Arabidopsis thaliana* et d'autre part sur des coupes transversales de tiges de plantes plus âgées (figure 74B).

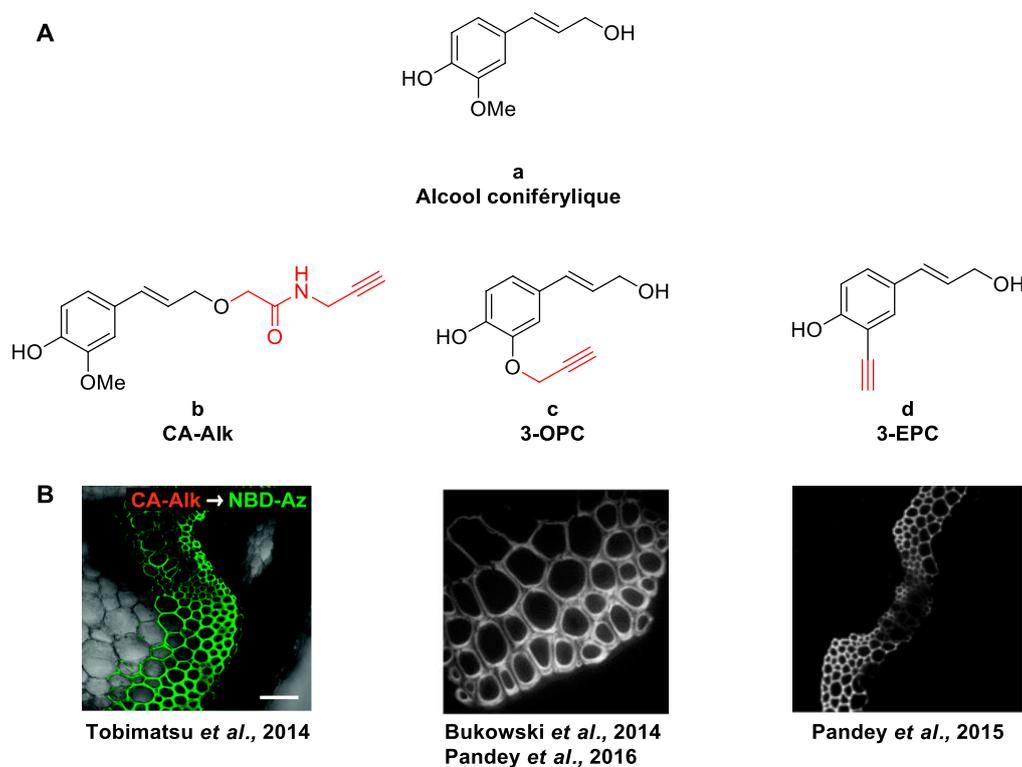


Figure 74 : rapporteurs chimiques développés pour l'étude de la lignine. A) Structure de l'alcool coniférylique naturel et de ses différents analogues synthétisés en 2014 et 2015. B) Visualisation de la lignine du xylème de coupes transversales de tiges matures d'*Arabidopsis thaliana*. Chaque analogue a été incorporé dans le polymère puis couplé à un fluorophore par une réaction de ligand bioorthogonale de type CuAAC. Adapté de [281–283].

Des expériences ont par la suite été réalisées sur des sections de tiges d'arabette mature avec l'analogue propargylique de l'alcool coniférylique (composé c) pour étudier les facteurs biochimiques et enzymatiques impliqués dans le contrôle de la lignification²⁸⁴. Les auteurs ont comparé les motifs de fluorescence à différents stades de développement de la tige : ces derniers suivent les motifs de lignification naturelle. Ils ont également observé une diminution du marquage en présence d'inhibiteurs de peroxydases et/ou de laccases, confirmant la présence nécessaire de ces enzymes pour le dépôt de la lignine. Cependant, les auteurs ne se sont pas intéressés aux deux autres principaux monolignols (alcools sinapylique et *p*-coumarylique), alors que l'assemblage des trois monomères participe à la complexité de la lignine. De plus, les études ont été réalisées sur *Arabidopsis thaliana* mais n'ont pas été étendues à d'autres espèces qui pourraient avoir un intérêt économique et/ou un profil de lignification différent.

Deuxième partie : objectifs

Remarque : afin de simplifier la lecture, les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique seront respectivement nommés monolignols H, G et S.

La lignine présente dans les parois cellulaires végétales des plantes vasculaires est un biopolymère d'intérêt à la fois au niveau fondamental et industriel. D'un point de vue physiologique, elle forme une matrice pariétale hydrophobe et rigide qui remplit de nombreuses fonctions essentielles au développement de la plante : résistance mécanique, transport de l'eau et protection contre les pathogènes. Bien que sa présence soit recherchée dans certaines industries, elle peut aussi entraver certaines applications de valorisation de la biomasse. En effet, la lignine incrustée dans les parois cellulaires végétales piège les polysaccharides et rend ces parois récalcitrantes à la dégradation par des processus enzymatiques. Cela limite notamment la dépolymérisation de la biomasse lignocellulosique à des fins industrielles telles que la fabrication de pâte à papier ou encore la production de biocarburants¹⁵³. Les recherches sur la biosynthèse de la lignine et la formation de la paroi en général représentent donc un enjeu économique et écologique majeur pour pouvoir à terme améliorer la qualité de la biomasse lignocellulosique.

La lignine est un polymère complexe puisque sa composition en monomères, la nature de ses liaisons inter-monomériques, sa concentration et sa distribution dans les parois varient selon l'espèce végétale, le tissu, le type cellulaire, le stade de développement ou encore les conditions environnementales. Ce polymère est composé de trois principaux monomères appelés monolignols (monolignols H, G et S), même s'il existe de nombreux autres composés phénoliques pouvant être incorporés. Les monolignols sont synthétisés dans le cytosol par la voie enzymatique des phénylpropanoïdes, puis transportés dans la paroi végétale où des laccases et/ou peroxydases initient leur polymérisation radicalaire en lignine (voir généralités partie II.4). Si la voie de biosynthèse des monolignols est relativement bien connue, de nombreux paramètres concernant les mécanismes de stockage dans le cytosol et d'export dans la paroi restent à élucider¹⁷⁶. Concernant l'étape finale de polymérisation radicalaire des monolignols, les facteurs de régulation spatiale (selon le type tissulaire, cellulaire ou les sous-couches de la paroi) et temporelle (selon le stade de développement de la plante) sont sujets à de nombreuses interrogations¹⁹⁴. Ces interrogations concernent notamment le rôle respectif des laccases et des peroxydases qui n'a toujours pas été élucidé. Une hypothèse suggère qu'au niveau du xylème, ces enzymes sont régulées de manière spatio-temporelle : elles agiraient à des stades de développement distincts et/ou dans différents tissus, types cellulaires ou couches pariétales. De plus, la mesure dans laquelle la spécificité des enzymes pour leurs substrats influence l'incorporation des différents types de monolignols dans la lignine reste inconnue.

Si de nombreuses techniques permettent de visualiser la lignine *in situ*, il existe très peu d'exemples d'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique afin de visualiser les zones actives de lignification²⁸¹⁻²⁸⁴. Par ailleurs, ces exemples se sont uniquement focalisés sur l'alcool coniférylique sans prendre en compte les deux autres principaux monolignols (alcool sinapylique et p-coumarylique) participant à la complexité de la lignine. En outre, les études ont uniquement été menées sur *Arabidopsis thaliana* comme preuve de concept. Elles n'ont donc pas été étendues à d'autres espèces qui pourraient présenter un profil de lignification différent et/ou posséder un intérêt économique plus important.

Cette thèse a pour objectif le développement et l'utilisation d'outils chimiques afin d'étudier les processus de lignification chez les plantes. Il s'agit plus précisément d'appliquer la stratégie du rapporteur chimique à chacun des trois monolignols dans le but d'étudier la dynamique spatio-temporelle de leur polymérisation en lignine. Le but général est de mettre au point des méthodologies de marquage qui aboutiront à un triple marquage des monolignols H, G et S. Cette stratégie nécessite de concevoir trois rapporteurs chimiques analogues à chacun des trois monolignols, puis d'utiliser trois réactions bioorthogonales afin de lier chaque rapporteur chimique à un fluorophore de manière spécifique. L'incorporation de chaque rapporteur chimique dans des tissus végétaux et sa ligation à un fluorophore seront d'abord effectuées de manière individuelle, ce qui prendra le nom de mono-marquage. Suite à ces mono-marquages sera mis en point un double marquage suivi d'un triple marquage afin de comparer la distribution des différents rapporteurs chimiques dans la lignine *de novo*. Une fois mises au point, les méthodologies de double et de triple marquage nous permettront d'obtenir différentes informations sur la dynamique de la lignification.

Ce manuscrit sera donc organisé en six parties : la première partie présentera la mise au point des travaux de mono-marquage des unités H, G et S de la lignine. La deuxième partie traitera du développement du double marquage et de ses applications biologiques, puis la troisième partie présentera le triple marquage final des trois monolignols. La quatrième partie étendra le triple marquage aux interactions lignine-polysaccharides. Une cinquième partie clôturera ces travaux de triple marquage en présentant l'avenir prometteur de la microscopie de fluorescence à super-résolution. Enfin, une dernière partie présentera l'initiation d'un développement méthodologique combinant la stratégie du rapporteur chimique à la détection par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique.

Troisième partie : résultats et discussion

I. Stratégie du rapporteur chimique appliquée à chaque monolignol

1. Elaboration de la stratégie générale

La première étape à accomplir pour étudier la dynamique de la lignification est de visualiser l'incorporation de chacun des trois monolignols dans la lignine végétale. Pour cela, la stratégie du rapporteur chimique sera appliquée en incorporant un rapporteur chimique analogue au monolignol d'intérêt dans les tissus végétaux. De la même manière que le monolignol naturel, il sera oxydé en radical phénoxy par les phénoloxydases, ce qui activera sa polymérisation radicalaire pour être incorporé dans la lignine. Pour finir, une réaction de ligation bioorthogonale permettra de lier covalamment un fluorophore spécifique au monolignol modifié polymérisé afin de le détecter par microscopie confocale de fluorescence (figure 75A).

L'objectif final est de visualiser l'incorporation simultanée des trois monomères dans la lignine au sein d'un même échantillon biologique. Ainsi, la nécessité de générer des structures pertinentes à chaque monolignol, tout en permettant des marquages sélectifs et compatibles entre eux, doit être prise en compte dans la conception des rapporteurs chimiques et dans le choix et la mise en œuvre des réactions bioorthogonales. Pour se faire, les modifications structurales de chaque monolignol ont d'abord été choisies de manière à pouvoir réaliser successivement trois réactions de ligation à la fois bioorthogonales et compatibles entre elles : la DAinv, la SPAAC et la CuAAC. De plus, les étiquettes chimiques doivent impacter au minimum les propriétés physico-chimiques et la réactivité des molécules modifiées afin de permettre une incorporation métabolique similaire à celle des monolignols naturels. Ainsi, les groupements cyclopropène, azoture et alcyne terminal ont été sélectionnés du fait de leur petite taille, leur absence de réactivité envers la majorité des fonctions chimiques présentes dans les systèmes vivants et leur grande sélectivité lors des réactions de ligation bioorthogonale (figure 75B).

Suite à cette conception stratégique de la méthodologie à suivre, voici maintenant les différentes étapes pratiques qui ont été suivies.

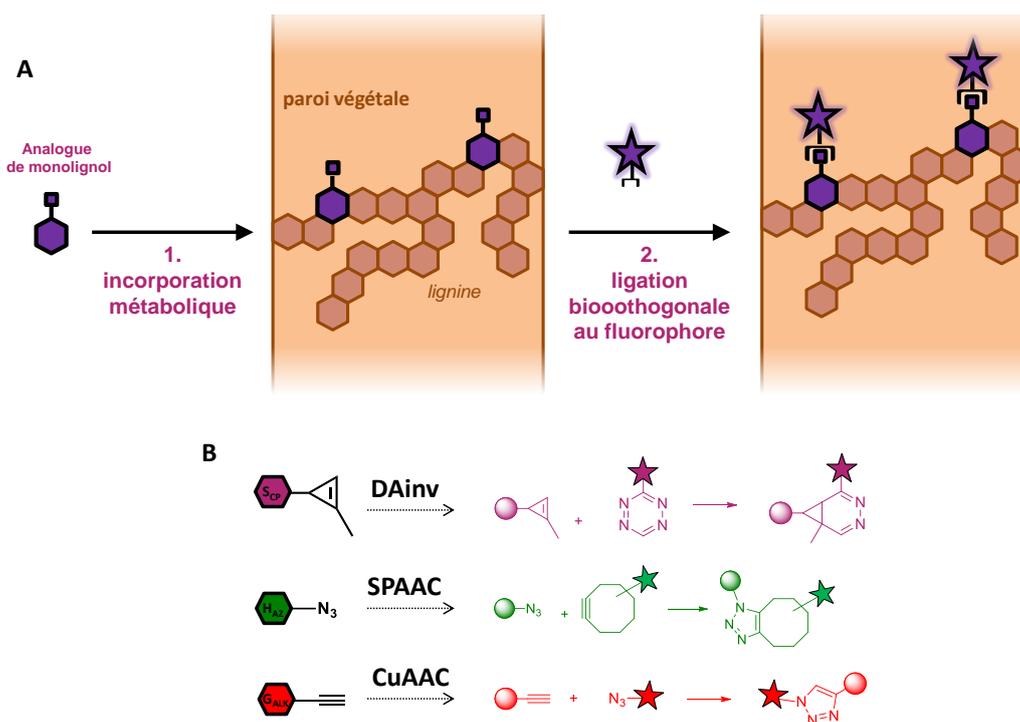


Figure 75 : stratégie du rapporteur chimique appliquée aux trois monolignols de la lignine. A) Pour chaque monolignol, un analogue portant une étiquette chimique est incorporé dans le polymère de lignine croissant par addition exogène. Il est ensuite lié à un fluorophore spécifique par une réaction de ligation bioorthogonale afin d'être visualisé par microscopie confocale de fluorescence. B) Etiquettes chimiques des trois analogues finaux des monolignols S, H et G. Les réactions de ligation bioorthogonale utilisées sont la DAinv, la SPAAC et la CuAAC pour les analogues S_{CP}, H_{AZ} et G_{ALK} respectivement.

2. Conception des rapporteurs chimiques

Dans le cadre d'une stratégie de marquage de la lignine *de novo*, la première étape est la conception de rapporteurs chimiques analogues de chaque monolignol en leur ajoutant une modification structurale appelée étiquette chimique. Le choix de la région chimique à modifier doit être pris en compte de manière à perturber au minimum le processus de lignification naturelle. Or, c'est un processus radicalaire initié par les familles enzymatiques des laccases et/ou des peroxydases (figure 76). Ces enzymes génèrent des radicaux phénoxyles délocalisables sur un système π -conjugué étendu faisant intervenir le cycle aromatique et l'alcène¹⁴⁶. Ces trois régions participent à la polymérisation correcte des monolignols et ne peuvent donc pas être modifiées chimiquement pour ne pas perturber les liaisons inter-unités natives. Le rapporteur chimique peut par conséquent être ajouté soit sur la fonction alcool primaire, soit sur l'un des groupements méthoxys potentiellement présents. En effet, les équipes de Ralph²⁸¹ et de Zhu²⁸² ont montré en 2014 que des analogues du monolignol G modifiés sur ces deux positions respectives peuvent être incorporés dans la lignine pariétale des tissus vasculaires chez *Arabidopsis thaliana*.

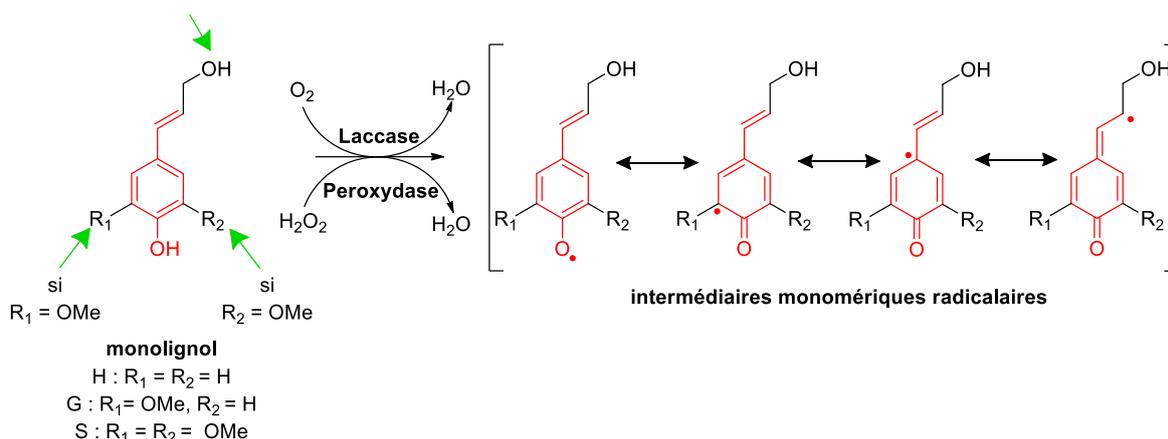


Figure 76 : polymérisation radicalaire des monolignols. Le monolignol est oxydé par une laccase et/ou une peroxydase pour former un radical phénoxy délocalisable sur un système π -conjugué étendu. Dans le cadre de la conception de rapporteurs chimiques, les régions en rouge sont impliquées dans la polymérisation des monomères et ne peuvent être modifiées, tandis que les flèches vertes indiquent les positions modifiables.

Le monolignol G a été étudié en premier car il est présent en proportions majoritaires au sein de la lignine chez le lin (72 % au niveau des fibres et 87 % au niveau du xylème²⁸⁵) et chez les autres espèces de manière plus générale. Un analogue a ainsi été synthétisé sur le modèle de celui publié par l'équipe de Zhu en 2014. Pour cela, le groupement méthoxy a été remplacé par un groupement propargyloxy afin de former le rapporteur chimique G_{ALK} (figure 77a). Après l'incorporation métabolique du rapporteur chimique dans les tissus, le groupement alcyne terminal sera couplé à une fonction azoture portée par un fluorophore via une réaction de ligation bioorthogonale de type CuAAC.

Le monolignol H ne possédant pas de fonction méthoxy sur le cycle aromatique, seul son alcool primaire peut être modifié sans impacter la délocalisation et la réactivité du radical formé lors de la polymérisation. Sa structure a donc été modifiée en ajoutant un bras espaceur de type PEG₃ fonctionnalisé par un azoture afin de former l'analogue nommé H_{AZ} (figure 77b). Après son incorporation métabolique, l'azoture du rapporteur H_{AZ} sera couplé au cyclooctyne porté par un fluorophore via une réaction de ligation bioorthogonale de type SPAAC. Etant donné l'encombrement stérique important des cyclooctynes, le bras espaceur de type PEG₃ a été introduit de manière à augmenter l'accessibilité de l'azoture lors de la fixation de la sonde.

Enfin, pour le monolignol S, la modification structurale peut être ajoutée soit sur la fonction alcool primaire, soit sur l'un des deux groupements méthoxys. Tenant compte de l'expérience accumulée lors de la synthèse des deux précédents rapporteurs, il a semblé plus judicieux d'introduire la modification sur l'alcool primaire en prévision de futurs projets où les trois rapporteurs porteront une modification sur la même région chimique. De plus, la modification structurale au niveau de cette région apparaît plus simple en termes de synthèse par rapport à la modification d'un groupement méthoxy : cette seconde solution pourrait engendrer des problèmes de sélectivité et d'instabilité des phénols. Deux modifications structurales ont été testées sur l'alcool primaire, conduisant à la synthèse successive de deux rapporteurs chimiques : S_{ALKE} et S_{CP} (figure 77c). L'analogue S_{ALKE} a d'abord été créé en

remplaçant l'alcool primaire par un alcène terminal à travers un bras espaceur de type PEG₂. Le but est de le faire réagir avec une tétrazine portée par un fluorophore lors d'une ligation bioorthogonale de type DA_{inv}. Comme nous le verrons par la suite, il s'est toutefois révélé trop peu réactif pour permettre une réaction satisfaisante. L'analogue alternatif S_{CP} a été donc synthétisé avec la substitution du groupement alcool par un groupement méthylcyclopropène. De plus, le bras espaceur a été remplacé par une liaison peptidique pour des raisons de disponibilité du réactif de départ et du fait des faibles rendements des réactions de Williamson utilisées pour les composés H_{AZ} et S_{ALKE}.

Chaque rapporteur chimique conçu en respect avec le processus de lignification a ensuite été synthétisé.

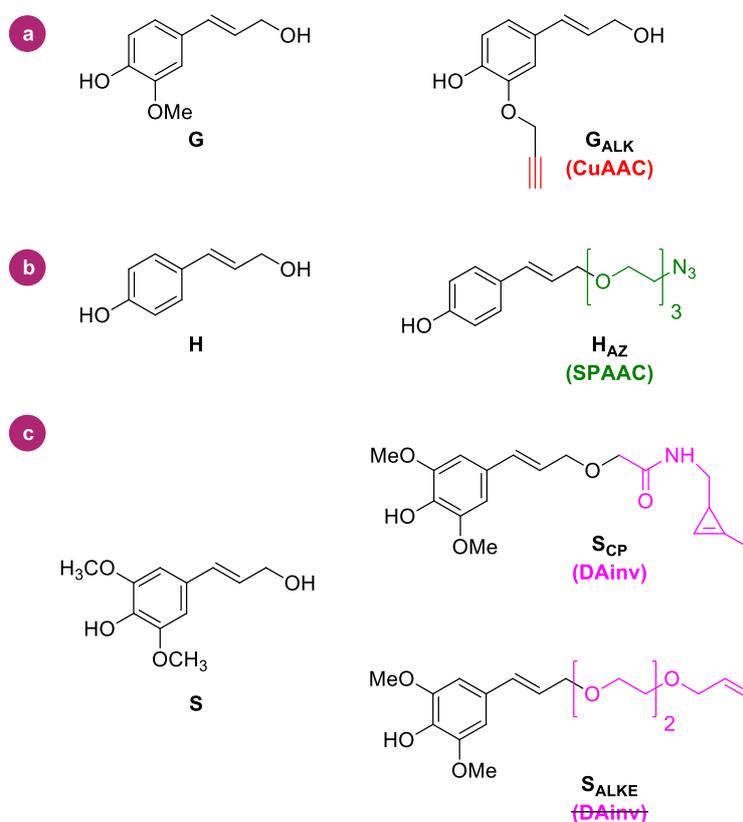


Figure 77 : conception des rapporteurs chimiques analogues des monolignols. a) Monolignol G naturel et son analogue de type alcyne G_{ALK}. b) Monolignol H naturel et son analogue de type azoture H_{AZ}. c) Monolignol S naturel et ses analogues de type méthylcyclopropène S_{CP} et de type alcène terminal S_{ALKE}.

3. Synthèse des rapporteurs chimiques

a. Synthèse de G_{ALK}

La synthèse de l'analogue de l'alcool coniférylique substitué par un groupement propargyle (G_{ALK}) comporte trois étapes, dont l'étape clé est une alkylation régiosélective du phénol en position

*meta*²⁸² (figure 78). Elle débute par l'estérification de Fischer de l'acide caféique commercial **1** par le méthanol en présence d'acide sulfurique comme catalyseur. Le composé **2** ainsi obtenu est déprotoné par un excès d'hydrure de sodium, puis le phénolate en position *meta* est sélectivement alkylé par le bromure de propargyle. Il est effectivement plus nucléophile que le phénolate en *para* car ce dernier est conjugué via le cycle aromatique à l'ester α,β -insaturé, électroattracteur par résonance. L'ester de la molécule **3** est ensuite réduit en alcool par un excès d'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) dans un solvant polaire, le tétrahydrofurane (THF). Le composé **4** correspondant au rapporteur G_{ALK} est obtenu avec un rendement global de 42 % pour trois étapes.

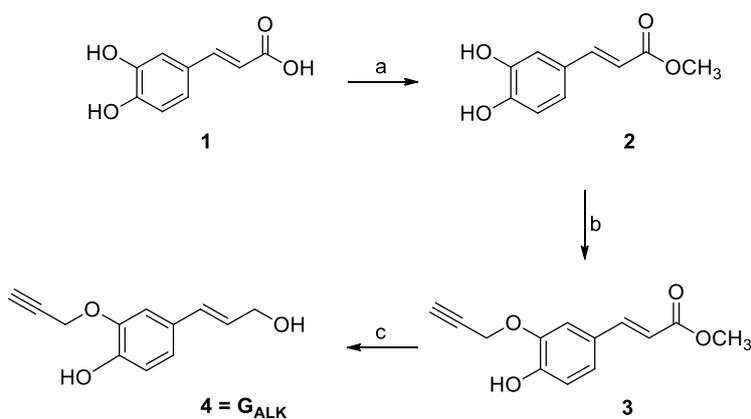


Figure 78 : stratégie de synthèse de l'analogue de l'alcool coniférylique G_{ALK} . Réactifs et conditions : a) MeOH, H₂SO₄, reflux, 99 % ; b) bromure de propargyle, NaH, DMSO, ta, 53 % ; c) DIBAL-H, THF, 0°C, 80 %.

b. Synthèse de H_{AZ}

La synthèse de l'analogue de l'alcool *p*-coumarylique portant une fonction azoture (H_{AZ}) comporte six étapes (figure 79). Cela débute à nouveau par une estérification de Fischer de l'acide *p*-coumarylique commercial **5** par le méthanol en présence d'acide sulfurique pour donner l'ester **6**²⁸⁶. La fonction phénol est alors protégée sous forme d'éther silylé par le chlorure de triisopropylsilyle (TIPSCl) en présence d'imidazole pour donner le composé **7**²⁸⁷. Son ester est ensuite soumis à une réduction en alcool primaire **8** par un excès de DIBAL-H dans le THF²⁸². L'alcool **8** est alors converti en son analogue bromé **9** en présence de PBr₃²⁸⁸. La réaction suivante, étape clé de cette synthèse, a fait l'objet d'une optimisation des conditions réactionnelles (choix du solvant et de la base, temps de réaction ; tableau récapitulatif en annexe 1). Il s'agit d'une réaction de Williamson : le 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol commercial est déprotoné par le NaH dans du THF pour former l'alcoolate correspondant qui réagit avec le composé bromé **9** selon une substitution nucléophile d'ordre 2. Deux produits sont formés : le composé **10** attendu est obtenu en minorité (5 %) alors que le composé **11** correspondant à une déprotection du phénol du composé **10** est majoritaire (21 %). Le composé **11** étant le composé final (H_{AZ}), il a été isolé et purifié par chromatographie. Cette réaction secondaire pourrait être due à une seconde substitution nucléophile de l'alcoolate restant sur le triisopropylsilyle du

composé **10** et suggère que ce groupement protecteur n'est pas assez stable dans le cadre de cette réaction, bien que cette hypothèse n'ait pas été vérifiée. Dans le cadre d'une approche méthodologique, le rendement de cette étape pourrait être amélioré en essayant un groupement silylé plus encombré tel que le *tert*-butyldiphénylesilyle. Cependant, le composé final **11** qui a été purifié lors de cette étape puis lors de la déprotection du composé **10** au fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF)²⁸⁸, (rendement de 91 %), a été obtenu en quantités largement suffisantes pour entreprendre les travaux de mise au point des réactions bioorthogonales, de l'incorporation biologique et de l'imagerie sur plante. Le composé **11** nommé H_{AZ} a été obtenu avec un rendement global de 2,7 % pour six étapes.

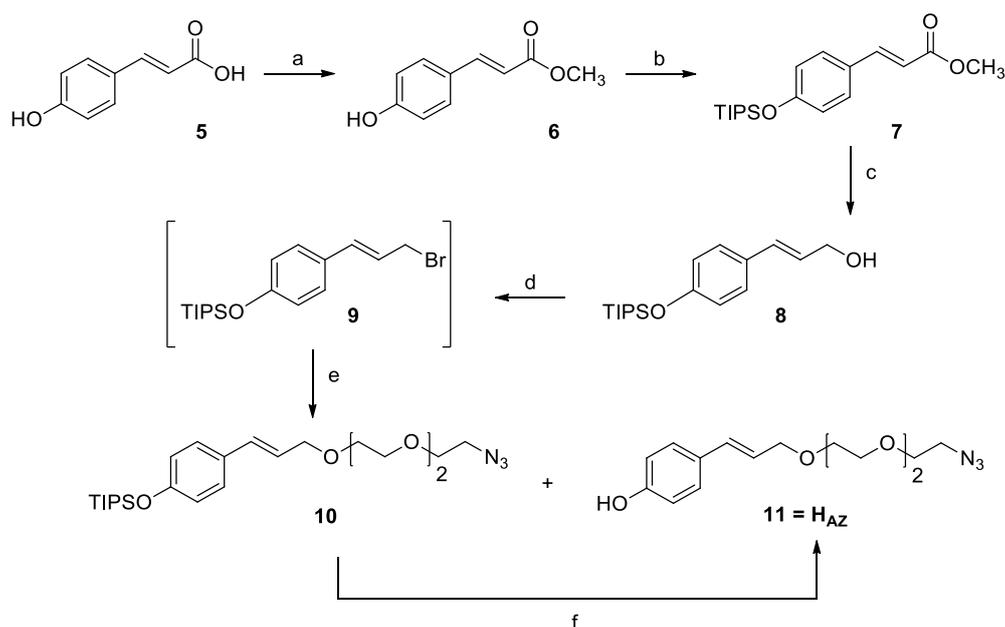


Figure 79 : stratégie de synthèse de l'analogue de l'alcool *p*-coumarylique H_{AZ}.

Réactifs et conditions : a) MeOH, H₂SO₄, reflux, 96 % ; b) DMF, imidazole, TIPSCl, 0°C à ta, 99 % ; c) DIBAL-H, THF, 0°C, 63 % ; d) PBr₃, Et₂O, 0°C, n.d. ; e) NaH, THF, 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol, 0°C à ta, 5 % sur deux étapes (composé **11** également obtenu avec un rendement de 21 %) ; f) TBAF, THF, 0°C, 91 %.

c. Synthèse de S_{ALKE} et S_{CP}

Synthèse de l'intermédiaire **15** commun aux deux analogues

Les deux analogues de l'alcool sinapylique présentent une synthèse similaire jusqu'au composé **15** (figure 80). L'acide sinapique commercial **12** est tout d'abord estérifié par du méthanol en présence d'acide sulfurique²⁸⁹. Le phénol du composé **13** obtenu est ensuite protégé sous forme d'éther silylé par le TIPSCl en présence d'imidazole pour donner le composé **14**²⁸⁷. L'ester **14** est réduit par un excès de DIBAL-H dans le THF pour former l'alcool **15** en tant qu'intermédiaire des deux voies de synthèse²⁸².

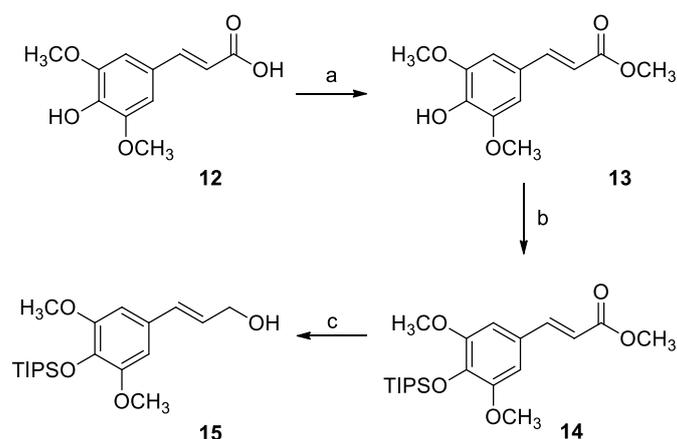


Figure 80 : stratégie de synthèse de l'intermédiaire **15** commun aux deux analogues de l'alcool sinapylique (S_{CP} et S_{ALKE}).
Réactifs et conditions : a) MeOH, H₂SO₄, reflux, 95 % ; b) DMF, imidazole, TIPSCl, 0°C à ta, 96 % ;
c) DIBAL-H, THF, 0°C, 77 %.

Synthèse de S_{ALKE}

L'éther monoallylique du diéthylène glycol **16** réagit par une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 avec le chlorure de tosylate en présence de triéthylamine (TEA), dans le but de convertir la fonction alcool en groupe partant²⁹⁰ (molécule **17**). L'alcool **15** est déprotoné par l'hydrure de sodium puis réagit avec le composé activé **17** par une seconde substitution nucléophile d'ordre 2²⁹⁰. Le composé **18** obtenu est ensuite déprotégé par du TBAF pour obtenir la molécule **19** correspondant au rapporteur S_{ALKE} final²⁸⁸ (figure 81). Cette synthèse à partir de l'alcool sinapylique commercial présente un rendement global de 25 % pour six étapes.

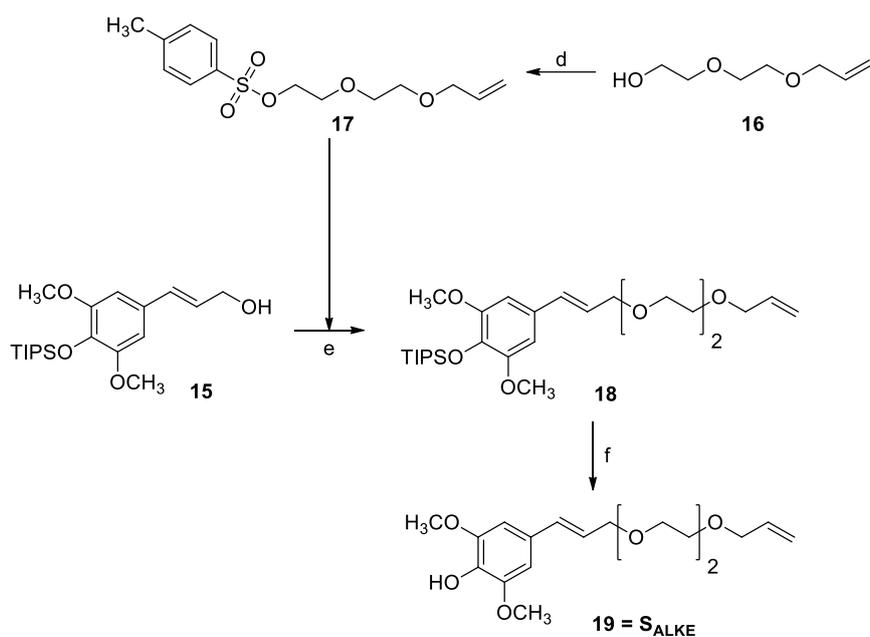


Figure 81 : stratégie de synthèse de l'analogue *S*_{ALKE} à partir de l'intermédiaire **15**. Réactifs et conditions : d) chlorure de tosyloyle, TEA, DCM, 0°C puis ta, 91 % ; e) composé **17**, NaH, THF, reflux puis ta, 36 % ; f) TBAF, THF, 0°C, 99 %.

Synthèse de *S*_{CP}

L'intermédiaire de synthèse **15** réagit avec le bromoacétate de *tert*-butyle par une synthèse de Williamson en mélange biphasique (toluène-eau) à l'aide du bromure de tétra-*n*-butylammonium (TBAB) comme agent de transfert de phase. L'ester *tert*-butylique du composé **20** formé est déprotégé à l'aide d'hydroxyde de lithium pour libérer l'acide carboxylique **21**. Ce dernier peut alors former une liaison peptidique avec l'amine de la [2-méthyl-3-(triméthylsilyl)cycloprop-2-en-1-yl]méthanamine en présence de PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium) comme agent de couplage²⁸¹. Le phénol et le méthylcyclopropène du composé **22** obtenu sont déprotégés simultanément par du TBAF pour donner la molécule finale **23** correspondant au rapporteur *S*_{CP} (figure 82). Cette synthèse à partir de l'alcool sinapylique commercial présente un rendement global de 12 % pour sept étapes.

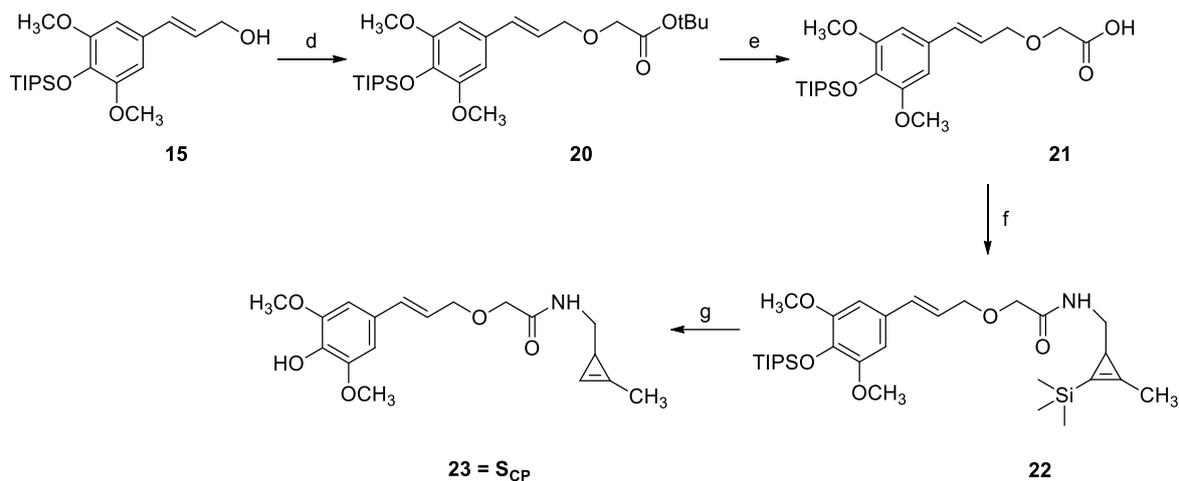


Figure 82 : stratégie de synthèse de l'analogue S_{CP} à partir de l'intermédiaire **15**. Réactifs et conditions : d) bromoacétate de *tert*-butyle, NaOH, TBAB, H₂O-toluène, ta, 75 % ; e) LiOH, H₂O-EtOH, 0°C à ta, 95 % ; f) [2-méthyl-3-(triméthylsilyl)cycloprop-2-en-1-yl]méthanamine, PyBOP, DIEA, DMF-DCM, 0°C à ta, 67 % ; g) TBAF, THF, 0°C, 35 %.

4. Mise au point des réactions de ligation bioorthogonale par HPLC

Une fois chaque rapporteur synthétisé, il faut vérifier que chaque réaction de ligation bioorthogonale entre son étiquette chimique et le partenaire de couplage porté par un fluorophore est effective en milieu aqueux. Cela a été réalisé pour les rapporteurs chimiques H_{AZ} (couplage de type SPAAC), S_{ALK} et S_{CP} (couplage de type DA_{inv}) par chromatographie liquide en phase inverse (HPLC). L'analogue G_{ALK} ayant déjà été validé par l'équipe de Zhu²⁸², l'efficacité de sa réaction de couplage de type CuAAC n'a pas été vérifiée en solution. Cet analogue a de ce fait directement été testé dans des expériences d'incorporation métabolique.

Pour chaque réaction de ligation bioorthogonale, les échantillons ont été analysés avec une colonne phase inverse de type C₁₈ et une détection dans l'UV à 254 nm. Le programme d'éluion est basé sur un gradient eau/méthanol 90 % (90:10 à 10:90). Le fluorophore est généralement ajouté en excès par rapport au rapporteur chimique afin de suivre la disparition de ce dernier.

a. Choix des fluorophores

Le choix des fluorophores pour chaque réaction de ligation bioorthogonale s'est fait selon plusieurs critères : i) la compatibilité des spectres d'excitation et d'émission en prévision d'un triple marquage, ii) les sources laser disponibles sur les microscopes confocaux utilisés, iii) la disponibilité du fluorophore fonctionnalisé par le groupement réactif adapté à chaque réaction bioorthogonale et iv) les caractères physico-chimiques des fluorochromes (photostabilité, coefficient d'extinction molaire ϵ). Les fluorophores sélectionnés ainsi que certaines de leurs caractéristiques sont ainsi représentés dans le tableau 1 (structures chimiques disponibles en annexe 2).

Tableau 1 : choix des fluorophores pour chaque réaction de ligation bioorthogonale.

Fluorophore	Réaction de ligation bioorthogonale	Groupe réactif	Longueurs d'onde	ϵ moyen (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Azide-fluor 545	CuAAC (G_{ALK})	azoture	λ_{Exc} : 546 nm λ_{Em} : 565 nm	92 000
DBCO-PEG ₄ -Rhodamine Green	SPAAC (H_{AZ})	cyclooctyne	λ_{Exc} : 501 nm λ_{Em} : 526 nm	74 000
Tétrazine-Cy5	DAinv (S_{ALKE} , S_{CP})	tétrazine	λ_{Exc} : 649 nm λ_{Em} : 670 nm	250 000

b. Suivi de la réaction SPAAC

Pour le rapporteur H_{AZ}, la réaction de ligation SPAAC se fait théoriquement entre sa fonction azoture et le groupement cyclooctyne porté par le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green (figure 83). Cette cycloaddition [3+2] permet la formation d'un triazole stable et inerte.

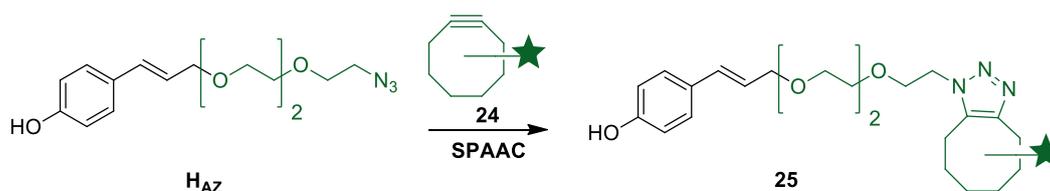


Figure 83 : réaction de ligation SPAAC réalisée en solution. L'analogue de l'alcool *p*-coumarylique H_{AZ} réagit avec le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green dans de l'eau pour former le cycloadduit **25**.

La réaction a été réalisée en solution aqueuse en présence d'un excès de fluorophore (4 équivalents molaires). Le chromatogramme obtenu montre une réaction totale au bout de 2 heures d'agitation à température ambiante, caractérisée par la disparition complète du monomère H_{AZ} et l'apparition de deux pics correspondant aux deux régioisomères du cycloadduit **25** résultant de la SPAAC (figure 84C). De plus, le cycloadduit a pu être caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (m/z [M+H]⁺ calculé = 1186,50 ; mesuré = 1186,82, annexe 3). Il convient de préciser que l'absence de régiosélectivité de la SPAAC n'est pas un problème dans le cadre de nos applications d'imagerie.

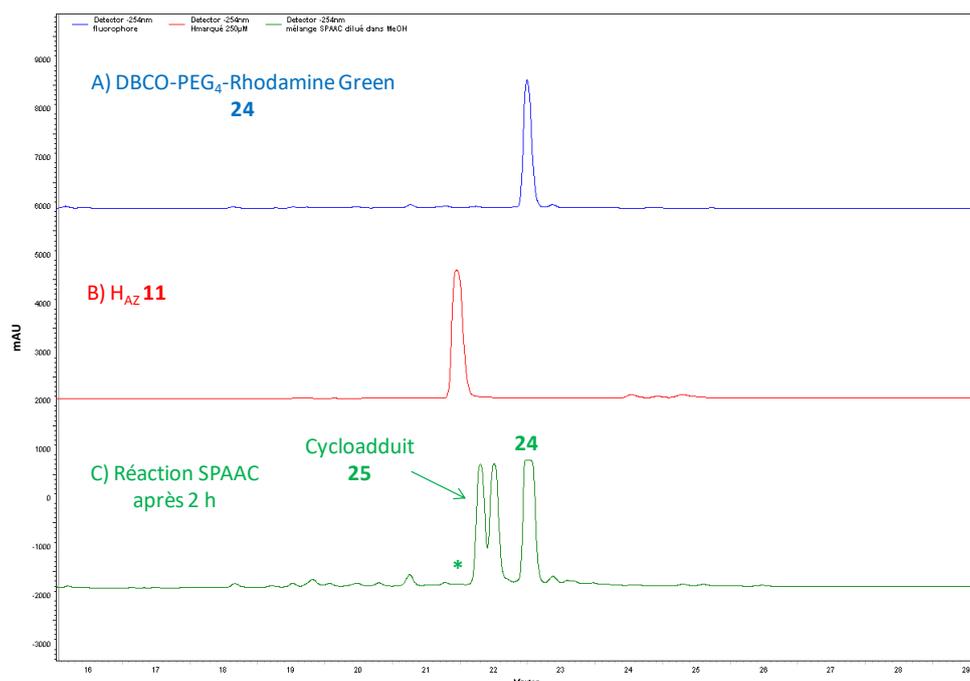


Figure 84 : suivi de la réaction de ligation SPAAC entre le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** et le rapporteur H_{AZ} par HPLC en phase inverse avec une détection dans l'UV à 254 nm. Chromatogrammes (A) : fluorophore **24** et (B) : rapporteur H_{AZ}. Chromatogramme (C) : ajout de 4 équivalents de fluorophore **24** à une solution aqueuse de H_{AZ}. Après 2 h de réaction, le mélange réactionnel est dilué dans du MeOH puis injecté en HPLC.

Un suivi plus détaillé de la cinétique de couplage de la SPAAC a également été réalisé par HPLC à l'aide d'un détecteur à fluorescence. Lorsque le monolignol est ajouté en excès par rapport au fluorophore, la réaction est aussi totale au bout de 2 heures (annexe 3).

c. Suivi de la réaction de DAinv

Suivi de la réaction avec le rapporteur S_{ALKE}

Le monomère S_{ALKE} constitue le premier analogue du monolignol S synthétisé. Son groupement alcène terminal doit théoriquement réagir avec le groupement tétrazine d'un fluorophore par une réaction de DAinv. En effet, bien qu'ils soient moins réactifs que les alcènes tendus, les alcènes terminaux ont permis la réalisation de ligations de DAinv efficaces pour le marquage des biomolécules. Par exemple, plusieurs dérivés de ManNAc portant un alcène terminal ont été localisés dans des cultures cellulaires après leur ligation à des tétrazines fluorescentes⁹⁰. De plus, le diénophile en question apparaît comme moins encombrant et plus simple à introduire lors de la synthèse du rapporteur chimique par rapport aux alcènes cycliques généralement utilisés (*trans*-cyclooctène, norbornène). Les alcènes cycliques à faible encombrement stérique tels que le cyclopropène n'étaient pas disponibles commercialement à ce stade du projet et demandaient une synthèse plus complexe.

La réaction de ligation bioorthogonale de DAinv a été effectuée en présence du fluorophore tétrazine-Cy5 et suivie par HPLC. Différentes conditions ont été testées en faisant varier : la concentration en fluorophore (en excès ou en défaut), le temps de réaction (de 1 h à plusieurs jours) ou

la température (avec ou sans chauffage), (annexe 4). La ligation n'a toutefois jamais été observée entre l'alcène terminal et la tétrazine ni par HPLC, ni par spectrométrie de masse. Cette absence de réactivité de la part du rapporteur S_{ALKE} pourrait être due à l'effet électroattracteur par induction de l'oxygène adjacent au motif vinylique. Ce problème aurait pu être résolu en synthétisant un nouveau rapporteur comportant deux méthylènes entre la double liaison et l'éther, comme cela a été suggéré par des études portant sur des analogues monosaccharidiques⁹¹. Cependant, nous avons opté pour un diénophile de type méthylcyclopropène comme étiquette chimique car des réactifs de base présentant ce motif sont devenus disponibles entre-temps. Bien que le méthylcyclopropène soit un peu plus encombrant que l'alcène terminal, il présente une cinétique plus favorable grâce à sa tension de cycle. L'analogue alternatif S_{CP} a donc été synthétisé (figure 85).

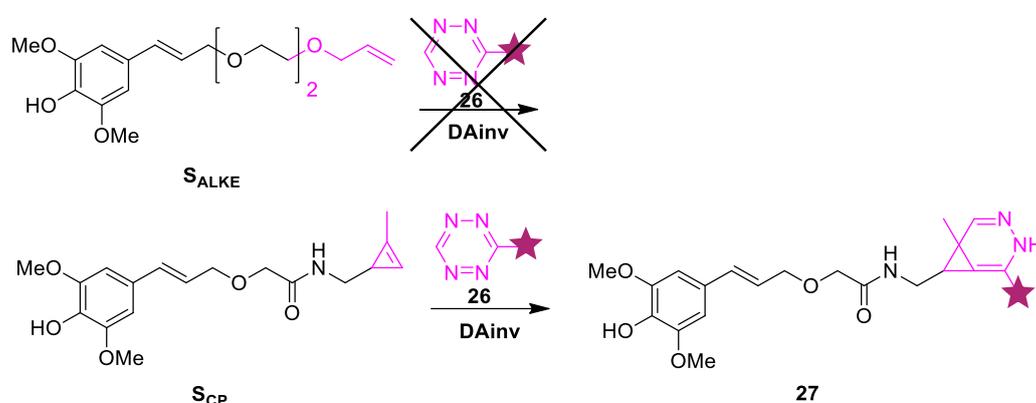


Figure 85 : réaction de DAinv réalisée en solution. L'analogue de l'alcool sinapylique portant un alcène terminal (S_{ALKE}) s'est révélé trop peu réactif pour réagir avec le fluorophore tétrazine-Cy5. Le second analogue possédant un groupement méthylcyclopropène (S_{CP}) a réagi avec succès avec le fluorophore dans de l'eau pour former le produit conjugué **27**.

Suivi de la réaction de DAinv avec le rapporteur S_{CP}

La réaction de DAinv a donc été mise en œuvre en solution aqueuse et suivie par HPLC en ajoutant dans le milieu réactionnel la tétrazine-Cy5 en excès par rapport au rapporteur S_{CP} (2 équivalents molaires), (figure 86C). Les résultats confirment une réaction totale au bout d'1 heure d'agitation à température ambiante en conditions aqueuses (et au bout de 2 heures dans un mélange MeOH/eau 1:1). La disparition du monomère S_{CP} peut être observée parallèlement à l'apparition du produit conjugué **27** résultant du couplage entre son méthylcyclopropène et le groupement tétrazine du fluorophore. De plus, le produit formé est également visible par spectrométrie de masse MALDI TOF (m/z $[M+Na]^+$ calculé = 1153,44 ; mesuré = 1153,39, annexe 5).

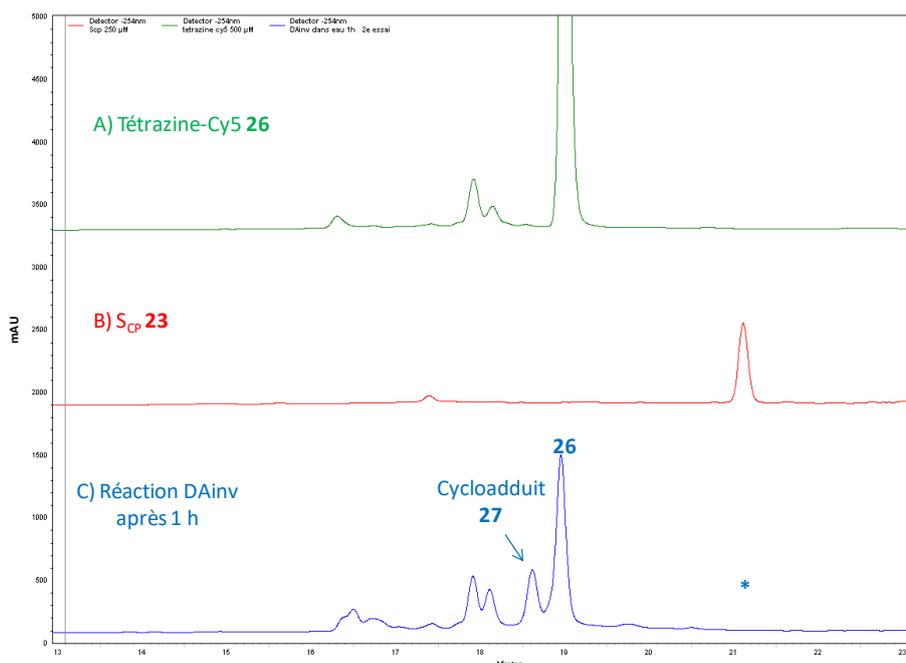


Figure 86 : suivi de la réaction de ligature de DAinv entre le fluorophore tétrazine-Cy5 **26** et le rapporteur SCP par HPLC en phase inverse avec une détection dans l'UV à 254 nm. Chromatogrammes (A) : fluorophore **26** et (B) : rapporteur SCP. Chromatogramme (C) : ajout de 2 équivalents de fluorophore **26** à une solution aqueuse de SCP. Après 1 h de réaction, le mélange réactionnel est injecté en HPLC.

d. Conclusion

D'après les suivis par HPLC des réactions de ligature bioorthogonale des rapporteurs H_{AZ} et SCP avec leurs fluorophores respectifs, les réactions SPAAC et DAinv sont effectives en milieu aqueux et sont donc transposables à des tests biologiques sur tissus végétaux. Cependant, les cinétiques mises en évidence ne peuvent être extrapolées à celles des tests biologiques réalisés car l'environnement est bien plus complexe. En effet, les monolignols modifiés vont être incorporés dans un polymère insoluble de la paroi végétale et ce en présence d'une multitude d'autres biomolécules. Le choix des rapporteurs chimiques est donc validé, mais les conditions réactionnelles (concentrations, temps, *etc.*) doivent être optimisées sur modèles végétaux pour chaque analogue monomérique.

5. Application sur modèle végétal

a. Le lin comme modèle d'étude de la lignification

Intérêt scientifique et économique

Le lin (*Linum usitatissimum* L.) a été choisi comme principal modèle d'étude de la dynamique de la lignification car il présente des proportions en lignine très contrastées entre deux types tissulaires au sein d'un même organe, la tige. En effet, les fibres périphloémiennes présentes au niveau des tissus externes ont la particularité d'être hypolignifiées : bien qu'elles présentent une paroi secondaire épaisse,

ces cellules ne contiennent que 4 % de lignine. *A contrario*, le xylème formant la majorité des tissus internes est composé de 30 % de lignine^{136,285}. Cette teneur en lignine contrastée entre les tissus externes et internes de la tige est une spécificité du lin (et de quelques autres plantes à fibres telles que le chanvre) et suggère une lignification très régulée. De plus, le lin présente un intérêt économique important car ses fibres sont utilisées dans l'industrie textile ou encore pour remplacer les fibres de verre difficilement recyclables dans les matériaux composites. Il peut aussi être cultivé pour extraire l'huile produite par ses graines car elle entre dans la composition de peintures, de vernis ou de revêtements de sol.

Organisation tissulaire de la tige de lin

Le lin fait parti des angiospermes dicotylédones. Cela signifie d'une part que c'est une plante vasculaire dont les organes reproducteurs sont portés par des fleurs, d'autre part qu'elle porte deux cotylédons. Les plantes vasculaires comme le lin sont caractérisées par deux types de tissu conducteur : le phloème et le xylème. Le phloème transporte la sève élaborée des feuilles vers les racines. Il se compose de cellules conductrices vivantes ainsi que de cellules parenchymateuses et peut être associé aux fibres périphloémiennes. Le xylème transporte quant à lui la sève brute des racines vers les autres organes de la plante. Ce tissu contient des cellules parenchymateuses vivantes mais surtout des cellules mortes aux parois lignifiées pour le transport et/ou le soutien mécanique : les fibres trachéides, les vaisseaux et les rayons.

L'observation au microscope d'une coupe transversale de tige de lin permet de situer ses différents tissus (figure 87). De l'extérieur vers l'intérieur sont présents l'épiderme, couche la plus externe jouant un rôle de protection, puis le parenchyme cortical (ou cortex) qui est un tissu de stockage. Les fibres périphloémiennes hypolignifiées apparaissent sous forme de massif au-dessus du phloème secondaire, lui-même suivi par le xylème secondaire (ou bois). Le centre de la tige se termine par des cellules constituant le parenchyme médullaire (ou moelle) et par une cavité centrale (lacune).

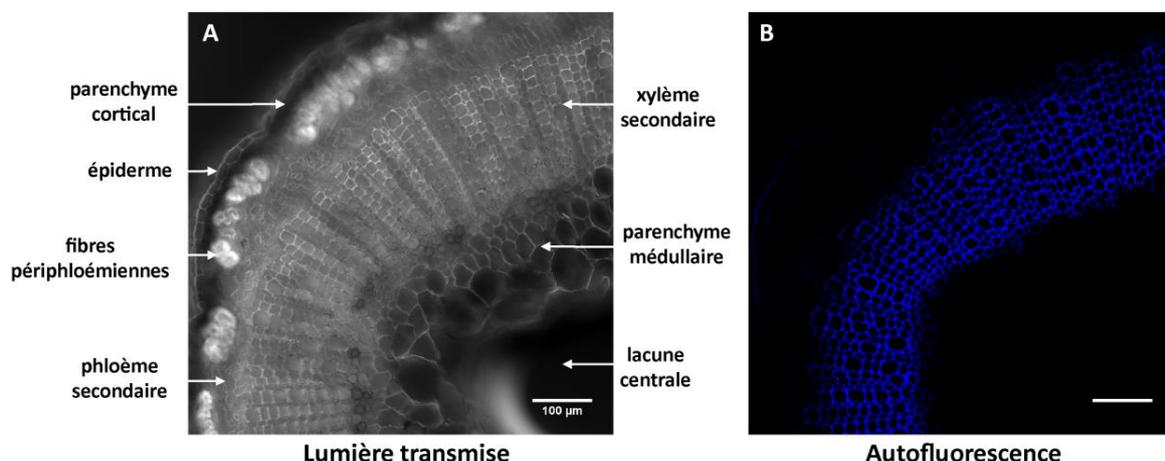


Figure 87 : observation d'une coupe transversale de tige de lin âgé de 2 mois en microscopie confocale. (A) Visualisation de son organisation tissulaire en lumière transmise. (B) Autofluorescence des polymères de lignine excités à 405 nm.

b. Protocole de mono-marquage sur coupes végétales

Remarque : pour chaque stratégie de marquage des rapporteurs chimiques, les contrôles négatifs des acquisitions microscopiques sont présentés en annexe 7.

Après avoir démontré l'efficacité de chaque réaction de ligation bioorthogonale en solution, l'absence de toxicité des rapporteurs inédits H_{AZ} et S_{CP} a été confirmée en cultivant des plantules de lin en présence des monomères d'intérêt (annexe 6). La stratégie du rapporteur chimique peut donc être appliquée sur le modèle du lin adulte (âgé de deux mois environ). Le premier type d'expérience envisagé comporte les étapes suivantes : des coupes transversales d'organes (tige ou racine) sont incubées dans une solution comportant le rapporteur chimique d'intérêt (G_{ALK}, H_{AZ} ou S_{CP}) pour qu'il puisse être reconnu par les enzymes oxydatives et incorporé au sein de la lignine par polymérisation radicalaire. Après une série de lavages permettant d'éliminer les rapporteurs non incorporés, les sections végétales sont à nouveau incubées dans une solution contenant le fluorophore spécifique selon la réaction de ligation bioorthogonale appropriée (CuAAC pour G_{ALK}, SPAAC pour H_{AZ} ou DAinv pour S_{CP}). De nouveaux lavages sont effectués pour éliminer le fluorophore n'ayant pas réagi, puis les coupes sont montées entre lame et lamelle. La distribution des rapporteurs chimiques polymérisés dans la lignine est alors visualisée par microscopie confocale de fluorescence.

c. Optimisation du protocole

Pour chaque rapporteur chimique, le mono-marquage sur coupe de tige de lin a d'abord été mis au point. Pour chaque condition optimisée, l'expérience a été réalisée en faisant varier un seul paramètre à la fois (concentration en fluorophore, durée de la réaction de ligation, lavage post-couplage, *etc.*). Le but est d'abord d'obtenir un signal de fluorescence spécifique tout en améliorant le rapport signal sur bruit afin de minimiser le signal aspécifique. Lorsque plusieurs valeurs donnent le même signal de fluorescence pour un paramètre donné, la valeur inférieure est choisie de manière à diminuer les temps de réaction de ligation avec les fluorophores ou les concentrations en réactifs nécessaires. Le tableau 2 résume par exemple les différentes conditions testées pour le mono-marquage des unités H_{AZ} par la cycloaddition de type SPAAC.

Tableau 2 : optimisation de la réaction de ligation bioorthogonale de type SPAAC pour le mono-marquage des unités H_{AZ}. MS ½ correspond à un milieu de culture nutritif à base aqueuse pour les plantes. Les conditions finales choisies sont en gras.

Durée de la réaction	[DBCO-PEG ₄ -Rhodamine Green]	Lavages post-couplage
1 h	0,5 µM	4 x MS ½ ;
5 h	1 µM	2 x MS ½ + EtOH 95 % (1 h) + 4 x MS ½
24 h	5 µM	2 x MS ½ + MeOH 70 % (1 h) + 4 x MS ½
	20 µM	

Concernant le marquage des unités G_{ALK} par la réaction bioorthogonale de type CuAAC, la mise au point des concentrations du système catalytique ascorbate de sodium/sulfate de cuivre pentahydraté a fait l'objet d'une attention particulière afin d'obtenir une réaction efficace en un temps relativement court (1 h de réaction). L'utilisation d'un ligand tétravalent du cuivre tel que le BTTAA ne s'est pas avérée nécessaire car les résultats obtenus avec et sans sa présence sont similaires (annexe 8). De même, l'équipe de Zhu a constaté que le marquage métabolique de l' Ac_4FucAl sur plantules d'*Arabidopsis thaliana* n'est pas amélioré en présence de BTTAA⁹⁵. Cela peut s'expliquer par un problème de diffusion du ligand dans les parois végétales, sa structure amphiphile portant des charges négatives qui pourraient être repoussées par celles des ions carboxylates des polysaccharides pariétaux.

L'ensemble des expériences d'optimisation des mono-marquages des unités G_{ALK} , H_{AZ} et S_{CP} est disponible en annexes 8, 9 et 10.

d. Protocole standard sur coupes de tiges de lin

Une fois les différents paramètres optimisés pour chaque mono-marquage, voici le protocole standard obtenu pour chaque rapporteur chimique :

- des coupes transversales de tiges de lin, d'une épaisseur de 150-250 μm , sont réalisées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir. Elles sont immédiatement plongées dans une solution de milieu de culture MS $\frac{1}{2}$ (Murashige et Skoog dilué au demi) afin de ne pas se dessécher ;
- les coupes végétales fraîches sont directement incubées avec le rapporteur chimique d'intérêt (H_{AZ} , G_{ALK} ou S_{CP}) à 10 μM durant 20 h ;
- une série de quatre lavages avec du milieu MS $\frac{1}{2}$ permet d'éliminer l'excédent de rapporteur chimique ;
- les coupes végétales sont incubées durant 1 h avec le fluorophore d'intérêt à 5 μM selon la réaction de ligation bioorthogonale appropriée (DBCO-PEG₄-Rhodamine Green lors de la SPAAC pour H_{AZ} , tétrazine-Cy5 lors de la DAInv pour S_{CP} et enfin azide fluor 545 accompagné du système catalytique ascorbate de sodium/sulfate de cuivre pentahydraté lors de la CuAAC pour G_{ALK}) ;
- une nouvelle série de 6 lavages avec du milieu MS $\frac{1}{2}$ incluant une incubation dans du MeOH à 70 % pendant 1 h permet d'éliminer l'excédent de fluorophore ;
- les sections végétales sont montées entre lame et lamelle pour être observées par microscopie confocale de fluorescence.

Des contrôles négatifs sont réalisés en parallèle de chaque expérience et reposent sur le même protocole en remplaçant chaque rapporteur chimique par son analogue naturel (H_{NAT} , G_{NAT} ou S_{NAT}). Pour une même expérience, les images sont acquises avec les mêmes réglages de microscopie afin de pouvoir les comparer entre elles.

e. Signification biologique

En mettant en évidence uniquement la lignine *de novo* polymérisée à partir des rapporteurs chimiques exogènes, la stratégie du rapporteur chimique permet de la différencier de la lignine préexistante dans les parois. Contrairement aux techniques classiques d'imagerie du polymère (autofluorescence, histochimie, immunolocalisation, *etc.*), cette méthode permet de distinguer les cellules dont les parois sont soumises à un processus de lignification actif et qui produisent de la lignine à l'instant t de l'incorporation métabolique, des cellules plus matures dont la lignification a cessé. Cela peut notamment permettre de localiser les zones tissulaires où les laccases et/ou peroxydases sont actives, leur présence étant nécessaire à la polymérisation des rapporteurs chimiques.

Pour chaque analogue de monolignol, le marquage métabolique a tout d'abord permis de visualiser les zones actives de la lignification au niveau de sections de tiges de lin. Par exemple, pour les unités H_{AZ} incorporées au sein du polymère (figure 88, ligne A), une fluorescence significative est visible dans l'ensemble du xylème secondaire (xy). C'est effectivement un tissu vasculaire typiquement lignifié des tiges et racines afin de transporter la sève brute et de fournir aux tissus un soutien mécanique nécessaire au port dressé de la plante. La même expérience réalisée en parallèle en l'absence de rapporteurs chimiques ne présente pas de fluorescence significative, confirmant que le marquage observé en présence de monomères H_{AZ} est spécifique à leur incorporation (ligne B).

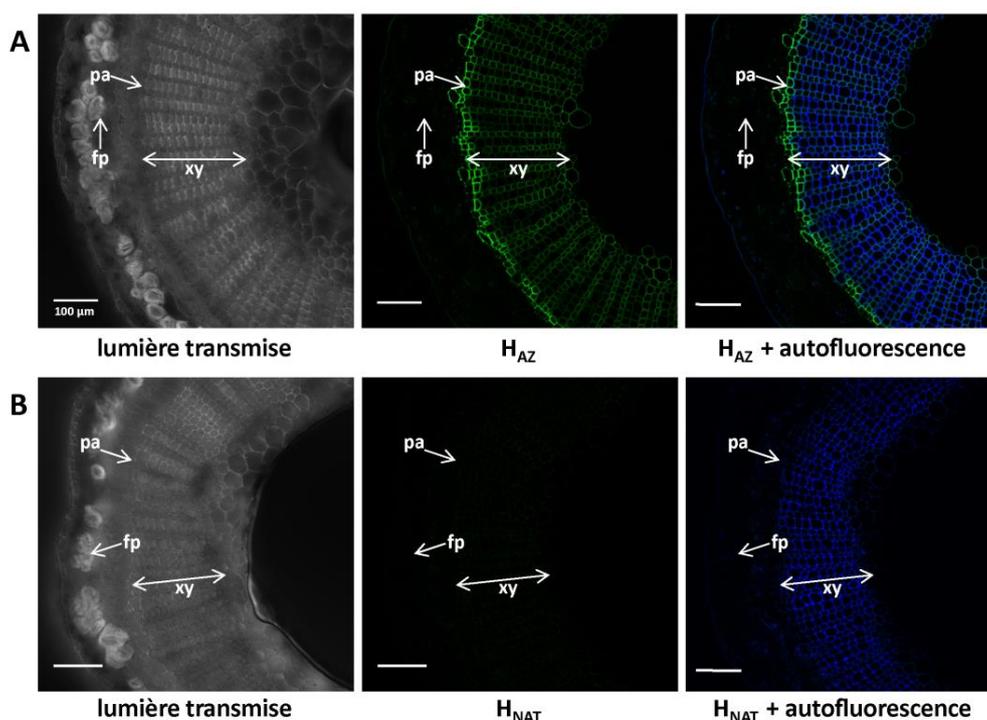


Figure 88 : mono-marquage des unités H_{AZ} . Coupes transversales de tige de lin de 2 mois, incubées pendant 20 h avec (A) 10 μM de monolignol naturel H_{NAT} (contrôle négatif) ou (B) 10 μM de rapporteur H_{AZ} , puis avec (A-B) 5 μM de DBCO-PEG₄-Rhodamine Green (λ_{Exc} : 501 nm/ λ_{Em} : 526 nm) pendant 1 h. xy = xylème secondaire, pa = premières assises cellulaires, fp = fibres périphloémiennes.

Le marquage des unités H_{AZ} est plus intense au niveau des premières assises cellulaires du xylème (ligne A, pa). En effet, ce sont les plus jeunes cellules qui se sont divisées à partir de l'assise cambiale et qui sont en cours de différenciation. Très actives, elles synthétisent un maximum de lignine et incorporent donc plus rapidement les monolignols modifiés dans leur paroi par rapport aux cellules plus matures du xylème secondaire.

Concernant le mono-marquage des unités G_{ALK} et S_{CP}, les résultats sont similaires avec une incorporation des rapporteurs chimiques dans l'ensemble du xylème secondaire et un signal plus intense dans les premières assises cellulaires en cours de différenciation (figure 89).

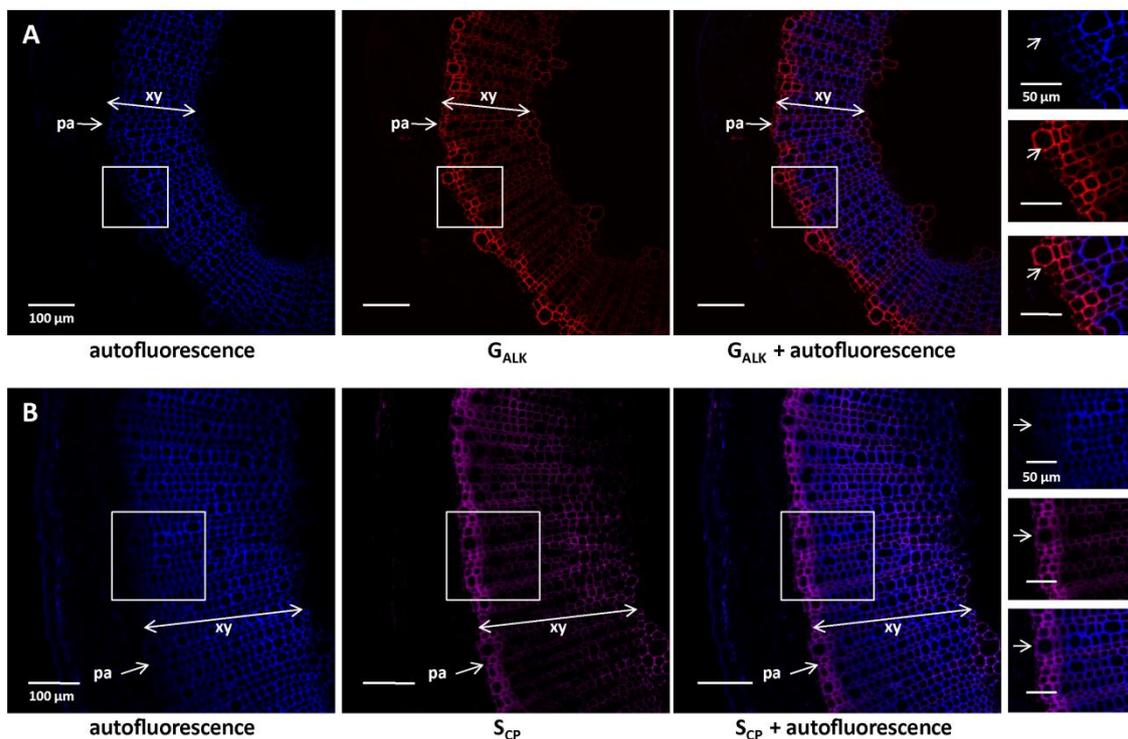


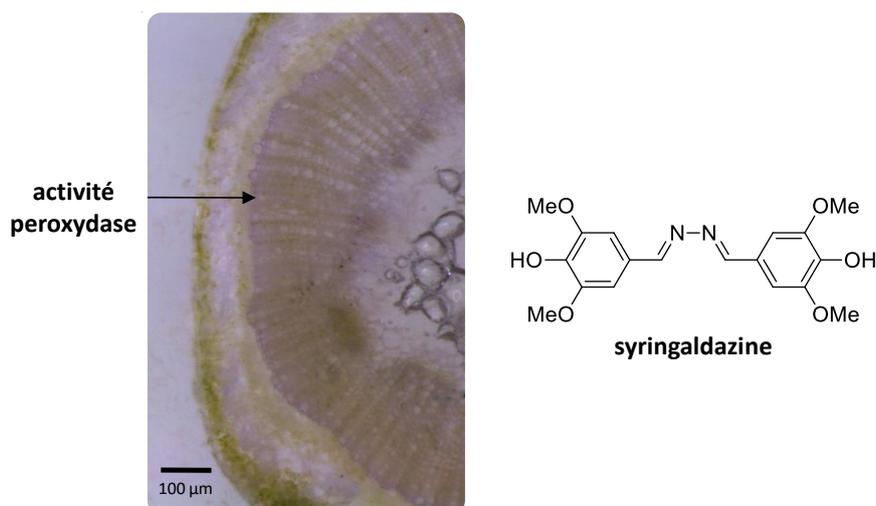
Figure 89 : mono-marquage des unités (A) G_{ALK} et (B) S_{CP}. Coupes transversales de tige de lin de 2 mois incubées pendant 20 h avec 10 µM de rapporteur (A) G_{ALK} ou (B) S_{CP}, puis pendant 1 h avec 5 µM de fluorophore (A) azide fluor 545 (λ_{Exc} : 546 nm/ λ_{Em} : 565 nm) ou (B) tétrazine-Cy5 (λ_{Exc} : 649 nm/ λ_{Em} : 670 nm). Xy = xylème secondaire, pa = premières assises cellulaires, fp = fibres périphloémiennes (fp). Droite : zooms sur les premières assises cellulaires.

La stratégie du rapporteur chimique est une technique plus sensible que l'autofluorescence de la lignine permettant de mettre en évidence les zones d'initiation de la lignification. En effet, si le polymère présente des propriétés de fluorescence intrinsèque appréciables du fait de sa structure polyaromatique, ses caractéristiques physico-chimiques sont assez pauvres²⁴⁵. Par conséquent, une quantité importante de lignine native est nécessaire pour générer un signal visible, si bien qu'aucune autofluorescence n'est détectable dans les parois cellulaires de la première assise du xylème qui initie son processus de lignification. En revanche, ces premières parois deviennent clairement visibles lors du marquage des unités G_{ALK}, S_{CP} ou H_{AZ} (figure 89, zooms, flèche blanche).

f. Spécificité de l'incorporation métabolique

Cohérence biologique des motifs de lignification

La spécificité de l'incorporation des rapporteurs chimiques dans la lignine peut être démontrée de plusieurs manières. Tout d'abord, les marquages obtenus sur coupes de tiges de lin semblent cohérents avec la biologie des végétaux : le signal de fluorescence est plus intense chez les jeunes cellules du xylème qui sont en cours de différenciation et dont la paroi est en pleine lignification. De plus, ce motif de lignification est également cohérent avec certaines expériences réalisées dans la littérature. Par exemple, la syringaldazine est un indicateur de l'activité des peroxydases et/ou des laccases²⁹¹. Lorsque ce composé chimique est appliqué sur des coupes fraîches de tiges de lin, une coloration rose-pourpre apparaît immédiatement dans les jeunes cellules de xylème adjacentes au cambium, indiquant la présence de phénoloxydases (figure 90). Les phénols de la syringaldazine sont oxydés par les laccases et/ou peroxydases en présence de leur cosubstrat, conduisant à la formation du produit pourpre. Cette activité enzymatique intense au niveau des premières assises cellulaires est cohérente avec le motif de déposition des rapporteurs chimiques et renforce l'idée d'un marquage spécifique.



Contrôle de la spécificité

Les motifs de fluorescence obtenus pour chaque rapporteur chimique semblent cohérents avec le processus de lignification. Une vérification rigoureuse de la spécificité d'incorporation de ces molécules au moyen d'expériences contrôlées reste tout de même nécessaire. Deux types d'expériences ont donc été menés afin de confirmer cette spécificité et sont présentés ici pour l'analogue S_{CP}.

Tout d'abord, des expériences de compétition ont consisté à incorporer le rapporteur S_{CP} en présence de son analogue naturel S_{NAT} en excès (100 équivalents) dans les sections de tige de lin. Les unités S_{CP} incorporées ont ensuite été liées à leur fluorophore et la fluorescence obtenue a été quantifiée. Les histogrammes obtenus indiquent une diminution significative de la fluorescence lorsque le rapporteur S_{CP} est mis en présence du monolignol S_{NAT} (figure 91A). L'intensité du signal est d'ailleurs similaire à celle du contrôle négatif. Cette compétition entre les deux substrats confirme que l'incorporation du rapporteur S_{CP} se fait sous contrôle enzymatique.

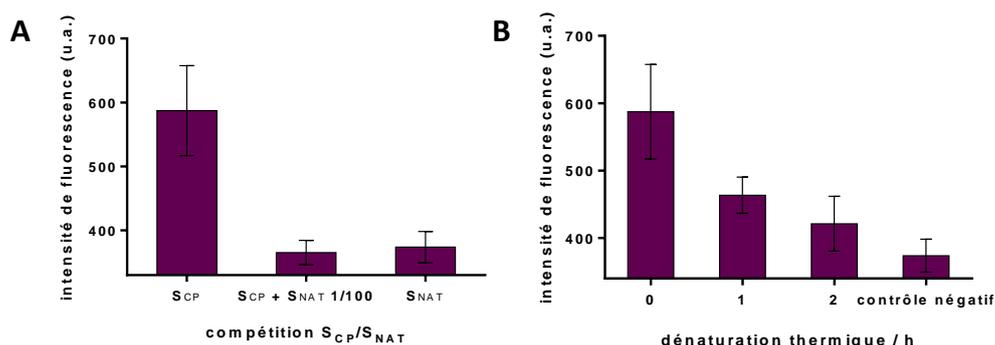


Figure 91 : spécificité de l'incorporation métabolique des unités S_{CP} . A) Expérience de compétition : coupes de tiges de lin incubées avec le rapporteur S_{CP} seul ou en présence de son analogue naturel en excès $\times 100$, avant la ligation au fluorophore tétrazine-Cy5. B) Expérience de dénaturation thermique : coupes préalablement incubées dans du MS $\frac{1}{2}$ à 90°C durant 0, 1 ou 2 h, avant l'incorporation métabolique du rapporteur S_{CP} et la ligation au fluorophore tétrazine-Cy5. Pour les expériences A et B, réalisation des acquisitions avec l'objectif 60x, puis quantification de l'intensité moyenne de fluorescence du xylème. Données moyennées à partir de 3 réplicats biologiques avec 4 coupes observées par condition.

La deuxième expérience pour démontrer le marquage spécifique des rapporteurs chimiques consiste à incuber les sections de tige fraîchement coupées à 90°C pendant 0, 1 ou 2 h. Le but est de dénaturer par la chaleur les protéines, donc les laccases et peroxydases des parois, afin de les rendre non fonctionnelles. Après cette dénaturation thermique, le protocole standard de mono-marquage est poursuivi. La quantification de fluorescence réalisée à partir de cette expérience montre une diminution significative du marquage après 1 h et davantage après 2 h de dénaturation thermique (figure 91B). Cette expérience confirme à nouveau le fait que l'incorporation des analogues de monolignols n'est pas due à leur polymérisation spontanée dans les tissus mais qu'elle fait bien intervenir le processus radicalaire de lignification initié par les phénoloxydases.

Des expériences similaires ont été menées pour prouver la spécificité d'incorporation des rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} et se trouvent en annexe 11.

Expériences dose-dépendantes

Des expériences de dose-dépendance ont également été réalisées : les coupes végétales ont été incubées avec le précurseur monomérique d'intérêt à différentes concentrations (1, 5, 10 ou 50 μM) avant l'étape de ligature au fluorophore. Pour les trois mono-marquages, les histogrammes obtenus indiquent une augmentation de l'intensité de fluorescence avec la concentration en rapporteur chimique jusqu'à atteindre un plateau pour une concentration de 10 μM (et même dès 5 μM pour H_{AZ}) (figure 92). Ce plateau suggère à nouveau une incorporation des rapporteurs sous contrôle enzymatique.

L'expérience équivalente a également été réalisée en faisant varier cette fois-ci la durée d'incubation des coupes avec les analogues monomériques. Dans le cas du triple marquage, elle présente l'apparition d'un plateau après 12 h d'incubation (annexe 11).

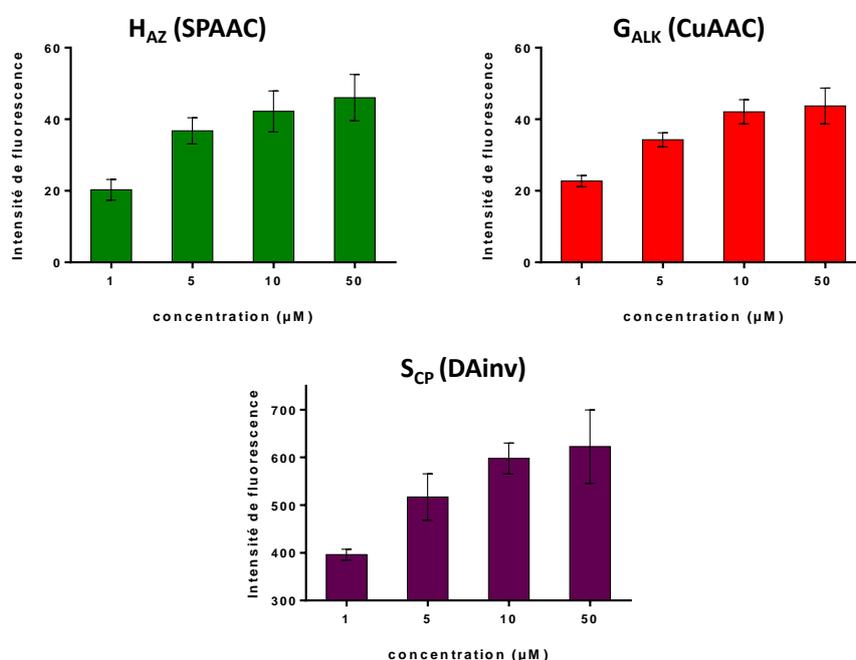


Figure 92 : incorporation dose-dépendante de chaque rapporteur chimique lors des expériences de mono-marquage. Coupes transversales de tiges de lin incubées avec 1, 5, 10 ou 50 μM de rapporteur H_{AZ} , G_{ALK} ou S_{CP} pendant 20 h, avant les étapes de ligature aux fluorophores. Réalisation des acquisitions avec l'objectif 60x, puis quantification de l'intensité moyenne de fluorescence du xylème. Données moyennées à partir de 3 réplicats biologiques avec 4 coupes observées par condition.

L'ensemble de ces expériences ont permis de démontrer la spécificité d'incorporation des rapporteurs H_{AZ} et S_{CP} au sein de la lignine pariétale. Ce sont donc des marqueurs appropriés pour étudier la dynamique de la lignification des unités H et S. De plus, ces expériences ont permis de reconfirmer la spécificité du rapporteur G_{ALK} qui est utilisé pour la première fois sur une autre plante qu'*Arabidopsis thaliana*.

II. Double marquage des unités G_{ALK} et H_{AZ}

1. Le double marquage dans la littérature

L'utilisation de deux réactions bioorthogonales pour réaliser des expériences de double marquage basées sur la stratégie du rapporteur chimique commence à se développer depuis les années 2010 avec une vingtaine de publications à l'heure actuelle. Toutefois, ces applications restent relativement rares car elles nécessitent d'utiliser deux réactions de ligation à la fois bioorthogonales et compatibles entre elles, ce qui limite les possibilités. Les paires réactionnelles les plus fréquemment utilisées chez les cellules de mammifères sont : la séquence 1.SPAAC 2.CuAAC^{292,293}, les réactions SPAAC et DA_{inv} utilisées de manière séquentielle ou simultanée^{77,85,87,294,295} et parfois la séquence 1.CuAAC 2.CuAAC²⁹⁶. Les principales classes de biomolécules ayant profité de ces doubles marquages chez les modèles mammaliens sont les glycanes suivis des acides nucléiques et des acides aminés. Chez les modèles végétaux, les exemples sont plus rares et sont répertoriés dans le tableau 3. Ils concernent tous le marquage de glycanes à la surface de plantules d'*Arabidopsis thaliana* à l'aide de deux CuAAC consécutives.

Tableau 3 : expériences de double marquage par la stratégie du rapporteur chimique recensées chez des modèles végétaux.

Réactions	Rapporteurs chimiques	Modèle d'étude	Référence
1.CuAAC 2.CuAAC	KdoN ₃ + Ac ₄ FucAl	<i>Arabidopsis thaliana</i> (plantule entière)	[¹²⁵], 2016
1.CuAAC 2.CuAAC	Ac ₄ GlcNAz + Ac ₄ FucAl	<i>Arabidopsis thaliana</i> (plantule entière)	[¹²⁶], 2016
1.CuAAC 2.CuAAC	Ac ₄ Me8AzKdo + Ac ₄ FucAl	<i>Arabidopsis thaliana</i> (plantule entière)	[⁹⁵], 2017

2. Choix des rapporteurs chimiques

Dans le cadre de cette thèse, une stratégie de double marquage a tout d'abord été mise au point avec les deux premiers rapporteurs synthétisés, soit les monomères G_{ALK} et H_{AZ}, afin de comparer leur localisation dans la lignine *de novo*. Les unités G ont été choisies car elles sont présentes en proportions majoritaires dans la lignine des espèces vasculaires en général. En effet, le rapport H/G/S déterminé par analyse de type Py-GC/MS est de 5/87/8 dans le xylème chez le lin²⁸⁵. Pour le second rapporteur à incorporer, le monolignol H a été choisi car s'il est généralement présent en plus faibles proportions au sein de la lignine, il affiche des quantités relatives plus importantes chez les fibres du lin par rapport à d'autres espèces végétales. En effet, les unités H représentent 25 % des monomères totaux libérés par analyse chimique au niveau de ses fibres, alors que leur quantité est presque négligeable dans les fibres de la majorité des autres espèces dicotylédones¹³⁶. Ces données suggèrent donc une régulation particulière de leur polymérisation.

3. Compatibilité de la séquence 1.SPAAC 2.CuAAC *in vitro*

Après avoir démontré l'efficacité des mono-marquages des monomères G_{ALK} et H_{AZ} , la première étape pour mettre en œuvre le double marquage est de vérifier la compatibilité des deux réactions de ligation aux fluorophores. La CuAAC et la SPAAC ont été choisies respectivement pour les unités G_{ALK} et H_{AZ} car elles présentent l'avantage d'être compatibles, à condition de les réaliser de manière séquentielle suivant l'ordre 1.SPAAC 2.CuAAC. En effet, la CuAAC nécessite l'ajout de cuivre pour activer la réaction entre l'alcyne porté par le rapporteur G_{ALK} et l'azoture porté par le fluorophore. Or, réaliser cette réaction en premier pourrait également engendrer des réactions secondaires de « *cross-linking* » entre l'alcyne porté par le rapporteur G_{ALK} et l'azoture porté par le monomère H_{AZ} également présent dans l'échantillon.

La compatibilité de la séquence réactionnelle 1.SPAAC 2.CuAAC a d'abord été testée *in vitro* par HPLC en phase inverse avec une détection dans l'UV à 254 nm. Pour cela, le fluorophore cyclooctyne **24** a été ajouté en excès (4 équivalents molaire) à un mélange équimolaire des rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} en solution aqueuse. Après 2 heures de réaction à température ambiante, le chromatogramme obtenu apporte plusieurs informations (figure 93C). D'une part, les unités G_{ALK} sont toujours présentes dans le mélange réactionnel et n'ont donc pas participé à une quelconque réaction secondaire durant la SPAAC. D'autre part, cette dernière est totale car on observe à la fois la disparition complète du pic correspondant au rapporteur H_{AZ} et l'apparition de deux nouveaux pics correspondant aux deux régioisomères du cycloadduit **25** formé entre le monomère H_{AZ} et le fluorophore.

Les deux réactions 1.SPAAC 2.CuAAC étant compatibles en solution selon cet ordre de réaction, la stratégie de double marquage sur tissus végétaux peut être mise au point.

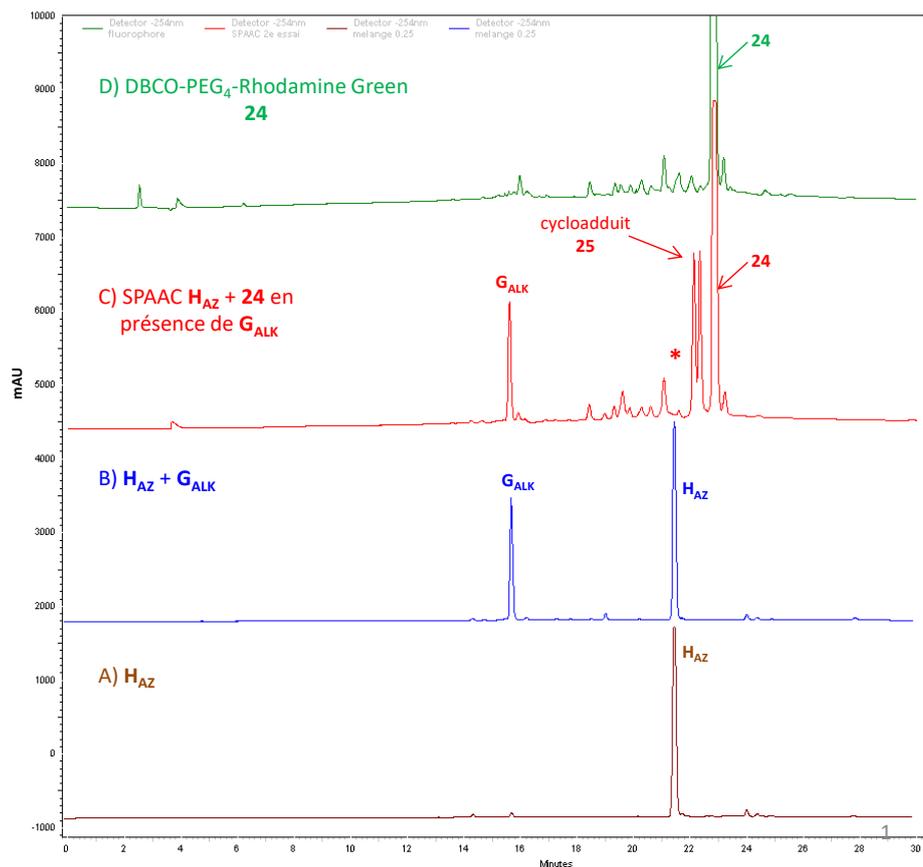


Figure 93 : vérification de la compatibilité 1.SPAAC 2.CuAAC en solution par HPLC en phase inverse avec une détection dans l'UV à 254 nm. Chromatogrammes (A) : rapporteur H_{AZ}, (B) : mélange équimolaire H_{AZ} + G_{ALK} et (D) : fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24**. Chromatogramme (C) : ajout de 4 équivalents de fluorophore **24** à un mélange équimolaire des rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ} en solution aqueuse. Après 2 h de réaction, le mélange réactionnel est dilué dans du MeOH puis injecté en HPLC.

4. Double marquage sur modèle végétal : stratégie BLISS

a. Protocole standard

La stratégie de double marquage des unités G_{ALK} et H_{AZ} mise au point sur modèle végétal a été surnommée BLISS (*bioorthogonal labeling imaging sequential strategy*). Après optimisation, le protocole standard mis en place consiste en l'incorporation simultanée des deux rapporteurs chimiques H_{AZ} et G_{ALK} à $10 \mu\text{M}$ chacun dans la lignine de tissus végétaux (incubation durant 20 h), avant de les coupler séquentiellement à leurs fluorophores respectifs par la SPAAC (fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green à $5 \mu\text{M}$ pendant 1 h) suivie de la CuAAC (fluorophore azide fluor 545 à $5 \mu\text{M}$ pendant 1 h) (figure 94). Chaque étape d'incubation est suivie d'une série de lavages des échantillons afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

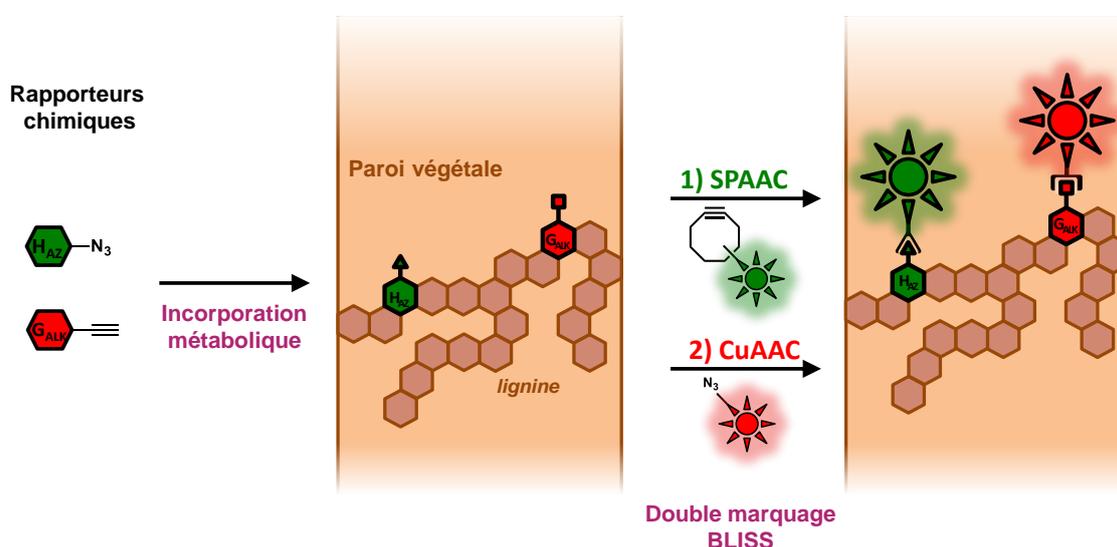


Figure 94 : représentation schématique de la stratégie de double marquage BLISS. Les rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ} sont incorporés simultanément dans la lignine pariétale grâce à un apport exogène. La première réaction bioorthogonale de type SPAAC permet de lier spécifiquement le cyclooctyne d'un premier fluorophore aux unités H_{AZ} , puis la deuxième réaction bioorthogonale de type CuAAC permet de lier spécifiquement l'azoture d'un second fluorophore aux unités G_{ALK} . La distribution des deux unités dans le même tissu végétal est ensuite comparée par microscopie confocale de fluorescence.

b. Applicabilité sur modèle végétal

La stratégie BLISS a d'abord été effectuée sur coupes de tiges de lin. Elle fournit des résultats similaires aux mono-marquages des unités G et H et permet de révéler les zones actives de lignification (figure 95, colonne de gauche). En effet, si l'ensemble du xylème incorpore les deux rapporteurs chimiques, l'intensité de marquage est plus forte au niveau des premières couches cellulaires qui sont en pleine différenciation et sont donc très actives.

La figure 95 illustre également la complémentarité entre la stratégie du rapporteur chimique et l'autofluorescence inhérente à la structure aromatique de la lignine. Contrairement à cette dernière, la méthode BLISS permet de visualiser la lignine *de novo* produite à partir des rapporteurs chimiques et

d'identifier ainsi les couches pariétales dans lesquelles la lignification a lieu. Lorsque les canaux de fluorescence des unités H_{AZ} et G_{ALK} sont superposés (encart D), cette lignine nouvellement formée apparaît notamment en jaune, indiquant une colocalisation des deux monomères marqués, tandis que l'autofluorescence représentant le polymère formé depuis les premiers stades de développement de la plante est visible en bleu. On obtient ainsi une image en trois couleurs de la lignine qui met en évidence les zones actives de la lignification et permet de visualiser la dynamique du processus.

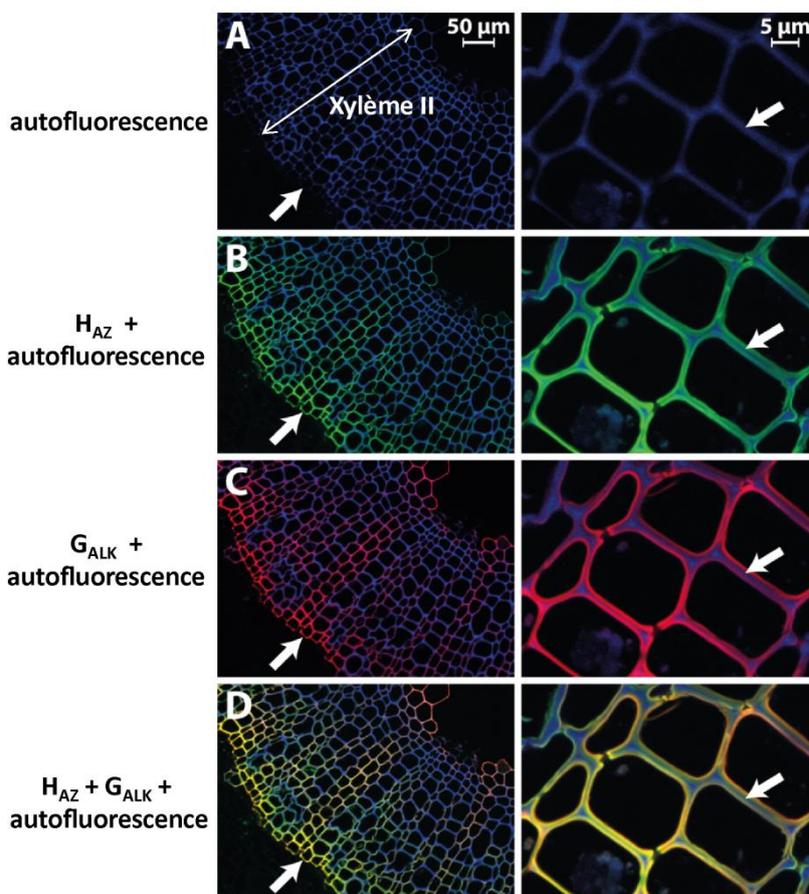


Figure 95 : double marquage BLISS sur coupe transversale de tige de lin de 2 mois. Gauche : xylème secondaire. La flèche indique les premières assises cellulaires en pleine différenciation. Droite : grossissement au niveau du jeune xylème. La flèche distingue la lignine *de novo* formée à partir des rapporteurs chimiques (H_{AZ} et/ou G_{ALK}) de la lignine préexistante visible en bleu. Canaux de fluorescence de : (A) l'autofluorescence de la lignine (bleu, λ_{Em} : 450 nm) ; (B) l'autofluorescence superposée aux unités H_{AZ} (vert, λ_{Em} : 526 nm) ; (C) l'autofluorescence superposée aux unités G_{ALK} (rouge, λ_{Em} : 565 nm). D) Superposition des trois canaux.

c. Choix de la séquence réactionnelle

Le fait que les distributions des deux rapporteurs chimiques soient comparables à celles obtenues pour leurs mono-marquages valide en outre le choix de la séquence réactionnelle 1.SPAAC 2.CuAAC. L'ordre inverse (1.CuAAC 2.SPAAC) a également été réalisé en tant que contrôle et a confirmé la formation de cycloadditions secondaires entre les rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} lors de l'ajout du cuivre (figure 96). En effet, lorsque la CuAAC est réalisée en premier, une partie des unités G_{ALK} réagit

comme attendu avec les fluorophores de type azide fluor 545. Cependant, l'autre partie forme également des triazoles secondaires avec les monolignols H_{AZ} via leur fonction azoture. Ces derniers ne sont alors plus disponibles pour réagir avec les fluorophores de type DBCO-PEG₄-Rhodamine Green lors de la SPAAC. Par conséquent, le signal des rapporteurs H_{AZ} a totalement disparu. Ces résultats sur tissus végétaux confirment que la CuAAC suivie de la SPAAC ne sont pas compatibles selon cet ordre.

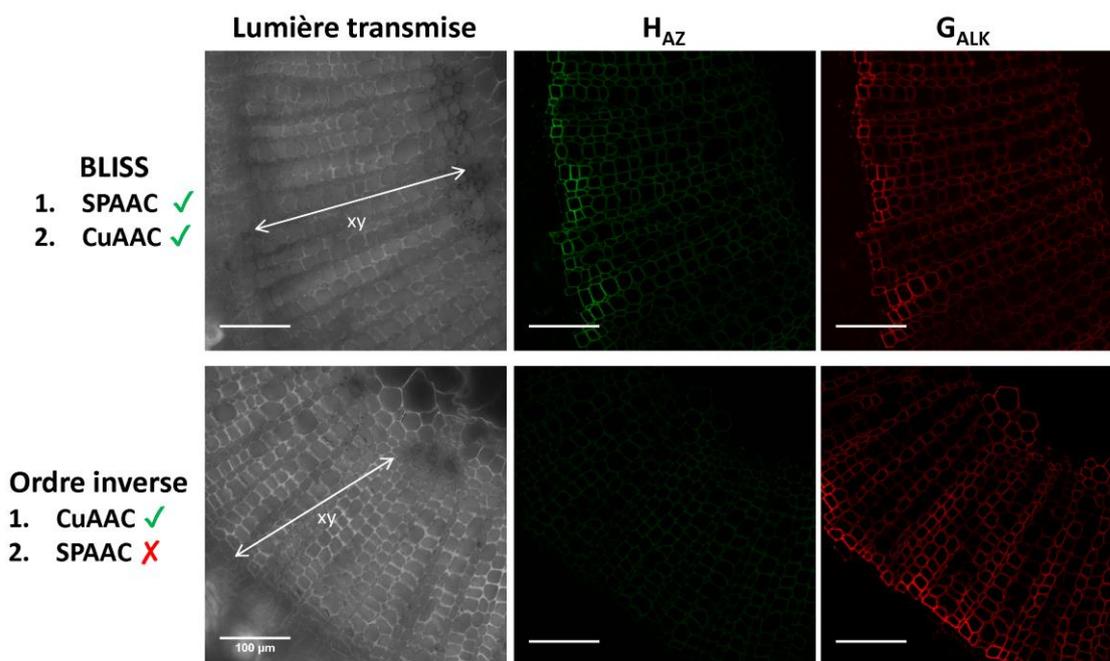


Figure 96 : double marquage BLISS, choix de la séquence réactionnelle. Coupes de tiges de lin de 2 mois incubées avec les analogues H_{AZ} et G_{ALK} , puis ligations aux fluorophores selon les deux ordres possibles : stratégie BLISS (1.SPAAC 2.CuAAC) ou ordre inverse (1.CuAAC 2.SPAAC).

La formation de réactions de *cross-linking* entre les deux rapporteurs suggère également la grande proximité spatiale des deux monolignols dans la matrice pariétale. Bien que l'utilisation de deux CuAAC consécutives ait été utilisée pour le marquage de glycanes pariétaux¹²⁵, cette séquence n'est donc pas envisageable pour la lignine. En 2015, l'équipe d'Andersen a constaté la même réaction secondaire sur d'autres types de structures à la surface de cellules de mammifères : deux dérivés du ManNAc portant un groupement alcyne terminal ou une fonction azoture ont été incorporés au niveau des acides sialiques membranaires des cellules, avant leur ligation à des fluorophores via le double marquage 1.CuAAC 2.SPAAC. Les auteurs en ont conclu que les glycocalyx des cellules sont très proches dans l'espace¹⁰⁴.

5. Apport de la stratégie BLISS pour l'étude de la dynamique de lignification des tiges

L'application du double marquage des unités G_{ALK} et H_{AZ} sur coupes transversales de tiges de lin nous a permis d'obtenir des informations sur la dynamique de lignification à différents niveaux : à l'échelle du tissu (le xylème), entre les différents types cellulaires d'un même tissu ou entre les différentes couches pariétales d'une même cellule.

a. A l'échelle du tissu

Le protocole standard de double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK} en proportions équimolaires montre que les monolignols modifiés peuvent être polymérisés simultanément dans la lignine. Cependant, ce rapport de concentrations 1:1 est purement artificiel puisque les rapports naturels entre les unités H, G et S sont normalement de 5, 87 et 8 % dans le xylème du lin²⁸⁵. Les unités H sont donc normalement présentes en proportions beaucoup plus faibles que les unités G dans la lignine native.

La régulation de la composition monomérique de la lignine peut se faire à différents niveaux suivant les trois principales étapes de biosynthèse du polymère : i) au niveau de la voie enzymatique de biosynthèse des monolignols dans le cytosol, ii) lors de l'export des monolignols vers la paroi et/ou iii) dans la paroi, selon la spécificité des phénoloxydases pour les différents monolignols. De nombreuses études ont d'ores et déjà démontré que des perturbations de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des monolignols induisent des changements de composition de la lignine¹⁵². Concernant la régulation du transport et de la polymérisation des monolignols, les connaissances restent limitées.

Les études portant sur la polymérisation *in vitro* de DHP suggèrent souvent une grande tolérance des enzymes oxydatives vis-à-vis des substrats phénoliques, mais cela n'a pas été démontré sur modèle végétal^{198,297}. Dans le cas de notre stratégie, les rapporteurs chimiques apportés aux sections tissulaires sont directement en contact avec les parois végétales pour être polymérisés par les enzymes, sans étape de biosynthèse ou de transport au préalable. Une expérience a donc été réalisée afin de tester la spécificité des phénoloxydases, en incubant les coupes de tiges de lin avec les monomères H_{AZ} et G_{ALK} en différentes proportions (90:10, 80:20, 50:50, 20:80 et 10:90) pour une concentration totale de 20 μ M. Les résultats d'imagerie obtenus montrent que le signal de fluorescence le plus intense est toujours associé au rapporteur le plus concentré lors de l'incubation : la fluorescence vire vers le rouge lorsque le milieu d'incubation comporte une majorité d'unités G_{ALK} et vers le vert lorsqu'il comporte une majorité d'unités H_{AZ} (figure 97). Ces expériences de compétition montrent qu'au niveau tissulaire, les laccases et/ou peroxydases sont capables de prendre en charge les deux rapporteurs de manière efficace et sans sélection apparente, même si des différences de cinétique selon le type de monolignol ne sont pas à exclure. Cela signifie que la composition de la lignine naturelle est contrôlée par la disponibilité

locale des monolignols dans la paroi. En d'autres termes, cette composition doit être régulée en amont de l'étape de polymérisation des monolignols : lors de leur biosynthèse dans le cytosol mais aussi certainement lors de leur transport dans la paroi.

Toutefois, comme nous le verrons pas la suite, la régulation de la polymérisation des monolignols est en réalité plus complexe : la distribution des différents monomères disponibles dans les différentes couches pariétales dépend également de facteurs locaux au niveau subcellulaire.

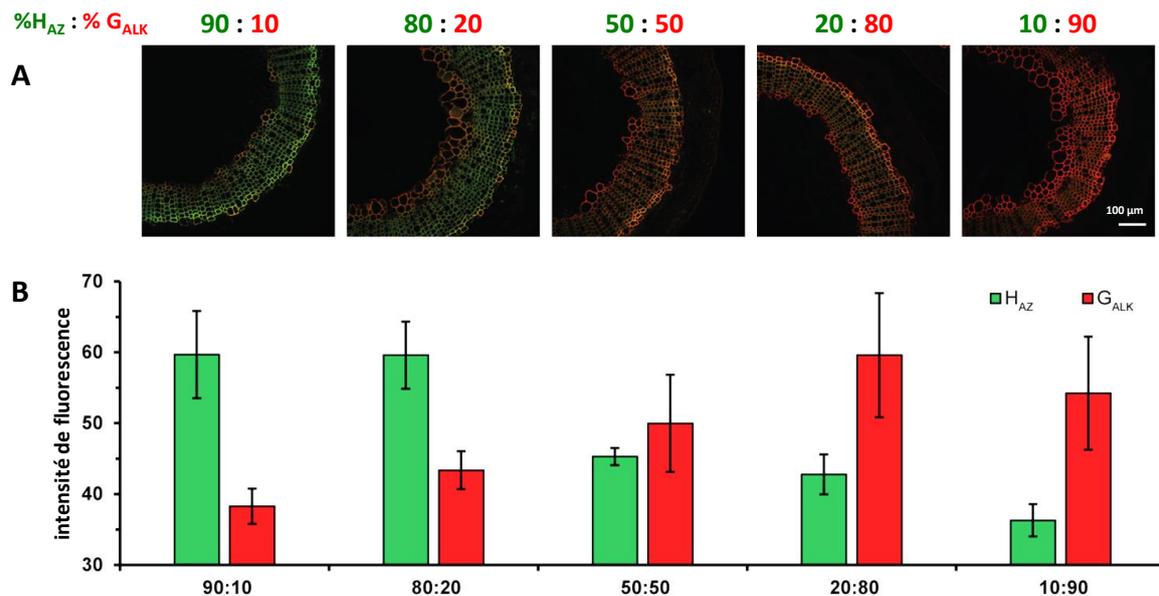


Figure 97 : double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK} incorporées selon différents ratios. Coupes transversales de tiges de lin de 2 mois incubées avec les rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} selon les proportions suivantes pour une concentration totale de $20 \mu M$: 90:10, 80:20, 50:50, 20:80, 10:90, suivi de la ligation séquentielle aux fluorophores. A) Superposition des canaux de fluorescence des unités H_{AZ} et G_{ALK} . B) Histogrammes représentant les intensités de fluorescence moyennes des unités H_{AZ} et G_{ALK} pour les différents ratios. Données moyennées à partir de 3 réplicats biologiques avec 4 coupes observées par condition. Adapté de [145].

b. Selon le type cellulaire

La stratégie du double marquage apporte également des informations entre les différents types cellulaires au niveau d'un tissu, le xylème secondaire. Ce dernier est composé de différents types cellulaires dont la morphologie dépend de leur fonction physiologique : les vaisseaux, les rayons et les fibres trachéides (figure 98A). Les vaisseaux sont de grosses cellules au large diamètre et à la paroi très lignifiée pour le transport vertical de la sève brute. Les fibres trachéides présentent un diamètre intermédiaire entre les rayons et les vaisseaux et possèdent également une paroi très lignifiée. Elles sont impliquées à la fois dans le transport vertical de la sève et dans le soutien mécanique de la plante. Enfin, les rayons possèdent un diamètre beaucoup plus petit et sont moins lignifiés que les vaisseaux et fibres trachéides. Ils sont impliqués dans le transport latéral des nutriments. Le xylème secondaire est caractérisé par un alignement radial des rayons et des fibres trachéides qui vont se diviser à partir du cambium puis se différencier. Les cellules les plus jeunes sont donc adjacentes au cambium tandis que

les cellules plus matures sont proches de la moelle. Les vaisseaux sont quant à eux retrouvés de manière isolée et peuvent parfois être confondus avec des fibres trachéides.

Si les deux rapporteurs chimiques incorporés lors du double marquage semblent présenter une distribution similaire au niveau du xylème secondaire, la mesure de leurs profils d'intensité de fluorescence révèle en réalité des dynamiques de lignification différentes selon le type cellulaire (fibres trachéides versus rayons), (figure 98C-F). Pour les fibres trachéides, le profil d'intensité de l'autofluorescence reflétant la quantité de lignine totale montre une augmentation rapide de celle-ci dans les premières parois cellulaires, jusqu'à atteindre un plateau au niveau de la quatrième paroi par rapport au cambium (figure 98D, *FT*). Dans ces mêmes cellules, les unités H_{AZ} et G_{ALK} présentent un profil quasiment inverse avec une incorporation importante dans les très jeunes cellules puis une diminution progressive après la deuxième paroi (figure 98E,F, *FT*). Ces résultats signifient que le maximum de lignification est rapidement atteint dans les fibres trachéides : les deux assises cellulaires correspondant aux cellules les plus jeunes incorporent rapidement un maximum de monolignols puis la lignification diminue pour les cellules suivantes qui sont plus matures

Concernant les rayons, la lignification semble se poursuivre à des stades de développement plus tardifs. En effet, les profils d'incorporation des rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} ainsi que celui de l'autofluorescence sont relativement plus constants dans les parois des jeunes cellules vers les cellules plus matures (figure 98D-F, *R*).

Ces dynamiques de lignification contrastées entre les fibres trachéides et les rayons peuvent s'expliquer par leurs rôles biologiques différents qui nécessitent des parois adaptées en termes de taille et de composition moléculaire, impliquant une régulation personnalisée de la lignification.

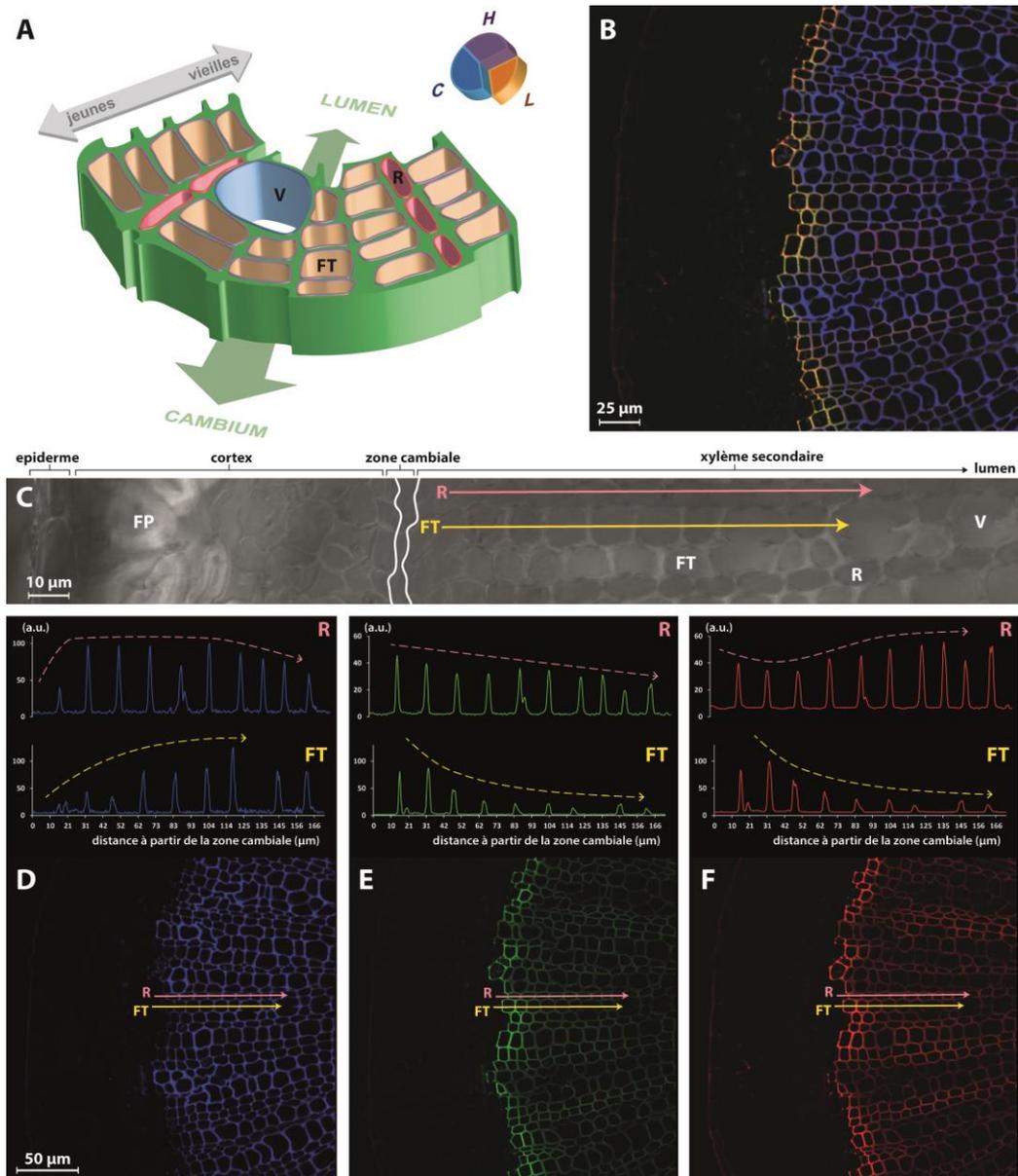


Figure 98 : incorporation des rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} spécifique du type cellulaire du xylème du lin. A) Illustration 3D du xylème secondaire d'une coupe transversale de tige de lin. V = vaisseau, FT = fibre trachéide, R = rayon. B) Vue du xylème secondaire suite au double marquage sur une section transversale de tige de lin : superposition de l'autofluorescence et de la fluorescence des unités H_{AZ} et G_{ALK} . C) Vue en lumière transmise d'une partie de la section transversale de tige. (C-F) Réalisation des profils d'intensité de fluorescence en ligne de deux types cellulaires qui se différencient à partir du cambium : les rayons (flèche rose) et les fibres trachéides (flèche jaune). Résultats obtenus pour : l'autofluorescence de la lignine (D) et la fluorescence des unités H_{AZ} (E) et G_{ALK} (F). Adapté de [145].

c. Au sein d'un type cellulaire : les fibres trachéides

La stratégie de double marquage a également permis d'étudier la dynamique de lignification des différentes couches pariétales des fibres trachéides selon leur stade de différenciation. La figure 99D présente ainsi un alignement radial de cellules trachéides pour lesquelles l'intensité de fluorescence dans les parois cellulaires a été mesurée. Les cellules a et b commencent à se différencier à partir de la zone cambiale, tandis que les cellules c et d sont plus matures.

Premièrement, la mesure de l'intensité d'autofluorescence de la lignine dans les différentes parois cellulaires montre que la teneur en lignine augmente rapidement dans la lamelle moyenne (pic unique de fluorescence) au fur et à mesure que les cellules se différencient (figure 99A). De plus, elle s'accumule dans les parois primaire et secondaire lorsque les cellules se différencient davantage (cellules c et d), la base du pic d'autofluorescence s'élargissant progressivement. Ces observations sont cohérentes avec la littérature puisque de nombreuses méthodes d'imagerie ont permis de mesurer une concentration en lignine au moins 2 fois plus élevée dans la lamelle moyenne que dans la paroi secondaire d'une cellule^{298,299}. L'incorporation des deux analogues de monolignols permet de visualiser plus clairement cette lignification séquentielle dans les différentes couches pariétales (figure 99B,C). Au niveau des fibres trachéides commençant seulement à se différencier (cellule b), les rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ} sont uniquement incorporés dans la lamelle moyenne (pic unique de fluorescence). Puis pour les cellules qui se différencient davantage (cellules c et d), ils sont incorporés dans les couches S1 et S2 de la paroi secondaire en cours de formation (double pic de fluorescence).

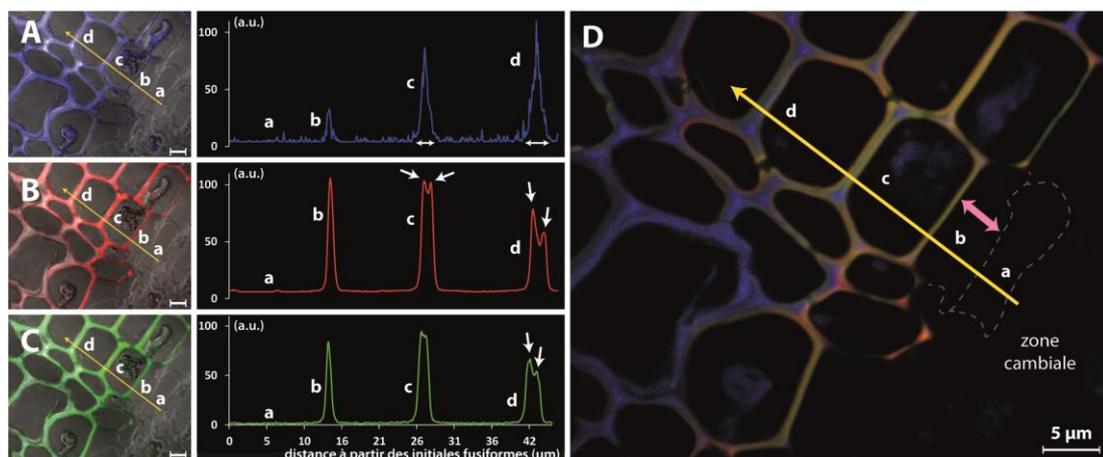


Figure 99 : dynamique de lignification des fibres trachéides en cours de différenciation. Application du double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK} sur coupe transversale de tige de lin. (A-C) Profil d'intensité en ligne de la fluorescence des parois des fibres trachéides en cours de différenciation (flèche jaune, cellules a vers d). Mesure de l'autofluorescence de la lignine (A) et de la fluorescence des unités G_{ALK} (B) et H_{AZ} (C). D) Superposition des trois canaux de fluorescence. Adapté de [145].

La stratégie de double marquage des unités G_{ALK} et H_{AZ} permet donc d'étudier la dynamique de la lignification lorsque les cellules se différencient, en identifiant uniquement les couches ou sous-structures de la paroi qui produisent de la lignine à un instant t.

d. Hypolignification des fibres périphloémiennes

Le lin est principalement cultivé pour l'exploitation de ses faisceaux de fibres périphloémiennes, utilisées dans l'industrie du textile ou des matériaux composites par exemple. Cette valorisation industrielle s'explique par le fait que la paroi secondaire très épaisse de ces fibres est riche en cellulose mais pauvre en lignine, contrairement au xylème qui est typiquement lignifié¹³⁶. L'application de la stratégie BLISS montre une incorporation très ponctuelle des monolignols modifiés au niveau de ces

fibres, visible uniquement dans les coins cellulaires et la lamelle moyenne de la paroi (figure 100B,C, *FP*). Bien qu'elle soit très épaisse, la paroi secondaire est effectivement très peu lignifiée, c'est pourquoi aucun rapporteur n'y est incorporé²⁸⁵. Les fibres voisines sont souvent non marquées alors que le xylème adjacent présente toujours un signal de fluorescence intense. Cette lignification ponctuelle des fibres périphloémiennes du lin suggère que leur hypolignification est due à l'absence de machinerie enzymatique capable d'oxyder les monoglucosylés.

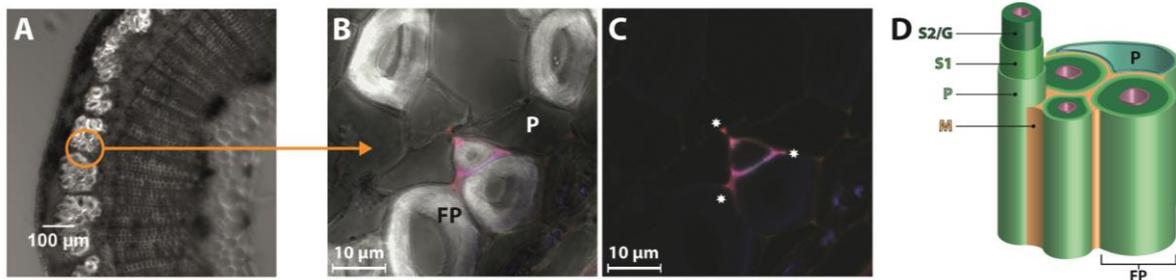


Figure 100 : double marquage BLISS des fibres de lin hypolignifiées. A) Image en lumière transmise d'une section transversale de tige de lin. B-C) Grossissement au niveau des fibres périphloémiennes (FP) entourées de parenchyme (P). Superposition des canaux de fluorescence des unités H_{AZ} et G_{ALK} avec ou sans lumière transmise (B ou C). Les étoiles * indiquent les coins cellulaires. D) Illustration 3D de fibres périphloémiennes. M = lamelle moyenne, P = paroi primaire, S1 et S2 = couches S1 et S2 de la paroi secondaire, G = couche gélatineuse de la paroi secondaire. Extrait de [300].

6. Apport de la stratégie BLISS pour l'étude de la dynamique de lignification des racines

a. Lignification du xylème secondaire

Si les résultats précédents ont été obtenus sur des coupes de tiges de lin, la stratégie BLISS a ensuite été étendue à d'autres organes végétaux tels que les racines. Pour cela, des sections transversales de racines de lin adulte ont été incubées avec les deux monomères H_{AZ} et G_{ALK} afin de permettre l'incorporation de ces derniers dans le polymère de lignine. La séquence réactionnelle 1.SPAAC 2.CuAAC a ensuite permis de lier les fluorophores.

Les images obtenues montrent une polymérisation spécifique des deux analogues monomériques dans le xylème secondaire (*xy*) en tant que principal tissu lignifié des racines (figure 101). De plus, le signal de fluorescence est à nouveau plus intense au niveau de ses premières assises cellulaires (*pa*). Enfin, les vaisseaux racinaires (*V*) ne sont plus en cours de lignification car ils n'incorporent pas de rapporteurs chimiques. A l'inverse, ils sont clairement visibles via l'autofluorescence de la lignine (en bleu) et contiennent par conséquent plus de lignine préexistante que les types cellulaires voisins. Ils ont donc été lignifiés plus tôt que les autres cellules au cours du développement de la racine.

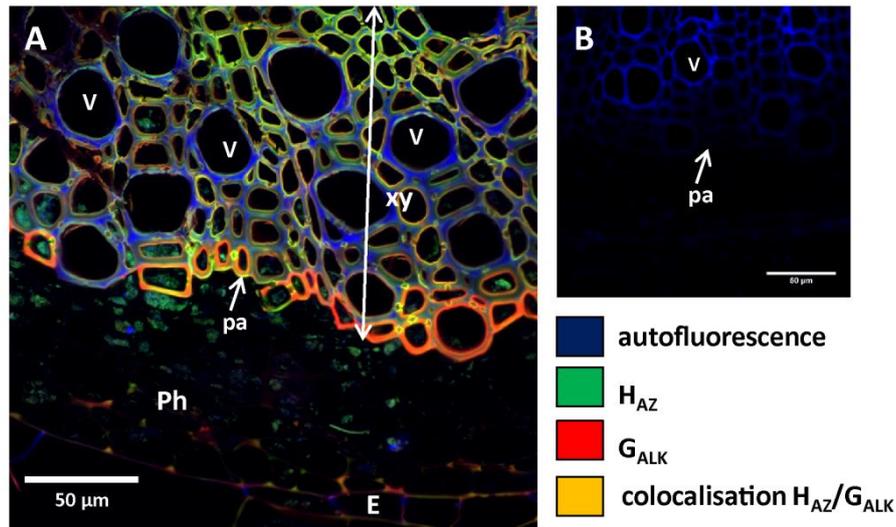


Figure 101 : application de la stratégie BLISS sur racines de lin. Sections transversales de racine de lin de 2 mois incubées avec les rapporteurs chimiques H_{AZ} et G_{ALK} (A) ou leurs analogues naturels H_{NAT} et G_{NAT} (B), suivi de la ligation séquentielle aux fluorophores. Superposition des canaux de fluorescence des unités H_{AZ} et G_{ALK} et de l'autofluorescence de la lignine. Xy = xylème secondaire, E = endoderme, Ph = phloème, V = vaisseau, pa = premières assises cellulaires.

Une analyse plus détaillée des premières assises cellulaires du xylème révèle une incorporation différentielle des unités H_{AZ} et G_{ALK} au niveau subcellulaire, c'est-à-dire selon les différentes couches de la paroi et ses substructures (figure 102). En effet, l'observation de ces cellules avec un grossissement plus important montre que les plasmodesmes, sortes de canaux contrôlant le passage des molécules entre deux cellules, sont visibles en jaune, indiquant une colocalisation H_{AZ}/G_{ALK}. En revanche, dans la même région cellulaire, les parois secondaires S2 sont visibles en rouge/orange, démontrant une plus grande incorporation d'unités G_{ALK}. Cette incorporation différentielle des unités H_{AZ} et G_{ALK} suggère l'existence d'une machinerie d'incorporation des monolignols et/ou d'une matrice polysaccharidique spécifique entre les différentes couches de la paroi cellulaire.

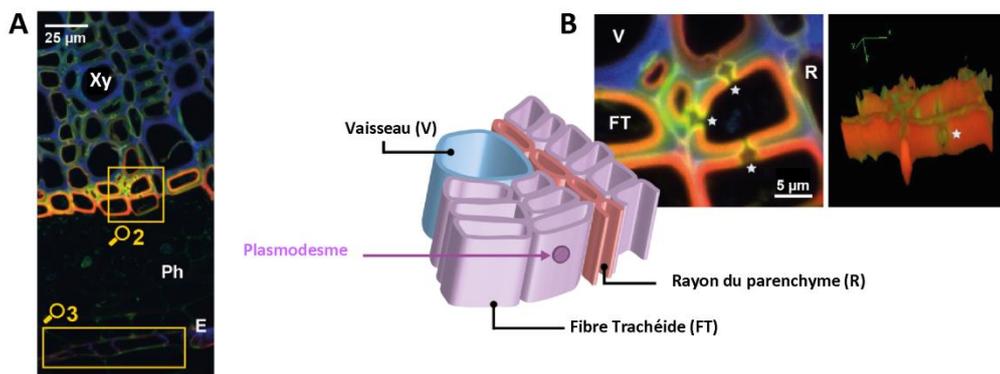


Figure 102 : double marquage BLISS au niveau du jeune xylème racinaire de lin. A) Section transversale de racine de lin après le double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK}. Superposition des canaux de fluorescence des unités H_{AZ}, G_{ALK} et de l'autofluorescence de la lignine. Xy = xylème secondaire, Ph = phloème, E = endoderme. B) Zoom sur les premières assises cellulaires du xylème (carré jaune n° 2). Image en 2D et reconstruction 3D du z-stack d'une fibre trachéide et de la cellule adjacente. Les étoiles indiquent les plasmodesmes. Adapté de [301].

b. Lignification de l'endoderme

Outre le xylème secondaire, le tissu nommé endoderme présente également une incorporation significative des monomères H_{AZ} et G_{ALK} . Uniquement présent dans les racines, il forme une couche unicellulaire qui entoure les tissus vasculaires, donc le xylème, et empêche la diffusion des nutriments (figure 103). Les cellules endodermiques constituent effectivement une barrière sélective qui régule le transport des nutriments puisés dans le sol vers les tissus vasculaires et bloque leur reflux vers les racines. Il limite aussi la perte en oxygène et empêche les microorganismes de pénétrer dans la plante. Pour remplir ces différents rôles, les parois des cellules endodermiques vont être successivement imprégnées de deux polymères imperméables formant une barrière hydrophobe : la lignine puis la subérine³⁰². Le premier stade de différenciation de l'endoderme correspond à la déposition de lignine au niveau des parois radiales des cellules, afin de former des anneaux lignifiés empêchant la diffusion des nutriments à travers la membrane. Ces anneaux prennent le nom de cadres de Caspary (figure 103). Le deuxième stade de différenciation correspond au dépôt de subérine dans la surface interne des parois, une substance lipidique cireuse principalement composée de chaînes aliphatiques saturées et insaturées, mais aussi de parties aromatiques.

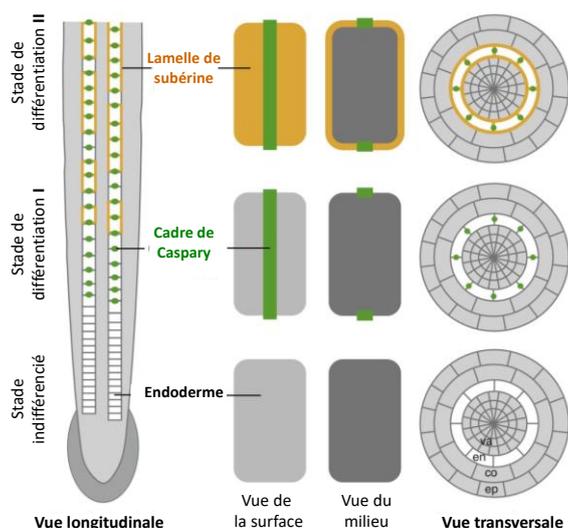


Figure 103 : stades de différenciation successifs de l'endoderme racinaire.

Représentation schématique de la différenciation de l'endoderme sur une section longitudinale (gauche) ou transversale (droite) de racine végétale ou au niveau d'une cellule (milieu). Le dépôt de lignine (vert) dans le cadre de Caspary a lieu lors du premier stade de différenciation. Il est suivi par le dépôt de subérine (orange) à l'intérieur des parois.

Va = tissu vasculaire, pe = pérycyle, en = endoderme, co = cortex, ep = épiderme. Adapté de [302].

D'après certaines études, l'endoderme possède la machinerie enzymatique capable d'oxyder les monolignols en lignine. L'équipe de Geldner a notamment prouvé que la peroxydase PRX64 est spécifique à la lignification du cadre de Caspary et qu'elle agit en parallèle avec une NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase) lui fournissant l' H_2O_2 ²¹³. Lorsque la stratégie de double marquage est appliquée aux coupes racinaires de lin, les unités H_{AZ} et G_{ALK} sont clairement

incorporées dans les parois de l'endoderme parallèles et adjacentes aux cadres de Caspary (figure 104B, E). *A contrario*, les rapporteurs sont totalement absents du cadre de Caspary lui-même, avec une nette délimitation des zones d'incorporation. Cela signifie que cette sous-structure de l'endoderme est déjà mature à ce stade de développement de la plante et qu'elle n'incorporera plus de monolignols, alors que la polymérisation est toujours active dans les autres parois adjacentes.

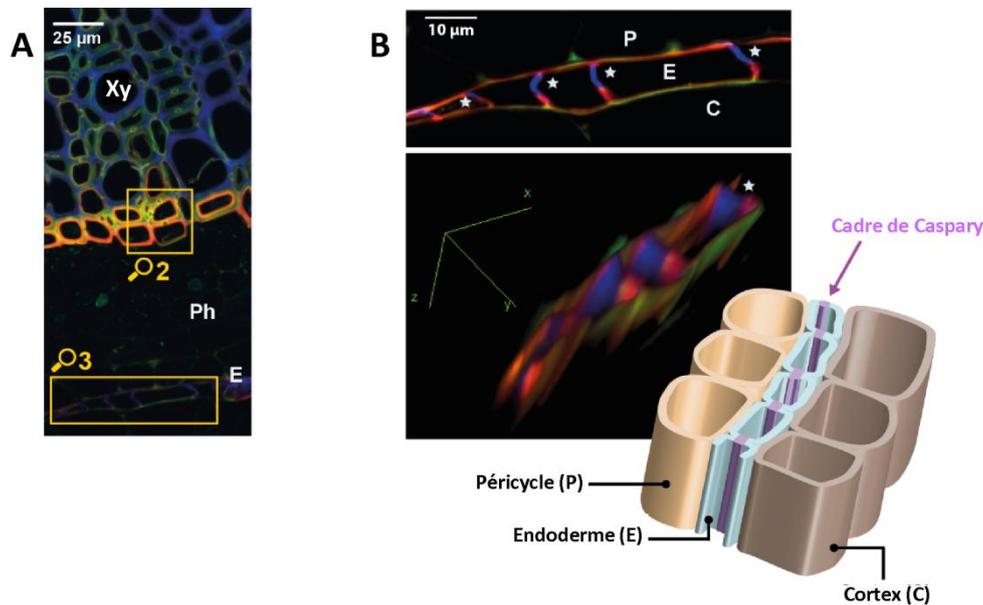


Figure 104 : double marquage BLISS au niveau de l'endoderme. A) Section transversale de racine de lin après le double marquage des unités HAZ et GALK. Superposition des canaux de fluorescence des unités HAZ, GALK et de l'autofluorescence de la lignine. Xy = xylème secondaire, Ph = phloème, E = endoderme. B) Zoom sur l'endoderme (rectangle jaune n°3). Image en 2D et reconstruction 3D du z-stack du tissu endermique. Les étoiles indiquent les cadres de Caspary. Adapté de [301].

7. Marquage métabolique sur tiges entières

Les résultats de double marquage obtenus sur sections transversales de tiges de lin sont cohérents d'un point de vu biologique puisque la polymérisation des analogues de monolignols a lieu dans le xylème typiquement lignifié, et plus fortement au niveau de ses premières assises cellulaires très actives. Cependant, les sections de tiges ne sont pas forcément considérées comme un modèle *in vivo* car les cellules à la surface des coupes sont endommagées ou mortes, même si les enzymes oxydatives sont toujours actives dans la matrice pariétale. Il est également possible que le processus de lignification dans les sections ne soit pas complètement identique à celui de la plante entière à cause des différences physiologiques majeures entre les deux situations.

Afin de vérifier que la localisation spatiale des rapporteurs polymérisés reflète la réelle dynamique spatiotemporelle de lignification chez la plante, le double marquage a également été réalisé sur un modèle *in vivo* : la tige entière de lin. Ce système expérimental est adapté des travaux de Terashima où le dispositif sert à visualiser par autoradiographie l'incorporation dans les tissus végétaux de précurseurs de la lignine marqués au tritium^{146,303}. Dans notre cas, le système racinaire d'une plante

de deux mois est sectionné, retiré, puis l'extrémité basale de la tige est plongée dans une solution contenant les rapporteurs H_{AZ} et G_{ALK} en proportions équimolaires, à l'image de fleurs coupées dans un vase (figure 105A). La base de la tige est incubée dans la solution durant 20 h afin de permettre au rapporteurs chimiques d'être absorbés par la plante et polymérisés dans la paroi. Après cette incorporation métabolique *in vivo*, des sections transversales sont effectuées à différentes hauteurs par rapport à la base de la tige pour l'étape suivante de ligation aux fluorophores.

Les images obtenues présentent un marquage significatif des tissus sectionnés à différentes hauteurs par rapport à la base de la tige (0,5-1,0 et 1,5-2 cm par exemple), (figure 105B,C). Cela signifie que les analogues de monolignols peuvent être absorbés par la tige, transportés par les cellules puis polymérisés dans la lignine. De plus, les motifs de fluorescence observés sont similaires à ceux obtenus sur sections transversales de tiges. En effet, le marquage des monolignols H_{AZ} et G_{ALK} est limité au xylème avec un signal plus intense au niveau de ses premières couches cellulaires. La stratégie de double marquage est donc applicable *in vivo*.

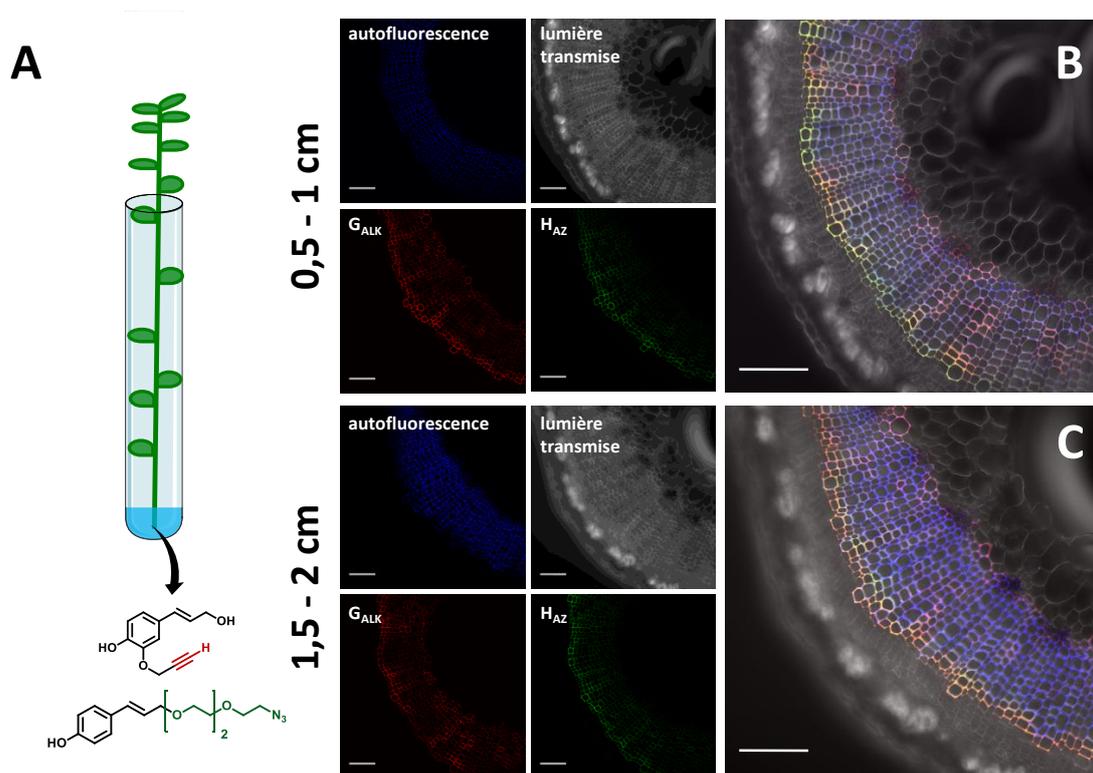


Figure 105 : double marquage BLISS sur tige entière de lin. A) Incubation de la base d'une tige de lin de 2 mois, dont la racine a préalablement été sectionnée, dans une solution contenant les rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ} à $10 \mu\text{M}$ chacun durant 20 h. Des coupes transversales sont ensuite réalisées à différentes hauteurs à partir de la zone sectionnée pour les étapes de ligation aux fluorophores selon l'ordre réactionnel 1.SPAAC 2.CuAAC. B-C) Résultats des acquisitions microscopiques. Gauche : canaux de l'autofluorescence de la lignine, de la lumière transmise, et de la fluorescence des unités H_{AZ} et G_{ALK} . Droite : superposition des quatre canaux. Echelle = $100 \mu\text{m}$.

La similarité des résultats entre l'incorporation métabolique à travers la tige entière par rapport aux sections végétales s'explique par la matrice 3D formée par la paroi lignocellulosique : elle permet de piéger physiquement les enzymes d'oxydation des monolignols. Même lorsque les tissus sont

sectionnés et que certaines cellules sont vidées de leur contenu cytoplasmique, ces enzymes pariétales restent emprisonnées dans les parois des sections végétales.

Les résultats du double marquage des monomères H_{AZ} et G_{ALK} sur tige et racine de lin ont donné lieu à trois publications^{145,300,301}.

Choix du dispositif expérimental

Les tiges entières et les sections transversales de tige apparaissent comme deux modèles expérimentaux efficaces pour étudier la dynamique de lignification par la stratégie du rapporteur chimique. Le choix du modèle doit se faire selon le type de question à laquelle on souhaite répondre : l'incorporation métabolique sur sections transversales est plus simple à mettre en œuvre tandis que l'incorporation au sein de tiges entières est plus proche de la physiologie végétale. Toutefois, dans les deux cas, l'étape suivante de liaison aux fluorophores nécessite de revenir à des sections tissulaires afin d'éviter des problèmes de pénétration de ces derniers. En effet, d'après les précédentes applications de marquage métabolique des glycanes ou des monolignols chez les végétaux, les fluorophores de type Alexa fluor sont imperméables aux membranes des cellules végétales et ne peuvent de ce fait pénétrer à l'intérieur de plantules entières d'*Arabidopsis thaliana*^{30,282}.

III. Triple marquage des unités G_{ALK}, H_{AZ} et S_{CP}

1. Le triple marquage dans la littérature

La difficulté d'obtenir des réactions de ligation à la fois bioorthogonales et compatibles entre elles s'accroît davantage lors d'un triple marquage métabolique. Les applications dans la littérature sont par conséquent plus rares que pour les doubles marquages. Elles sont au nombre de cinq en associant à la fois les expériences sur extraits cellulaires et sur cellules vivantes³⁰⁴⁻³⁰⁸. La première démonstration de triple marquage métabolique a été publiée en 2012 afin d'étudier l'activité enzymatique de trois protéines différentes³⁰⁴. Les trois réactions impliquées étaient la DA_{inv}, la ligation de Staudinger-Bertozzi et la CuAAC. Le marquage a cependant été appliqué à des extraits cellulaires et non à des cellules vivantes. Suite à cet article précurseur, le second triple marquage complètement basé sur la stratégie du rapporteur chimique a été publié en 2018 par l'équipe de Chang. Les auteurs ont présenté un marquage des composés intracellulaires de cellules mammaliennes au moyen de trois SPAAC successives³⁰⁶. Quelques mois plus tard, l'équipe de Wittmann a publié un triple marquage bioorthogonal de trois dérivés du ManNAc portant trois étiquettes différentes : un méthylcyclopropène pour un couplage de DA_{inv}, un azoture pour un couplage de type SPAAC et un alcène terminal pour un couplage photoactivé de type nitrilimine-alcène³⁰⁷.

2. Conception du triple marquage

Une fois la procédure du double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK} maîtrisée, nous l'avons étendue au troisième monolignol formant la lignine : le monomère S représenté par son rapporteur S_{CP}. La troisième réaction bioorthogonale choisie est la DA_{inv} car elle est compatible avec les cycloadditions azoture-alcyne. L'un des objectifs est de pouvoir visualiser simultanément les trois principales unités du polymère et d'avoir une vue exhaustive de la dynamique de la lignification. De plus, la mise au point du triple marquage des unités H, G et S constitue une avancée d'un point de vue méthodologique car il s'agit de : i) l'un des premiers triples marquages basés sur la stratégie du rapporteur chimique, ii) le premier triple marquage réalisé sur modèle végétal et iii) le premier triple marquage impliquant la DA_{inv}, la SPAAC et la CuAAC.

3. Compatibilité de la séquence 1.DA_{inv} 2.SPAAC 3.CuAAC en solution

La première étape pour réaliser le triple marquage est de vérifier que les trois réactions sont compatibles entre elles en solution. Pour cela le seul impératif est d'effectuer la CuAAC en dernière position afin d'éviter les réactions secondaires de *cross-linking* entre les unités H_{AZ} et G_{ALK}. La compatibilité des réactions selon la séquence 1.DA_{inv} 2.SPAAC 3.CuAAC a donc été vérifiée par HPLC avec une détection dans l'UV à 254 nm (figure 106). Le fluorophore tétrazine-Cy5 **26** a d'abord

été ajouté en excès (2 équivalents molaires) à un mélange équimolaire des rapporteurs H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} . Après 2 heures de réaction à température ambiante, le chromatogramme (C) obtenu présente clairement la disparition du pic du rapporteur chimique S_{CP} accompagné de l'apparition d'un nouveau pic correspondant au cycloadduit **27** de la réaction de DAinv entre le monomère S_{CP} et le fluorophore **26**. Le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** a ensuite été ajouté en excès (4 équivalents molaires) à ce même mélange réactionnel. Après 2 heures de réaction, le chromatogramme (D) obtenu présente maintenant la disparition du pic du rapporteur chimique H_{AZ} et l'apparition simultanée des deux régioisomères du cycloadduit **25** de la réaction SPAAC entre le rapporteur H_{AZ} et le fluorophore **24**.

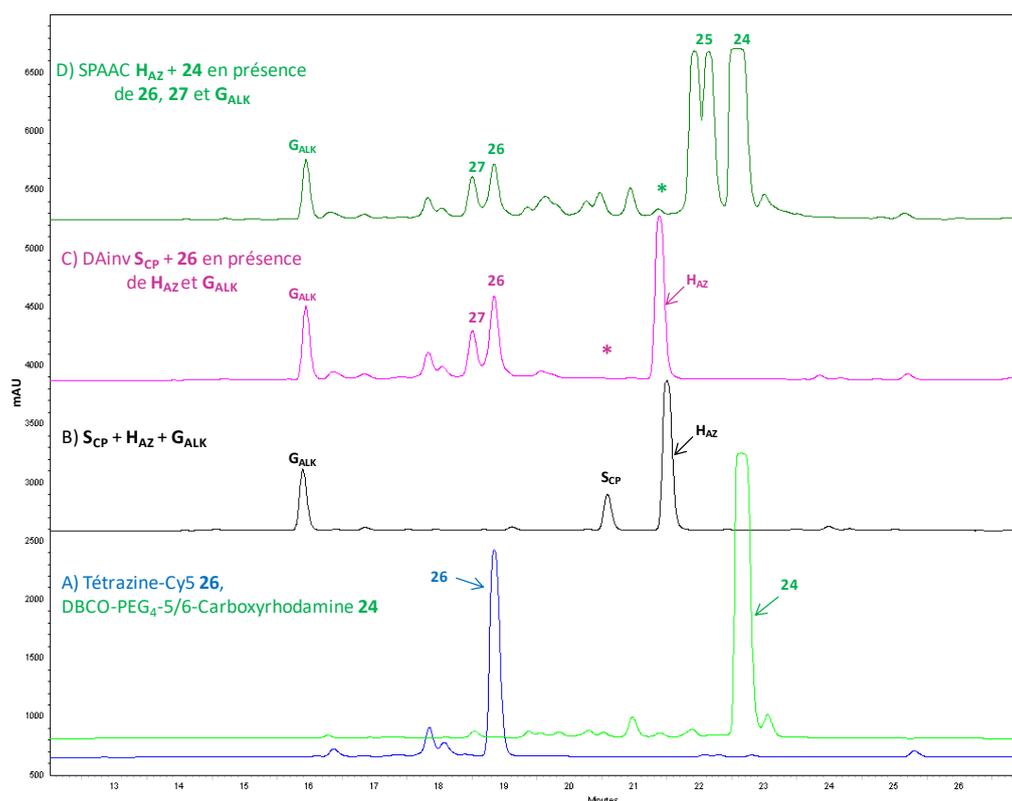


Figure 106 : vérification de la compatibilité 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC par HPLC en phase inverse avec une détection dans l'UV à 254 nm. Chromatogrammes (A) : fluorophores tétrazine-Cy5 **26** et DBCO-PEG₄-5/6-carboxyrhodamine **24** ; (B) : mélange équimolaire des rapporteurs G_{ALK} , H_{AZ} et S_{CP} ; (C) : réaction DAinv, ajout du fluorophore **26** en excès (2 équivalents molaires) au mélange G_{ALK} , H_{AZ} et S_{CP} dans un milieu MeOH/eau (1:1). Après 2 h de réaction, disparition du rapporteur S_{CP} et apparition du produit conjugué **27** ; (D) : réaction SPAAC, ajout du fluorophore **24** en excès (4 équivalents molaires) au mélange contenant les rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ} , le produit **27** et le fluorophore tétrazine **26**. Après 2 h de réaction, disparition du rapporteur H_{AZ} et apparition du cycloadduit **25** résultant de la SPAAC.

La formation successive des cycloadduits **27** et **25** résultant des réactions de DAinv puis SPAAC s'est faite sans réaction secondaire puisqu'aucun pic autre que les impuretés présentes dans les lots de fluorophores commerciaux n'est apparu. Néanmoins, la CuAAC ne peut pas être réalisée à la suite dans le même mélange réactionnel car les deux fluorophores tétrazine-Cy5 et DBCO-PEG₄-Rhodamine Green ont été ajoutés en excès et sont toujours présents dans le milieu (chromatogramme D). La fonction azoture de l'azide fluor 545 utilisé pour la CuAAC réagirait donc directement avec le cyclooctyne du fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green en excès par une cycloaddition secondaire de type

SPAAC. Ce problème n'aura pas lieu sur modèle végétal puisque des lavages sont effectués entre chaque étape de ligation bioorthogonale pour éliminer des tissus les fluorophores n'ayant pas réagi. La séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC est donc compatible en solution.

4. Application sur coupes de tiges de lin

Protocole standard

Une fois la compatibilité de la séquence réactionnelle établie par HPLC, le triple marquage des monomères H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} peut être effectué sur modèle végétal avec la mise en place d'un protocole final similaire à celui du double marquage (figure 107). Des coupes transversales de tige de lin sont incubées durant 20 h en présence d'une solution contenant les trois rapporteurs chimiques à 10 µM chacun, permettant leur incorporation métabolique dans la lignine. Chaque rapporteur polymérisé est ensuite couplé à son fluorophore respectif en réalisant les trois réactions de ligation bioorthogonale de manière séquentielle : la DAinv suivie de la SPAAC et de la CuAAC pour les unités S_{CP}, H_{AZ} et G_{ALK} respectivement (chaque fluorophore étant incubé à 5 µM durant 1 h). Chaque étape d'incubation est toujours suivie d'une série de lavages des échantillons essentielle à la spécificité des marquages.

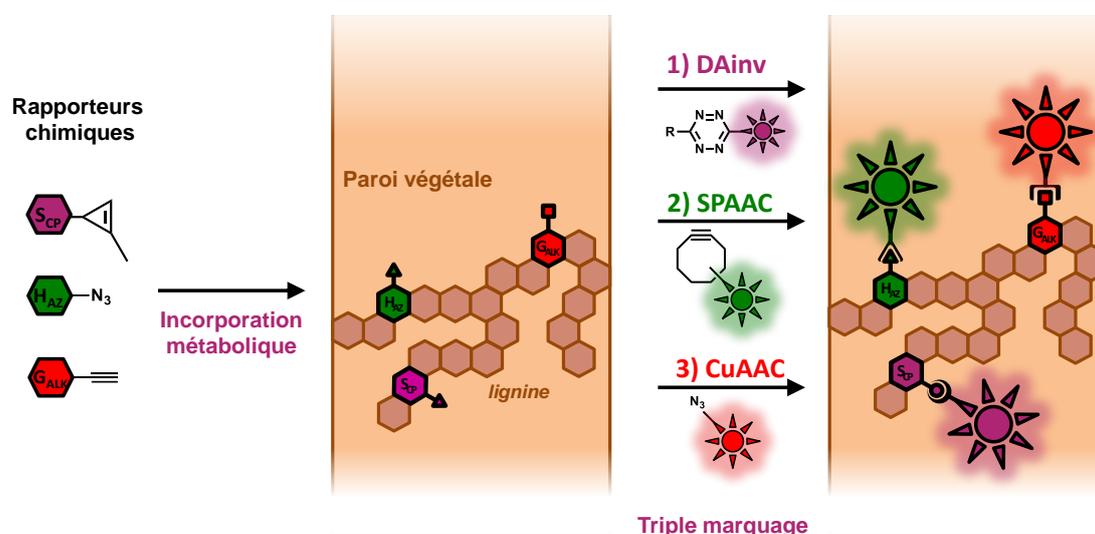


Figure 107 : représentation schématique de la stratégie de triple marquage H_{AZ}/G_{ALK}/S_{CP}.

Les rapporteurs chimiques H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} sont incorporés simultanément dans la lignine pariétale grâce à un apport exogène. Les réactions successives de type DAinv, SPAAC et CuAAC permettent de lier respectivement la tétrazine du premier fluorophore aux unités S_{CP}, puis le cyclooctyne du second fluorophore aux unités H_{AZ}, et enfin l'azoture du troisième fluorophore aux unités G_{ALK}. La distribution des trois unités est ensuite visualisée par microscopie confocale de fluorescence.

Coupes transversales de tiges de lin

Les images obtenues par microscopie confocale sont constituées de quatre canaux de fluorescence, trois canaux correspondant aux unités H_{AZ}, G_{ALK}, S_{CP} et un canal pour l'autofluorescence de la lignine (figure 108). La distribution des rapporteurs chimiques dans les coupes transversales de tige est à nouveau similaire aux trois mono-marquages avec une incorporation plus importante au niveau des premières assises cellulaires du xylème. Les trois rapporteurs peuvent donc être incorporés simultanément au sein de la lignine afin de révéler des informations sur les zones actives de lignification. De plus, la superposition des quatre canaux de fluorescence donne pour la première fois une image à quatre couleurs de la lignine.

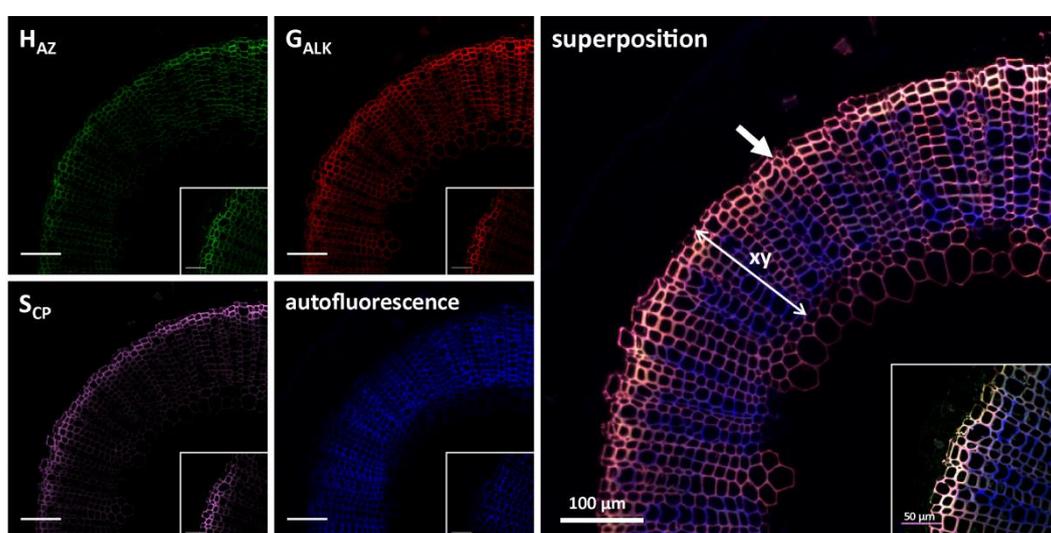


Figure 108 : triple marquage H_{AZ}/G_{ALK}/S_{CP} sur coupe transversale de tige de lin.

Coupe de 2 mois incubée avec les rapporteurs H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP}. Chaque rapporteur incorporé est couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Gauche : canaux de fluorescence des unités H_{AZ} (vert, $\lambda_{Em} = 426$ nm), G_{ALK} (rouge, $\lambda_{Em} = 565$ nm), S_{CP} (magenta, $\lambda_{Em} = 670$ nm) et de l'autofluorescence de la lignine (bleu, $\lambda_{Em} = 450$ nm). Droite : superposition des quatre canaux. Les rapporteurs chimiques sont incorporés au niveau du xylème secondaire (xy) et de manière plus intense au niveau des premières assises cellulaires indiquées par la flèche blanche. Grossissement des premières assises cellulaires en bas à droite de chaque image.

De la même manière, le triple marquage a été réalisé sur coupes longitudinales de tige de lin pour mettre en évidence des motifs de lignification caractéristiques des cellules vasculaires, et sur coupes transversales racinaires afin de montrer son applicabilité à d'autres organes végétaux que les tiges (annexe 12).

5. Application à d'autres espèces d'intérêt biologique

La stratégie du rapporteur chimique a été mise au point sur le lin comme modèle végétal, du fait de sa régulation particulière de la lignification et de son intérêt économique. Néanmoins, le triple marquage est également transposable à d'autres espèces végétales. Le protocole standard sur coupes transversales de tiges a effectivement été appliqué à trois espèces couramment utilisées en biologie

végétale : l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), le tabac (*Nicotiana benthamiana*) et le peuplier (*Populus tremula x alba*). L'arabette représente la plante modèle type pour la recherche en biologie végétale du fait de son cycle de vie court et de sa petite taille. De plus, elle est très appropriée pour des recherches en génétique car son génome a été entièrement séquencé et car elle possède une large banque de mutants. Le tabac est une plante modèle pour les études liées aux mécanismes de défense car elle peut être infectée par une large variété d'agents pathogènes (bactéries, virus, *etc.*). De plus c'est une espèce très utilisée pour les approches de transformation génétique telles que l'agroinfiltration. Enfin, le peuplier présente un intérêt industriel car son bois est valorisé pour la production de biocarburants et de pâte à papier, grâce à sa croissance rapide et à sa durée de vie relativement courte.

L'application du triple marquage sur chaque espèce présentée engendre une incorporation de chaque rapporteur chimique dans le xylème en cours de lignification (figure 109A-C, *xy*). Comme pour le lin, le signal de fluorescence est plus intense au niveau des parois des plus jeunes cellules qui commencent seulement à se différencier par rapport aux cellules plus matures. Chez le peuplier en particulier, les parois du xylème mature (XM) ne présentent pas de lignification active et n'incorporent pas du tout de rapporteurs chimiques (figure 109C, *XM*). Elles sont ainsi visibles uniquement par l'autofluorescence de la lignine.

Contrairement aux fibres de lin hypolignifiées qui incorporent des monolignols modifiés uniquement de manière ponctuelle, les fibres des trois autres espèces étudiées présentent une lignification plus active avec un marquage conséquent (figure 109A-C, étoiles). Certaines régions tissulaires montrent également une incorporation préférentielle de certains rapporteurs chimiques. Par exemple, chez les faisceaux de fibres parenchymateuses du peuplier, les unités G_{ALK} et S_{CP} sont davantage incorporées en périphérie du faisceau par rapport à son centre, en comparaison des unités H_{AZ} pour qui l'incorporation est plus homogène (figure 109C, étoile), (grossissement en annexe 12). Cette déposition différentielle des monolignols suggère à nouveau une hétérogénéité de la machinerie d'oxydation et/ou de la structure chimique des parois. Des expériences supplémentaires s'avèrent néanmoins nécessaires pour confirmer ces résultats chez le peuplier.

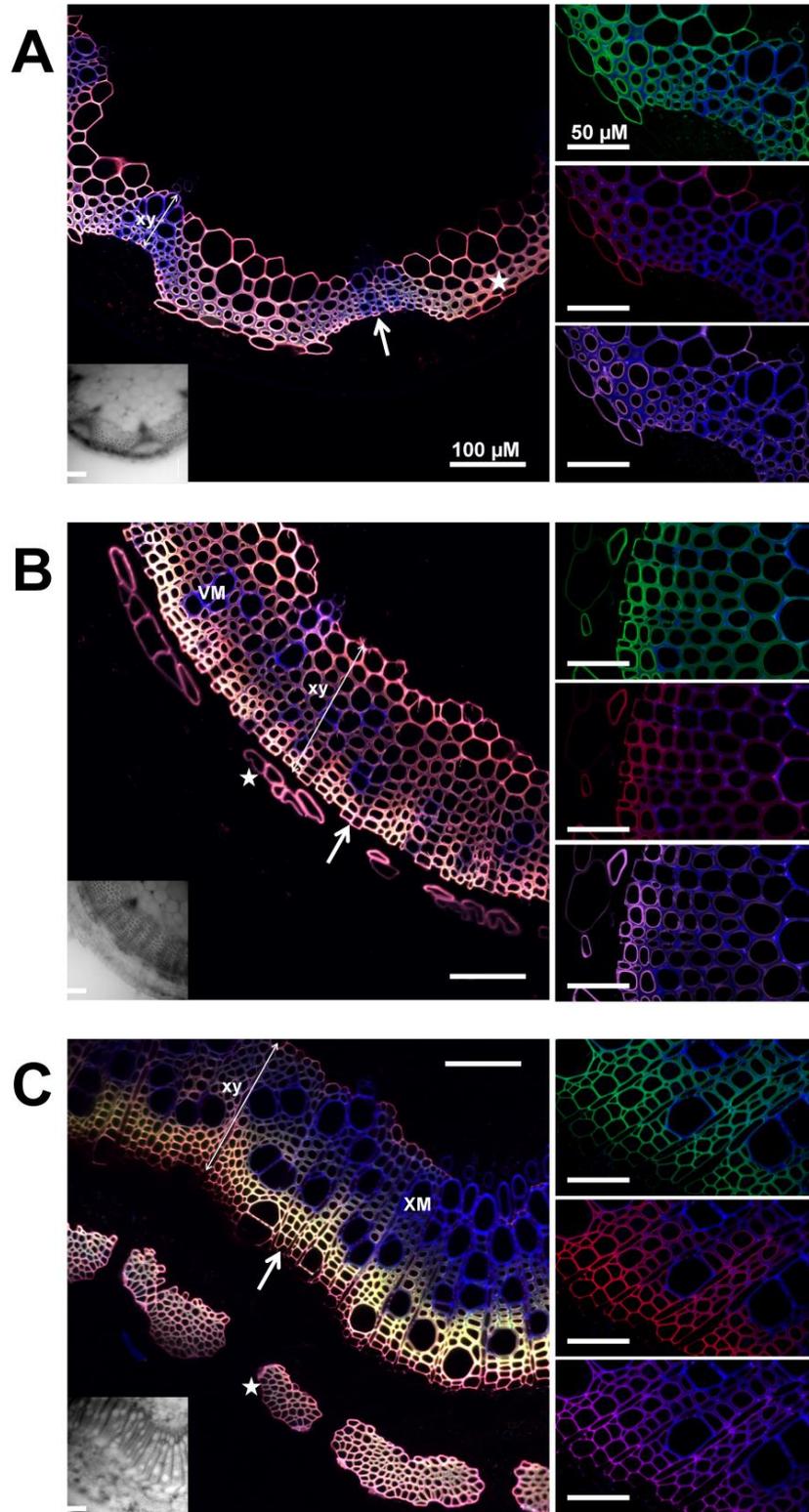


Figure 109 : triple marquage HAZ/GALK/SCP appliqué à d'autres espèces végétales. Coupes transversales de (A) hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*, (B) tige de tabac et (C) tige de peuplier incubées avec les rapporteurs HAZ, GALK et SCP. Chaque rapporteur incorporé est ensuite couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Gauche : vue d'ensemble des tissus vasculaires, superposition des quatre canaux de fluorescence. Droite : zooms sur les xylèmes en cours de différenciation, superposition de l'auto fluorescence avec le canal de fluorescence de chaque rapporteur chimique. Les flèches indiquent pour chaque espèce le xylème en cours de différenciation, et les étoiles indiquent les fibres interfasciculaires. Xy = xylème, XM = xylème mature, VM = vaisseau mature.

6. Marquage métabolique sur tiges entières

Tout comme pour la stratégie BLISS, l'incorporation métabolique des rapporteurs H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} a été réalisée avec le dispositif de la tige entière de lin en tant que modèle végétal *in vivo*. La base de la tige a été incubée avec la solution comportant les trois rapporteurs en proportions équimolaires avant de réaliser la séquence réactionnelle 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Comme attendu, les images obtenues indiquent une incorporation des trois rapporteurs chimiques dans le xylème et plus largement au niveau des premières assises cellulaires, confirmant l'applicabilité de la stratégie sur un modèle *in vivo* (figure 110A). Fait intéressant, une incorporation préférentielle des rapporteurs chimiques peut être observée entre les différentes couches de la paroi au niveau d'une même cellule, ici une fibre trachéide (figure 110C). Pour cela, les trois unités sont représentées en fausse couleur afin de comparer leur localisation. Les unités H_{AZ} semblent incorporées préférentiellement au niveau de la lamelle moyenne alors que les unités G_{ALK} sont incorporées dans la couche adjacente à cette lamelle moyenne correspondant à la paroi primaire et à la couche S1 de la paroi secondaire. Enfin, les rapporteurs S_{CP} semblent plus fortement déposés au niveau de la couche S2 de la paroi secondaire, soit la couche la plus interne.

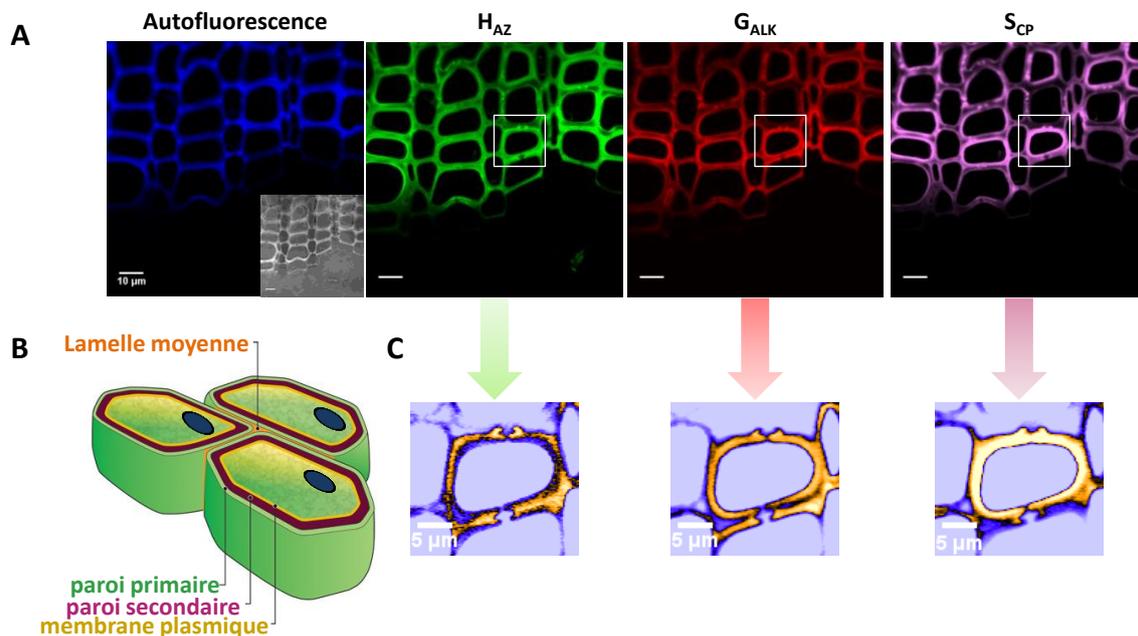


Figure 110 : triple marquage $H_{AZ}/G_{ALK}/S_{CP}$ sur tige entière de lin. A) partie basale d'une tige de lin de 2 mois incubée dans une solution contenant les rapporteurs S_{CP} , H_{AZ} et G_{ALK} à $10 \mu\text{M}$ chacun durant 20 h. Des coupes transversales sont réalisées à partir de la zone sectionnée pour les étapes de ligature aux fluorophores selon l'ordre réactionnel 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. A) Xylème secondaire visualisé avec le canal d'autofluorescence de la lignine (avec un encart représentant l'image correspondante en lumière transmise), suivi des canaux de fluorescence des unités H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} . Echelle = $10 \mu\text{m}$. B) Représentation schématique des différentes couches de la paroi cellulaire végétale. C) Grossissement d'une fibre trachéide en cours de différenciation. Représentation de l'intensité de fluorescence de chaque unité en fausse couleur.

Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec précaution car les trois canaux de fluorescence ne peuvent pas être directement comparés entre eux. En effet, la quantification absolue de la fluorescence n'est pas possible pour les raisons suivantes : les fluorophores présentent des rendements quantiques différents et des réponses en fluorescence non linéaires et les lasers d'excitation sont différents pour chaque canal. Les données obtenues semblent tout de même biologiquement pertinentes car elles sont en accord avec les études autoradiographiques réalisées par Terashima *et al.*¹⁴⁶. Les auteurs ont procédé à l'incorporation métabolique des monolignols H, G et S glycosylés et marqués au tritium au niveau de jeunes tiges de pin, puis ils ont visualisé leurs distributions dans les différentes couches pariétales du xylème par autoradiographie. Ils ont notamment conclu que les unités H sont majoritairement déposées au niveau de la lamelle moyenne et des coins cellulaires, tandis que les unités S sont distribuées uniquement dans la couche la plus interne de la paroi secondaire. Cette incorporation différentielle des rapporteurs chimiques au niveau subcellulaire suggère à nouveau l'existence i) d'une machinerie d'oxydation des monolignols différente entre les différentes couches pariétales et/ou ii) d'une composition polysaccharidique spécifique pour chaque couche pariétale.

Enfin, il convient de préciser que l'incorporation métabolique des trois rapporteurs chimiques peut se faire au sein de plantules de lin entières via leurs racines, avant la ligation aux fluorophores sur sections transversales (annexe 12). Ce système d'incorporation permet de s'approcher davantage de la définition réelle du modèle *in vivo*. Il présente cependant un intérêt moindre pour l'étude de la lignification par rapport à la tige entière car les plantules sont jeunes (2,3 semaines) et de ce fait peu lignifiées.

Une régulation de la lignification complexe au niveau subcellulaire

S'il a été démontré précédemment qu'au niveau tissulaire, la composition de la lignine *de novo* dépend de la disponibilité des analogues de monolignols dans la paroi (figure 97), la régulation de leur polymérisation est plus complexe au niveau subcellulaire. En effet, les rapporteurs chimiques ne colocalisent pas toujours et sont parfois incorporés différemment dans les différentes couches pariétales, comme cela a été illustré au niveau du xylème des racines (figure 102) ou des tiges (figure 110) de lin. Ces observations signifient qu'après les étapes régulées de biosynthèse et de transport des monolignols dans la paroi, d'autres facteurs vont intervenir pour contrôler la composition de la lignine. Parmi eux, la localisation précise des laccases et/ou peroxydases et leur spécificité au niveau subcellulaire pourraient influencer cette composition. Par exemple, la peroxydase PRX4 est impliquée dans la polymérisation préférentielle des monomères S chez *Arabidopsis thaliana*³⁰⁹. De plus, la nature de la matrice polysaccharidique sur laquelle vient polymériser la lignine pourrait influencer sa composition. Il a notamment été démontré chez la luzerne (*Medicago sativa*) que la lignine présente un motif de distribution similaire à celui de la pectine et des peroxydases dans la lamelle moyenne³¹⁰. Cette similitude suggère fortement que l'architecture de la pectine influence la distribution de lignine dans

cette couche pariétale. En fait, des interactions covalentes et non covalentes existent entre la lignine et les différents polysaccharides (pectines, cellulose, hémicelluloses). Une étude récente a d'ailleurs apporté la preuve directe par RMN 2D de type HSQC de la présence de liaisons covalentes de type éther entre la lignine et les galactoglucomannanes des hémicelluloses³¹¹.

IV. Marquage simultané de deux polymères pariétaux

1. Choix du rapporteur monosaccharidique

La formation de la paroi cellulaire végétale est un processus très régulé où la déposition de la lignine est coordonnée avec la formation de polymères polysaccharidiques. Nous avons donc voulu voir si le marquage multiple pouvait être utilisé pour visualiser simultanément la dynamique de deux polymères au sein de la paroi : la lignine et un polysaccharide non cellulosique (composé d'hémicelluloses et/ou de pectines).

Parmi les rapporteurs chimiques disponibles pour visualiser les polysaccharides pariétaux, notre choix s'est porté sur un analogue commercial de type alcyne du fucose peracétylé, l'Ac₄FucAl. Le fucose est un monosaccharide présent dans les polymères polysaccharidiques non cellulosiques de la paroi végétale. Il est à la fois retrouvé au niveau des motifs rhamnogalacturonanes de la pectine (RGI et RGII)¹⁴⁰, mais aussi au niveau des chaînes latérales de xyloglucanes des hémicelluloses¹³⁹. L'Ac₄FucAl a été utilisé plusieurs fois dans la littérature pour marquer les parois racinaires de plantules d'*Arabidopsis thaliana*^{30,95,126}. Une fois incorporé dans les parois végétales, il a été couplé à des fluorophores présentant des fonctions azotures par CuAAC.

2. Choix du système expérimental

Contrairement à la polymérisation de la lignine qui se fait directement dans la paroi végétale extracellulaire, la synthèse de la pectine et des hémicelluloses a lieu à l'intérieur de la cellule au niveau de l'appareil de Golgi^{139,141}. Des glycosyltransférases golgiennes permettent d'ajouter des monosaccharides aux chaînes polysaccharidiques croissantes à partir de précurseurs nucléotidiques, puis les polysaccharides finaux sont transportés dans la paroi végétale via des vésicules. Ce mécanisme d'incorporation intracellulaire nécessite de travailler avec des cellules entières vivantes où l'appareil de Golgi est toujours fonctionnel. Le système expérimental le plus approprié pour obtenir une incorporation métabolique biologiquement correcte de l'Ac₄FucAl est donc l'absorption *in vivo* dans la tige entière de lin. En effet, le modèle des coupes transversales présente des cellules en surface endommagées qui ne permettraient pas une absorption intracellulaire normale de l'analogue du fucose.

3. Triple marquage Ac₄FucAl, H_{AZ}, SCP

Suite à l'optimisation du mono-marquage de l'Ac₄FucAl sur tige entière de lin, le triple marquage lignine/polysaccharides non cellulosiques a pu être réalisé avec les rapporteurs Ac₄FucAl, H_{AZ} et SCP. La base d'une tige adulte de lin a été incubée en présence des trois rapporteurs chimiques pour l'étape d'incorporation métabolique, puis la séquence réactionnelle habituelle de ligation aux fluorophores a été effectuée sur des sections transversales. Les images obtenues en microscopie

présentent à première vue une déposition des deux polymères dans deux tissus végétaux adjacents (figure 111). Les analogues de monolignols sont incorporés dans le xylème secondaire comme attendu, tandis que l'analogue du fucose est déposé dans le tissu adjacent nommé cambium. Il convient de rappeler que le cambium est la zone à partir de laquelle les cellules vont se diviser pour se différencier notamment en xylème. Lors de cette différenciation, la lignification est la dernière étape de formation de la paroi secondaire. Cependant, elle débute déjà pendant que la synthèse polysaccharidique se termine^{146,312,313}. Lorsque que les cellules forment leur paroi secondaire, il peut donc y avoir un chevauchement entre la biosynthèse des polysaccharides qui se termine et celle de la lignine qui débute.

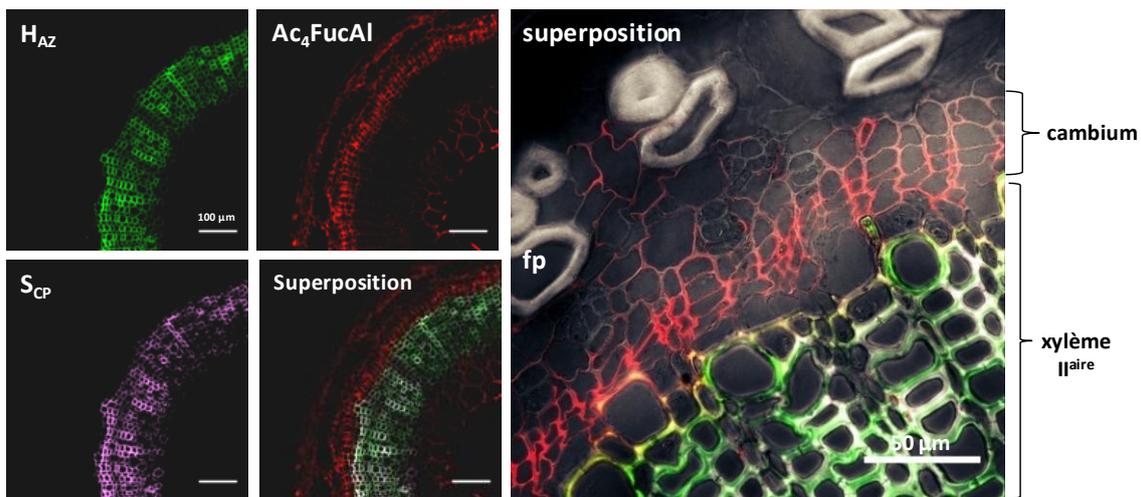


Figure 111 : triple marquage Ac_4FucAl , H_{AZ} , S_{CP} sur tige entière de lin.

Partie basale d'une tige de lin adulte incubée dans une solution contenant les rapporteurs Ac_4FucAl (20 μM), H_{AZ} (10 μM) et S_{CP} (10 μM). Des coupes transversales sont ensuite réalisées à 0,5-1 cm de hauteur à partir de la zone sectionnée pour les étapes de liaison aux fluorophores selon l'ordre réactionnel 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Gauche : canaux de fluorescence des unités H_{AZ} , Ac_4FucAl , S_{CP} et superposition des trois canaux. Echelle = 100 μm . Droite : grossissement de la zone cambium-xylème, superposition des trois canaux de fluorescence et de la lumière transmise. Echelle = 50 μm .

La mesure des profils d'intensité de fluorescence des rapporteurs chimiques permet de distinguer trois principales zones d'incorporation (figure 112). La zone 1 correspond aux cellules du cambium qui ne sont pas lignifiées. Elles incorporent donc des polysaccharides (Ac_4FucAl , pic rouge), mais pas de monolignols. La zone 2 correspond aux cellules du xylème qui sont déjà relativement matures avec une paroi secondaire bien développée. Elles n'incorporent plus d' Ac_4FucAl , ce qui signifie que la biosynthèse de polysaccharides non cellulosiques est terminée. Elles continuent néanmoins à polymériser les monolignols pour former de la lignine (H_{AZ} , pic vert, S_{CP} , pic violet). Enfin, la zone 3 correspond à la paroi des premières cellules de xylème commençant leur différenciation. Dans ces cellules, la synthèse polysaccharidique n'est pas totalement terminée mais la polymérisation de la lignine a déjà commencé. Ainsi, on peut remarquer une incorporation simultanée de l' Ac_4FucAl et des monomères H_{AZ} et S_{CP} dans la même paroi végétale (pics rouge, vert et violet de même intensité). Cette co-déposition simultanée de la lignine et des polysaccharides non cellulosiques lors des premiers stades

de différenciation de la paroi secondaire a déjà été suggérée^{146,312}, mais c'est la première fois qu'elle est visualisée.

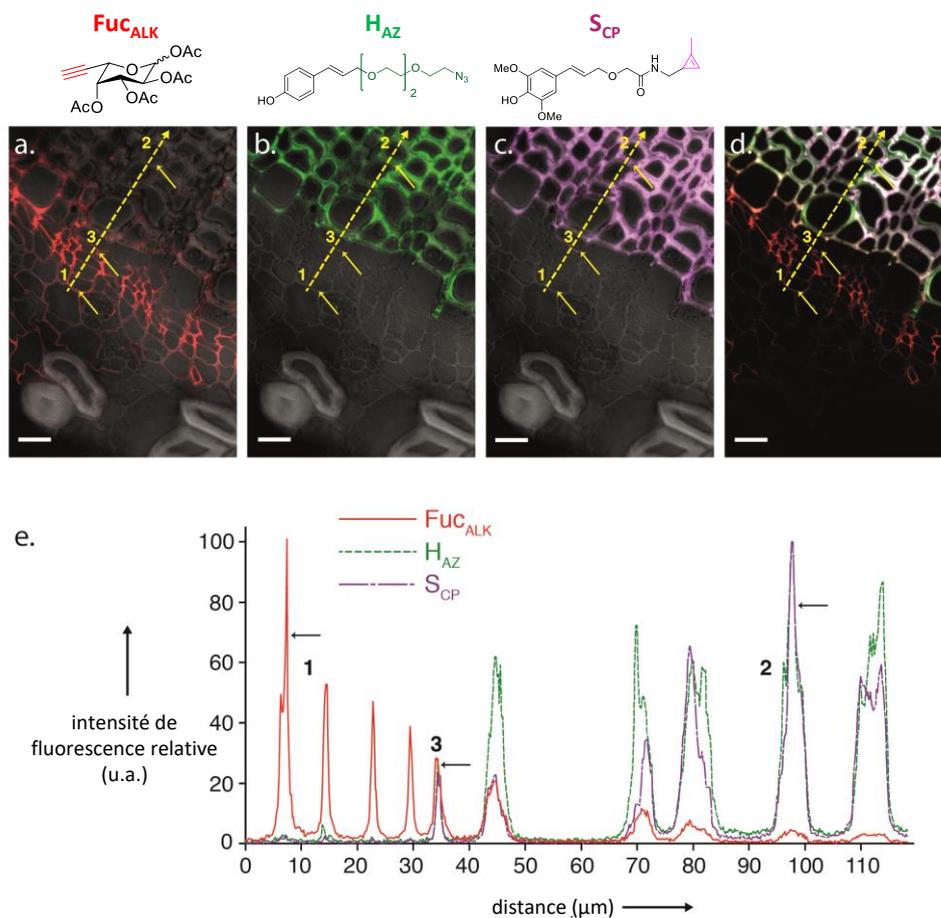


Figure 112 : mesure des profils d'intensité de fluorescence lors du triple marquage Ac₄FucAl, H_{AZ}, S_{CP}. (a-c) Canaux de fluorescence des rapporteurs Ac₄FucAl, H_{AZ} et S_{CP}. (d) Superposition des trois canaux de fluorescence. Echelle = 20 μm. e) Profil d'intensité de fluorescence mesuré au niveau de la ligne en pointillés, reflétant l'incorporation de chaque rapporteur chimique au niveau : (1) du cambium vasculaire, (2) du xylème mature et (3) du très jeune xylème en cours de différenciation. Les flèches permettent de resituer les différentes régions entre le spectre de fluorescence et les images. Adapté de [314].

Les résultats présentés sur le triple marquage des monolignols et également sur le marquage multiple lignine-polysaccharides ont fait l'objet d'une publication fin 2018³¹⁴.

V. Vers la microscopie de super-résolution

Les applications de microscopie de super-résolution pour étudier les parois végétales sont très limitées et comportent uniquement deux exemples à l'heure actuelle^{271,272}. Or ces techniques permettraient d'obtenir une visualisation plus fine des parois végétales et de leur composition en se rapprochant de la haute résolution de la microscopie électronique.

La technique de super-résolution à fluorescence nommée AiryScan a pu être expérimentée lors de cette thèse pour visualiser un échantillon de triple marquage des unités H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} sur coupe de tige de lin. Elle repose sur l'utilisation de 32 détecteurs particuliers qui forment un détecteur global. Chacun d'entre eux acquiert une information spatiale très résolue. Les 32 images acquises simultanément sont ensuite traitées et permettent d'obtenir une augmentation de la résolution de 1,7 à 2,4 fois, avec une amélioration du rapport signal sur bruit de 4 fois minimum par rapport à une acquisition confocale équivalente. L'autre avantage dans notre cas est que la technologie Airyscan est directement compatible avec nos expériences puisqu'elle nécessite les mêmes fluorophores et les mêmes compétences que pour la technologie confocale classique³¹⁵.

La comparaison entre les modes d'acquisition Airyscan et confocal sur un échantillon de xylème marqué souligne le gain de résolution et permet une différenciation plus fine des différentes couches de la paroi (figure 113A). Cela valide en outre l'incorporation différentielle des rapporteurs chimiques dans les différentes couches pariétales qui avait été suggérée lors du triple marquage sur tige entière de lin (figure 110).

La quantification relative des signaux de fluorescence entre les deux images confirme le gain de précision apporté par la technique Airyscan. Les profils d'intensité de fluorescence des monomères polymérisés ont été mesurés au niveau de la paroi d'une cellule de xylème (figure 113A, flèche jaune). En microscopie confocale classique, les trois rapporteurs présentent un signal d'incorporation relativement similaire dans la couche S2 de la paroi secondaire, avec une intensité de fluorescence d'environ 1 u.a. (figure 113B, confocal). Le profil d'intensité réalisé sur la même zone à partir de l'image AiryScan révèle un schéma d'incorporation des monomères plus contrasté (figure 113B, Airyscan). D'abord, les unités H_{AZ} (bleu) et G_{ALK} (vert) sont globalement incorporées en quantités plus faibles que l'unité S_{CP} (rouge), comparativement aux résultats obtenus en microscopie confocale. De plus, elles ne présentent plus un profil d'incorporation linéaire dans cette zone (cercle orange). Enfin, les zones adjacentes à la paroi secondaire qui semblaient plus riches que cette dernière en unités H_{AZ} et G_{ALK} en microscopie confocale peuvent être clairement identifiées en microscopie Airyscan (cercles noirs).

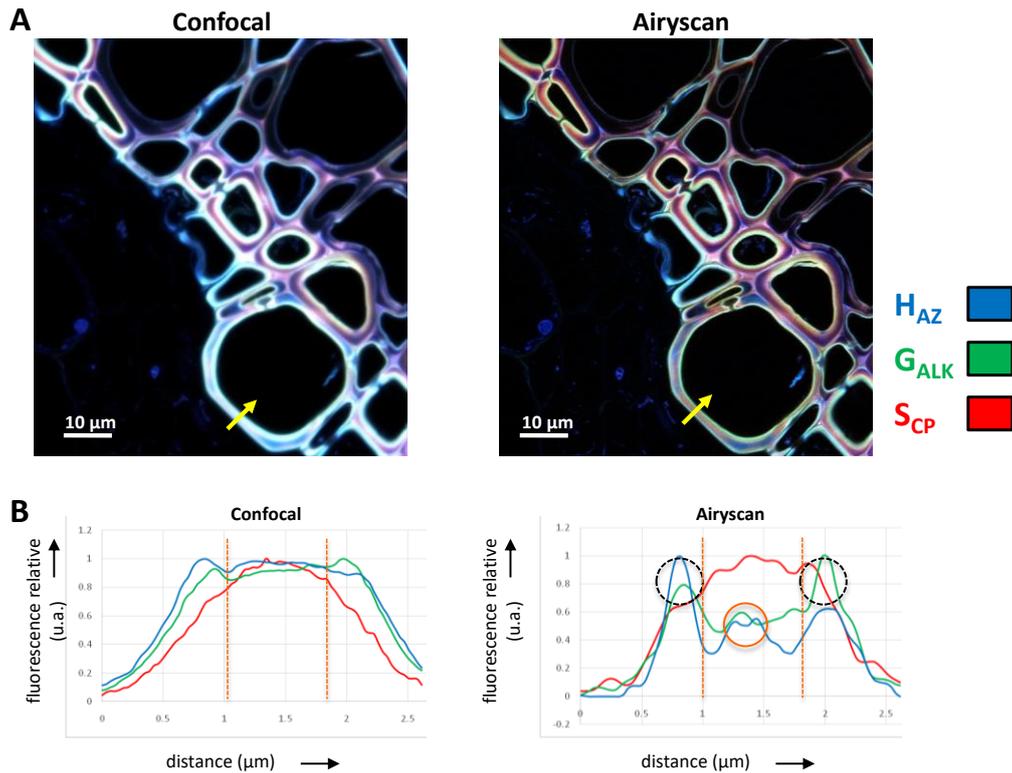


Figure 113 : apport de la microscopie de super-résolution Airyscan pour le triple marquage de la lignine. A) Triple marquage H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} réalisé sur coupe transversale de tige de lin de 2 mois. Observation des premières assises du xylème par la technologie confocale classique puis par la technologie Airyscan. Superposition des canaux de fluorescence des rapporteurs H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} . B) Comparaison des profils d'intensité de fluorescence des trois rapporteurs chimiques entre les deux technologies. La paroi secondaire est délimitée par les deux traits verticaux.

Ces résultats montrent que la technologie Airyscan permet d'affiner les motifs de lignification au niveau des différentes couches pariétales et d'étudier de manière plus précise la distribution des différents analogues de monolignols au niveau subcellulaire. Les technologies de microscopie de super-résolution semblent ainsi prometteuses pour l'étude des composés pariétaux comme la lignine, surtout lorsqu'elles sont compatibles avec des microscopies de fluorescence plus accessibles telles que la microscopie confocale.

VI. RPE, résultats préliminaires

1. Principe de la RPE

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique qui détecte les espèces paramagnétiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche de valence. Elle permet de détecter leur structure, leur concentration ou leurs interactions avec l'environnement. Les espèces paramagnétiques comprennent principalement les radicaux libres (motifs nitroxydes), les métaux de transition ($\text{Fe}^{2+/3+}$, Cu^{2+} , *etc.*), les radicaux organiques ou encore les molécules formées au cours de réactions d'oxydoréduction. Elles présentent toutes deux types d'interaction magnétique lors d'une expérience RPE : l'interaction de Zeeman correspond à l'interaction de l'espèce paramagnétique avec le champ magnétique extérieur, alors que l'interaction hyperfine correspond à son interaction avec l'environnement.

a. Interactions magnétiques

Interaction de Zeeman

Le principe de la RPE peut être assimilé à celui de la RMN en remplaçant l'étude des spins des noyaux par celle des spins des électrons célibataires³¹⁶. En effet, lorsque l'électron libre (dont la valeur de spin S est égale à $1/2$) est placé dans un champ magnétique extérieur (nommé B_0), il va se comporter comme un barreau aimanté qui s'aligne sur l'axe du champ B_0 . Les spins peuvent alors prendre deux types d'orientation selon cet axe, ce qui donne lieu à deux populations énergétiques différentes. La population de basse énergie est alignée parallèlement au champ et possède un niveau d'énergie $E = -1/2$, tandis que celle de haute énergie est alignée dans le sens opposé au champ et possède un niveau d'énergie $E = +1/2$ (figure 114A). Les deux populations électroniques sont alors séparées par un écart d'énergie ΔE qui est proportionnel à l'amplitude du champ B_0 appliqué. Lorsqu'un rayonnement électromagnétique de valeur $h\nu$ est fourni au système paramagnétique, ce dernier absorbe de l'énergie, ce qui engendre une transition entre les deux niveaux énergétiques associée à une radiation (figure 114B).

L'écart d'énergie ΔE est donné par l'équation $\Delta E = h\nu = g\beta B_0$ régie par :

- deux constantes expérimentales :
 - h : constante de Planck ($h = 6,6261 \cdot 10^{-34}$ J.s)
 - β : magnéton de Bohr électronique ($\mu_B = 9,2741 \cdot 10^{-24}$ J/T)
- deux paramètres expérimentaux :
 - B_0 : champ magnétique externe (Tesla)
 - ν : fréquence de l'onde électromagnétique (Hz)
- une constante de proportionnalité :

- g : facteur de Landé (grandeur physique sans dimension qui dépend de la structure électronique du centre paramagnétique)

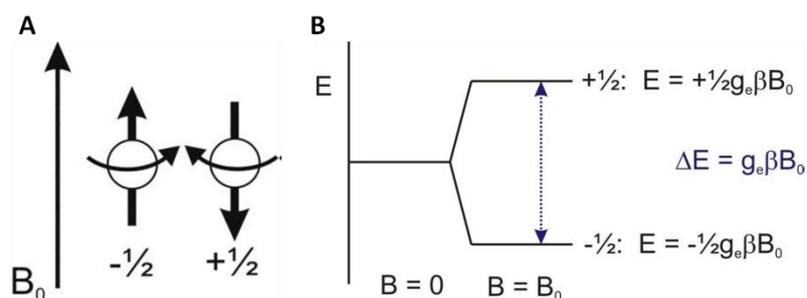


Figure 114 : principe théorique de la spectroscopie RPE.

A) Orientations possibles d'un spin électronique dans un champ magnétique extérieur B_0 .

B) Niveaux d'énergie associés à l'orientation des spins d'après l'interaction de Zeeman. Extrait de [316].

Cette transition génère un spectre caractéristique des énergies absorbées correspondant au phénomène RPE. En pratique, la dérivée première de ce spectre est mesurée afin de faciliter son interprétation. L'identification des espèces paramagnétiques sur les spectres est réalisée en déterminant la valeur du facteur de Landé (g) de chaque espèce.

Interaction hyperfine

L'espèce paramagnétique étant soumise également à l'interaction hyperfine, le signal RPE obtenu comporte en réalité plusieurs raies. En effet, cette deuxième variable correspond à l'interaction la plus forte entre le spin de l'électron non apparié et le spin du noyau de l'atome autour duquel il gravite. Pour chaque état énergétique de spin $+1/2$ et $-1/2$, l'interaction entre l'électron libre analysé et les n atomes équivalents voisins (de spin I) donnera la formule de $2nI+1$ orientations possibles du spin électronique, soit $2nI+1$ niveaux d'énergie représentés par $2nI+1$ raies sur le spectre d'absorption.

b. Marquage de spin : sonde TEMPO

Lorsque la molécule à étudier ne présente pas de centre paramagnétique naturel, l'une des solutions existantes consiste à la coupler de manière covalente avec une sonde radicalaire stable. La signature radicalaire de cette sonde permet d'étudier son environnement dans la matrice hôte. Cette méthode est appelée marquage de spin (pour *spin labelling*). Dans le cadre de ces travaux de thèse, une sonde radicalaire a donc été liée de manière covalente à un analogue de monoglignol afin de pouvoir obtenir des informations sur la lignification par spectroscopie RPE. La sonde (ou marqueur de spin) choisie est le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl (TEMPO, figure 115A). Son caractère paramagnétique est généré par l'électron célibataire porté par l'oxygène du groupement nitroxyde $N-O\cdot$. L'encombrement stérique autour de ce groupement est responsable de la stabilité radicalaire de la sonde. Le spin nucléaire du noyau de l'azote a une valeur de $I = 1$, ce qui signifie qu'il va interagir avec le spin

électronique de trois manières énergétiques différentes selon la formule $2nI+1$. Par conséquent, le spectre RPE obtenu comporte 3 raies identiques centrées vers $g = 2,0070^{317}$ (figure 115B).

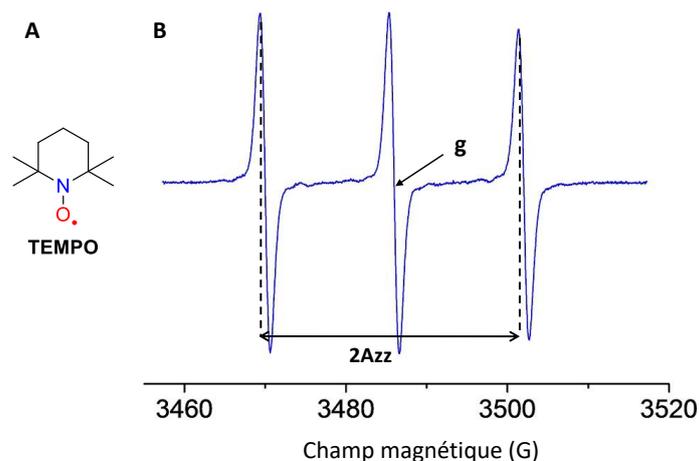


Figure 115 : signature RPE de la sonde TEMPO. A) Structure chimique du motif TEMPO. B) Spectre RPE de son signal d'absorption en solution (après avoir effectué la dérivée première). La constante de couplage $2A_{zz}$ correspond à la distance entre les raies les plus éloignées. La valeur du champ magnétique permet de déterminer la valeur de g .

Lors du marquage de spin, l'environnement biologique local dans lequel se trouve la sonde nitroxyde influe sur sa mobilité, ce qui se traduit sur le spectre par des changements de forme et d'intensité. Cette mobilité est notamment définie par le temps de corrélation de la sonde noté τ_c . Plus sa valeur est faible, plus le mouvement de rotation du radical est rapide et plus les trois raies formant son signal RPE sont fines (figure 116). A l'inverse, plus le motif paramagnétique est immobilisé, plus les raies s'élargissent. Les spectres obtenus donnent donc des informations sur l'environnement local, ici la matrice lignocellulosique, dans lequel se situe la sonde radicalaire.

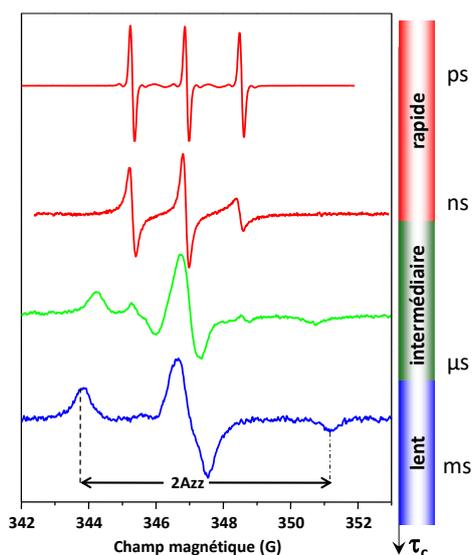


Figure 116 : ensemble de spectres RPE d'un radical nitroxyde en fonction de sa mobilité, caractérisée par le temps de corrélation τ_c . La constante de couplage $2A_{zz}$ déterminée graphiquement permet également de caractériser la mobilité du radical.

Le spectre RPE d'une sonde TEMPO donne donc accès à différentes informations sur la mobilité de l'espèce paramagnétique et sur son environnement. Les paramètres qui vont nous intéresser sont les suivants :

- L'intégration du spectre RPE informe sur le nombre de spin électroniques présents et permet de réaliser des quantifications par rapport à un standard.
- La largeur des raies d'absorption et le temps de corrélation τ_c renseignent sur la mobilité de la sonde et donc sur son environnement local.
- La constante de couplage $2A_{zz}$ renseigne également sur la mobilité de la sonde. Elle est directement mesurable sur le spectre et correspond à la distance entre les raies les plus éloignées (figure 116). Plus sa valeur augmente, plus la sonde étudiée est ralentie.

2. La RPE appliquée aux modèles végétaux

La RPE présente un large champ d'applications en chimie du solide, géologie, pétrologie ou encore biochimie. Elle présente l'avantage de pouvoir être appliquée à des échantillons complexes. En effet, ces derniers peuvent être liquides, solides et même organiques (tissus animaux ou végétaux).

La spectroscopie RPE appliquée aux modèles végétaux permet notamment d'étudier les ROS directement au sein des tissus. En effet, ces derniers comportent deux formes paramagnétiques détectables : l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} . Ces ROS sont générés pendant le développement de la plante et en condition de stress. Elles sont cependant très réactives et possèdent des temps de vie très courts (de l'ordre de la seconde ou de la nanoseconde), ce qui rend leur quantification dans les tissus très complexes. Deux méthodes de spectroscopie RPE peuvent être utilisées pour les étudier. La première consiste à stabiliser les ROS à l'aide de piègeurs à spin. Ce sont des composés diamagnétiques qui vont réagir avec un ROS spécifique et former des adduits paramagnétiques plus stables. Ces derniers vont s'accumuler dans les tissus végétaux et atteindre une concentration suffisante permettant à la fois d'identifier le ROS piégé et de le quantifier par spectroscopie RPE³¹⁸. La deuxième technique consiste à insérer dans l'échantillon végétal des sondes radicalaires stables telles que les sondes TEMPO. Elles vont alors réagir par couplage radicalaire avec les ROS paramagnétiques et devenir diamagnétiques. Le suivi de la cinétique de dégradation des radicaux nitroxydes permet d'obtenir des informations sur le statut redox de l'échantillon végétal mais ne permet pas d'identifier spécifiquement les ROS.

Le polymère végétal de lignine a également été étudié par RPE dans un contexte de valorisation de la biomasse lignocellulosique. En effet, la dépolymérisation de la lignine par pyrolyse génère des monomères radicalaires. En raison de leur faible stabilité, des piègeurs de spin ont été utilisés afin de les stabiliser suffisamment longtemps pour pouvoir les détecter par spectroscopie RPE³¹⁹. Dans d'autres études, des extraits de lignine ont été incubés avec des laccases fongiques capables de dégrader le

polymère en radicaux phénoxyles. Le suivi cinétique du signal RPE pendant la dégradation enzymatique du polymère donne des informations sur la réactivité de ces laccases³²⁰.

Concernant l'imagerie RPE, les applications sur les plantes restent relativement rares. Parmi les exemples existants, Nagawa *et al.* ont notamment visualisé l'ensemble des espèces paramagnétiques présentes dans les graines de poivre³²¹ et de sésame³²².

3. Objectifs

Nous avons précédemment démontré que la stratégie du rapporteur chimique combinée à l'imagerie par microscopie confocale de fluorescence est applicable aux différents monomères formant le polymère de lignine. Cependant, la quantification du signal de fluorescence ne peut se faire que de manière relative entre les différents échantillons d'une même expérience. Il n'est donc pas possible de déterminer la quantité de rapporteurs chimiques polymérisés dans les tissus à l'aide de la stratégie de marquage par fluorescence mise au point.

L'objectif ici est d'initier un développement méthodologique afin d'adapter notre méthode de mono-marquage métabolique à une autre technique de détection : la spectroscopie RPE. Ceci permettra à terme de quantifier le rapporteur introduit et d'obtenir des informations sur l'environnement dans lequel il est incorporé. L'étude de la localisation des rapporteurs chimiques marqués en spin, de leur environnement chimique ou de leur mobilité au sein de la paroi sont autant de paramètres non accessibles par la microscopie en fluorescence mais potentiellement accessibles par la RPE et qui pourraient contribuer à mieux comprendre le phénomène de lignification. Dans le cadre d'un autre projet, cela pourrait également permettre de faire la connexion entre les monolignols et les enzymes qui contrôlent leur polymérisation radicalaire. En effet, les métaux présents dans les sites catalytiques des laccases et peroxydases peuvent eux aussi théoriquement être détectés en RPE.

Le but de cet axe de recherche est donc de concevoir des sondes radicalaires fonctionnalisées adaptées à la ligation bioorthogonale afin d'appliquer à nouveau la stratégie du rapporteur chimique à la détection de la lignine *in situ* par RPE. La validation de la stabilité et de la solubilité de ces sondes par spectroscopie RPE, la caractérisation de leur signal puis la vérification que la réaction bioorthogonale choisie a bien lieu sans altérer la nature du radical constituera d'abord une preuve de concept montrant l'adéquation de la technique avec nos méthodes de marquage. De plus, la détection d'un signal spécifique résultant du cycloadduit formé entre le rapporteur chimique et la sonde radicalaire pourra par la suite donner des informations sur sa structure, sa concentration ou ses interactions avec l'environnement chimique pariétal dans lequel il est incorporé. Une fois la preuve de concept obtenue par spectroscopie RPE, la méthode pourra être étendue à l'imagerie RPE afin de détecter les zones de lignification actives, ce qui représente un véritable challenge d'un point de vue technologique.

4. Stratégie générale

Comme pour les travaux précédemment présentés, la stratégie du rapporteur chimique comprend deux principales étapes. La première est l'incorporation métabolique d'un analogue du monolignol d'intérêt parmi les trois rapporteurs spécifiques à disposition (H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP}). Le monomère S_{CP} a été choisi pour réaliser la preuve de concept car la ligation bioorthogonale de DAinv semble la plus simple à mettre en œuvre pour la spectroscopie RPE (figure 117A). En effet, l'utilisation de l'analogue G_{ALK} nécessite une réaction bioorthogonale de type CuAAC. Or, le système catalytique ascorbate de sodium/sulfate de cuivre pentahydraté n'est pas compatible avec la sonde radicalaire car l'ascorbate de sodium est susceptible de réduire le radical nitroxyde. Concernant le rapporteur chimique S_{CP} , le groupement tétrazine nécessaire à la ligation de type DAinv génère moins de marquage aspécifique que le groupement cyclooctyne de la SPAAC. Cependant, cette dernière est *a priori* également compatible avec la technique RPE.

La deuxième étape de la stratégie est la réalisation de la réaction de DAinv entre le rapporteur chimique incorporé et une sonde radicalaire de type TEMPO afin de la détecter en RPE (figure 117B).

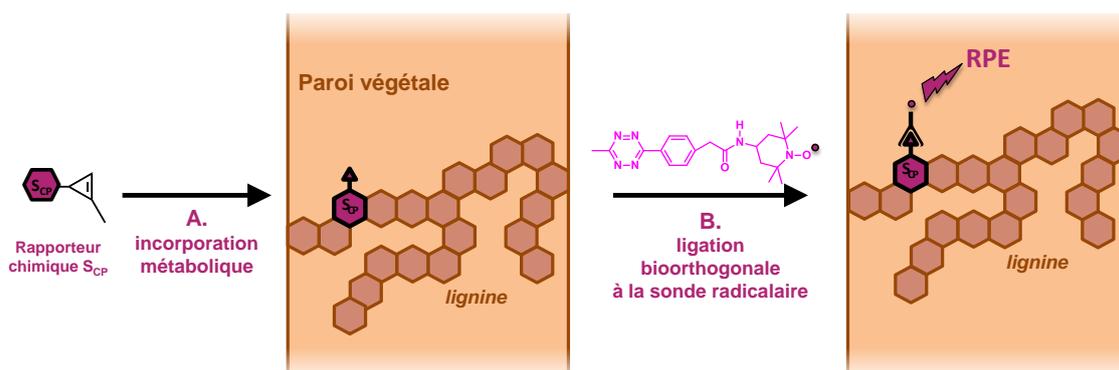


Figure 117 : stratégie mise au point pour l'étude de la lignification par la stratégie du rapporteur chimique combinée à la spectroscopie RPE. A) Incorporation métabolique du rapporteur S_{CP} dans la lignine de tissus végétaux. B) Ligation du groupement méthylcyclopropène des unités S_{CP} polymérisées au groupement tétrazine porté par une sonde radicalaire de type TEMPO (technique du marquage de spin) par la réaction de ligation bioorthogonale de DAinv.

5. Conception et synthèse des sondes radicalaires

Conception

Une fois le monomère S_{CP} incorporé dans la lignine de tissus végétaux, son groupement méthylcyclopropène peut réagir spécifiquement avec un groupement tétrazine par la réaction bioorthogonale de DAinv. Il a donc d'abord fallu concevoir des sondes radicalaires de type TEMPO portant un groupement tétrazine. Trois sondes présentant des différences structurales ont été synthétisées afin de comparer leur efficacité d'incorporation dans les tissus et/ou de réactivité lors de leur ligation avec le groupement méthylcyclopropène du rapporteur S_{CP} (figure 118). La sonde CS093, surnommée méthyl-tétrazine-TEMPO, est constituée de la partie radicalaire TEMPO couplée à un groupement 3-

méthyl-6-phényl-tétrazine via une liaison amide. Elle a fait l'objet des premières mises au point en solution et sur tissus végétaux, avant que deux autres sondes ne soient par la suite synthétisées. Ainsi, la sonde CS094, surnommée méthyl-tétrazine-PEG₄-TEMPO, comporte un bras espaceur de type PEG₄ afin d'augmenter sa solubilité en milieu aqueux, mais elle présente le même linker réactif que CS093. La sonde CS095, surnommée tétrazine-PEG₅-TEMPO, comporte un bras espaceur presque identique à celui de CS094, mais elle ne possède plus de groupement méthyle en position 3 de la tétrazine. Cette modification devrait avoir pour effet de rendre la sonde plus réactive envers le méthylcyclopropène du monomère S_{CP}. En revanche, les tétrazines non méthylées sont parfois moins stables que les tétrazines méthylées.

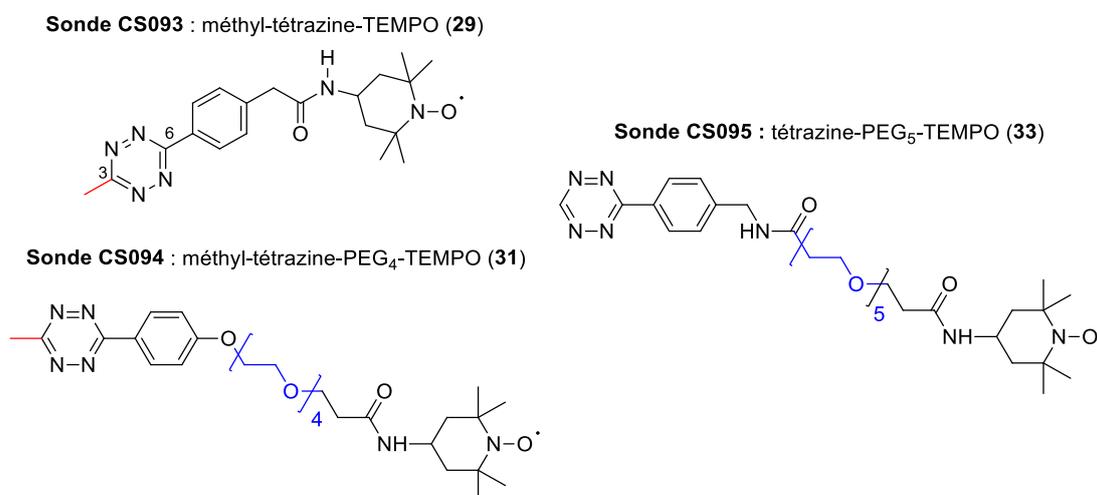


Figure 118 : structure chimique des trois sondes radicalaires synthétisées. Les sondes CS093 et CS094 possèdent un groupement méthyle au niveau de leur tétrazine tandis que celui-ci est absent chez la sonde CS095. Les sondes CS094 et CS095 possèdent des bras espaceurs respectivement de type PEG₄ et PEG₅, alors que la sonde CS093 en est dépourvue.

Synthèse

La synthèse de chaque sonde se fait en une seule étape à partir des linkers commerciaux de type ester activé de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (figure 119, composés **28**, **30** et **32**). Ces derniers sont engagés dans une réaction de couplage avec le 4-amino-TEMPO afin d'aboutir aux composés finaux **29** (CS093), **31** (CS094) et **33** (CS095) avec des rendements respectifs de 83, 89 et 99 %³²³. Chaque sonde obtenue a été caractérisée par RMN et par spectrométrie de masse.

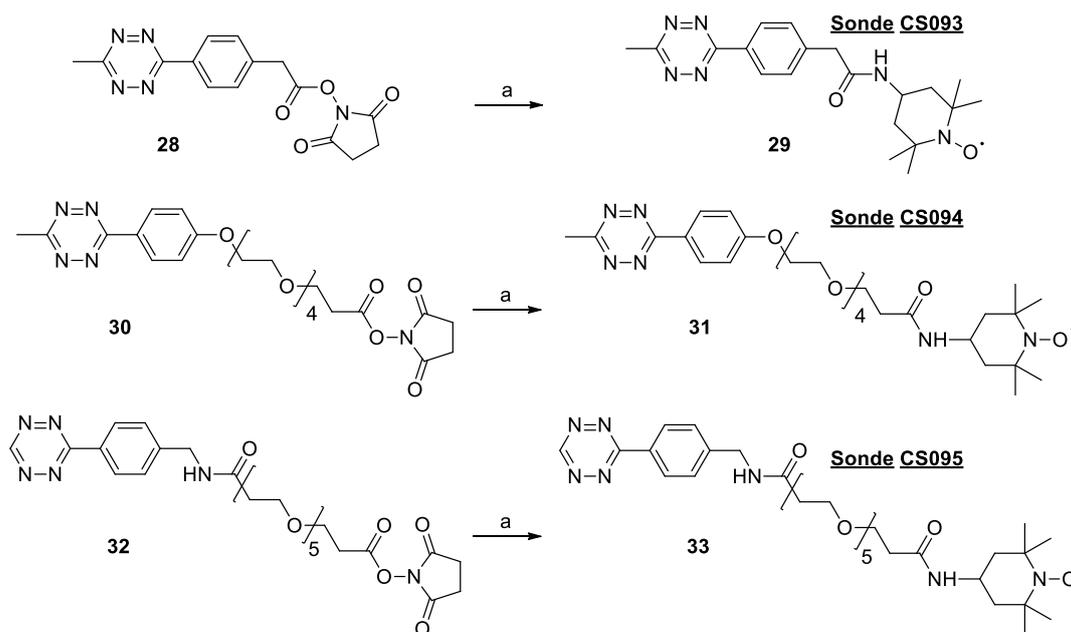


Figure 119 : stratégie de synthèse des trois sondes radicalaires. Réactifs et conditions : a) 4-amino-TEMPO, DIEA, THF-DCM, 0°C à ta. Rendements respectifs : CS093, 83 % ; CS094, 89 % ; CS095, 99 %.

6. Vérification de l'efficacité du couplage de DAinv par spectrométrie de masse

L'efficacité de la ligation de DAinv entre le méthylcyclopropène du rapporteur S_{CP} et la tétrazine de la sonde radicalaire initiale CS093 a été vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La réaction a été réalisée en solution aqueuse en présence d'un excès de sonde radicalaire (2 équivalents molaires). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel a été analysé et le cycloadduit identifié : m/z $[M+2H]^+$ calculé : 690,39 ; mesuré : 689,60 ; $[M+H+Na]^+$ calculé : 712,37 ; mesuré : 711,58 (figure 120).

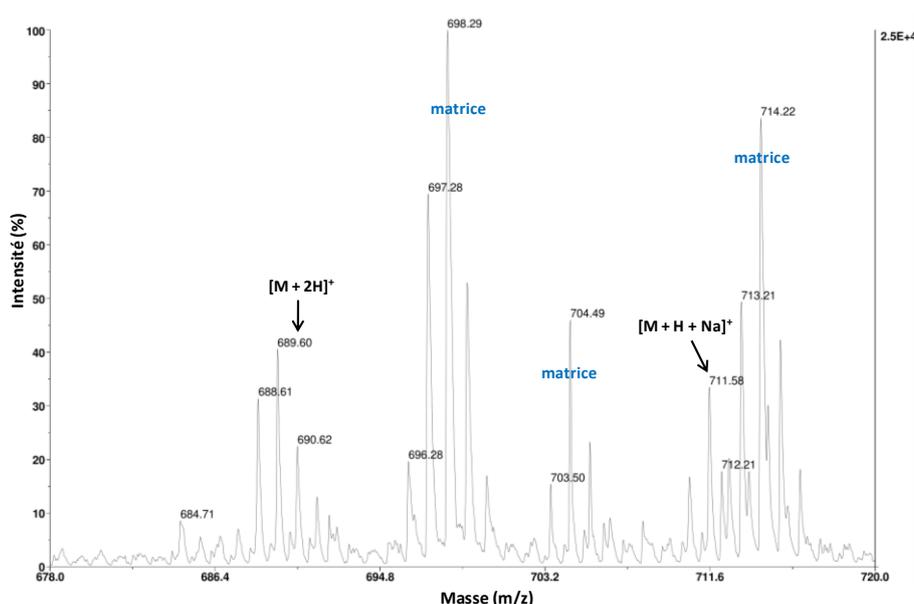


Figure 120 : identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF du cycloadduit formé lors de la réaction de DAinv entre la sonde radicalaire CS093 (100 μ M) et le rapporteur S_{CP} (50 μ M) en milieu aqueux.

La réaction de ligation bioorthogonale entre la sonde CS093 et le monomère S_{CP} étant effective en milieu aqueux, elle peut être étendue à la spectroscopie sur tissus végétaux. Pour cela, il faut d'abord vérifier que la sonde CS093 possède bien une signature radicalaire visible.

7. Spectroscopie RPE

a. Analyse des sondes en solution

Chaque sonde synthétisée a été analysée en solution par spectroscopie RPE en onde continue. Le spectre obtenu pour la sonde CS093 confirme son caractère paramagnétique (figure 121). Le signal est composé de trois raies équidistantes typiques du groupement nitroxyde porté par le motif TEMPO. La stabilité dans le temps des sondes en solution a été vérifiée en réalisant des spectres RPE à intervalle régulier sur une période de plusieurs semaines (solutions conservées à -20°C). De même, les spectres RPE obtenus pour les sondes CS094 et CS095 synthétisées par la suite présentent un signal radicalaire similaire et spécifique du motif chimique TEMPO (annexe 13).

La relation de proportionnalité entre l'aire du signal radicalaire de la sonde CS093 et la concentration à laquelle elle est analysée a permis de réaliser une droite d'étalonnage pour une gamme de concentrations de $1\ \mu\text{M}$ à $200\ \mu\text{M}$ (annexe 13).

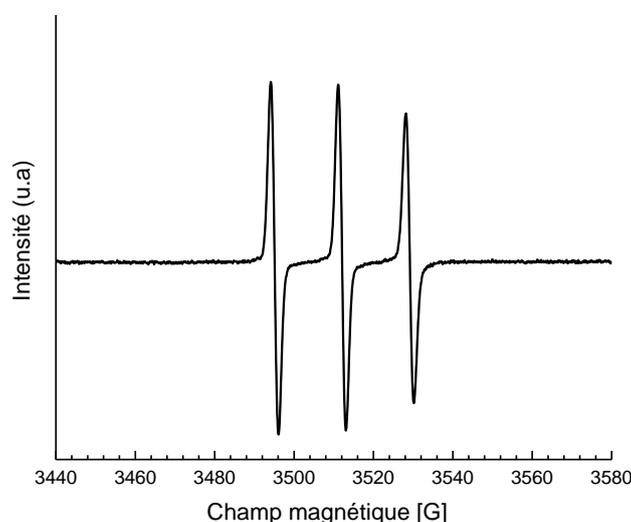


Figure 121 : spectre RPE de la sonde CS093 en solution. Les trois raies équidistantes sont représentatives de l'empreinte radicalaire du groupement nitroxyde du motif TEMPO. Détermination expérimentale de $g = 2,0056$.
Conditions d'acquisition : puissance = $0,6325\ \text{mW}$, modulation d'amplitude = $2\ \text{G}$.

b. Analyse des sondes sur tissus végétaux

i. Protocole mis au point

Après avoir vérifié le caractère radicalaire des molécules de détection synthétisées, la stratégie du rapporteur chimique a pu être effectuée sur modèle végétal. Les coupes transversales de tige ont été incubées dans une solution comportant le rapporteur chimique S_{CP} à 10 μM afin de permettre son incorporation dans la lignine. Après plusieurs lavages, une étape de fixation au paraformaldéhyde à 4 % a été ajoutée par rapport à la stratégie mise au point pour la détection par fluorescence. En effet, les laccases et/ou peroxydases pouvant catalyser la formation d'espèces radicalaires (radicaux phénoxyles), il est nécessaire de les rendre non fonctionnelles par fixation afin d'éviter la génération de réactions secondaires avec les sondes radicalaires. Les coupes végétales ont ensuite été incubées avec la molécule paramagnétique d'intérêt (CS093, 94 ou 95) à 100 μM pendant 2 heures afin de réaliser la réaction de DA_{inv} entre les méthylcyclopropènes des monomères polymérisés et les tétrazines portées par les sondes TEMPO. Des lavages ont été effectués puis les coupes ont été analysées par spectroscopie RPE en onde continue. Les spectres ont été enregistrés pour un ensemble de neuf sections végétales par échantillon afin d'obtenir un ratio signal sur bruit suffisant pour les analyses.

Pour chaque sonde radicalaire, un contrôle négatif a été réalisé en parallèle en remplaçant le monomère S_{CP} par du milieu de culture MS $\frac{1}{2}$ lors de l'étape d'incorporation métabolique.

ii. Résultats

Aspects généraux des spectres

Pour chaque sonde radicalaire testée, les résultats sont obtenus sous la forme d'un graphe RPE sur lequel sont représentés différents spectres (figure 122A-C). Chaque spectre expérimental (représenté en noir) correspond au signal de chaque sonde radicalaire mise en présence des tissus ayant incorporé le rapporteur S_{CP} . Les aires observées entre ces spectres expérimentaux et le spectre TEMPO en solution ne présentent pas la même forme. En effet, plus la sonde est immobilisée dans l'échantillon, plus elle va présenter des raies élargies et une anisotropie du tenseur hyperfin. Les élargissements observés peuvent avoir plusieurs significations. Soit la sonde est immobilisée car elle est liée de manière covalente au rapporteur S_{CP} incorporé dans les tissus, ce qui signifie que les raies élargies représentent un marquage spécifique de la lignine. Soit la sonde est immobilisée car elle est piégée dans la matrice lignocellulosique. Dans ce cas, une raie large peut aussi être observée sans pour autant qu'elle ne reflète un couplage spécifique de la sonde paramagnétique avec les rapporteurs chimiques. La réalisation des témoins négatifs pour chaque spectre est donc essentielle pour distinguer le marquage spécifique du non spécifique.

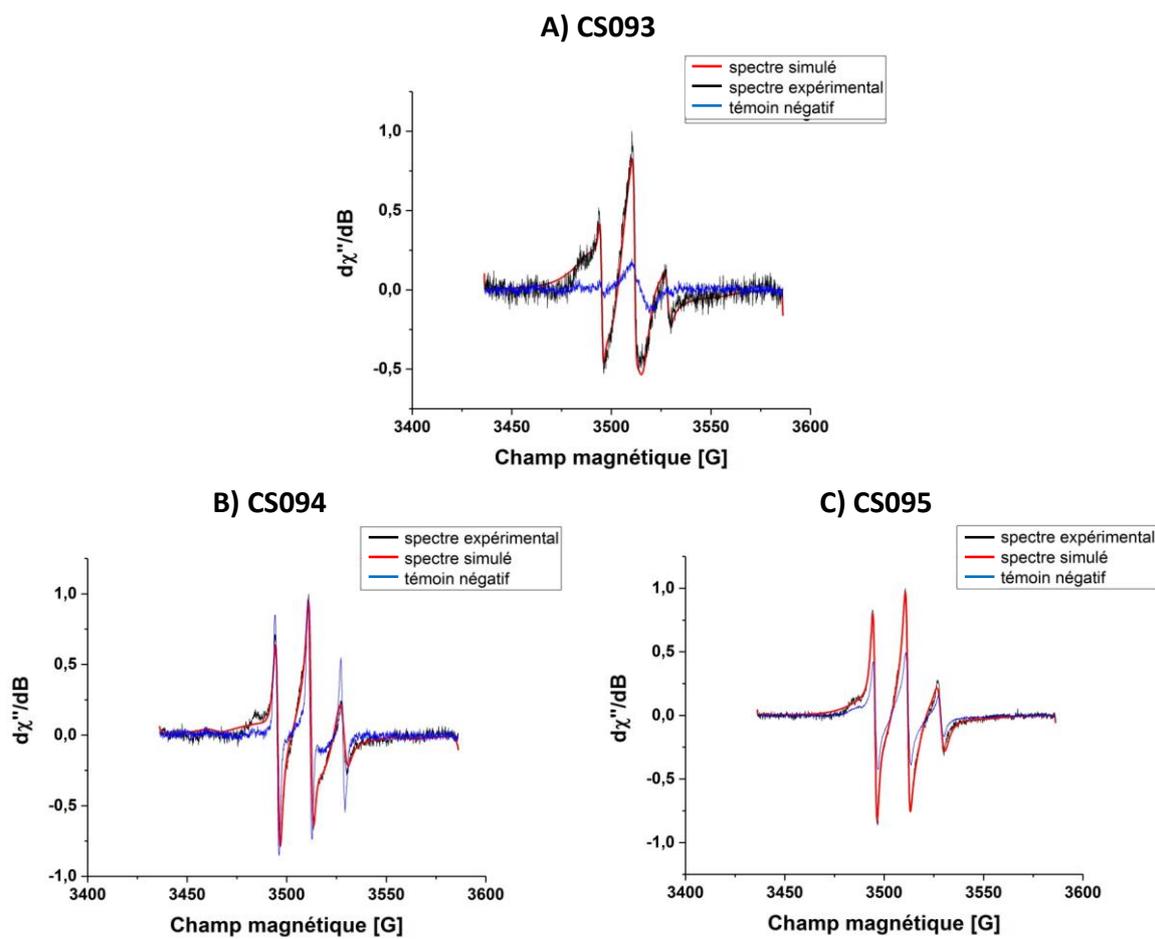


Figure 122 : spectres radicalaires obtenus après la stratégie du rapporteur chimique sur tissus végétaux. Coupes transversales de tiges de lin de 2 mois incubées avec le rapporteur S_{CP} à $10 \mu\text{M}$ durant 20 h, puis fixées au PAF à 4 % pendant 1 h, avant d'être incubées avec la sonde paramagnétique d'intérêt (CS093, 94 ou 95) à $100 \mu\text{M}$ durant 2 h. Les spectres représentent la dérivée de la susceptibilité paramagnétique (*i.e.* l'intensité paramagnétique) du signal en fonction du champ magnétique. Conditions d'acquisition : puissance = 15, 89 mW, modulation d'amplitude = 2 G.

Comparaison aux témoins négatifs

Pour la molécule CS093, une différence nette est observée entre le spectre expérimental versus le témoin, à la fois en termes d'intensité et de forme (spectres A). Ces deux critères confirment que la sonde s'est liée de manière spécifique au rapporteur S_{CP} incorporé dans les tissus. De plus, le spectre du témoin négatif est négligeable par rapport au spectre expérimental si l'on intègre les signaux.

Pour le spectre CS094, la distinction du signal spécifique est à première vue moins évidente car le spectre du témoin présente un signal intense (spectres B). Pourtant, la superposition des spectres témoin versus expérimental présente des différences de forme, ce qui signifie que la sonde nitroxyde comporte différentes composantes ayant chacune une mobilité propre. D'une part, une première composante similaire au signal du témoin négatif représente le marquage aspécifique. D'autre part, des raies supplémentaires visibles uniquement sur le spectre expérimental confirment la présence d'au moins une autre composante. Cette dernière correspond donc à une fixation spécifique de la sonde sur le rapporteur chimique S_{CP} dans les tissus.

Pour la sonde CS095, le spectre du témoin négatif présente un signal moins intense mais avec une forme totalement identique à celle du spectre expérimental (spectres C). Son signal est donc entièrement aspécifique. Cette absence de marquage spécifique peut s'expliquer par l'absence de groupement méthyle en position 3 de la tétrazine qui l'a rendue moins stable. La sonde alors a pu se décomposer lors de l'étape de ligation bioorthogonale et rester piégée de manière aspécifique dans les tissus végétaux. Elle ne sera donc pas retenue pour les prochaines expériences de marquage métabolique de la lignine.

Simulation des spectres

Les sondes CS093 et CS094 permettant un marquage radicalaire spécifique des unités S_{CP} , des paramètres d'étude plus précis ont été déterminés à partir de simulations réalisées par le Dr. Hervé Vezin. Elles ont été effectuées à partir de la boîte à outils Easyspin³²⁴ développée par MatLab® et consistent à reprendre les conditions expérimentales des acquisitions en faisant varier différents paramètres (couplage hyperfin, largeur des raies et facteur g) jusqu'à ce que la simulation soit superposable au spectre expérimental. Ces spectres simulés sont représentés en rouge au niveau de la figure 122. Les paramètres obtenus grâce à chaque simulation spectrale sont recensés dans le tableau 4.

Les valeurs obtenues pour la molécule CS093 révèlent l'incorporation dans les tissus de deux composantes (espèces **A** et **B**). D'après son temps de corrélation τ_c et sa constante de couplage $2A_{zz}$, l'espèce **A** est la plus mobile et peut être attribuée à la sonde « libre » dans le sens où elle n'est pas liée de manière covalente au rapporteur S_{CP} . Cette composante piégée de manière aspécifique dans les tissus est présente en proportions minoritaires (19 %). L'espèce **B** présente quant à elle une valeur de $2A_{zz}$ plus grande (74 versus 34 G) et donc une mobilité plus réduite. Elle peut être attribuée à la fraction de sonde couplée de manière spécifique aux unités S_{CP} , la liaison covalente étant à l'origine de son ralentissement. Elle correspond donc au marquage spécifique de la lignine *de novo* et est présente en proportions majoritaires dans l'échantillon (81 %).

La simulation du signal radicalaire obtenu pour la sonde CS094 présente deux premières composantes **A'** et **B'** similaires en termes de mobilité à leur équivalents **A** et **B** chez CS093. Une troisième composante spécifique **C'** est également détectée. Sa mobilité est ralentie par rapport à **B'** puisque sa constante $2A_{zz}$ est plus élevée (101 versus 75 G). Cette différence de vitesse pourrait s'expliquer par des localisations différentes des espèces **B'** et **C'** dans les couches pariétales.

Tableau 4 : caractérisation des sondes radicalaires CS093 et CS094 incorporées dans les sections végétales. Paramètres de mobilité déterminés à partir des simulations des spectres RPE enregistrés sur tissus végétaux.

Sonde paramagnétique	Espèce	2Azz (G)	τ_c (s ⁻¹)	Poids relatif	Concentration (μM)
CS093	A (aspécifique)	34	1,73E-9	0,19	0,36
	B (spécifique)	74	3,01E-9	0,81	1,54
CS094	A' (aspécifique)	34	3,23E-9	0,22	0,75
	B' (spécifique)	75	4,12E-9	0,51	1,74
	C' (spécifique)	101	8,73E-8	0,23	0,79

Quantification des sondes radicalaires incorporées

Les concentrations des composantes de chaque sonde nitroxyde incorporée au sein d'une coupe végétale ont été calculées à partir de l'intégration des spectres et de la droite d'étalonnage réalisée précédemment. Elles sont reportées dans le tableau 4 et les calculs sont expliqués en annexe 14. La sonde CS093 liée de manière spécifique au rapporteur chimique S_{CP} (espèce **B**) est présente à une concentration de 1,54 μM dans une coupe végétale moyenne. Cela signifie que sur les 10 μM de rapporteur S_{CP} incubé lors de l'étape d'incorporation métabolique, au moins 1,54 μM de monomère a été polymérisé dans la lignine *de novo* (soit 15 %).

Concernant la sonde CS094, sa composante spécifique **B'** présente une concentration sensiblement plus élevée que celle de son analogue **B**, mais qui reste comparable (1,74 μM contre 1,54 μM). En revanche, la concentration de l'espèce **C'** est plus faible (0,79 μM). Cette composante pourrait être liée au monomère S_{CP} dans des endroits moins accessibles de la paroi, ce qui expliquerait à la fois sa concentration moins élevée sa mobilité plus lente.

8. Conclusion et perspectives

Ces résultats préliminaires constituent la preuve de concept de l'adéquation de la stratégie du rapporteur chimique avec la spectroscopie RPE et notamment la technique de marquage de spin. A terme, la technologie développée permettra de quantifier les rapporteurs chimiques polymérisés. Néanmoins, la méthodologie nécessite des mises au point préalables avant de pouvoir être interprétée correctement. D'une part, le rendement de la réaction de ligation bioorthogonale de DA_{inv} entre chaque sonde nitroxyde et le monomère incorporé dans les parois n'est pas connu. Le protocole de marquage métabolique suivi de la quantification de la sonde TEMPO incorporée devra donc être à nouveau réalisé en faisant varier le temps de ligation de DA_{inv}, afin de voir si cette quantité augmente pour une durée de ligation bioorthogonale supérieure à 2 h. D'autre part, la concentration obtenue pour un échantillon analysé en RPE (soit neuf sections végétales) est ici exprimée par rapport à une coupe en réalisant une moyenne sur neuf. Or, il faudrait normalement tenir compte de la variabilité biologique, chaque coupe ayant une composition différente. Si des précautions ont été prises lors de la réalisation des tranches de

tissus pour avoir des épaisseurs similaires (utilisation d'un vibratome), une solution serait de conserver les sections végétales, de les déshydrater et de ramener les concentrations en sonde TEMPO calculées par rapport à une masse sèche afin de pouvoir réaliser des comparaisons plus rigoureuses.

Des essais sont actuellement en cours afin d'étendre cette méthodologie à l'imagerie RPE pour visualiser les zones actives de lignification.

Conclusion générale

Résultats obtenus pendant la thèse

Si la lignine présente un intérêt économique fort du fait de son implication dans la valorisation industrielle de la biomasse lignocellulosique, la régulation spatio-temporelle de sa biosynthèse présente encore de nombreuses interrogations. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse s'inscrivent dans ce contexte. Ils ont permis le développement d'une méthodologie inédite de triple marquage basée sur la stratégie du rapporteur chimique afin d'étudier les processus de lignification. La première étape a été la conception, la synthèse et la caractérisation de trois rapporteurs chimiques analogues des monolignols G, H et S, portant respectivement une étiquette chimique de type alcyne (G_{ALK}), azoture (H_{AZ}) ou méthylcyclopropène (S_{CP}). Chaque analogue a été couplé à un fluorophore spécifique grâce à une réaction de ligation bioorthogonale (respectivement CuAAC, SPAAC et DAinv) avec une optimisation en solution puis sur modèle végétal. La mise en place de chaque mono-marquage sur tissus végétaux puis d'un double marquage intermédiaire a conduit au développement inédit du triple marquage des monolignols grâce à la séquence réactionnelle 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC.

Contrairement aux techniques classiques de visualisation de la lignine, la stratégie du rapporteur chimique permet de visualiser la lignine *de novo* et d'identifier les zones actives de lignification. De plus, la comparaison de la distribution des différents monolignols modifiés lors du marquage multiple met en évidence la capacité des différentes couches pariétales à incorporer les monolignols selon les stades de développement de la plante. Différentes informations concernant la dynamique de la lignification ont ainsi été obtenues chez le modèle du lin à différentes échelles : au niveau tissulaire, entre différents types cellulaires ou entre les différentes couches de la paroi. Si la composition de la lignine au niveau tissulaire semble dépendre de la disponibilité des monolignols biosynthétisés exportés dans la paroi, d'autres facteurs locaux régulent cette composition à l'échelle subcellulaire (matrice polysaccharidique, spécificité et localisation de la machinerie d'oxydation des monolignols). Le triple marquage est applicable à différents systèmes expérimentaux selon la question à élucider (sections végétales, tiges entières, *etc.*). De plus, il est transposable à des espèces modèles autres que le lin (tabac, peuplier ou *Arabidopsis thaliana*). La méthode a été étendue à la détection simultanée de deux polymères pariétaux (lignine et polysaccharides non cellulosiques) afin d'étudier leurs interactions *in situ*, démontrant également les nombreuses possibilités qu'offre cette technique pour étudier les molécules des parois végétales.

Un second axe de recherche a également été initié en collaboration avec le Docteur Hervé Vezin du LASIR afin de montrer l'adéquation de la stratégie de mono-marquage des monolignols avec la détection de la lignine *de novo* par spectroscopie RPE. Contrairement aux fluorophores, la détection des rapporteurs polymérisés dans les parois végétales à l'aide d'une sonde radicalaire permet notamment de

déterminer la concentration du cycloadduit sonde-rapporteur incorporé dans la lignine. La preuve de concept présentée dans cette thèse nécessite toutefois plusieurs mises au point pour obtenir des interprétations rigoureuses.

Collaborations

La stratégie de triple marquage développée pendant cette thèse fait l'objet d'une étroite collaboration avec l'équipe Fibres Végétales dirigée par le Professeur Simon Hawkins de l'UGSF. Elle a notamment été réalisée sur des lignées végétales mutantes pour certaines peroxydases et/ou laccases afin d'étudier la formation de la lignine de développement dans les différents tissus vasculaires. Parmi les lignées utilisées, le mutant d'*Arabidopsis thaliana lac4 lac17* présente une diminution de la lignification, tandis que le mutant de lin *lbf1* présente des fibres hyperlignifiées. Les motifs de distribution des rapporteurs chimiques obtenus chez ces lignées mutantes sont cohérents avec les phénotypes attendus.

Perspectives

La suite de ce projet offre de nombreuses perspectives à plus ou moins long terme. A court terme, les perspectives sont de poursuivre l'étude de la dynamique de lignification avec la stratégie mise au point chez des espèces d'intérêt économique (le peuplier, le maïs, *etc.*), le but étant de comprendre l'impact de ce processus biologique sur les propriétés industrielles de leurs parois lignocellulosiques. La comparaison de la distribution des différents rapporteurs chimiques doit également être poursuivie chez différents mutants afin de mieux comprendre le rôle des laccases et des peroxydases dans la polymérisation des monolignols.

A moyen terme, une perspective prometteuse serait de combiner le triple marquage aux techniques de fluorescence à super-résolution tels que les technologies STED ou Airyscan. Cette dernière a déjà fait l'objet de résultats préliminaires où le gain de résolution permet d'affiner le profil de distribution des différents rapporteurs chimiques au niveau des parois. S'il existe d'autres techniques de super-résolution disponibles, les deux citées ci-dessus présentent l'avantage d'être directement compatibles avec notre méthodologie en l'état puisque des fluorophores classiques peuvent être utilisés.

Enfin, une perspective à plus long terme sera de comparer la distribution de la lignine *de novo* obtenue par la stratégie du rapporteur chimique avec celle des différents polysaccharides pariétaux obtenue par imagerie Raman. L'objectif sera de mieux comprendre l'impact de l'architecture polysaccharidique de la paroi sur la déposition de la lignine. Ce projet fera d'ailleurs l'objet d'une thèse internationale fin 2019 qui impliquera les équipes du Professeur Christophe Biot et du Professeur Simon Hawkins de l'UGSF, en collaboration avec l'équipe du Docteur Notburga Gierlinger (Université d'Autriche) qui apportera son expertise en spectroscopie et imagerie Raman.

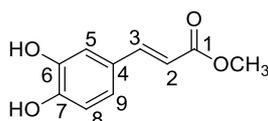
Partie expérimentale

I. Synthèse et caractérisation des rapporteurs chimiques

1. Généralités

Les réactifs et solvants utilisés lors des synthèses ont été fournis par Sigma-Aldrich, Fluorochem ou TCI. Les solvants deutérés ont été fournis par Eurisotop. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur plaques de gel de silice de type ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel, détectées par une lampe UV (254 nm) puis révélées par une solution d'acide phosphomolybdique ou de vanilline. Les spectres RMN (1D et 2D) ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker DPX-300 (RMN ¹H à 300 MHz, RMN ¹³C à 75,4 MHz). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au triméthylsilane. Les multiplicités sont nommées selon les abréviations suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, sl = singulet large. Les constantes de couplages (J) sont exprimées en Hz. Les colonnes chromatographiques ont été réalisées à l'aide d'un Interchim® puriflash 430, équipé d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière et d'un détecteur UV, et de colonnes flash de granulométrie 30 ou 50 μ m. Les analyses de masses ont été réalisées avec un spectromètre MALDI-TOF Voyager Elite (DE-STR, Perspective Biosystem®), en utilisant l'acide dihydroxybenzoïque comme matrice.

2. Synthèse et caractérisation du rapporteur G_{ALK} (analogue de l'alcool coniférylique)



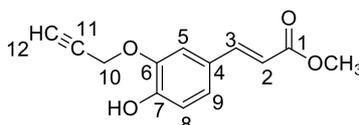
Composé 2

Formule chimique : C₁₀H₁₀O₄

Masse exacte : 194,06 g/mol

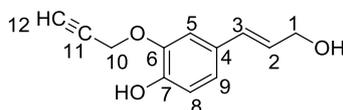
(E)-3,4-dihydroxycinnamate de méthyle (2) : l'acide caféique **1** (2,00 g, 11,10 mmol) est dissous dans du MeOH (70 mL), puis de l'acide sulfurique concentré (1,5 mL, 28,14 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux durant 15 h. Il est ensuite refroidi à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans de l'acétate d'éthyle (EtOAc, 100 mL), puis lavé avec une solution saturée en carbonate de sodium (4 x 50 mL) et de la saumure (3 x 50 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 75:25 (v/v)). Le composé **2** est obtenu sous forme d'un solide jaune pâle (2,14 g ; 11,03 mmol ; 99 %). **RMN ¹H (DMSO)** : δ 7,48 (d, J = 15,9 Hz, 1H,

H3) ; 7,05 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H5) ; 6,99 (dd, $J = 8,2, 2,0$ Hz, 1H, H9) ; 6,76 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H8) ; 6,26 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H2) ; 3,69 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (DMSO)** : δ 166,96 (C1) ; 148,43 (C6 ou C7), 145,55 (C6 ou C7) ; 145,13 (C3) ; 125,42 (C4) ; 121,37 (C9) ; 115,69 (C8) ; 114,74 (C2) ; 113,64 (C5) ; 51,15 (CH₃). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+Na]⁺ : 217,05 ; mesuré : 217,01 ; calculé [M+K]⁺ : 233,02 ; mesuré : 233,07.



Composé **3**
Formule chimique : C₁₃H₁₂O₄
Masse exacte : 232,07 g/mol

(E)-3-(4-hydroxy-3-(prop-2-yn-1-yloxy)phényl)acrylate de méthyle (3) : une solution contenant du composé **2** (300 mg, 1,54 mmol) dans du diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO, 4 mL) est ajoutée goutte à goutte à une suspension de NaH 60 % (129 mg, 3,24 mmol) dans du DMSO anhydre (5 mL). Le mélange réactionnel est agité durant 30 minutes. Du bromure de propargyle (80 % dans le toluène, 168 μ L, 1,54 mmol) est ajouté goutte à goutte durant 30 minutes, puis le mélange réactionnel est agité durant une nuit à température ambiante. Il est ensuite traité avec du MeOH (3 mL) puis versé dans de la glace (25 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, gradient de 95:5 à 20:80 (v/v)). Le composé **3** est obtenu sous forme d'un solide blanc (188 mg, 0,81 mmol, 53 %). **RMN ¹H (Acétone-d₆)** : δ 8,35 (s, 1H, OH) ; 7,59 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H3) ; 7,44 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H5) ; 7,20 (dd, $J = 8,2, 2,0$ Hz, 1H, H9) ; 6,91 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H8) ; 6,38 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H2) ; 4,90 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, H10) ; 3,72 (s, 3H, CH₃) ; 3,09 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, H12). **RMN ¹³C (Acétone-d₆)** : δ 167,98 (C1) ; 150,74 (C7) ; 146,86 (C6) ; 145,67 (C3) ; 127,54 (C4) ; 124,92 (C9) ; 116,98 (C8) ; 116,06 (C2) ; 114,12 (C5) ; 79,69 (C11) ; 77,50 (C12) ; 57,57 (C10) ; 51,71 (CH₃). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 233,07 ; mesuré : 233,10.

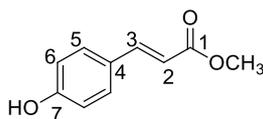


Composé **4 (G_{ALK})**
Formule chimique : C₁₂H₁₂O₃
Masse exacte : 204,08 g/mol

Alcool (E)-4-hydroxy-3-propargyloxycinnamylique (4) : une solution de DIBAL-H 1M dans de l'hexane anhydre (2 mL, 2 mmol) est ajoutée goutte à goutte à une solution du composé **3** (112 mg, 0,48 mmol) dissous du THF anhydre (5 mL) durant 1 h à 0°C. Le mélange réactionnel est agité durant 1 h supplémentaire à 0°C. Il est ensuite traité avec du MeOH (5 mL) puis agité durant 30 minutes à

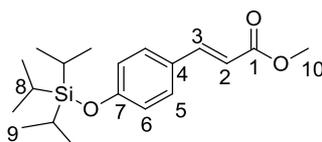
température ambiante. Après avoir réduit le volume réactionnel, le gel est traité avec un mélange biphasique d'eau (10 mL) et d'acétate d'éthyle (10 mL), puis filtré sur Büchner. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 30 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, gradient de 80:20 à 50:50 (v/v)). Le composé **4** est obtenu sous forme d'une huile jaune (80 mg ; 0,39 mmol ; 80 %). **RMN ¹H (Acétone-d₆)** : δ 7,79, sl, 1H, OH) ; 7,18 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, H5) ; 6,92 (dd, *J* = 8,2, 1,9 Hz, 1H, H9) ; 6,81 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H8) ; 6,50 (dt, *J* = 15,9, 1,6 Hz, 1H, H3) ; 6,22 (dt, *J* = 15,9, 5,5 Hz, 1H, H2, H10) ; 4,83 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H, H10) ; 4,20 (td, *J* = 5,5, 1,5 Hz, 2H, H1) ; 3,70 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, OH) ; 3,06 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H, H12). **RMN ¹³C (Acétone-d₆)** : δ 147,74 (C6) ; 146,50 (C7) ; 130,33 (C3) ; 130,23 (C4) ; 128,55 (C2) ; 121,71 (C9) ; 116,52 (C8) ; 112,76 (C5) ; 79,87 (C11) ; 77,06 (C12) ; 63,43 (C1) ; 57,38 (C10). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 205,08 ; mesuré : 205,10.

3. Synthèse et caractérisation du rapporteur H_{AZ} (analogue de l'alcool *p*-coumarylique)



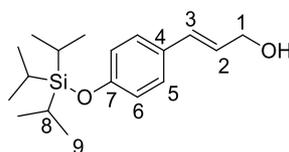
Composé **6**
Formule Chimique : C₁₀H₁₀O₃
Masse Exacte : 178,06 g/mol

Coumarate de méthyle (6) : l'acide *p*-coumarylique **5** (2,00 g, 12,18 mmol) est dissous dans du MeOH (70 mL), puis de l'acide sulfurique concentré (2 mL, 37,52 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux durant 24 h. Il est ensuite refroidi à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans de l'acétate d'éthyle (100 mL), puis lavé avec une solution saturée en carbonate de sodium (3 x 20 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous vide. Le composé **6** est obtenu sous forme un solide orange (2,10 g ; 11,78 mmol ; 96 %). Le composé est assez pur pour être utilisé directement dans l'étape suivante sans nécessiter de purification. **RMN ¹H (Acétone-d₆)** : δ 8,82 (s, 1H, OH) ; 7,60 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H3) ; 7,54 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H5) ; 6,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H6) ; 6,35 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H2) ; 3,72 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (Acétone-d₆)** : δ 206,16 (C1) ; 160,62 (C7) ; 145,38 (C3) ; 130,94 (C5) ; 127,02 (C4) ; 116,73 (C6) ; 115,36 (C2) ; 51,51 (OCH₃). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 179,07 ; mesuré : 179,12 ; calculé [M+Na]⁺ : 201,05 ; mesuré : 201,11 ; calculé [M+K]⁺ : 217,03 ; mesuré : 217,09.



Composé 7
Formule Chimique : C₁₉H₃₀O₃Si
Masse exacte : 334,20 g/mol

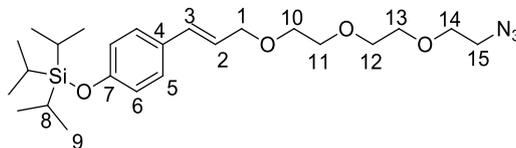
(E)-3-(4-((triisopropylsilyloxy)phényl)acrylate de méthyle (7) : le composé **6** (921 mg, 5,17 mmol) est dissous dans du diméthylformamide (DMF) (7 mL). L'imidazole (705 mg, 10,35 mmol) est ajouté à température ambiante, puis le TIPSCl (1,20 g, 6,21 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0°C. Le mélange réactionnel est agité à 0°C durant 15 minutes puis à température ambiante durant 3 h. Il est ensuite traité avec du MeOH (0,5 mL). Le mélange est dilué dans 20 mL d'eau et extrait avec de l'Et₂O (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (3 x 10 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **7** est obtenu sous forme d'une huile incolore (1,72 g ; 5,13 mmol ; 99 %). Le composé est assez pur pour être utilisé directement dans l'étape suivante sans nécessiter de purification. **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,64 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H3) ; 7,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H5) ; 6,87 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H6) ; 6,29 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H2) ; 3,79 (s, 3H, H10) ; 1,34 – 1,18 (m, 3H, H8) ; 1,10 (m, 18H, H9). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 167,94 (C1) ; 158,47 (C7) ; 144,79 (C3) ; 129,83 (C5) ; 127,57 (C4) ; 120,47 (C6) ; 115,44 (C2) ; 51,69 (C10) ; 18,02 (C9) ; 12,84 (C8). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 335,20 ; mesuré : 335,31 ; calculé [M+Na]⁺ : 357,19 ; mesuré : 357,36.



Composé 8
Formule Chimique : C₁₈H₃₀O₂Si
Masse exacte : 306,20 g/mol

(E)-3-(4-((triisopropylsilyloxy)phényl)prop-2-èn-1-ol (8) : une solution de DIBAL-H 1 M dans du THF anhydre (12 mL, 12 mmol) est ajoutée goutte à goutte à une solution du composé **7** (1,00 g, 2,99 mmol) dissous du THF anhydre (20 mL) durant 1 h à 0°C. Le mélange réactionnel est agité durant 30 minutes supplémentaires à 0°C. Il est ensuite traité avec du MeOH (5 mL), puis agité durant 30 minutes à température ambiante. Après avoir réduit le volume réactionnel, le gel est traité avec un mélange biphasique d'eau (30 mL) et d'acétate d'éthyle (30 mL), puis filtré sur Büchner. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 30 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 85:15, (v/v)). Le composé **8** est obtenu sous forme d'une huile jaune (579 mg ; 1,89 mmol ; 63 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,25 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H5) ; 6,83 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H6) ; 6,54 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H3) ; 6,23 (dt, *J* = 15,8, 6,0 Hz, 1H, H2) ; 4,29 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H, H1) ; 1,45 (s, 1H, OH) ; 1,33 – 1,18 (m, 3H, H8) ; 1,10 (d, *J* =

6,8 Hz, 18H, H9). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 156,10 (C7) ; 131,33 (C3) ; 129,79 (C4) ; 127,74 (C5) ; 126,35 (C2) ; 120,17 (C6) ; 64,11 (C1) ; 18,05 (C9) ; 12,82 (C8). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 307,21 ; mesuré : 307,17.

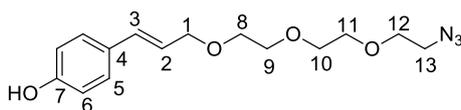


Composé **10**
Formule Chimique : C₂₄H₄₁N₃O₄Si
Masse Exacte : 463,29 g/mol

(E)-4-(3-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)prop-1-èn-1-yl)phénoxy)triisopropylsilane (10) : une solution de PBr₃ (388 mg, 1,43 mmol) diluée dans de l'Et₂O anhydre (10 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution du composé **8** (1072 mg, 3,50 mmol) dissous dans de l'Et₂O anhydre (25 mL). Le mélange réactionnel est agité durant 3 h à 0°C. Il est ensuite versé dans un mélange composé d'une solution saturée en NaHCO₃ et de glace (80 mL). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'Et₂O (3 x 40 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. L'intermédiaire **9** ((E)-4-(3-bromoprop-1-èn-1-yl)phénoxy)triisopropylsilane) est obtenu sous forme d'une huile incolore. A cause de son instabilité, il est directement utilisé en totalité pour l'étape suivante, sans purification ni analyse structurale.

Une solution de 2-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol (613 mg, 3,50 mmol) dans du THF anhydre (2,5 mL) est ajoutée goutte à goutte à une suspension de NaH 60 % (196 mg, 4,90 mmol) dissous dans du THF anhydre (1 mL). Le mélange réactionnel est agité durant 30 minutes à température ambiante. Le ballon est refroidi à 0°C, puis une solution de l'intermédiaire **9** dilué dans du THF anhydre (2,5 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 16 h. La réaction est neutralisée par une addition lente de MeOH (1 mL), puis le mélange est concentré sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, gradient de 90:10 à 50:50 (v/v)). Le composé **10** est obtenu en minorité sous forme d'une huile jaune (86 mg ; 0,19 mmol ; 5 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,24 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H, H5) ; 6,82 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H6) ; 6,53 (dt, *J* = 15,9, 1,4 Hz, 1H, H3) ; 6,15 (dt, *J* = 15,9, 6,3 Hz, 1H, H2) ; 4,16 (dd, *J* = 6,3, 1,3 Hz, 2H, H1) ; 3,75 – 3,60 (m, 10H, H10 + H11 + H12 + H13 + H14) ; 3,38 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H, H15) ; 1,32 – 1,17 (m, 3H, H8) ; 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 18H, H9). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+Na]⁺ : 486,28 ; mesuré : 486,27 ; calculé [M+K]⁺ : 502,25 ; mesuré : 502,22.

La fraction majoritairement obtenue correspond directement au produit final déprotégé, soit le composé **11**, sous forme d'une huile jaune (223 mg ; 0,73 mmol ; 21 %).

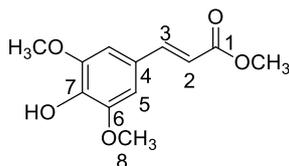


Composé **11** (**H_{AZ}**)
 Formule Chimique : C₁₅H₂₁N₃O₄
 Masse Exacte : 307,15 g/mol

(E)-4-(3-(2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthoxy)prop-1-èn-1-yl)phénol (11) : le composé **10** (102 mg, 0,22 mmol) est dissous dans du THF anhydre (1,1 mL). Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C puis une solution de TBAF 1 M dans du THF (0,33 mL, 0,33 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité durant 4 h, puis il est dilué dans de l'eau (2 mL). La phase aqueuse est alors extraite avec de l'Et₂O (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau (3 x 30 mL), de la saumure (1 x 20 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé final **11** pur est obtenu sous forme d'une huile jaune (63 mg ; 0,20 mmol ; 91 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H5) ; 6,77 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H6) ; 6,51 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H3) ; 6,10 (dt, *J* = 15,8, 6,3 Hz, 1H, H2) ; 5,44 (s, 1H, OH) ; 4,15 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H, H1) ; 3,76 – 3,61 (m, 10H, H8 + H9 + H10 + H11 + H12) ; 3,36 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, H13). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 155,71 (C7) ; 132,60 (C3) ; 129,57 (C4) ; 128,02 (C5) ; 123,69 (C2) ; 115,67 (C6) ; 72,25 (C1) ; 70,94 + 70,84 + 70,17 + 69,44 (C8 + C9 + C10 + C11 + C12) ; 50,83 (C13). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+Na]⁺ : 330,14 ; mesuré : 330,16 ; calculé [M+K]⁺ : 346,12 ; mesuré : 346,08.

4. Synthèse et caractérisation des rapporteurs chimiques SALKE et SCP (analogues de l'alcool sinapylique)

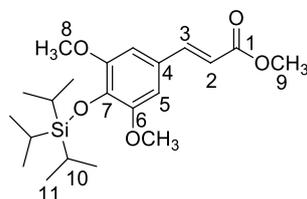
a. Synthèse du composé intermédiaire 15



Composé **13**
 Formule chimique : C₁₂H₁₄O₅
 Masse exacte : 238,08 g/mol

(E)-3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)acrylate de méthyle (13) : l'acide sinapique **12** (972 mg, 4,34 mmol) est dissous dans du MeOH (60 mL), puis de l'acide sulfurique concentré (2 mL, 37,52 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux durant 2 h. Il est ensuite refroidi à température ambiante puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans de l'acétate d'éthyle (60 mL), puis lavé avec une solution saturée en carbonate de sodium (3 x 40 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous vide. Le composé **13** est obtenu sous forme d'un solide orange (970 mg ; 4,07 mmol ; 95 %). Le composé est assez pur pour être utilisé directement dans l'étape suivante sans nécessiter de purification. **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,60 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H3) ; 6,77 (s, 2H, H5) ; 6,30 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H2) ; 5,76 (s, 1H, OH) ; 3,92 (s, 6H, H8) ; 3,80 (s, 3H, H9). **RMN ¹³C (CDCl₃)** :

δ 167,70 (C1) ; 147,39 (C6) ; 145,26 (C3) ; 137,34 (C7) ; 126,05 (C4) ; 115,73 (C2) ; 105,26 (C5) ; 56,50 (C8) ; 51,75 (C9). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé $[M+H]^+$: 239,09 ; mesuré : 239,05 ; calculé $[M+Na]^+$: 261,07 ; mesuré : 261,04 ; calculé $[M+K]^+$: 277,05 ; mesuré : 276,99.

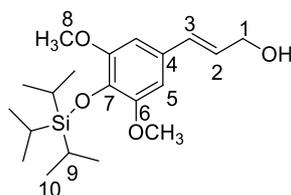


Composé **14**

Formule chimique : $C_{21}H_{34}O_5Si$

Masse exacte : 394,22 g/mol

(E)-3-(3,5-diméthoxy-4-((triisopropylsilyloxy)phényl)acrylate de méthyle (14) : le composé **13** (970 mg, 4,07 mmol) est dissous dans du DMF (6 mL). L'imidazole (554 mg, 8,14 mmol) est ajouté à température ambiante, puis le TIPSCl (945 mg, 4,90 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0°C. Le mélange réactionnel est agité à 0°C durant 15 minutes puis à température ambiante durant 3 h. Il est ensuite traité avec du MeOH (1 mL) puis agité durant 5 minutes supplémentaires. Le mélange est dilué dans de l'eau (20 mL) puis extrait avec de l'Et₂O (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (3 x 20 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **14** est obtenu sous forme d'un solide jaune (1,55 mg ; 3,93 mmol ; 96 %). Le composé est assez pur pour être utilisé directement dans l'étape suivante sans nécessiter de purification. **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,60 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H3) ; 6,71 (s, 2H, H5) ; 6,29 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H2) ; 3,81 (s, 6H, H8) ; 1,33 – 1,17 (m, 3H, H10) ; 1,08 (d, $J = 7,0$ Hz, 18H, H11). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 167,82 (C1) ; 151,69 (C6) ; 145,58 (C3) ; 137,81 (C7) ; 126,75 (C4) ; 115,57 (C2) ; 105,31 (C5) ; 55,72 (C8) ; 51,71 (C9) ; 18,06 (C11) ; 13,51 (C10). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé $[M+H]^+$: 395,22 ; mesuré : 395,17 ; calculé $[M+Na]^+$: 417,21 ; mesuré : 417,13.



Composé **15**

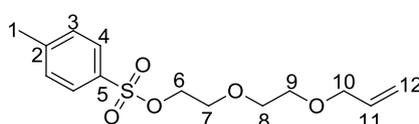
Formule chimique : $C_{20}H_{34}O_4Si$

Masse exacte : 366,22 g/mol

(E)-3-(3,5-diméthoxy-4-((triisopropylsilyloxy)phényl)prop-2-en-1-ol (15) : une solution de DIBAL-H 1 M dans du THF anhydre (10 mL, 10 mmol) est ajoutée goutte à goutte à une solution du composé **14** (987 mg, 2,50 mmol) dissous du THF anhydre (20 mL) durant 1 h à 0°C. Le mélange réactionnel est agité durant 30 minutes supplémentaires à 0°C. Il est ensuite traité avec du MeOH (5 mL) puis agité durant 30 minutes à température ambiante. Après avoir réduit le volume réactionnel, le gel est traité

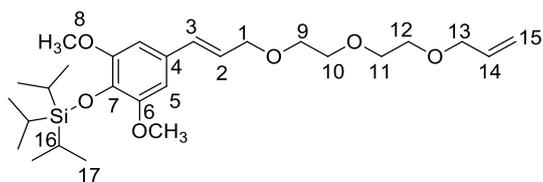
avec un mélange biphasique d'eau (30 mL) et d'acétate d'éthyle (30 mL), puis filtré sur Büchner. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 30 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, gradient de 90:10 à 75:25 (v/v)). Le composé **15** est obtenu sous forme d'un solide blanc (705 mg ; 1,92 mmol ; 77 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 6,58 (s, 2H, H5) ; 6,52 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H, H3) ; 6,24 (dt, *J* = 15,8, 6,0 Hz, 1H, H2) ; 4,30 (dd, *J* = 6,1, 1,0 Hz, 2H, H1) ; 3,79 (s, 6H, H8) ; 1,31 – 1,17 (m, 3H, H9) ; 1,08 (d, *J* = 7,0 Hz, 18H, H10). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 151,58 (C6) ; 135,27 (C7) ; 131,92 (C3) ; 129,15 (C4) ; 126,60 (C2) ; 103,62 (C5) ; 63,92 (C1) ; 55,66 (C8) ; 18,07 (C10) ; 13,44 (C9). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 367,23 ; mesuré : 367,18 ; calculé [M+Na]⁺ : 389,21 ; mesuré : 389,18.

b. Synthèse du rapporteur chimique *S*_{ALKE}



Composé **17**
Formule chimique : C₁₄H₂₀O₅S
Masse exacte : 300,10 g/mol

2-(2-(allyloxy)éthoxy)éthyl 4-méthylbenzènesulfonate (17) : l'éther monoallylilque du diéthylène glycol commercial **16** (500 mg, 3,42 mmol) est dissous dans du dichlorométhane (DCM, 10 mL) à 0°C. La TEA (621 μL, 4,45 mmol) est ajoutée, puis le chlorure de tosyloyle (782 mg, 4,10 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0°C. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant une nuit. Il est ensuite dilué dans du DCM (10 mL) puis lavé successivement avec de l'eau, de l'acide chlorhydrique, une solution saturée en NaHCO₃ puis de la saumure (10 mL chacun). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 85:15, (v/v)). Le composé **17** est obtenu sous forme d'une huile incolore (929 mg ; 3,10 mmol ; 91 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 7,79 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H4) ; 7,32 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H3) ; 5,87 (ddt, *J* = 17,3, 10,4, 5,7 Hz, 1H, H11) ; 5,32– 5,12 (m, 2H, H12) ; 4,19 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, H6) ; 3,97 (dt, *J* = 5,7, 1,6 Hz, 2H, H10) ; 3,68 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, H7) ; 3,60 – 3,50 (m, 4H, H8 et H9) ; 2,43 (s, 3H, H1). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 144,87 (C5) ; 134,74 (C11) ; 133,18 (C2) ; 129,90 (C3) ; 128,07 (C4) ; 117,21 (C12) ; 72,32 (C10) ; 70,90 (C7) ; 69,44 (C8 ou C9) ; 69,34 (C8 ou C9) ; 68,81 (C6) ; 21,71 (C1). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H]⁺ : 301,11 ; mesuré : 301,22 ; calculé [M+Na]⁺ : 323,09 ; mesuré : 323,16 ; calculé [M+K]⁺ : 339,07 ; mesuré : 339,06.

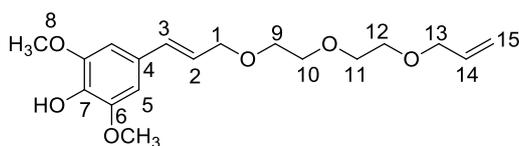


Composé **18**

Formule chimique : $C_{27}H_{46}O_6Si$

Masse exacte : 494,31 g/mol

(E)-4-(3-(2-(2-(allyloxy)éthoxy)éthoxy)prop-1-en-1-yl)-2,6-diméthoxyphénoxy)triisopropylsilane (18) : une solution contenant du composé **15** (413 mg, 1,13 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est ajoutée goutte à goutte à une suspension de NaH 60 % (90 mg, 2,25 mmol) dissous dans du THF anhydre (15 mL). Le mélange est chauffé à reflux durant 3 h. Il est refroidi à température ambiante, puis une solution du composé **17** (304 mg, 1,01 mmol) dans du THF anhydre (5 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est à nouveau chauffé à reflux durant 6 h. L'excès de NaH est neutralisé par une addition lente d'eau (10 mL), puis la phase aqueuse est extraite avec de l'Et₂O (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 15 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 85:15 (v/v)). Le composé **18** est obtenu sous forme d'une huile jaune (200 mg ; 0,40 mmol ; 36 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 6,56 (s, 2H, H5) ; 6,50 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H, H3) ; 6,16 (dt, *J* = 15,8, 6,2 Hz, 1H, H2) ; 5,92 (ddt, *J* = 17,2, 10,4, 5,6 Hz, 1H, H14) ; 5,34 – 5,13 (m, 2H, H15) ; 4,17 (dd, *J* = 6,3, 1,2 Hz, 2H, H1) ; 4,03 (dt, *J* = 5,7, 1,4 Hz, 2H, H13) ; 3,78 (s, 6H, H8) ; 3,74 – 3,59 (m, 8H, H9, 10, 11, 12) ; 1,34 – 1,17 (m, 3H, H16) ; 1,07 (d, *J* = 7,0 Hz, 18H, H17). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 151,52 (C6) ; 134,91 (C14) ; 133,32 (C3) ; 129,15 (C4) ; 124,09 (C2) ; 117,27 (C15) ; 103,58 (C5) ; 72,41 (C13) ; 72,16 (C1) ; 70,89 (C10 ou 11) ; 70,84 (C10 ou C11) ; 69,59 (C9 ou C12) ; 69,49 (C9 ou C12) ; 55,66 (C8) ; 18,08 (C17) ; 13,43 (C16). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+K]⁺ : 533,27 ; mesuré : 533,21.



Composé **19 (SALKE)**

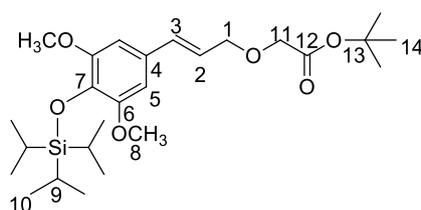
Formule chimique : $C_{18}H_{26}O_6$

Masse exacte : 338,17 g/mol

(E)-4-(3-(2-(2-(allyloxy)éthoxy)éthoxy)prop-1-en-1-yl)-2,6-diméthoxyphénol (19) : le composé **18** (89 mg, 0,18 mmol) est dissous dans du THF anhydre (2 mL). Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C puis une solution de TBAF 1M dans du THF (0,27 mL, 0,27 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 1 h, puis il est dilué dans de l'eau (5 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau (3 x 10 mL) et de la saumure (1 x 10 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **19** final est obtenu sous forme d'une huile marron (60 mg ; 0,18

mmol ; 99 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 6,62 (s, 2H, H5) ; 6,50 (dt, *J* = 15,8, 1,3 Hz, 1H, H3) ; 6,16 (dt, *J* = 15,8, 6,2 Hz, 1H, H2) ; 6,91 (ddt, 1H, H14) ; 5,22 (m, 2H, H15) ; 4,17 (dd, *J* = 6,2, 1,3 Hz, 2H, H1) ; 4,03 (dt, *J* = 5,7, 1,4 Hz, 2H, H13) ; 3,89 (s, 6H, H8), 3,73 – 3,54 (m, 8H, H9,10,11,12). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 147,24 (C6) ; 134,91 (C7) ; 134,89 (C14) ; 132,86 (C3) ; 128,44 (C4) ; 124,35 (C2) ; 117,21 (C15) ; 103,55 (C5) ; 72,39 (C13) ; 72,05 (C1) ; 70,88 (C10 ou C11) ; 70,84 (C10 ou C11) ; 69,60 (C9 ou C12) ; 69,56 (C9 ou C12) ; 56,40 (C8). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+Na]⁺ : 361,38 ; mesuré : 361,20.

c. Synthèse du rapporteur chimique S_{CP}

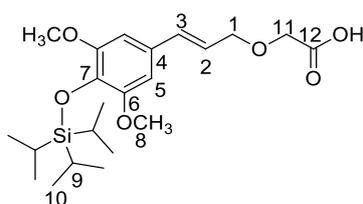


Composé **20**

Formule chimique : C₂₆H₄₄O₆Si

Masse exacte : 480,29 g/mol

(E)-tert-butyl 2-((3-(3,5-diméthoxy-4-((triisopropylsilyl)oxy)phényl)allyl)oxy)acétate (20) : le composé **15** (700 mg, 1,91 mmol) et le *tert*-butyl bromoacétate (846 μL, 5,73 mmol) sont dissous dans un mélange biphasique composé de toluène (6 mL) et d'une solution aqueuse de NaOH (1,91 g, 47,75 mmol, dans 4 mL d'eau). Le TBAB (31 mg, 0,10 mmol) est ajouté, puis le mélange réactionnel est agité durant une nuit. La solution est ensuite extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée de NH₄Cl (3 x 50 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 80:20 (v/v)). Le composé **20** est obtenu sous forme d'une huile brunâtre (685 mg ; 1,43 mmol ; 75 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 6,57 (s, 2H, H5) ; 6,51 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H, H3) ; 6,16 (dt, *J* = 15,8, 6,4 Hz, 1H, H2) ; 4,22 (dd, *J* = 6,4, 1,2 Hz, 1H, H1) ; 4,00 (s, 2H, H11) ; 3,78 (s, 6H, H8) ; 1,53 – 1,44 (m, 9H, H14) ; 1,32 – 1,16 (m, 3H, H9) ; 1,07 (d, *J* = 7,0 Hz, 18H, H10). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 169,86 (C12) ; 151,57 (C6) ; 135,39 (C7) ; 134,11 (C3) ; 128,99 (C4) ; 123,27 (C2) ; 103,74 (C5) ; 81,71 (C13) ; 72,17 (C1) ; 67,75 (C11) ; 55,65 (C8) ; 28,27 (C14) ; 18,09 (C10) ; 13,46 (C9). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+Na]⁺ : 503,28 ; mesuré : 503,22.

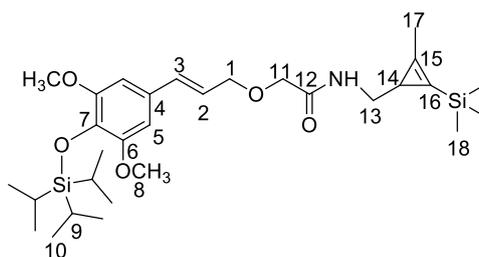


Composé **21**

Formule chimique : C₂₂H₃₆O₆Si

Masse exacte : 424,23 g/mol

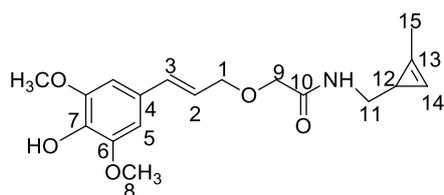
Acide (E)-2-((3-(3,5-diméthoxy-4-((triisopropylsilyl)oxy)phényl)allyl)oxy)acétique (21) : le composé **20** (360 mg, 0,75 mmol) est dissous dans de l'éthanol (7 mL). Le ballon est refroidi à 0°C puis l'hydroxyde de lithium monohydrate (63 mg, 1,50 mmol) dissous de l'eau (1 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante durant 4 h. Il est ensuite refroidi à 0°C, puis acidifié lentement avec une solution aqueuse d'HCl 1 M (5 mL). Après 10 min d'agitation supplémentaires, la solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 30 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **21** est obtenu sous forme d'un solide blanc (303 mg ; 0,71 mmol ; 95 %). Le composé est assez pur pour être utilisé directement dans l'étape suivante sans nécessiter de purification. **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 6,56 (s, 2H, H5) ; 6,50 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H, H3) ; 6,11 (dt, *J* = 15,7, 6,4 Hz, 1H, H2) ; 4,23 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H, H1) ; 4,11 (s, 2H, H11) ; 3,78 (s, 6H, H8) ; 1,30 – 1,16 (m, 3H, H9) ; 1,07 (d, *J* = 7,0 Hz, 18H, H10). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 174,28 (C12) ; 151,62 (C6) ; 135,65 (C7) ; 135,07 (C3) ; 128,59 (C4) ; 122,15 (C2) ; 103,80 (C5) ; 72,29 (C1) ; 66,97 (C11) ; 55,70 (C8) ; 18,09 (C10) ; 13,47 (C9). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+Na]⁺ : 447,22 ; mesuré : 447,12 ; calculé [M+K]⁺ : 463,19 ; mesuré : 463,11.



Composé **22**
Formule chimique : C₃₀H₅₁NO₅Si₂
Masse exacte : 561,33 g/mol

(E)-2-((3-(3,5-diméthoxy-4-((triisopropylsilyl)oxy)phényl)allyl)oxy)-N-((2-méthyl-3-(triméthylsilyl)cycloprop-2-en-1-yl)méthyl)acétamide (22) : le composé **21** (215 mg, 0,51 mmol), la (2-méthyl-3-(triméthylsilyl)cycloprop-2-en-1-yl)méthanamine commerciale (79 mg, 0,51 mmol), et le PyBOP (263 mg, 0,51 mmol) sont dissous dans un mélange de DMF (2 mL) et de DCM (3 mL) anhydre. La *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA, 441 µL, 2,53 mmol) est ajoutée goutte à goutte à 0°C. Le mélange est agité à température ambiante durant 24 h. Il est ensuite concentré sous vide et repris dans un mélange d'acétate d'éthyle (20 mL) et d'une solution saturée en NH₄Cl (20 mL). Le mélange est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse de NH₄Cl (3 x 20 mL) puis avec de la saumure (3 x 20 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 80:20 (v/v)). Le composé **22** est obtenu sous forme d'un solide blanc (191 mg ; 0,34 mmol ; 67 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 6,56 (s, 2H, H5) ; 6,52 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H, H3) ; 6,49 (s, 1H, NH) ; 6,11 (dt, *J* = 15,8, 6,3 Hz, 1H, H2) ; 4,18 (dd, *J* = 6,3 Hz, 2H, H1) ; 3,98 (s, 2H, H11) ;

3,79 (s, 6H, H8) ; 3,33 – 3,06 (m, 2H, H13) ; 2,18 (s, 3H, H17) ; 1,48 (t, $J = 4,7$ Hz, 1H, H14) ; 1,32 – 1,17 (m, 3H, H9) ; 1,07 (d, $J = 7,0$ Hz, 18H, H10) ; 0,16 (s, 9H, H18). **RMN ^{13}C (CDCl_3)** : δ 169,43 (C12) ; 151,63 (C6) ; 135,93 (C15) ; 135,60 (C7) ; 134,48 (C3) ; 128,73 (C4) ; 122,56 (C2) ; 111,91 (C16) ; 103,74 (C5) ; 72,24 (C1) ; 69,50 (C11) ; 55,70 (C8) ; 45,54 (C13) ; 19,36 (C14) ; 18,08 (C10) ; 13,46 (C9) ; 13,26 (C17) ; -0,97 (C18). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 584,32 ; mesuré : 584,17 ; calculé $[\text{M}+\text{K}]^+$: 600,29 ; mesuré : 600,13.



Composé **23** (**S_{CP}**)

Formule chimique : $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_5$

Masse exacte : 333,16 g/mol

(E)-2-((3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)allyl)oxy)-N-((2-méthylcycloprop-2-en-1-yl)méthyl)acétamide (23) : le composé **22** (355 mg, 0,63 mmol) est dissous dans du THF anhydre (13 mL). Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C puis une solution de TBAF 1 M dans du THF (1770 μL , 1,77 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 5 h, puis il est dilué dans de l'eau (10 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'Et₂O (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau (3 x 30 mL) et de la saumure (2 x 30 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée (cyclohexane/acétate d'éthyle, 40:60 (v/v)). Le composé **23** final est obtenu sous forme d'une huile marron (73 mg ; 0,22 mmol ; 35 %).

RMN ^1H (CDCl_3) : δ 6,63 (s, 2H, H5) ; 6,59 (d, $J = 0,6$ Hz, 1H, H14) ; 6,57 – 6,47 (m, $J = 15,8$ Hz, 2H, H3 + NH) ; 6,12 (dt, $J = 15,8, 6,3$ Hz, 1H, H2) ; 5,61 (sl, 1H, OH) ; 4,19 (dd, $J = 6,3, 1,2$ Hz, 2H, H1) ; 3,98 (s, 2H, H9) ; 3,90 (s, 6H, H8) ; 3,39 – 3,11 (m, 2H, H11) ; 2,11 (dd, $J = 1,1$ Hz, 3H, H15) ; 1,58 (td, $J = 4,3, 1,7$ Hz, 1H, H12). **RMN ^{13}C (CDCl_3)** : δ 169,60 (C10) ; 147,25 (C6) ; 135,15 (C7) ; 134,17 (C3) ; 127,86 (C4) ; 122,68 (C2) ; 121,55 (C13) ; 103,50 (C5) ; 103,01 (C14) ; 72,20 (C1) ; 69,48 (C9) ; 56,40 (C8) ; 44,77 (C11) ; 17,97 (C12) ; 11,73 (C15). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé $[\text{M}+\text{H}]^+$: 334,16 ; mesuré : 334,16 ; calculé $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 356,15 ; mesuré : 356,15.

II. Expériences HPLC

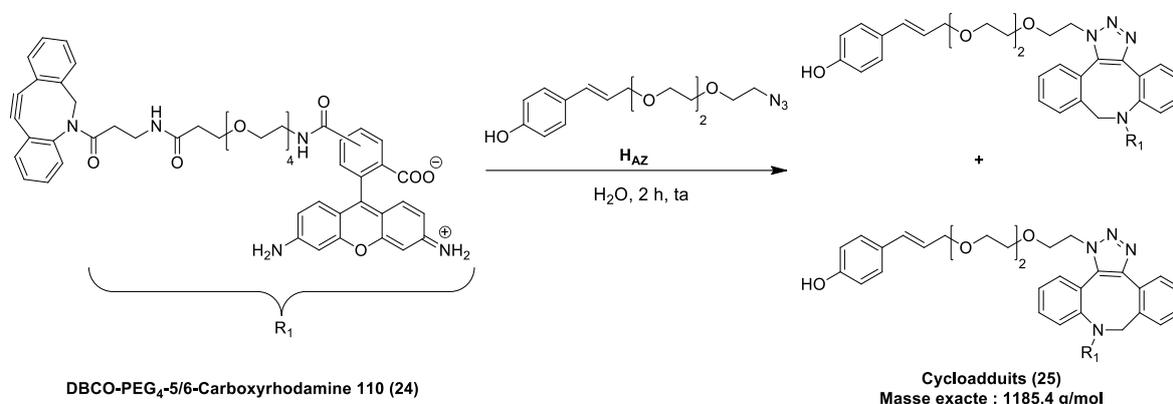
1. Généralités

Les analyses HPLC ont été réalisées en phase inverse, sur un chromatographe Thermo Finnigan SCM1000 équipé d'une colonne Grace (colonne Alltima C₁₈ de 5 µm, 150 mm x 4,6 mm) et d'un détecteur UV à barrettes de diodes (système UV6000LP). La phase mobile est composée de deux tampons : A (H₂O 0,1 % de TFA) ; B (MeOH/H₂O (90:10), 0,1 % de TFA). Les molécules ont été détectées à 254 nm. Pour chaque injection réalisée, le programme d'éluion est le suivant :

- 0-20 min : A/B, gradient de 90:10 à 10:90 (v/v)
- 20-35 min : A/B, plateau à 10:90 (v/v)
- 35-38 min : A/B, gradient de 10:90 à 90:10 (v/v)
- 38-40 min : A/B plateau à 90:10 (v/v).

Les fluorophores 5-carboxytétraméthylrhodamine-azide (azide fluor 545), dibenzylcyclooctyne-PEG₄-5/6-carboxyrhodamine 110 (DBCO-PEG₄-Rhodamine Green) et 3-(*p*-benzylamino)-1,2,4,5-tétrazine-Cy5 (tétrazine-Cy5) ont été fournis par Jena Bioscience.

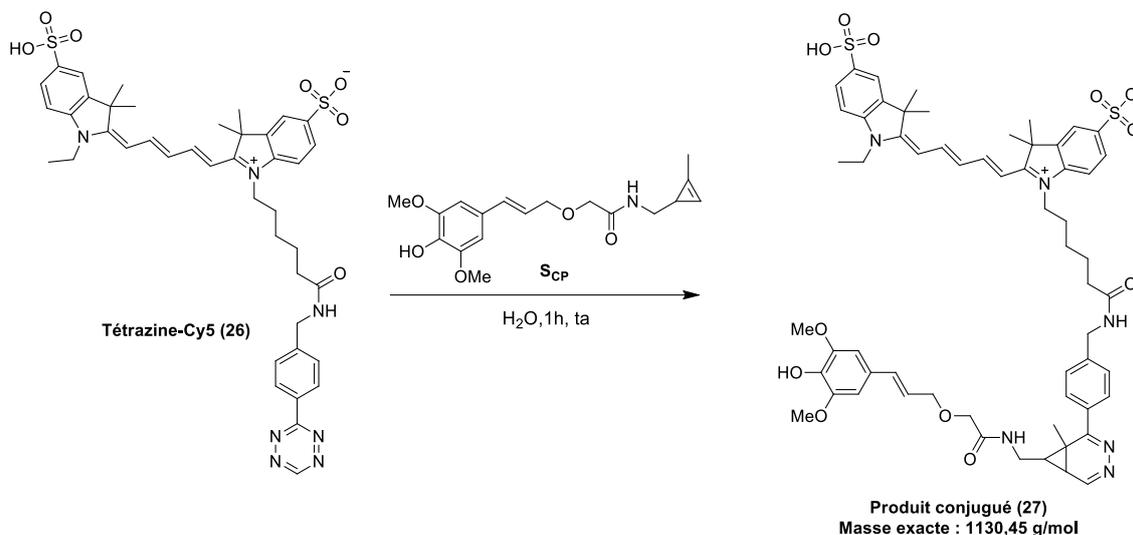
2. Suivi cinétique de la réaction de ligation SPAAC



Un mélange contenant 250 µM de rapporteur chimique H_{AZ} et 1 mM de fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** dans de l'eau ultra-pure est agité à l'obscurité et à température ambiante durant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans un volume équivalent de MeOH avant d'être injecté en HPLC.

Le cycloadduit **25** formé entre le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green et le rapporteur chimique H_{AZ} est caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

3. Suivi cinétique de la réaction de ligation de DAinv



Un mélange contenant 500 μ M de rapporteur chimique S_{CP} et 1 mM de fluorophore tétrazine-Cy5 **26** dans i) de l'eau ultra-pure ou ii) un mélange MeOH/eau 1:1 est agité à l'obscurité et à température ambiante durant i) 1 h ou ii) 2 h. Lorsque la réaction se déroule en milieu aqueux, le mélange réactionnel est dilué dans un volume équivalent de MeOH avant d'être injecté en HPLC. Lorsque la réaction se déroule dans un mélange MeOH/eau 1:1, il est directement injecté. Le produit conjugué **27** formé entre le fluorophore tétrazine-Cy5 et le rapporteur chimique S_{CP} est caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

4. Compatibilité de la séquence 1.SPAAC 2.CuAAC

Le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** (1 mM) est ajouté à un mélange équimolaire des rapporteurs chimiques H_{AZ} et G_{ALK} (250 μ M chacun) dans de l'eau ultra-pure pour effectuer le couplage SPAAC entre le fluorophore et le rapporteur H_{AZ}. La réaction est agitée à l'obscurité et à température ambiante durant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans un volume équivalent de MeOH avant d'être injecté en HPLC.

5. Compatibilité de la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC

L'ensemble des réactions doit être effectué dans un milieu MeOH/eau (1:1) afin de solubiliser chaque cycloadduit. Le fluorophore tétrazine-Cy5 **26** (500 μ M) est ajouté à un mélange équimolaire des rapporteurs chimiques H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} (250 μ M chacun) pour effectuer le couplage de DAinv entre le fluorophore tétrazine-Cy5 et le rapporteur S_{CP}. La réaction est agitée à l'obscurité et à température ambiante durant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite directement injecté en HPLC. Le fluorophore

DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** (1 mM) est ensuite ajouté au mélange réactionnel comportant désormais les rapporteurs chimiques H_{AZ} et G_{ALK} (250 µM chacun), le produit conjugué **27** résultant de la ligation de DA_{inv} et le fluorophore **26**. Le but est d'effectuer le couplage SPAAC entre le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** et le monomère H_{AZ}. La réaction est agitée à l'obscurité et à température ambiante durant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite directement injecté en HPLC.

III. Evaluation de la toxicité des rapporteurs chimiques

Les racines de plantules de lin de deux semaines sont incubées en conditions aseptiques dans différents milieux durant sept jours. Les solutions d'incubation sont : soit du milieu MS ½ (Murashige and Skoog dilué au demi³²⁵), soit dans du milieu MS ½ contenant le rapporteur chimique d'intérêt (H_{AZ} à 40 µM ou S_{CP} à 20 µM), soit dans du milieu MS ½ contenant son analogue naturel (H_{NAT} 40 µM ou S_{NAT} à 20 µM). La taille des plantules est mesurée et leur nombre de feuilles est calculé avant et après les sept jours d'incubation.

IV. Expériences d'imagerie sur modèles végétaux

1. Matériel végétal

a. Lin

Les expériences d'imagerie ont principalement été réalisées sur le lin (*Linum usitatissimum* L.). Des plantes âgées de deux mois ou des plantules âgées de deux semaines ont été utilisées.

- Les plantules de lin sont obtenues par culture *in vitro*. Les graines sont aseptisées par un bain d'éthanol à 70 % durant 1 minute puis par deux bains successifs de 10 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % de chlore actif. Les graines sont ensuite lavées par une succession de bains d'eau désionisée stérile puis déposées dans des pots Magenta (5 cm x 5 cm x 10 cm) autoclavés contenant environ 70 mL de milieu MS ½ gélifié avec de l'agar à 0,8 %. Les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire. La culture est effectuée dans des phytotrons Grobanks (CLF-Plant Climatics) à 22°C avec une photopériode de 16 h / 8 h jour/nuit.
- Pour les plantes âgées de deux mois, les graines sont semées directement en pot dans du terreau pour mélange spécial (NEUHAUS®). La culture est réalisée en phytotron (Angelantoni Life Sciences) à 22°C avec une photopériode de 16 h / 8 h jour/nuit. Au bout d'un mois de culture, les plantes sont tuteurées.

b. Autres espèces végétales

D'autres espèces végétales ont été utilisées pour les expériences de triple marquage des monomères H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} :

- Pour les plant(e)s de tabac (*Nicotiana benthamiana*) et d'arabette (*Arabidopsis thaliana*), les graines sont semées directement en pot dans du terreau pour mélange spécial (NEUHAUS®). La culture est réalisée en phytotron à 22°C avec une photopériode de 16 h / 8 h jour/nuit.
- Pour les peupliers, les explants obtenus par bouturage sont placés dans des tubes en verre stériles contenant du milieu MS ½ gélifié avec de l'agar à 0,7 %. Après trois semaines, les plantules sont transférées dans du terreau Vivimus® universel DCM. La culture est réalisée en phytotron avec une température de 24°C / 21 °C jour/nuit et une photopériode de 16 h / 8 h jour/nuit.

Pour les expériences d'imagerie, les plantes sont utilisées à neuf semaines pour le tabac, six semaines pour *Arabidopsis thaliana*, et trois mois pour le peuplier.

2. Mono-marquages sur coupes transversales de tige de lin

a. Incorporation métabolique des rapporteurs chimiques H_{AZ} , G_{ALK} ou S_{CP}

Pour chaque expérience, dix sections végétales sont réalisées et proviennent de trois réplicats biologiques différents.

Les monolignols modifiés (rapporteurs chimiques) ou leurs analogues naturels sont préparés sous forme de solutions mères à 10 mM dans de l'éthanol à 50 %.

Des coupes transversales de tige d'une épaisseur d'environ 150-250 μm sont réalisées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir à environ 10 cm à partir de la base. Elles sont immédiatement plongées dans une solution de MS $\frac{1}{2}$ pour ne pas se dessécher. Les sections végétales sont ensuite incubées dans 300 μL d'une solution de MS $\frac{1}{2}$ contenant l'analogue du monolignol d'intérêt (G_{ALK} , H_{AZ} ou S_{CP}) à 10 μM pendant 20 h en lumière continue à 20°C (en phytotron). Pour les échantillons témoins, les sections végétales sont incubées dans 300 μL contenant le monolignol naturel non modifié correspondant (monolignol G_{NAT} , H_{NAT} ou S_{NAT} respectivement) dans des conditions identiques. Après l'incorporation métabolique, les échantillons sont lavés avec du milieu MS $\frac{1}{2}$ pendant 10 min puis 3 x 5 min.

Variations du protocole

- Pour les expériences dose-dépendantes, le protocole standard est utilisé en faisant varier la concentration en monolignols (0 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM et 50 μM).
- Pour les expériences dépendantes de la durée d'incorporation, le protocole standard est utilisé en faisant varier le temps d'incubation (0,5 h, 1 h, 2 h, 12 h, 24 h et 48 h).
- Pour les expériences de dénaturation enzymatique, les coupes transversales de tige sont directement incubées à 90 °C pendant 0, 1 ou 2 h dans du MS $\frac{1}{2}$ avant l'étape d'incorporation métabolique suivant le protocole standard.
- Pour les expériences de compétition, les coupes transversales sont incubées avec du milieu MS $\frac{1}{2}$ contenant soit 10 μM de monolignol modifié (S_{CP}), soit 10 μM de monolignol S_{CP} en présence de son analogue naturel S_{NAT} à 1000 μM . Après une incubation de 20 h en lumière continue, les échantillons sont lavés selon le protocole standard.

b. Réaction de ligation avec le fluorophore

La réaction de ligation consiste à incuber les sections végétales dans 300 μL d'une solution de ligation spécifique du rapporteur chimique précédemment métabolisé (H_{AZ} , G_{ALK} ou S_{CP}). Pour chaque réaction bioorthogonale, la ligation est réalisée à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité durant 1 h. Les échantillons sont ensuite lavés suivant le protocole de lavage post-ligation mis au point :

MS ½ (2 x 5 min), MeOH 70 % (60 min), MS ½ (1 x 10 min, puis 3 x 5 min), à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation.

Solutions de ligation

- Solution SPAAC

Pour le mono-marquage des unités H_{AZ} par la réaction de ligation bioorthogonale SPAAC, la solution contient le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green à 5 µM dans du milieu MS ½.

- Solution CuAAC

Pour le mono-marquage des unités G_{ALK} par la réaction de ligation bioorthogonale CuAAC, la solution contient le fluorophore azide fluor 545 à 5 µM, de l'ascorbate de sodium à 2,5 mM et du sulfate de cuivre pentahydraté à 500 µM dans du milieu MS ½.

- Solution DA_{inv}

Pour le mono-marquage des unités S_{CP} par la réaction de ligation bioorthogonale de DA_{inv}, la solution contient le fluorophore tétrazine-Cy5 à 5 µM dans du milieu MS ½.

Variations du protocole

- Pour les expériences d'optimisation de la concentration en fluorophore, (ou en ascorbate de sodium et en sulfate de cuivre pentahydraté lors de la CuAAC), le protocole standard est utilisé en faisant varier la concentration du réactif d'intérêt.

3. Double et triple marquages

a. Incorporation métabolique des rapporteurs chimiques

i. Coupes transversales d'organes

Coupes transversales de tige de lin

Les sections végétales sont réalisées comme pour le mono-marquage (partie 2.a). Elles sont incubées dans 300 µL d'une solution de MS ½ contenant soit les deux analogues de monolignols H_{AZ} et G_{ALK} lors du double marquage, soit les trois analogues H_{AZ} et G_{ALK} et S_{CP} lors du triple marquage. Chaque analogue est à 10 µM. L'incubation dure 20 h en lumière continue à 20°C. Les échantillons témoins consistent à remplacer chaque monolignol modifié par son analogue naturel. Après l'incorporation métabolique, les échantillons sont lavés avec du milieu MS ½ (1 x 10 min, puis 3 x 5 min).

Coupes transversales de racine de lin

Des coupes transversales sont réalisées à main levée au niveau de la racine principale. Les conditions d'incubation et de lavage sont identiques au protocole décrit ci-dessus (partie 3.a.i).

Coupes transversales d'autres espèces végétales

- Pour *Arabidopsis thaliana*, des coupes transversales sont réalisées à main levée au niveau de la hampe florale, à 5 cm au-dessus du niveau du sol.
- Pour le peuplier, des coupes transversales sont réalisées à main levée au niveau de la tige, à 10 cm en dessous de l'extrémité apicale de la plante.
- Pour le tabac, des coupes transversales sont réalisées à main levée au niveau de la tige, à 10 cm au-dessus du niveau du sol.

Les coupes sont immédiatement plongées dans une solution de MS ½ pour ne pas se dessécher, puis elles sont incubées avec les rapporteurs chimiques comme décrit pour les sections transversales de tige de lin (partie 3.a.i).

ii. Tiges entières de lin

Le système racinaire d'une plante de lin est sectionné à l'aide d'une lame de rasoir à environ 10 cm au-dessus du niveau du sol puis est séparé de la tige. La base de la tige entière est directement incubée dans du milieu MS ½ contenant soit les monomères H_{AZ} et G_{ALK} lors du double marquage, soit les trois monomères H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} lors du triple marquage. Chaque monomère est à 10 µM. L'incubation dure 20 h en lumière continue (sous un néon). Après l'incorporation métabolique, des coupes transversales sont réalisées à main levée à différentes hauteurs par rapport à la base de la tige. Elles sont directement lavées avec du milieu MS ½ (1 x 10 min, puis 3 x 5 min). Les échantillons témoins consistent à incuber la base de la tige entière dans du milieu MS ½ contenant les monolignols naturels dans les mêmes conditions.

b. Réactions de ligation bioorthogonale

i. Double marquage 1.SPAAC 2.CuAAC

Pour le double marquage des unités H_{AZ} et G_{ALK}, les deux réactions de ligation 1.SPAAC 2. CuAAC sont réalisées de manière successive selon les protocoles décrits au niveau de la partie 2.b. Les sections végétales sont d'abord incubées avec la solution SPAAC pour la ligation des unités H_{AZ} avec le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green, puis elles sont lavées avec du milieu MS ½ (1 x 10 min puis 3 x 5 min). Les coupes sont ensuite incubées avec la solution CuAAC pour la ligation des unités G_{ALK} avec le fluorophore azide fluor 545. Les échantillons sont ensuite lavés selon le protocole de lavage post-couplage décrit en partie 2.b.

ii. Triple marquage 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC

Pour le triple marquage des unités H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP}, les trois réactions de ligation 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC sont réalisées de manière successive selon les protocoles décrits au niveau de la partie 2.b. Les sections végétales sont d'abord incubées avec la solution DAinv pour la ligation des unités S_{CP} avec le fluorophore tétrazine-Cy5, puis elles sont lavées avec du milieu MS ½ (1 x 10 min, puis 3 x 5 min). Les coupes sont ensuite incubées avec la solution SPAAC pour la ligation des unités H_{AZ} avec le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green et lavées avec du milieu MS ½ (1 x 10 min, puis 3 x 5 min). Enfin les coupes sont incubées avec la solution CuAAC pour la ligation des unités G_{ALK} avec le fluorophore azide fluor 545. Les échantillons sont ensuite lavés selon le protocole de lavage post-couplage décrit en partie 2.b.

4. Triple marquage Ac₄FucAl, S_{CP} et H_{AZ}

Le système d'incorporation métabolique sur tige entière précédemment décrit en partie 3.a.ii est utilisé. La base de la tige entière est incubée dans du milieu MS ½ contenant le rapporteur monosaccharidique Ac₄FucAl à 20 µM et les analogues de monolignols H_{AZ} et S_{CP} à 10 µM chacun. Après l'incorporation métabolique durant 20 h en lumière continue, des coupes transversales sont réalisées à main levée à 0,5-1 cm de hauteur par rapport à la base de la tige. Elles sont directement lavées avec du milieu MS ½ (1 x 10 min, puis 3 x 5 min). Pour la ligation des fluorophores, la séquence réactionnelle 1.DAinv 2. SPAAC 3.CuAAC est utilisée pour marquer les unités S_{CP}, H_{AZ} et Ac₄FucAl respectivement. Le protocole est identique à celui utilisé pour le triple marquage des trois analogues de monolignols (partie 3.b.ii), sauf pour la solution CuAAC qui contient 1 µM de fluorophore azide fluor 545.

5. Imagerie

Après la série de lavages post-couplage, les coupes végétales sont montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage Fluoromount-G®. Elles peuvent être conservées à l'obscurité à 4°C pendant quelques semaines.

Les coupes sont observées par microscopie confocale avec les objectifs x20 (ouverture numérique de 0,8) et x60 (ouverture numérique de 1,4, objectif à immersion d'huile). Les longueurs d'onde d'excitation (exc) et les filtres d'émission (em) utilisés sont adaptés à chaque fluorophore et sont les suivants : i) DBCO-PEG₄-Rhodamine Green : exc : 488 nm, em : 525/50 ; ii) azide fluor 545 : exc : 561 nm, em : 595/50 ; iii) tétrazine-Cy5 : exc : 561 nm, em : 700/75 ; iv) autofluorescence de la lignine : exc : 405 nm, em : 450/50 nm. Pour s'assurer de la spécificité des signaux de fluorescence observés, une acquisition et une décomposition spectrales sont appliquées pour séparer les fluorescences de l'azide fluor 545 et de la tétrazine-Cy5. Les réglages du microscope (gain, intensité du laser, taille du pinhole)

sont maintenus constants tout au long d'une expérience. Les images sont analysées avec le logiciel Fiji³²⁶. Les valeurs des niveaux de gris sont identiques pour toutes les images d'une même expérience afin de pouvoir comparer les intensités relatives de fluorescence.

Les acquisitions des images de mono-marquage des unités H_{AZ} et de double marquage H_{AZ}/G_{ALK} (BLISS) ont été réalisées avec un microscope confocal Zeiss LSM 780 (plateforme BICEL). Les acquisitions des images de mono-marquage des unités S_{CP} et de triple marquage S_{CP}/H_{AZ}/G_{ALK} ont été réalisées avec un microscope confocal Nikon A1R (plateforme TISBio).

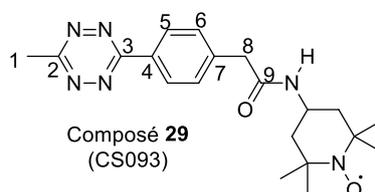
Les quantifications d'intensité de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'une macro compatible avec le logiciel Fiji et développée à cet effet par la plateforme TISBio.

V. Spectroscopie RPE

1. Synthèse des sondes paramagnétiques

Remarque : pour l'analyse de chaque sonde radicalaire par spectroscopie RMN, les signaux de la partie amino-TEMPO ne sont pas visibles à cause de l'élargissement paramagnétique causé par le radical nitroxyde. Les signaux du reste de la molécule sont visibles et permettent l'attribution de ses hydrogènes et carbones. Cependant, ils sont parfois trop peu résolus pour pouvoir attribuer la multiplicité des pics. C'est la combinaison des analyses par RMN et par spectrométrie de masse qui permet de confirmer que la structure des sondes synthétisées est correcte.

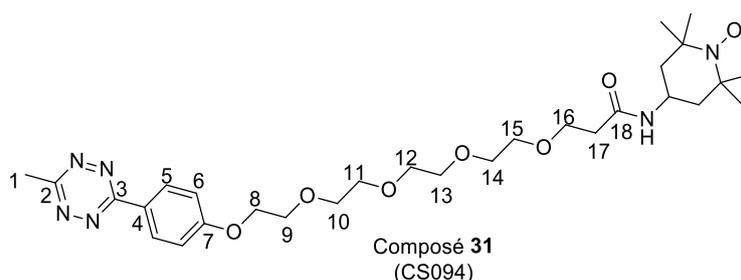
a. Synthèse de la sonde méthyl-tétrazine-TEMPO (CS093)



Composé **29**
(CS093)
2-(4-(6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine-3-yl)phényl)acétamido-TEMPO
Formule chimique : $C_{20}H_{27}N_6O_2$
Masse exacte : 383,22 g/mol

Méthyl-tétrazine-TEMPO (29) : une solution de l'ester de méthyl-tétrazine-NHS **28** (50 mg, 0,15 mmol) dans du DCM (2 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution de 4-amino-TEMPO (32 mg, 0,18 mmol) et de DIEA (54 μ L, 0,31 mmol) dans le THF (5 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 3 h 30. Il est ensuite évaporé sous vide. Le résidu obtenu est repris dans de l'eau (10 mL). La solution est ajustée à pH 5 avec une solution d'HCl 1M, puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 20 mL), séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **29** est obtenu sous forme d'un solide violet (48 mg, 0,13 mmol, 83 %). **RMN 1H ($CDCl_3$)** : δ 8,69 (2H, H5) ; 7,60 (2H, H6) ; 3,74 (s, 2H, H8) ; 3,19 (s, 3H, H1). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$)** : δ 168,26 (C9) ; 165,89 (C2) ; 162,33 (C3) ; 137,94 (C7) ; 129,63 (C4) ; 129,09 (C6) ; 127,17 (C5) ; 19,84 (C1). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé $[M+2H]^+$: 385,23 ; mesuré : 385,25 ; calculé $[M+H+Na]^+$: 407,22 ; mesuré : 407,21 ; calculé $[M+H+K]^+$: 423,19 ; mesuré : 423,10.

b. Synthèse de la sonde méthyl-tétrazine-PEG₄-TEMPO (CS094)



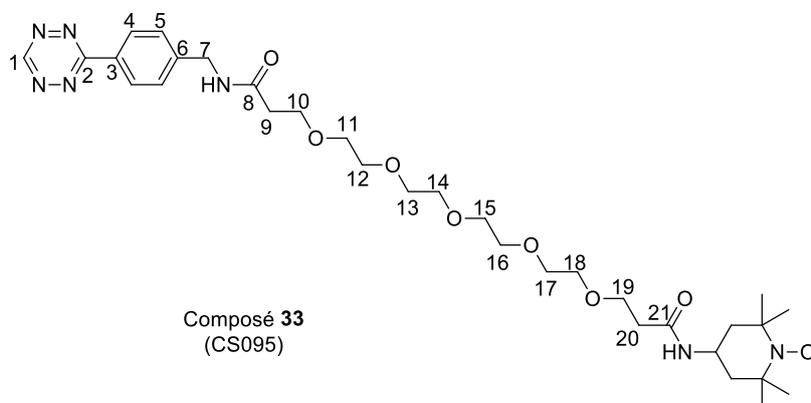
1-(4-(6-méthyl-1,2,4,5-tétrazine-3-yl)phénoxy)-3,6,9,12-tétraoxapentadécane-15-amido-TEMPO

Formule chimique : C₂₉H₄₅N₆O₇*

Masse exacte : 589,33 g/mol

Méthyl-tétrazine-PEG₄-TEMPO (31) : une solution de l'ester de méthyl-tétrazine-PEG₄-NHS **30** (48 mg, 0,09 mmol) dans du DCM (3 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution de 4-amino-TEMPO (19 mg, 0,11 mmol) et de DIEA (32 µL, 0,19 mmol) dans le THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 3 h 30. Il est ensuite évaporé sous vide. Le résidu obtenu est repris dans de l'eau (10 mL). La solution est ajustée à pH 5 avec une solution d'HCl 1M, puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 20 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **31** est obtenu sous forme d'une huile violette (48 mg, 0,08 mmol, 89 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 8,58 (2H, H5) ; 7,12 (2H, H6) ; 4,28 (2H, H8) ; 3,94 (2H, H9) ; 3,86 – 3,51 (m, 14H, H10-16) ; 3,10 (s, 3H, H1) ; 2,50 (2H, H17). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 169,64 (C18) ; 165,12 (C2) ; 162,24 (C3) ; 161,00 (C7) ; 128,31 (C5) ; 122,93 (C4) ; 114,05 (C6) ; 69,96, 69,81, 69,58, 69,47, 69,17, 68,95, 68,86 (7 CH₂, C9-15) ; 66,98 (C8) ; 65,70 (C16) ; 37,95 (C17) ; 19,75 (C1). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H+Na]⁺ : 613,13 ; mesuré : 613,22 ; calculé [M+H+K]⁺ : 629,31 ; mesuré : 629,13.

c. Synthèse de la sonde tétrazine-PEG₅-TEMPO (CS095)



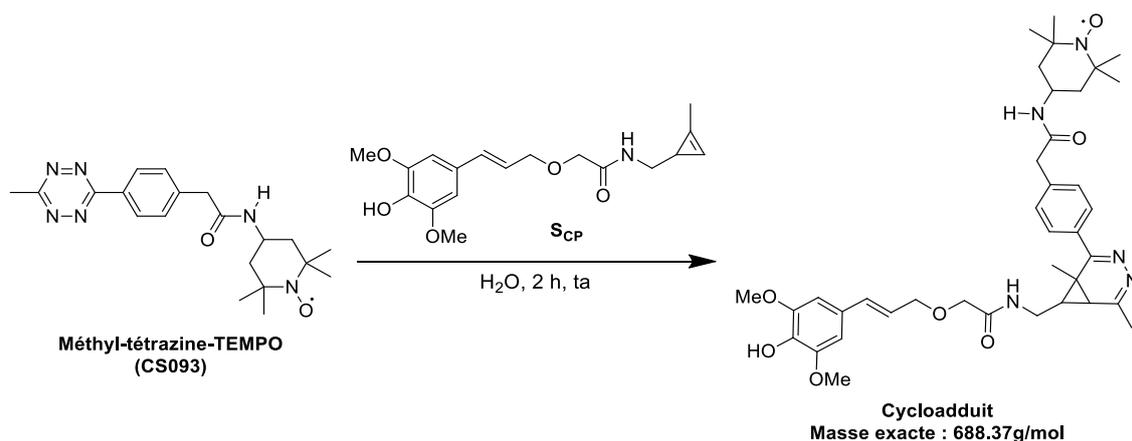
N¹-(4-(1,2,4,5-tétrazine-3-yl)benzyl)-4,7,10,13,16-pentaoxonadécane-1,19-diamido-TEMPO

Formule chimique : C₃₂H₅₀N₇O₈*

Masse exacte : 660,37 g/mol

Tétrazine-PEG₅-TEMPO (33) : une solution de l'ester de tétrazine-PEG₅-NHS **32** (50 mg, 0,08 mmol) dans du DCM (1,5 mL) est ajoutée goutte à goutte à 0°C à une solution de 4-amino-TEMPO (17 mg, 0,10 mmol) et de DIEA (28 µL, 0,17 mmol) dans le THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 4 h. Il est ensuite évaporé sous vide. Le résidu obtenu est repris dans de l'eau (10 mL). La solution est ajustée à pH 5 avec une solution d'HCl 1M, puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de la saumure (3 x 20 mL), séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous vide. Le composé **33** est obtenu sous forme d'une huile violette (54 mg, 0,08 mmol, 99 %). **RMN ¹H (CDCl₃)** : δ 10,35 (1H, H1) ; 8,75 (2H, H4) ; 7,72 (2H, H5) ; 4,89 (s, 2H, H7) ; 4,23 – 3,41 (m, 20H, H10-19) ; 2,99 – 2,41 (m, 4H, H9 + H20). **RMN ¹³C (CDCl₃)** : δ 168,27 ; 168,18 (C8 + C21) ; 162,55 (C2) ; 155,16 (C1) ; 140,99 (C6) ; 126,72 (C3) ; 124,98 (C4 + C5) ; 68,39, 68,36, 67,51, 67,32, 67,16, 67,13, 66,79, 66,64 (8 CH₂, C11-18) ; 64,11, 63,66 (C10 + C19) ; 39,78 (C7) ; 34,34 ; 34,28 (C9 + C20). **m/z (MALDI-TOF)** : calculé [M+H+Na]⁺ : 684,37 ; mesuré : 684,20 ; calculé [M+H+K]⁺ : 700,34 ; mesuré : 700,13.

2. Suivi de la ligation de Dainv en solution par spectrométrie de masse



Un mélange contenant 50 µM de rapporteur chimique S_{CP} et 100 µM de sonde radicalaire méthyl-tétrazine-TEMPO (CS093, composé **29**) dans de l'eau ultra-pure est mis sous agitation à l'obscurité et à température ambiante. Après 2 h de réaction, le produit formé est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant l'acide dihydroxybenzoïque comme matrice.

3. Marquage radicalaire des unités S_{CP} sur modèle végétal

Les sondes radicalaires sont préparées sous forme de solutions mères à 5 mM dans 100 % de DMSO pour CS093 et dans 20 % de DMSO pour CS094 et CS095.

Pour chaque expérience, dix sections végétales sont réalisées et proviennent de trois réplicats biologiques différents.

Des coupes transversales de tige d'une épaisseur de 120 μm sont réalisées au vibratome à environ 10 cm à partir de la base et sont plongées dans une solution de MS $\frac{1}{2}$. Elles sont ensuite incubées dans 300 μL d'une solution de MS $\frac{1}{2}$ contenant le monomère S_{CP} à 10 μM pendant 20 h en lumière continue à 20°C (en phytotron). Pour les échantillons témoins, les sections végétales sont incubées dans 300 μL contenant le monolignol naturel S_{NAT} dans des conditions identiques.

Après l'incorporation métabolique, les échantillons sont lavés avec du milieu MS $\frac{1}{2}$ (4 x 5 min). Après élimination de la dernière solution de lavage, les sections végétales sont incubées avec 300 μL d'une solution de paraformaldéhyde 4 % pendant 1 h à température ambiante avant d'être lavées avec de l'eau (2 x 1 min). Elles sont ensuite incubées avec 300 μL d'une solution aqueuse comprenant l'une des trois sondes radicalaires à 100 μM (CS093, 94 ou 95), afin de réaliser la réaction de ligation bioorthogonale de DA_{inv} aux unités S_{CP} incorporées. Le couplage est réalisé à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité durant 2 h. Les échantillons sont ensuite lavés suivant la série de lavages suivante : eau (2 x 5 min), MeOH 70 % (15 min), eau (4 x 5 min), à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation. Les coupes végétales sont incubées dans un mélange eau/glycérol 1:1 (v/v) et sont conservées à l'obscurité à 4°C. L'acquisition par spectroscopie RPE a lieu le jour même ou le lendemain matin.

4. Spectroscopie RPE

Les analyses RPE ont été réalisées en utilisant un spectromètre Bruker (Elexsys E500) en bande X fonctionnant en onde continue (CW) à une fréquence fixe de 9,45 GHz.

Pour les solutions étalons contenant les sondes radicalaires, des capillaires de 2 mm sont utilisés et placés dans un tube RPE en quartz de 4 mm avant d'être analysés.

Pour les tissus végétaux, neuf sections transversales de tige de lin sont placées dans un tube RPE en quartz de 4 mm avant d'être analysées.

Chaque tube est introduit dans la cavité du spectromètre. Des spectres en onde continue sont enregistrés à température ambiante pour l'ensemble des échantillons. Les conditions de mesures sont fixées à une puissance de 0,6325 mW pour les sondes radicalaires en solution et à 15,89 mW pour les échantillons végétaux, avec une modulation d'amplitude de 2 G.

La simulation des spectres RPE enregistrés sur les tissus végétaux est réalisée avec le logiciel Matlab en utilisant la base de données Easyspin³²⁴. Chaque simulation consiste à reprendre les conditions expérimentales des acquisitions en faisant varier différents paramètres tels que le couplage hyperfin, la largeur des raies et le facteur g. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que les deux spectres expérimental et simulé soient superposables. Les paramètres issus de la simulation sont ensuite récupérés et comparés à ceux rapportés dans la littérature pour le système nitroxyde.

Annexes

Annexe 1 : optimisation des conditions réactionnelles de la réaction de Williamson pour la synthèse du composé 10.

Tableau 5 : optimisation des conditions réactionnelles. La condition 1 a été retenue.

Conditions	Solvant	Base	Rendement du composé 10	Rendement du composé 11
1 (Ischay <i>et al.</i> , 2010)	THF	NaH	5 %	21 %
2 (Chien <i>et al.</i> , 2008)	DMF	NaH	n.d.	n.d.
3 (Heller <i>et al.</i> , 2015)	<i>tert</i> -butanol	tBuOK	14 %	8 %

Annexe 2 : structure chimique des fluorophores

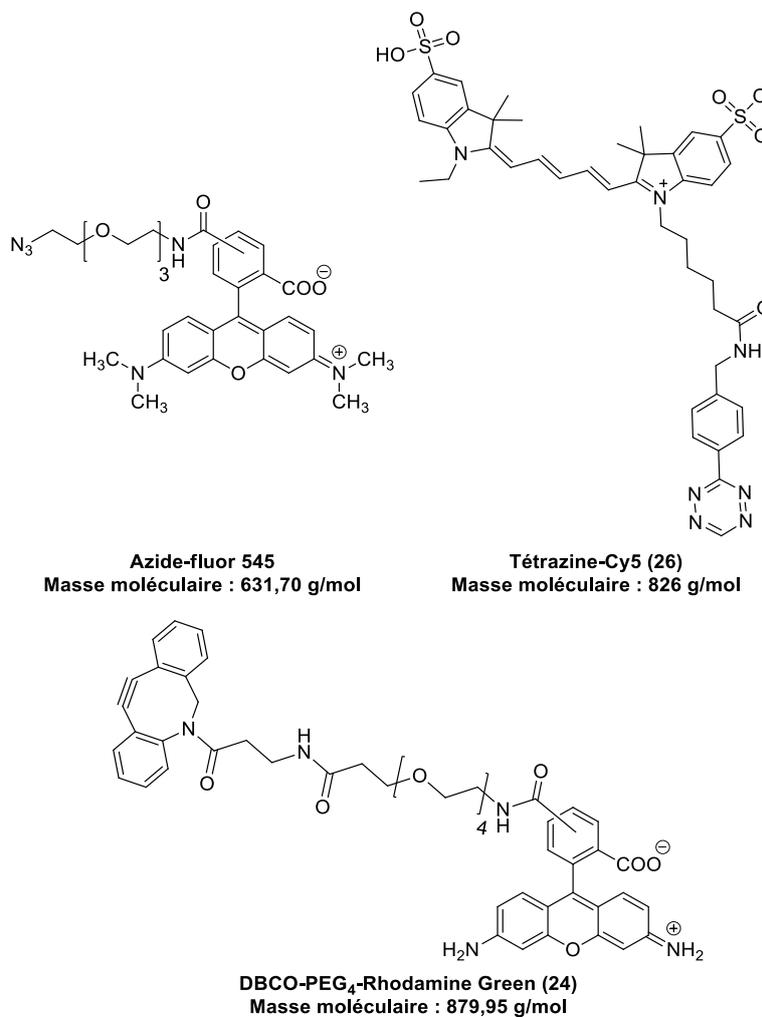


Figure 123 : structure chimique des trois fluorophores utilisés pour les réactions de ligation bioorthogonale.

Annexe 3 : rapporteur H_{AZ}, suivi de la réaction de ligation SPAAC en solution

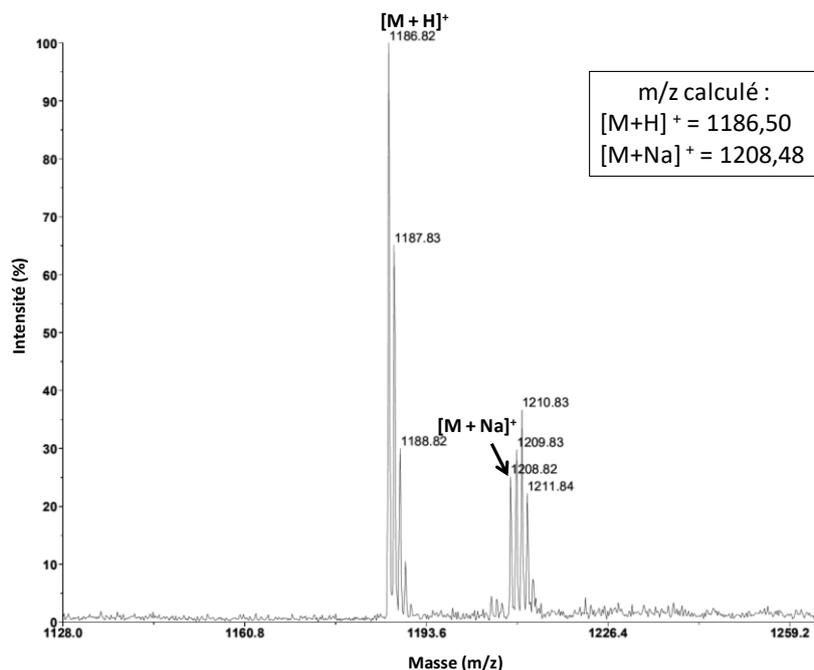


Figure 124 : identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF du cycloadduit **25** formé lors de la réaction de ligation bioorthogonale SPAAC entre le rapporteur chimique H_{AZ} (250 μM) et le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** (1 mM), en solution aqueuse et après 2 h d'agitation à température ambiante.

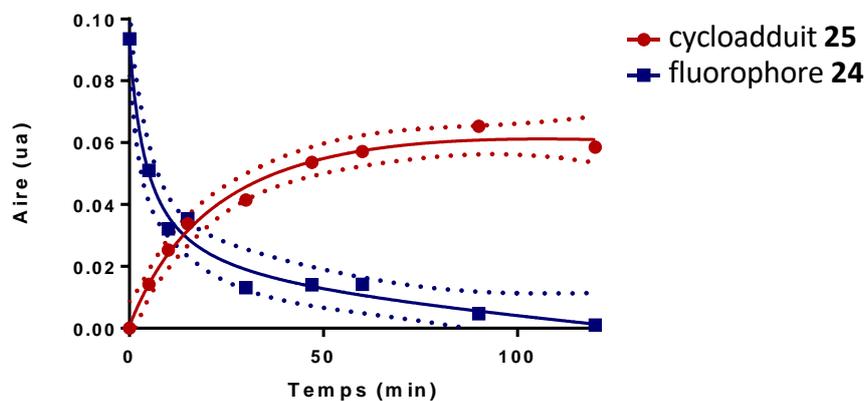


Figure 125 : suivi cinétique de la réaction de ligation SPAAC entre le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green **24** (5 μM) et le rapporteur H_{AZ} (10 μM) en solution aqueuse par HPLC en phase inverse avec une détection par fluorescence (λ_{Abs} : 501 nm/ λ_{Em} : 526 nm). Le mélange est prélevé à différents temps et dilué dans un volume équivalent de MeOH avant injection. Suivi de la disparition du fluorophore **24** et de l'apparition du cycloadduit **25**. Le graphe représente l'aire des pics de fluorescence en fonction du temps. Les courbes en pointillés sont les bornes de l'intervalle de confiance à 95 %.

Annexe 4 : rapporteur S_{ALKE} , suivi de la réaction de ligation de DAinv en solution

Condition	Température	Solvant	$[S_{ALKE}]$	[tétrazine-Cy5]
1	ta	eau	250 μM	50 μM
2	ta	eau	125 μM	500 μM
3	37°C	MeOH	25 μM	100 μM
4	37°C	eau	25 μM	100 μM
5	37°C	eau	50 μM	50 μM

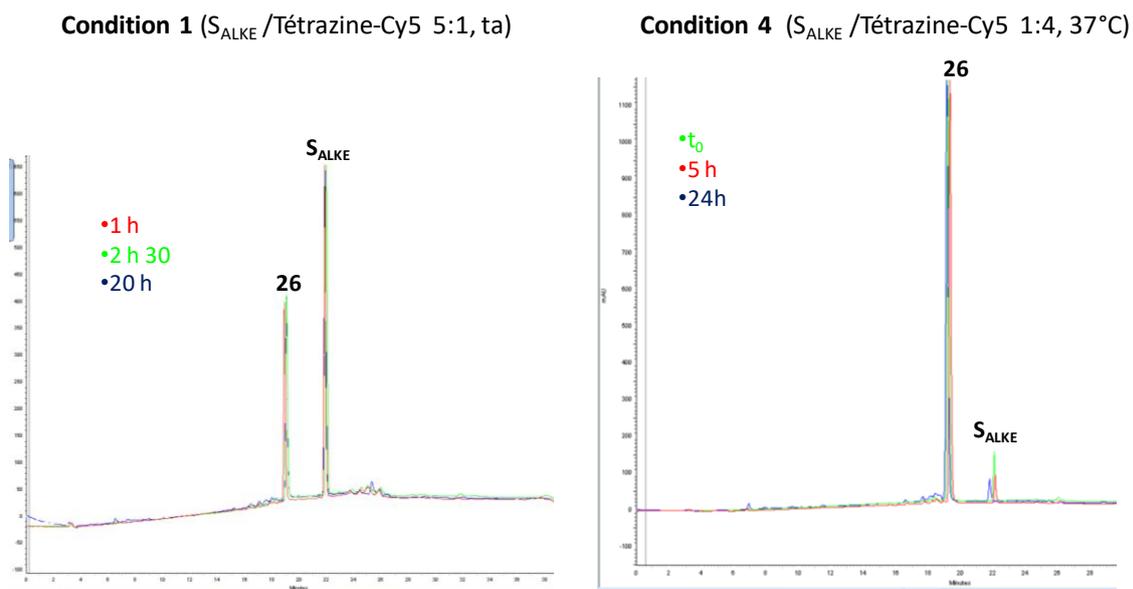


Figure 126 : couplage de DAinv entre le fluorophore tétrazine-Cy5 **26** et le rapporteur S_{ALKE} . Haut : conditions réactionnelles testées par HPLC en phase inverse avec une détection dans l'UV à 254 nm. La formation du produit conjugué attendu n'a jamais été observée. Bas : chromatogrammes HPLC obtenus pour les conditions 1 et 4.

Annexe 5 : rapporteur SCP, suivi de la réaction de ligation de DAinv en solution

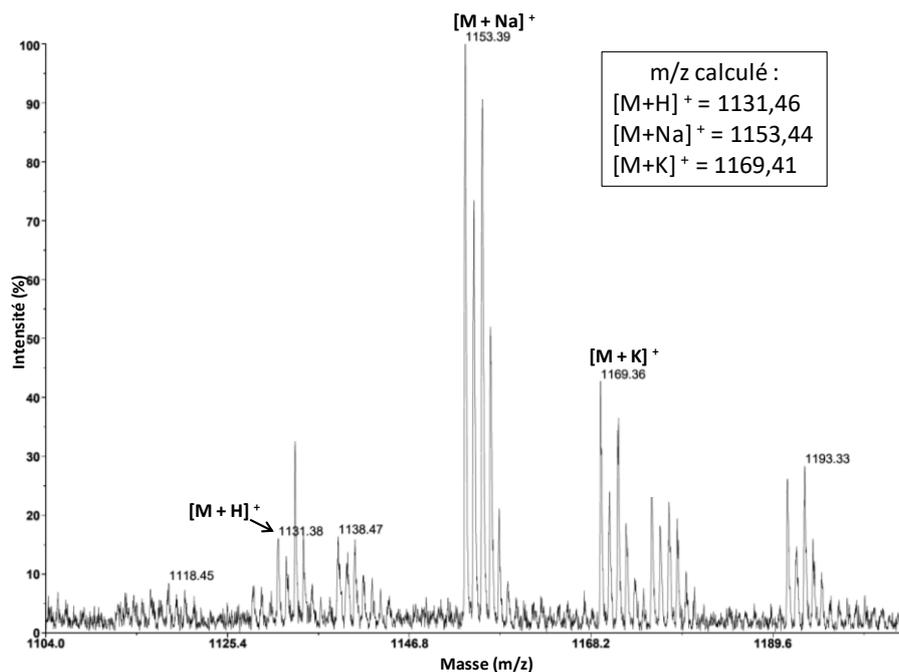


Figure 127 : identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF du produit conjugué **27** formé lors de la réaction de ligation bioorthogonale de DAinv entre le rapporteur chimique SCP (500 μM) et le fluorophore tétrazine-Cy5 **26** (1 mM), en solution aqueuse et après 1 h d'agitation à température ambiante.

Annexe 6 : évaluation de la toxicité des rapporteurs SCP et HAZ

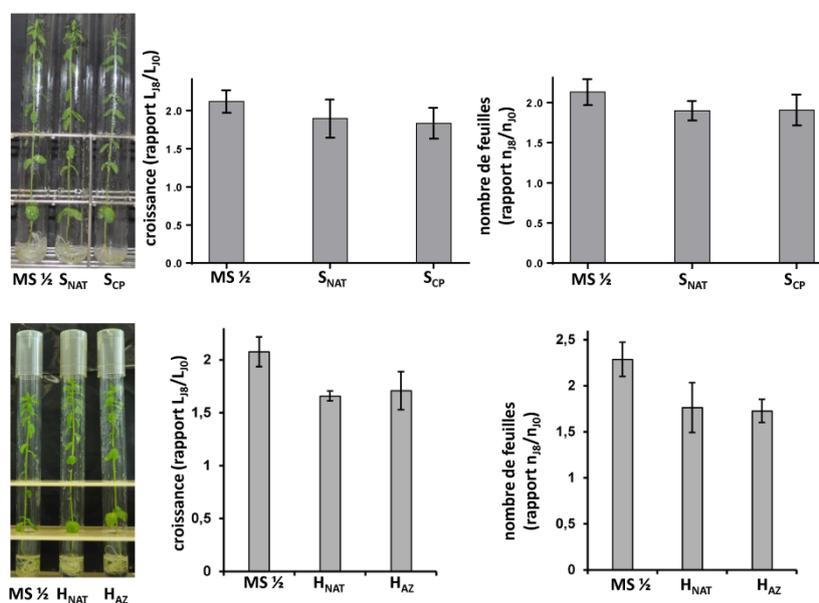


Figure 128 : plantules de lin de 2 semaines incubées via leurs racines dans du milieu MS 1/2 seul ou contenant les monomères (haut) SCP ou SNAT à 20 μM, et (bas) HAZ ou HNAT à 40 μM. La longueur des plantules (L) est mesurée et le nombre de feuilles (n) est compté avant et après 7 jours d'incubation. Le nombre de plantules par condition est de 5 (haut) ou 3 (bas). Les rapporteurs SCP et HAZ ne présentent aucun effet significatif sur la croissance et la morphologie des plantes.

Annexe 7 : marquage métabolique sur coupes de tiges de lin, contrôles négatifs

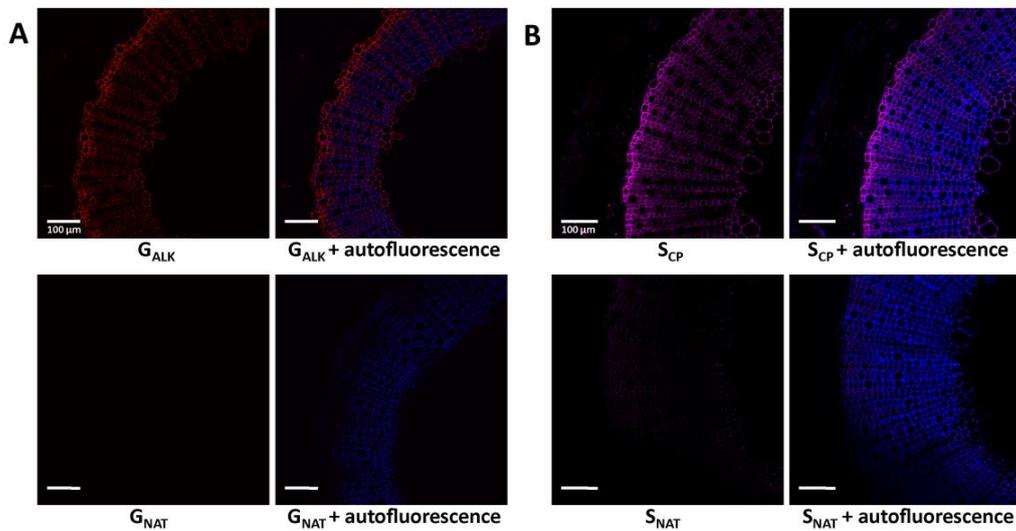


Figure 129 : contrôles négatifs des mono-marquages des unités G_{ALK} et S_{CP} . Coupes transversales de tige de lin incubées pendant 20 h avec (A) le rapporteur G_{ALK} ou son analogue naturel G_{NAT} , et (B) le rapporteur S_{CP} ou son analogue S_{NAT} , à $10\mu\text{M}$ chacun pendant 20 h, puis avec leurs fluorophores respectifs ((A) azide fluor 545, (B) tétrazine-Cy5) à $5\mu\text{M}$ pendant 1 h.

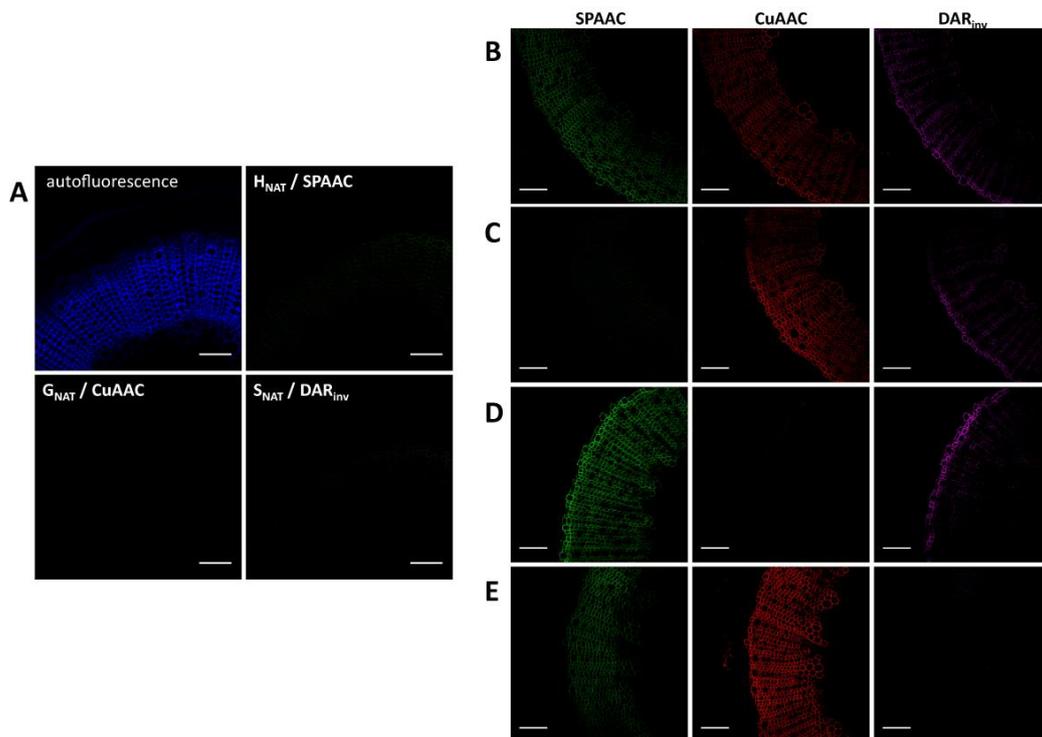


Figure 130 : contrôles négatifs du triple marquage. Gauche : section transversale de tige de lin incubée avec les monolignols naturels H_{NAT} , G_{NAT} et S_{NAT} à $10\mu\text{M}$ chacun pendant 20 h, avant les étapes de ligation aux fluorophores selon l'ordre réactionnel 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Droite : sections incubées avec $10\mu\text{M}$ de (B) H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} ; (C) H_{NAT} , G_{ALK} et S_{CP} ; (D) H_{AZ} , G_{NAT} et S_{CP} ou (E) H_{AZ} , G_{ALK} et S_{NAT} pendant 20 h. Suivi des étapes de ligation aux fluorophores selon l'ordre réactionnel 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Echelle = $100\mu\text{m}$.

Annexe 8 : mono-marquage des unités G_{ALK} , optimisation de la réaction de ligation CuAAC

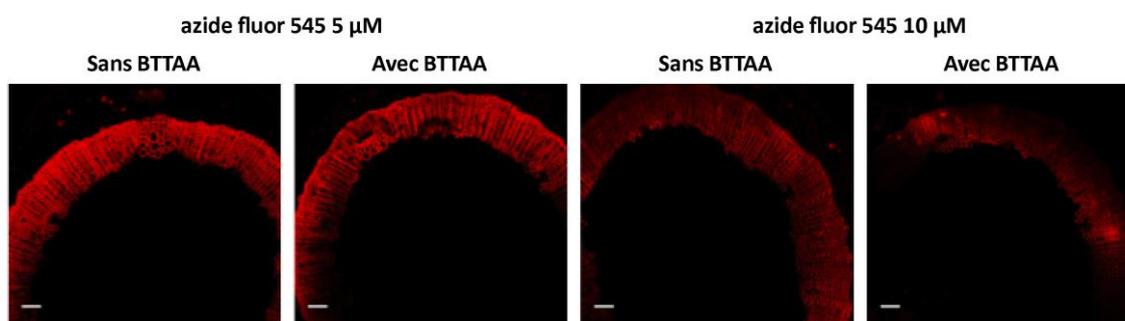


Figure 131 : mono-marquage des unités G_{ALK} , utilisation du BTTAA. Coupes transversales de tige de lin incubées avec le rapporteur G_{ALK} , puis avec la solution CuAAC contenant l'azide fluor 545 à 5 ou 10 μM , en absence ou en présence de BTTAA (en présence d'ascorbate de sodium et de sulfate de cuivre pentahydraté).

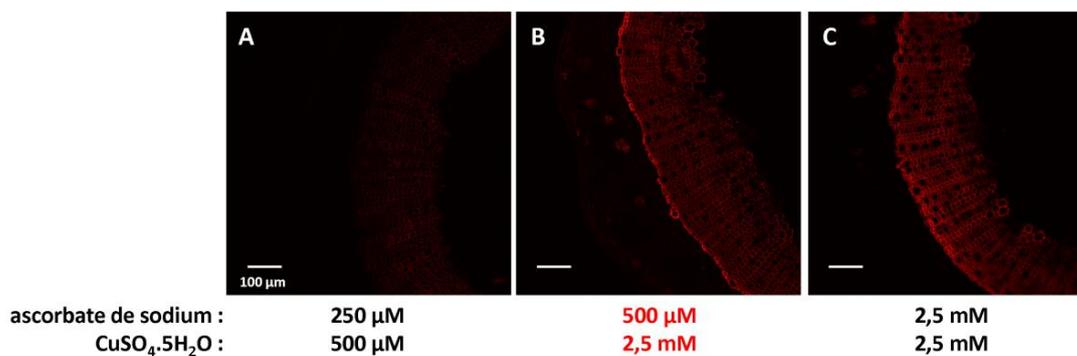


Figure 132 : mono-marquage des unités G_{ALK} , optimisation des concentrations en cuivre et en ascorbate de sodium. Sections transversales de tige de lin incubées pendant 20 h avec le rapporteur G_{ALK} à 10 μM , puis pendant 1 h avec une solution de couplage CuAAC contenant 5 μM d'azide fluor 545, du cuivre pentahydraté et de l'ascorbate de sodium aux concentrations respectives de (A) 250 μM et 500 μM , (B) 500 μM et 2,5 mM, (C) 2,5 mM et 2,5 mM. La condition B a été retenue.

Annexe 9 : mono-marquage des unités H_{AZ}, optimisation de la réaction de ligation SPAAC

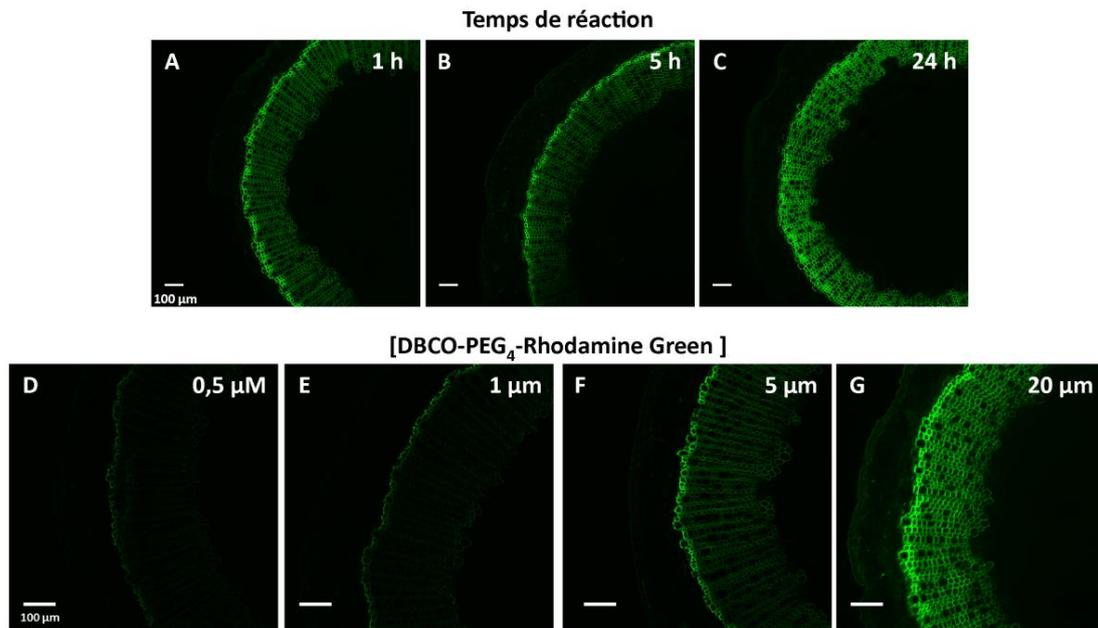


Figure 133 : mono-marquage des unités H_{AZ}, optimisation du temps de ligation et de la concentration en fluorophore. Sections transversales de tige de lin incubées avec le rapporteur H_{AZ} à 10 μM pendant 20 h, puis avec (A-C) le fluorophore DBCO-PEG₄-Rhodamine Green à 5 μM pendant différents temps (1, 5 ou 24 h) ou (D-G) à différentes concentrations (0,5, 1, 5 ou 20 μM) pendant 1 h. Les conditions retenues sont un couplage SPAAC d'1 h avec 5 μM de fluorophore.

Annexe 10 : mono-marquage des unités S_{CP}, optimisation de la réaction de ligation de DAinv

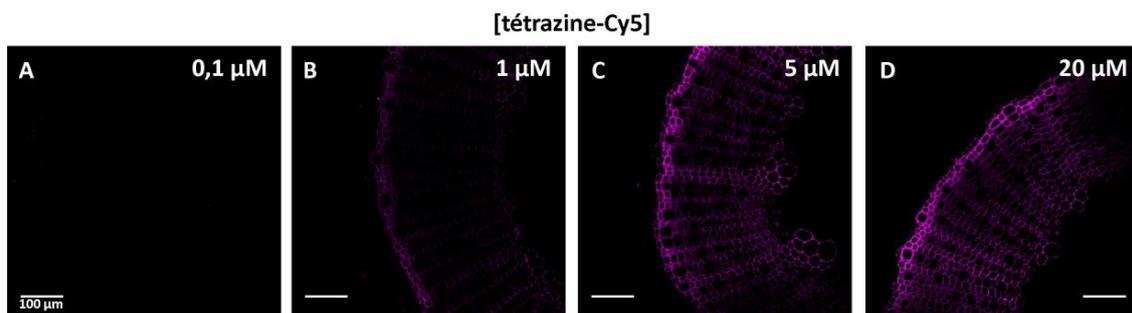


Figure 134 : mono-marquage des unités S_{CP}, optimisation de la concentration en fluorophore. Sections transversales de tige de lin incubées avec le rapporteur S_{CP} à 10 μM pendant 20 h, puis avec le fluorophore tétrazine-Cy5 à différentes concentrations (0,1, 1, 5 ou 20 μM) pendant 1 h. La concentration de 5 μM a été retenue.

Annexe 11 : spécificité de l'incorporation métabolique des rapporteurs H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP}

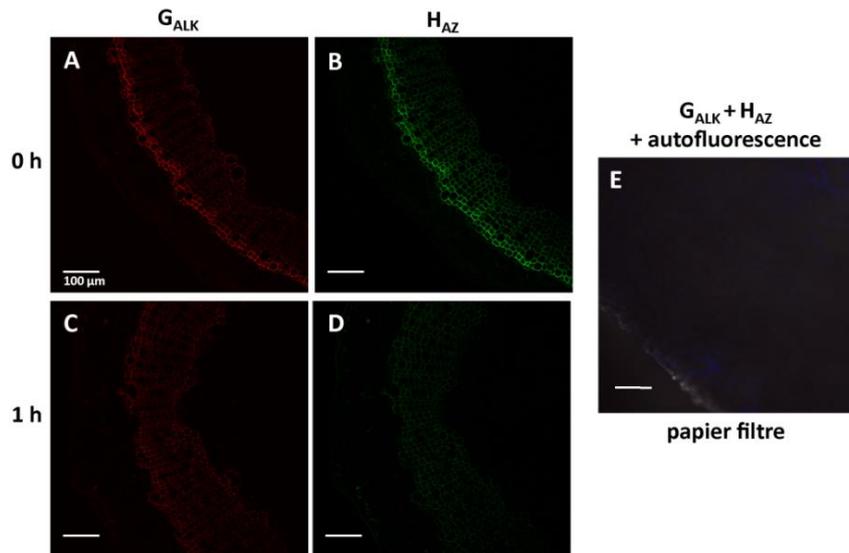


Figure 135 : expérience de dénaturation thermique, spécificité de l'incorporation des rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ}. (A-D) Coupes transversales de tige de lin préalablement incubées dans du MS ½ à 90 °C durant 0 ou 1 h, avant l'incorporation métabolique des rapporteurs G_{ALK} et H_{AZ} à 10 µM chacun durant 20 h, suivie des étapes de ligation aux fluorophores selon l'ordre BLISS (1.SPAAC 2.CuAAC). La diminution significative de fluorescence après la dénaturation enzymatique d'1 h (C-D) montre que l'incorporation des rapporteurs chimiques se fait sous contrôle enzymatique. (E) Application du double marquage standard des unités H_{AZ} et G_{ALK} à du papier filtre composé de cellulose. L'absence de signal de fluorescence signifie que les rapporteurs ne sont pas piégés de manière aspécifique dans la cellulose de la paroi lignocellulosique.

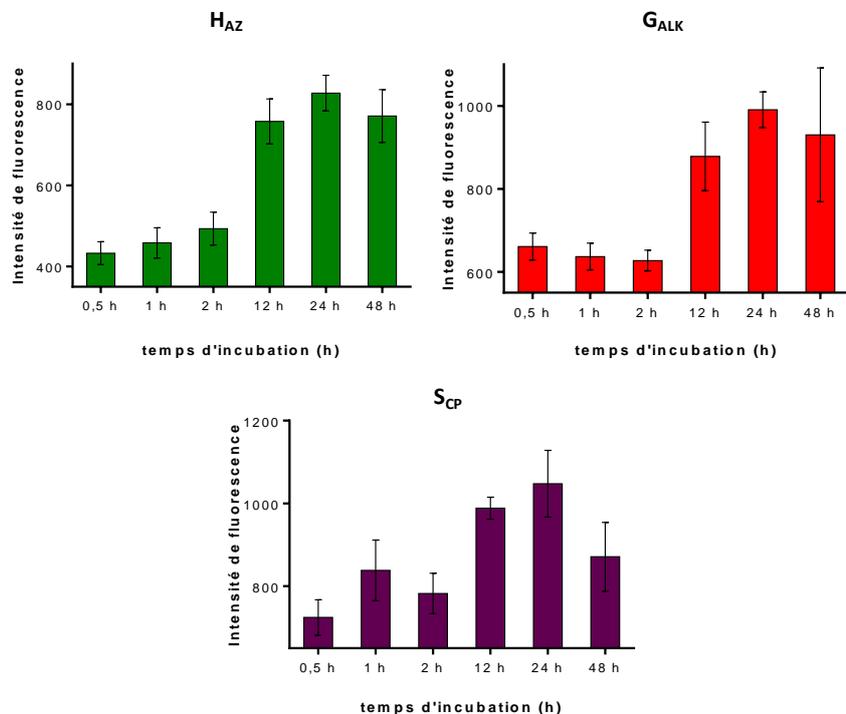


Figure 136 : incorporation durée-dépendante des trois rapporteurs chimiques lors du triple marquage. Coupes transversales de tiges de lin incubées avec les trois rapporteurs H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} à 10 µM chacun pendant différents temps (0,5, 1, 2, 12, 24 ou 48 h), avant les étapes de ligation aux fluorophores suivant l'ordre 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Réalisation des acquisitions avec l'objectif 60x, puis quantification de l'intensité moyenne de fluorescence du xylème. Données moyennées à partir de 3 réplicats biologiques avec 4 coupes observées par condition. L'apparition d'un plateau après 12 h d'incubation suggère que l'incorporation des rapporteurs chimiques se fait sous le contrôle des phénoloxydases.

Annexe 12 : triple marquage H_{AZ}/G_{ALK}/S_{CP} sur modèles végétaux

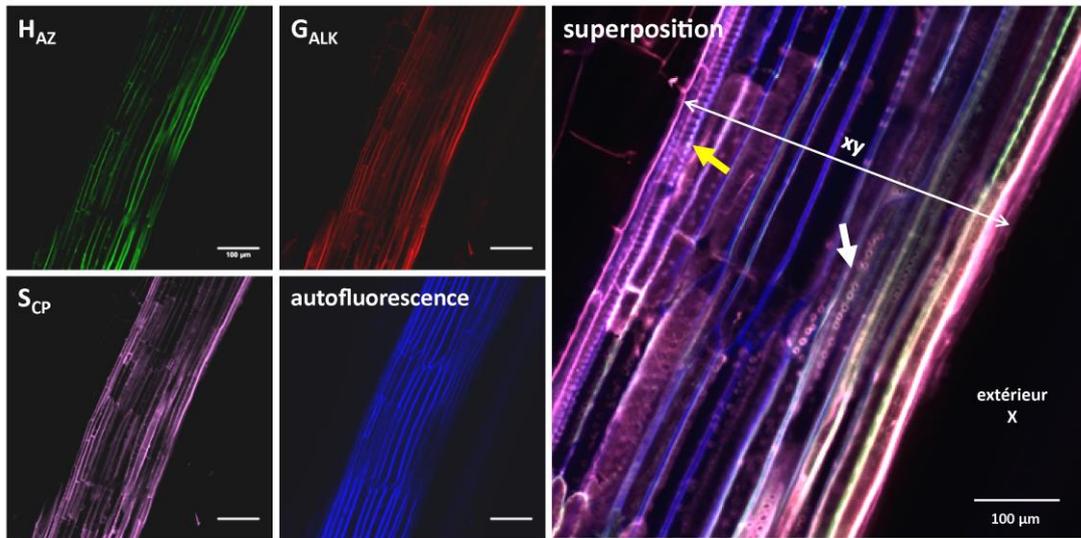


Figure 137 : triple marquage sur coupe longitudinale de tige de lin. Coupe incubée avec les rapporteurs H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} à 10 µM chacun durant 20 h. Puis chaque rapporteur incorporé est couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Gauche : canaux de fluorescence des unités H_{AZ}, G_{ALK}, S_{CP}, et de l'autofluorescence de la lignine. Droite : superposition des quatre canaux. Les rapporteurs chimiques sont incorporés au niveau du xylème secondaire (xy) et mettent en avant certains motifs de lignification caractéristiques des cellules vasculaires. Les ornementsations spiralées et ponctuées sont indiquées par les flèches jaune et blanche respectivement.

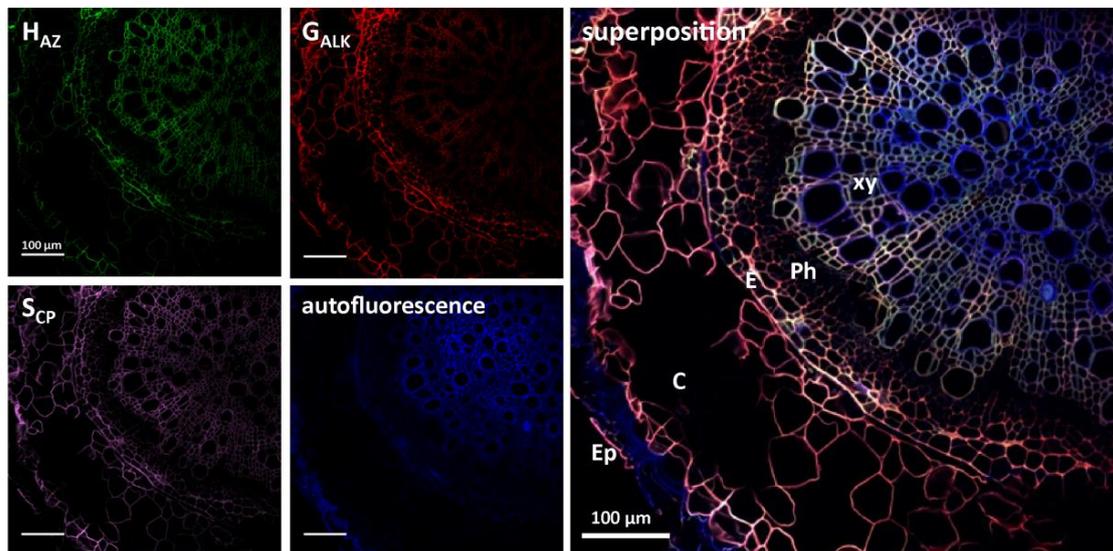


Figure 138 : triple marquage sur coupe transversale de racine de lin. Coupe incubée avec les rapporteurs H_{AZ}, G_{ALK} et S_{CP} à 10 µM chacun durant 20 h. Puis chaque rapporteur incorporé est couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Gauche : canaux de fluorescence des unités H_{AZ}, G_{ALK}, S_{CP} et de l'autofluorescence de la lignine. Droite : superposition des quatre canaux. Les trois rapporteurs sont polymérisés au niveau des tissus lignifiés : le xylème secondaire (xy) et l'endoderme (E). C = cortex, Ep = épiderme, Ph = phloème.

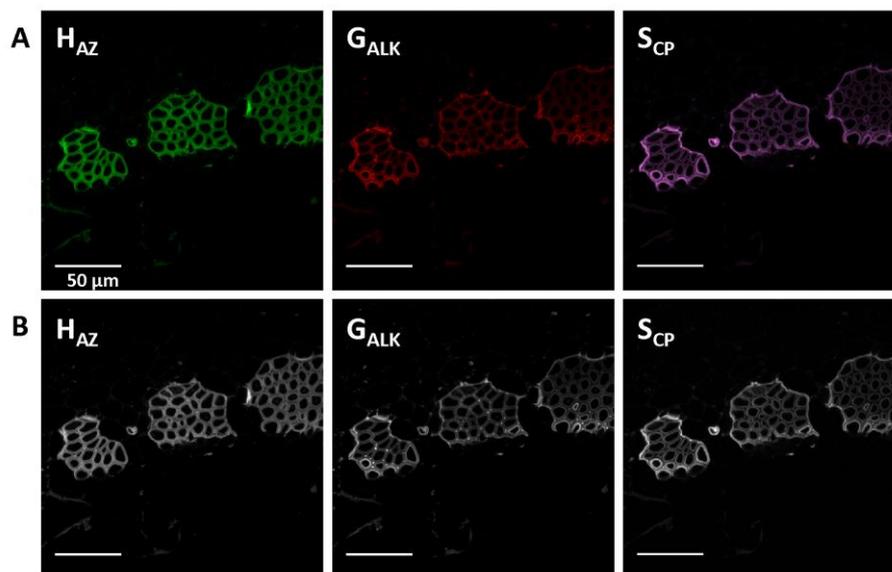


Figure 139 : triple marquage appliqué au peuplier, zoom sur les faisceaux de fibres parenchymateuses. Coupe transversale de tige de peuplier incubée avec les rapporteurs H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} à $10 \mu M$ chacun pendant 20 h. Chaque rapporteur incorporé est ensuite couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Visualisation des canaux de fluorescence des unités H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} (A) avec les couleurs traditionnelles (vert, rouge et magenta) ou (B) en niveaux de gris. Les unités G_{ALK} et S_{CP} sont davantage incorporées en périphérie du faisceau par rapport à son centre, en comparaison des unités H_{AZ} pour qui l'incorporation est plus homogène.

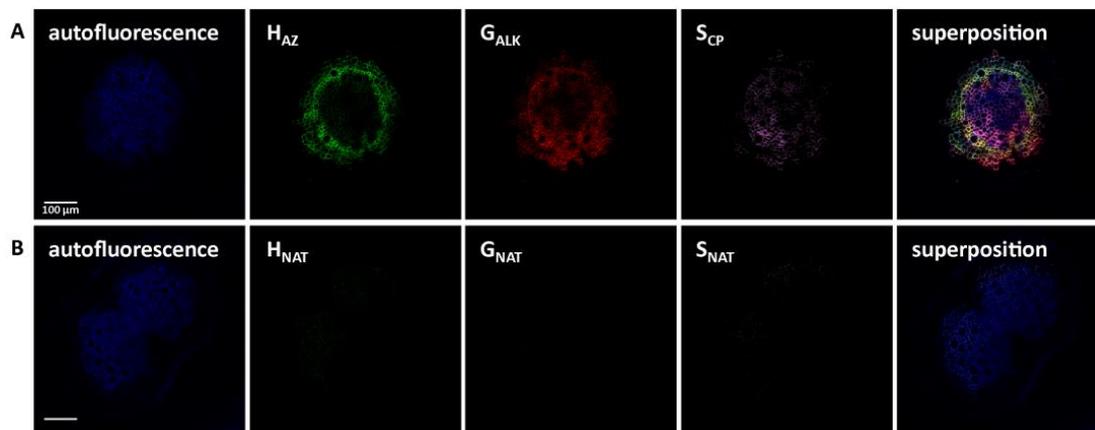


Figure 140 : triple marquage sur plantules de lin. Incubation des racines de plantules de lin de 3 semaines (dont la moitié des racines secondaire a préalablement été sectionnée) dans une solution contenant (A) les rapporteurs H_{AZ} , G_{ALK} et S_{CP} ou (B) leurs analogues naturels à $20 \mu M$ chacun durant 13 jours. Des coupes transversales sont ensuite réalisées au niveau des racines primaires pour les étapes de ligation aux fluorophores selon l'ordre réactionnel 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. Les trois rapporteurs chimiques sont absorbés par les plantules et incorporés dans les parois racinaires où ils participent à la lignification.

Annexe 13 : spectroscopie RPE des sondes radicalaires en solution

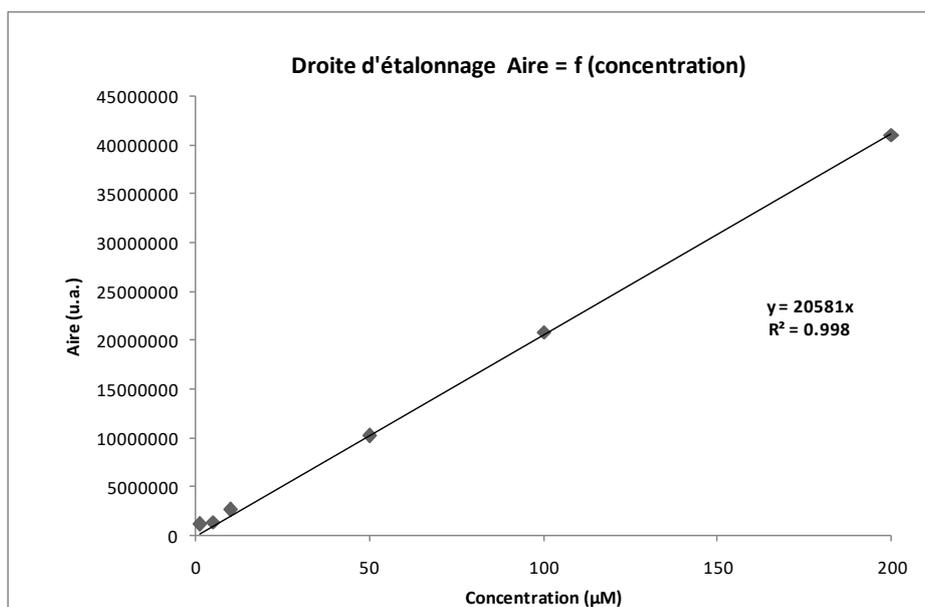


Figure 141 : droite d'étalonnage. Aire du spectre RPE de la sonde CS093 en fonction de sa concentration (de 0 à 200 µM). Le coefficient de détermination R^2 étant très proche de 1, l'équation de la droite $y = 20581x$ peut être utilisée pour déterminer des concentrations inconnues à partir de la mesure de l'aire des spectres acquis pour les sondes radicalaires sur tissus végétaux.

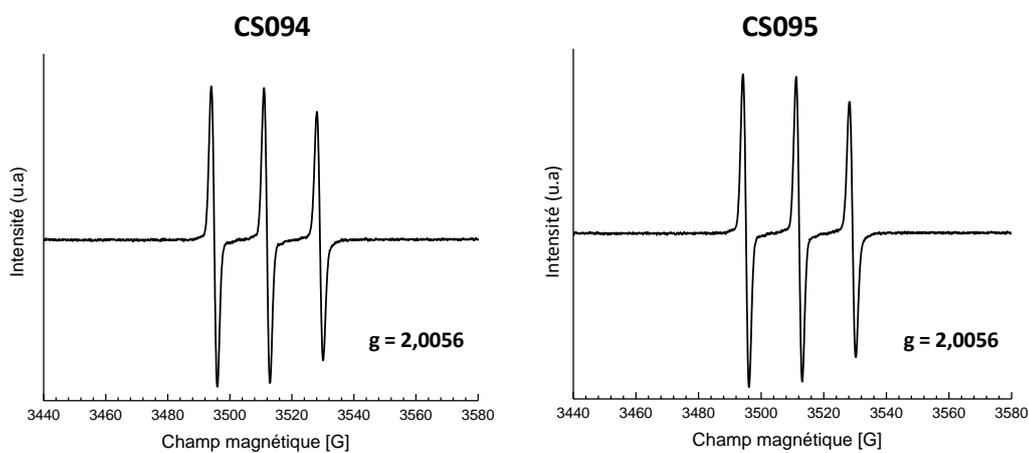


Figure 142 : spectres RPE des sondes CS094 et 95 en solution. Les trois raies équidistantes sont représentatives de l'empreinte radicalaire du groupement nitroxyde du motif TEMPO. Détermination expérimentale de $g = 2,0056$. Conditions d'acquisition : puissance = 0,6325 mW, modulation d'amplitude = 2 G.

Annexe 14 : détermination de la concentration en sonde radicalaire incorporée dans les tissus végétaux par spectroscopie RPE

Formule 1

- La droite d'étalonnage présentée en annexe 13 a pour équation :

$$\boxed{\text{Intégration totale} = 20581 \times [\text{espèces libre} + \text{liée(s)}]}$$

d'où :

$$\boxed{[\text{espèces libre} + \text{liée(s)}] = \text{intégration totale} / 20581}$$

- Facteur de 12,2 à prendre en compte à cause des paramètres d'acquisition différents* :

$$\boxed{[\text{espèces libre} + \text{liée(s)}] = \text{intégration totale} / 251088}$$

- Un échantillon RPE comprend 9 coupes végétales analysées simultanément : facteur de 1/9 à prendre en compte pour obtenir la concentration pour 1 coupe végétale :

$$\boxed{\text{espèces libre} + \text{liée(s)} = \text{intégration totale} / 2259792}$$

Formule 2

- L'intégration d'un spectre RPE est égale à la somme des concentrations des espèces radicalaires :

$$\boxed{\text{Intégration totale} = ([\text{espèce 1}] + [\text{espèce 2}] + [\text{espèce 3}] + [\dots])}$$

A partir de ces deux formules et de l'intégration des spectres RPE, la concentration peut être calculée pour chaque espèce radicalaire incorporée dans les tissus végétaux.

Sonde CS093

	Espèce A (libre)	Espèce B (liée)	Total
Intégration totale (u.a)	XXX	XXX	4,290E6
Poids relatif	0,19	0,81	100
Concentration (μM)	0,36	1,54	1,90

Sonde CS094

	Espèce A' (libre)	Espèce B' (liée)	Espèce C' (liée)	Total
Intégration totale (u.a)	XXX	XXX		7,740E6
Poids relatif	0,22	0,51	0,23	0,96
Concentration (μM)	0,75	1,74	0,79	3,42

* Le facteur de 12,2 est obtenu en normalisant les paramètres d'acquisition (modulation d'amplitude et puissance) entre les spectres réalisés pour la droite d'étalonnage et ceux réalisés après la stratégie du rapporteur chimique sur tissus végétaux.

Annexe 15 : production scientifique

Publications

*co-premiers auteurs

5-One, two, three: a bioorthogonal triple labelling strategy for studying the dynamics of plant cell wall formation *in vivo*.

Clémence Simon*, Cédric Lion*, Corentin Spriet, Fabien Baldacci, Simon Hawkins, Christophe Biot
Angewandte Chemie, 2018, (57), 16665–16671

4-Lignification and Advances in Lignin Imaging in Plant Cell Walls.

Clémence Simon, Cédric Lion, Christophe Biot, Notburga Gierlinger, Simon Hawkins
Annual Plant Reviews online, 2018, 1–32

3-Visualizing Lignification Dynamics in Plants with *Click Chemistry*: Dual Labeling is BLISS!

Clémence Simon, Corentin Spriet, Simon Hawkins, Cédric Lion
Journal of Visualized Experiments, 2018, (131), e56947–e56947

2-BLISS: Shining a light on lignification in plants.

Clémence Simon, Cédric Lion, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Corentin Spriet, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
Plant Signaling & Behavior, 2017, 12(8), e1359366

1-BLISS: A Bioorthogonal Dual-Labeling Strategy to Unravel Lignification Dynamics in Plants.

Clémence Simon*, Cédric Lion*, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Louis Tirot, Djadidi Toybou, Corentin Spriet, Christian Slomianny, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
Cell Chemical Biology, 2017, 24(3), 326–38

Séminaire

1-Bioorthogonal chemical reporter strategy to study lignification process in the flax.

Clémence Simon
Université de Lille, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 30 juin 2017, Villeneuve d'Ascq, France

Communications orales

3-A multi-color strategy to decipher lignification dynamics in plants.

Clémence Simon, Cédric Lion, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Corentin Spriet, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
Journée André Verbert 2018, 13 septembre 2018, Lille, France (*prix de la meilleure communication orale*)

2-Dual labeling by chemical reporters allows visualization of lignification dynamics in plants.

Clémence Simon, Cédric Lion, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Corentin Spriet, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
1st International Plant Spectroscopy Conference, 29-30 août 2017, Umeå, Suède

1-Multi-color staining of lignification dynamics in plants.

Clémence Simon, Cédric Lion, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Corentin Spriet, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
Meeting of Organic Chemistry et Biology, RECOB 17, 28-22 mars 2018, Aussois, France

Communications par affiche

6-A bioorthogonal triple labeling strategy for studying the dynamics of lignification *in vivo*.

Clémence Simon, Cédric Lion, Coentinspriet, Fabien Baldacci, Simon Hawkins, Christophe Biot
2nd PSL Chemical Biology Symposium, 17-18 janvier 2019, Paris, France

5-Visualization of lignification dynamics in plants by a multi-color strategy.

Clémence Simon, Cédric Lion, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Coentinspriet, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
18th European Light Microscopy Initiative Meeting, 5-8 juin 2018, Dublin, Irlande

4-A bioorthogonal dual labeling strategy to visualize lignification dynamics in plants.

Clémence Simon, Cédric Lion, Brigitte Huss, Anne-Sophie Blervacq, Coentinspriet, Yann Guérardel, Simon Hawkins, Christophe Biot
4th France BioImaging annual meeting, 14 avril 2017, Paris, France

3-Applications de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal pour l'étude des processus de lignification chez le lin par microscopie confocale de fluorescence.

Clémence Simon, Brigitte Huss, Cédric Lion, Yann Guérardel, Christian Slomianny, Anne-Sophie Blervacq, Christophe Biot, Simon Hawkins
Découverte de la Recherche en Chimie et en Physique, 8 mars 2017, Villeneuve d'ascq, France (*prix du meilleur poster*)

2-A chemical reporter strategy for a better understating of lignification in the flax stem.

Clémence Simon, Brigitte Huss, Cédric Lion, Yann Guérardel, Christian Slomianny, Anne-Sophie Blervacq, Christophe Biot, Simon Hawkins
Ecole de Microscopie Fonctionnelle en Biologie (MIFOBIO 2016), 30 septembre- 6 octobre 2016, Seignosse, France

1-Applications de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal pour l'étude des processus de lignification chez le lin par microscopie confocale de fluorescence.

Clémence Simon, Brigitte Huss, Cédric Lion, Yann Guérardel, Christian Slomianny, Anne-Sophie Blervacq, Christophe Biot, Simon Hawkins
Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs de la Société Chimique de France, 8-9 juin 2016, Villeneuve d'ascq, France (*prix du meilleur poster*)

Bibliographie

- (1) Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- (2) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* **2006**, *312* (5771), 217–224.
- (3) Nicolas, M.-T.; Moreau, M. Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien) : Osamu Shimomura. *médecine/sciences* **2008**, *24* (11), 983–984.
- (4) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A Metabolic Labeling Approach toward Proteomic Analysis of Mucin-Type O-Linked Glycosylation. *PNAS* **2003**, *100* (25), 14846–14851.
- (5) B. Albert Griffin; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science* **1998**, *281* (5374), 569–272.
- (6) Grünholz, H.-J.; Harms, E.; Opetz, M.; Reutter, W.; Černý, M. Inhibition of in Vitro Biosynthesis of N-Acetylneuraminic Acid by n-Acyl- and n-Alkyl-2-Amino-2-Deoxyhexoses. *Carbohydr. Res.* **1981**, *96* (2), 259–270.
- (7) Rideout, D. Self-Assembling Cytotoxins. *Science* **1986**, *233* (4763), 561–563.
- (8) Mahal, L. K.; Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* **1997**, *276* (5315), 1125–1128.
- (9) Yarema, K. J.; Mahal, L. K.; Bruehl, R. E.; Rodriguez, E. C.; Bertozzi, C. R. Metabolic Delivery of Ketone Groups to Sialic Acid Residues APPLICATION TO CELL SURFACE GLYCOFORM ENGINEERING. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (47), 31168–31179.
- (10) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (1), 13–21.
- (11) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (12) Staudinger, H.; Meyer, J. Über Neue Organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate Und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 635–646.
- (13) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
- (14) Saxon, E.; Luchansky, S. J.; Hang, H. C.; Yu, C.; Lee, S. C.; Bertozzi, C. R. Investigating Cellular Metabolism of Synthetic Azidosugars with the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 14893–14902.
- (15) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143.
- (16) van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8806–8827.
- (17) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2* (10), 565–598.
- (18) Michael, A. Ueber Die Einwirkung von Diazobenzolimid Auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48* (1), 94–95.
- (19) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
- (20) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.

- (21) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460.
- (22) *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*; Vrabl, M., Carell, T., Eds.; Topics in Current Chemistry Collections; Springer International Publishing, 2016.
- (23) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. Cellular Consequences of Copper Complexes Used To Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (44), 17993–18001.
- (24) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193.
- (25) Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P. Increasing the Efficacy of Bioorthogonal Click Reactions for Bioconjugation: A Comparative Study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (35), 8051–8056.
- (26) Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. Glycoproteomic Probes for Fluorescent Imaging of Fucosylated Glycans in Vivo. *PNAS* **2006**, *103* (33), 12371–12376.
- (27) Link, A. J.; Tirrell, D. A. Cell Surface Labeling of Escherichia Coli via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37), 11164–11165.
- (28) Salic, A.; Mitchison, T. J. A Chemical Method for Fast and Sensitive Detection of DNA Synthesis in Vivo. *PNAS* **2008**, *105* (7), 2415–2420.
- (29) Jao, C. Y.; Roth, M.; Welti, R.; Salic, A. Metabolic Labeling and Direct Imaging of Choline Phospholipids in Vivo. *PNAS* **2009**, *106* (36), 15332–15337.
- (30) Anderson, C. T.; Wallace, I. S.; Somerville, C. R. Metabolic Click-Labeling with a Fucose Analog Reveals Pectin Delivery, Architecture, and Dynamics in Arabidopsis Cell Walls. *PNAS* **2012**, *109* (4), 1329–1334.
- (31) Blomquist, A. T.; Liu, L. H. Many-Membered Carbon Rings. VII. Cycloöctyne. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (9), 2153–2154.
- (32) Wittig, G.; Krebs, A. Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkyne, I. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (12), 3260–3275.
- (33) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (34) Meier, H.; Petersen, H.; Kolshorn, H. Die Ringspannung von Cycloalkinen und ihre spektroskopischen Auswirkungen. *Chem. Ber.* **1980**, *113* (7), 2398–2409.
- (35) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648.
- (36) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *PNAS* **2007**, *104* (43), 16793–16797.
- (37) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11486–11493.
- (38) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, *320* (5876), 664–667.
- (39) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10* (14), 3097–3099.

- (40) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253–2255.
- (41) Kuzmin, A.; Poloukhina, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. Surface Functionalization Using Catalyst-Free Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (11), 2076–2085.
- (42) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. Aza-Dibenzocyclooctynes for Fast and Efficient Enzyme PEGylation via Copper-Free (3+2) Cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (1), 97–99.
- (43) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3688–3690.
- (44) Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Difluorobenzocyclooctyne: Synthesis, Reactivity, and Stabilization by β -Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (33), 11799–11805.
- (45) Varga, B. R.; Kállay, M.; Hegyi, K.; Béni, S.; Kele, P. A Non-Fluorinated Monobenzocyclooctyne for Rapid Copper-Free Click Reactions. *Chemistry* **2012**, *18* (3), 822–828.
- (46) Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. Development and Evaluation of New Cyclooctynes for Cell Surface Glycan Imaging in Cancer Cells. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (5), 932–936.
- (47) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefebvre, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (49), 9422–9425.
- (48) Burke, E. G.; Gold, B.; Hoang, T. T.; Raines, R. T.; Schomaker, J. M. Fine-Tuning Strain and Electronic Activation of Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloadditions with Endocyclic Sulfamates in SNO-OCTs. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (23), 8029–8037.
- (49) de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. Thiacycloalkynes for Copper-Free Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (10), 2443–2447.
- (50) Tummatorn, J.; Batsomboon, P.; Clark, R. J.; Alabugin, I. V.; Dudley, G. B. Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloadditions of Benzocyclononynes. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (5), 2093–2097.
- (51) Zimmerman, E. S.; Heibeck, T. H.; Gill, A.; Li, X.; Murray, C. J.; Madlansacay, M. R.; Tran, C.; Uter, N. T.; Yin, G.; Rivers, P. J.; et al. Production of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Optimized Non-Natural Amino Acids in a Cell-Free Expression System. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (2), 351–361.
- (52) Dommerholt, J.; van Rooijen, O.; Borrmann, A.; Guerra, C. F.; Bickelhaupt, F. M.; van Delft, F. L. Highly Accelerated Inverse Electron-Demand Cycloaddition of Electron-Deficient Azides with Aliphatic Cyclooctynes. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5378.
- (53) Svatoněk, D.; Houszka, N.; Hamlin, T. A.; Bickelhaupt, F. M.; Mikula, H. Chemoselectivity of Tertiary Azides in Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (3), 754–758.
- (54) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 16.
- (55) Beatty, K. E.; Szychowski, J.; Fisk, J. D.; Tirrell, D. A. A BODIPY-Cyclooctyne for Protein Imaging in Live Cells. *Chembiochem* **2011**, *12* (14), 2137–2139.
- (56) Neef, A. B.; Schultz, C. Selective Fluorescence Labeling of Lipids in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (8), 1498–1500.

- (57) Neef, A. B.; Luedtke, N. W. An Azide-Modified Nucleoside for Metabolic Labeling of DNA. *Chembiochem* **2014**, *15* (6), 789–793.
- (58) Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry in Living Animals. *PNAS* **2010**, *107* (5), 1821–1826.
- (59) Hoogenboom, J.; Berghuis, N.; Cramer, D.; Geurts, R.; Zuilhof, H.; Wennekes, T. Direct Imaging of Glycans in Arabidopsis Roots via Click Labeling of Metabolically Incorporated Azido-Monosaccharides. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16* (220).
- (60) Diels, O.; Alder, K. Synthesen in Der Hydroaromatischen Reihe. I. Mitteilung: Anlagerungen von Di-En Kohlenwasserstoffen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460* (1), 98–122.
- (61) Fukui, K.; Yonezawa, T.; Shingu, H. A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons. *J. Chem. Phys.* **1952**, *20* (4), 722–725.
- (62) Nobel Prize for Chemistry for 1950: Prof. O. Diels and Prof. K. Alder. *Nature* **1950**, *166* (4230), 889.
- (63) Woodward, R. B.; Sondheimer, F.; Taub, D.; Heusler, K.; McLamore, W. M. The Total Synthesis of Steroids I. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (17), 4223–4251.
- (64) Chen, C.-M.; Shiao, H.-Y.; Uang, B.-J.; Hsieh, H.-P. Biomimetic Syntheses of (±)-Isopalhinine A, (±)-Palhinine A, and (±)-Palhinine D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (47), 15572–15576.
- (65) Rideout, D. C.; Breslow, R. Hydrophobic Acceleration of Diels-Alder Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (26), 7816–7817.
- (66) Hill, K. W.; Taunton-Rigby, J.; Carter, J. D.; Kropp, E.; Vagle, K.; Pieken, W.; McGee, D. P.; Husar, G. M.; Leuck, M.; Anziano, D. J.; et al. Diels-Alder Bioconjugation of Diene-Modified Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (16), 5352–5358.
- (67) de Araújo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Köhn, M.; Schröder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. Diels-Alder Ligation and Surface Immobilization of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *45* (2), 296–301.
- (68) Carboni, R. A.; Lindsey, R. V. Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (16), 4342–4346.
- (69) Sauer, J. Diels-Alder Reactions II: The Reaction Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, *6* (1), 16–33.
- (70) Thalhammer, F.; Wallfahrer, U.; Sauer, J. Reaktivität Einfacher Offenkettiger Und Cyclischer Dienophile Bei Diels-Alder-Reaktionen Mit Inversem Elektronenbedarf. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (47), 6851–6854.
- (71) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519.
- (72) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299.
- (73) Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B. Clicking 1,2,4,5-Tetrazine and Cyclooctynes with Tunable Reaction Rates. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (12), 1736–1738.
- (74) Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C.; Szymański, J.; Mueller, R.; Wießler, M.; Schultz, C.; Lemke, E. A. Amino Acids for Diels–Alder Reactions in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (17), 4166–4170.
- (75) Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. Live-Cell Imaging of Cyclopropene Tags with Fluorogenic Tetrazine Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (30), 7476–7479.

- (76) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Xie, B.; Kamber, D. N.; Prescher, J. A. Functionalized Cyclopropenes As Bioorthogonal Chemical Reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18638–18643.
- (77) Niederwieser, A.; Späte, A.-K.; Nguyen, L. D. Two-Color Glycan Labeling of Live Cells by a Combination of Diels-Alder and Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (15), 4265–4268.
- (78) Engelsma, S. B.; Willems, L. I.; van Paaschen, C. E.; van Kasteren, S. I.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Filippov, D. V. Acylazetine as a Dienophile in Bioorthogonal Inverse Electron-Demand Diels–Alder Ligation. *Org. Lett.* **2014**, *16* (10), 2744–2747.
- (79) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (16), 4895–4950.
- (80) Kamber, D. N.; Liang, Y.; Blizzard, R. J.; Liu, F.; Mehl, R. A.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. 1,2,4-Triazines Are Versatile Bioorthogonal Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (26), 8388–8391.
- (81) Horner, K. A.; Valette, N. M.; Webb, M. E. Strain-Promoted Reaction of 1,2,4-Triazines with Bicyclononynes. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14376–14381.
- (82) Peewasan, K.; Wagenknecht, H.-A. 1,2,4-Triazine-Modified 2'-Deoxyuridine Triphosphate for Efficient Bioorthogonal Fluorescent Labeling of DNA. *Chembiochem* **2017**, *18* (15), 1473–1476.
- (83) Reisacher, U.; Ploschik, D.; Rönicke, F.; Cserép, G. B.; Kele, P.; Wagenknecht, H.-A. Copper-Free Dual Labeling of DNA by Triazines and Cyclopropenes as Minimal Orthogonal and Bioorthogonal Functions. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (14), 4032–4037.
- (84) Cole, C. M.; Yang, J.; Šečkutė, J.; Devaraj, N. K. Fluorescent Live-Cell Imaging of Metabolically Incorporated Unnatural Cyclopropene-Mannosamine Derivatives. *Chembiochem* **2013**, *14* (2), 205–208.
- (85) Patterson, D. M.; Jones, K. A.; Prescher, J. A. Improved Cyclopropene Reporters for Probing Protein Glycosylation. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10* (7), 1693–1697.
- (86) Späte, A.-K.; Schart, V. F.; Häfner, J.; Niederwieser, A.; Mayer, T. U.; Wittmann, V. Expanding the Scope of Cyclopropene Reporters for the Detection of Metabolically Engineered Glycoproteins by Diels–Alder Reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10* (1), 2235–2242.
- (87) Späte, A.-K.; Bußkamp, H.; Niederwieser, A.; Schart, V. F.; Marx, A.; Wittmann, V. Rapid Labeling of Metabolically Engineered Cell-Surface Glycoconjugates with a Carbamate-Linked Cyclopropene Reporter. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (1), 147–154.
- (88) Yang, J.; Liang, Y.; Šečkutė, J.; Houk, K. N.; Devaraj, N. K. Synthesis and Reactivity Comparisons of 1-Methyl-3-Substituted Cyclopropene Mini-Tags for Tetrazine Bioorthogonal Reactions. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (12), 3365–3375.
- (89) Hassenrück, J.; Wittmann, V. Cyclopropene Derivatives of Aminosugars for Metabolic Glycoengineering. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15* (1), 584–601.
- (90) Späte, A.-K.; Schart, V. F.; Schöllkopf, S.; Niederwieser, A.; Wittmann, V. Terminal Alkenes as Versatile Chemical Reporter Groups for Metabolic Oligosaccharide Engineering. *Chemistry* **2014**, *20* (50), 16502–16508.
- (91) Dold, J. E. G. A.; Pfozter, J.; Späte, A.-K.; Wittmann, V. Dienophile-Modified Mannosamine Derivatives for Metabolic Labeling of Sialic Acids: A Comparative Study. *Chembiochem* **2017**, *18* (13), 1242–1250.
- (92) Späte, A.-K.; Dold, J. E. G. A.; Batroff, E.; Schart, V. F.; Wieland, D. E.; Baudendistel, O. R.; Wittmann, V. Exploring the Potential of Norbornene-Modified Mannosamine Derivatives for Metabolic Glycoengineering. *Chembiochem* **2016**, *17* (14), 1374–1383.

- (93) Lee, Y.-J.; Kurra, Y.; Yang, Y.; Torres-Kolbus, J.; Deiters, A.; Liu, W. R. Genetically Encoded Unstrained Olefins for Live Cell Labeling with Tetrazine Dyes. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (86), 13085–13088.
- (94) Rieder, U.; Luedtke, N. W. Alkene-Tetrazine Ligation for Imaging Cellular DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (35), 9168–9172.
- (95) Zhu, Y.; Chen, X. Expanding the Scope of Metabolic Glycan Labeling in Arabidopsis Thaliana. *Chembiochem* **2017**, *18* (13), 1286–1296.
- (96) Meimetis, L. G.; Carlson, J. C. T.; Giedt, R. J.; Kohler, R. H.; Weissleder, R. Ultrafluorogenic Coumarin-Tetrazine Probes for Real-Time Biological Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (29), 7531–7534.
- (97) Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulderson, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (19), 3375–3378.
- (98) Houghton, J. L.; Membreno, R.; Abdel-Atti, D.; Cunanan, K. M.; Carlin, S.; Scholz, W. W.; Zanzonico, P. B.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Establishment of the In Vivo Efficacy of Pretargeted Radioimmunotherapy Utilizing Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16* (1), 124–133.
- (99) Gutmiedl, K.; Wirges, C. T.; Ehmke, V.; Carell, T. Copper-Free “Click” Modification of DNA via Nitrile Oxide–Norbornene 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Org. Lett.* **2009**, *11* (11), 2405–2408.
- (100) Jawalekar, A. M.; Reubsaet, E.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Synthesis of Isoxazoles by Hypervalent Iodine-Induced Cycloaddition of Nitrile Oxides to Alkynes. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (11), 3198–3200.
- (101) McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. Strain-Promoted Cycloadditions of Cyclic Nitrones with Cyclooctynes for Labeling Human Cancer Cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (36), 10040–10042.
- (102) Kolodych, S.; Rasolofonjatovo, E.; Chaumontet, M.; Nevers, M.-C.; Créminon, C.; Taran, F. Discovery of Chemoselective and Biocompatible Reactions Using a High-Throughput Immunoassay Screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 12056–12060.
- (103) Wallace, S.; Chin, J. W. Strain-Promoted Sydnone Bicyclo-[6.1.0]-Nonyne Cycloaddition. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (5), 1742–1744.
- (104) Andersen, K. A.; Aronoff, M. R.; McGrath, N. A.; Raines, R. T. Diazo Groups Endure Metabolism and Enable Chemoselectivity in Cellulo. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (7), 2412–2415.
- (105) McGrath, N. A.; Raines, R. T. Diazo Compounds as Highly Tunable Reactants in 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions with Cycloalkynes. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (11), 3237–3240.
- (106) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Madden, M. M.; Lin, Q. A Photoinducible 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction for Rapid, Selective Modification of Tetrazole-Containing Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (15), 2832–2835.
- (107) Lim, R. K. V.; Lin, Q. Azirine Ligation: Fast and Selective Protein Conjugation via Photoinduced Azirine–Alkene Cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (42), 7993–7995.
- (108) Dondoni, A.; Massi, A.; Nanni, P.; Roda, A. A New Ligation Strategy for Peptide and Protein Glycosylation: Photoinduced Thiol–Ene Coupling. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (43), 11444–11449.
- (109) Brustad, E.; Bushey, M. L.; Lee, J. W.; Groff, D.; Liu, W.; Schultz, P. G. A Genetically Encoded Boronate-Containing Amino Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (43), 8220–8223.

- (110) Lemieux, G. A.; de Graffenried, C. L.; Bertozzi, C. R. A Fluorogenic Dye Activated by the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4708–4709.
- (111) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6* (24), 4603–4606.
- (112) Zhou, Z.; Fahrni, C. J. A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $3(n,\Pi^*)-(\pi,\Pi^*)$ Inversion. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8862–8863.
- (113) Shie, J.-J.; Liu, Y.-C.; Lee, Y.-M.; Lim, C.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. An Azido-BODIPY Probe for Glycosylation: Initiation of Strong Fluorescence upon Triazole Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (28), 9953–9961.
- (114) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Synthesis of a Fluorogenic Cyclooctyne Activated by Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2011**, *13* (22), 5937–5939.
- (115) Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. A Fluorogenic Probe for the Catalyst-Free Detection of Azide-Tagged Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18809–18815.
- (116) Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (16), 2869–2872.
- (117) Carlson, J. C. T.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. BODIPY–Tetrazine Derivatives as Superbright Bioorthogonal Turn-on Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (27), 6917–6920.
- (118) Wu, H.; Yang, J.; Šečková, J.; Devaraj, N. K. In Situ Synthesis of Alkenyl Tetrazines for Highly Fluorogenic Bioorthogonal Live-Cell Imaging Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126* (23), 5915–5919.
- (119) Wiczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. Green- to Far-Red-Emitting Fluorogenic Tetrazine Probes – Synthetic Access and No-Wash Protein Imaging inside Living Cells. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (2), 1506–1510.
- (120) Kozma, E.; Girona, G. E.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. Bioorthogonal Double-Fluorogenic Siliconrhodamine Probes for Intracellular Super-Resolution Microscopy. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (50), 6696–6699.
- (121) Werther, P.; Möhler, J. S.; Wombacher, R. A Bifunctional Fluorogenic Rhodamine Probe for Proximity-Induced Bioorthogonal Chemistry. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (72), 18216–18224.
- (122) Vázquez, A.; Dzijak, R.; Dračinský, M.; Rampmaier, R.; Siegl, S. J.; Vrabel, M. Mechanism-Based Fluorogenic Trans-Cyclooctene–Tetrazine Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (5), 1334–1337.
- (123) Siegl, S. J.; Vázquez, A.; Dzijak, R.; Dračinský, M.; Galeta, J.; Rampmaier, R.; Klepetářová, B.; Vrabel, M. Design and Synthesis of Aza-Bicyclononene Dienophiles for Rapid Fluorogenic Ligations. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (10), 2426–2432.
- (124) Li, C.; Tebo, A. G.; Gautier, A. Fluorogenic Labeling Strategies for Biological Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (7), E1473.
- (125) Dumont, M.; Lehner, A.; Vauzeilles, B.; Malassis, J.; Marchant, A.; Smyth, K.; Linclau, B.; Baron, A.; Pons, J. M.; Anderson, C. T.; et al. Plant Cell Wall Imaging by Metabolic Click-Mediated Labelling of Rhamnogalacturonan II Using Azido 3-Deoxy-d-Manno-Oct-2-Ulosonic Acid. *Plant J.* **2016**, *85* (3), 437–447.
- (126) Zhu, Y.; Wu, J.; Chen, X. Metabolic Labeling and Imaging of N-Linked Glycans in *Arabidopsis Thaliana*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (32), 9301–9305.

- (127) McClosky, D. D.; Wang, B.; Chen, G.; Anderson, C. T. The Click-Compatible Sugar 6-Deoxy-Alkynyl Glucose Metabolically Incorporates into Arabidopsis Root Hair Tips and Arrests Their Growth. *Phytochemistry* **2016**, *123*, 16–24.
- (128) Mravec, J.; Kračun, S. K.; Zemlyanskaya, E.; Rydahl, M. G.; Guo, X.; Pičmanová, M.; Sørensen, K. K.; Růžička, K.; Willats, W. G. T. Click Chemistry-Based Tracking Reveals Putative Cell Wall-Located Auxin Binding Sites in Expanding Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 15988.
- (129) Paper, J. M.; Mukherjee, T.; Schrick, K. Bioorthogonal Click Chemistry for Fluorescence Imaging of Choline Phospholipids in Plants. *Plant Methods* **2018**, *14* (1), 31.
- (130) Bourge, M.; Fort, C.; Soler, M.-N.; Satiat-Jeunemaître, B.; Brown, S. C. A Pulse-Chase Strategy Combining Click-EdU and Photoconvertible Fluorescent Reporter: Tracking Golgi Protein Dynamics during the Cell Cycle. *New Phytol.* **2015**, *205* (2), 938–950.
- (131) Boyle, P. C.; Schwizer, S.; Hind, S. R.; Kraus, C. M.; De la Torre Diaz, S.; He, B.; Martin, G. B. Detecting N-Myristoylation and S-Acylation of Host and Pathogen Proteins in Plants Using Click Chemistry. *Plant Methods* **2016**, *12* (1), 38.
- (132) Kaschani, F.; Verhelst, S. H. L.; van Swieten, P. F.; Verdoes, M.; Wong, C.-S.; Wang, Z.; Kaiser, M.; Overkleeft, H. S.; Bogyo, M.; van der Hoorn, R. A. L. Minitags for Small Molecules: Detecting Targets of Reactive Small Molecules in Living Plant Tissues Using “Click Chemistry.” *Plant J.* **2009**, *57* (2), 373–385.
- (133) Liu, F.; Liang, Y.; Houk, K. N. Bioorthogonal Cycloadditions: Computational Analysis with the Distortion/Interaction Model and Predictions of Reactivities. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (9), 2297–2308.
- (134) Row, R. D.; Prescher, J. A. Constructing New Bioorthogonal Reagents and Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (5), 1073–1081.
- (135) Devaraj, N. K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (8), 952–959.
- (136) Day, A.; Ruel, K.; Neutelings, G.; Crônier, D.; David, H.; Hawkins, S.; Chabbert, B. Lignification in the Flax Stem: Evidence for an Unusual Lignin in Bast Fibers. *Planta* **2005**, *222* (2), 234–245.
- (137) Rytioja, J.; Hildén, K.; Yuzon, J.; Hatakka, A.; de Vries, R. P.; Mäkelä, M. R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78* (4), 614–649.
- (138) Taylor, N. G. Cellulose Biosynthesis and Deposition in Higher Plants. *New Phytol.* **2008**, *178* (2), 239–252.
- (139) Scheller, H. V.; Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 263–289.
- (140) Atmodjo, M. A.; Hao, Z.; Mohnen, D. Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, *64*, 747–779.
- (141) Harholt, J.; Suttangkakul, A.; Scheller, H. V. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiol.* **2010**, *153* (2), 384–395.
- (142) Cassab, G. I. Plant Cell Wall Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49* (1), 281–309.
- (143) Albenne, C.; Canut, H.; Hoffmann, L.; Jamet, E. Plant Cell Wall Proteins: A Large Body of Data, but What about Runaways? *Proteomes* **2014**, *2* (2), 224–242.
- (144) Barros, J.; Serk, H.; Granlund, I.; Pesquet, E. The Cell Biology of Lignification in Higher Plants. *Ann. Bot.* **2015**, *115* (7), 1053–1074.
- (145) Lion, C.; Simon, C.; Huss, B.; Blervacq, A.-S.; Tiroit, L.; Toybou, D.; Spriet, C.; Slomianny, C.; Guerardel, Y.; Hawkins, S.; et al. BLISS: A Bioorthogonal Dual-Labeling Strategy to Unravel Lignification Dynamics in Plants. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (3), 326–338.

- (146) Terashima, N.; Fukushima, K. Heterogeneity in Formation of Lignin—XI: An Autoradiographic Study of the Heterogeneous Formation and Structure of Pine Lignin. *Wood Sci. Technol.* **1988**, *22* (3), 259–270.
- (147) Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 519–546.
- (148) Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.* **2010**, *153* (3), 895–905.
- (149) Simon, C.; Lion, C.; Biot, C.; Gierlinger, N.; Hawkins, S. Lignification and Advances in Lignin Imaging in Plant Cell Walls. In *Annual Plant Reviews online*; American Cancer Society, 2018; pp 1–32.
- (150) Campbell, M. M.; Sederoff, R. R. Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiol.* **1996**, *110* (1), 3–13.
- (151) Ek, M.; Gellerstedt, G.; Henriksson, G. *Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*; De Gruyter: Berlin, Boston, 2009.
- (152) Ralph, J.; Lapierre, C.; Boerjan, W. Lignin Structure and Its Engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 240–249.
- (153) Chapple, C.; Ladisch, M.; Meilan, R. Loosening Lignin’s Grip on Biofuel Production. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (7), 746–748.
- (154) Kumar, A. K.; Sharma, S. Recent Updates on Different Methods of Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks: A Review. *BIOB* **2017**, *4* (7).
- (155) Miyamoto, T.; Mihashi, A.; Yamamura, M.; Tobimatsu, Y.; Suzuki, S.; Takada, R.; Kobayashi, Y.; Umezawa, T. Comparative Analysis of Lignin Chemical Structures of Sugarcane Bagasse Pretreated by Alkaline, Hydrothermal, and Dilute Sulfuric Acid Methods. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *121*, 124–131.
- (156) Umezawa, T. Lignin Modification in Planta for Valorization. *Phytochem. Rev.* **2018**, *17* (6), 1305–1327.
- (157) Chen, Z.; Wan, C. Biological Valorization Strategies for Converting Lignin into Fuels and Chemicals. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2017**, *73*, 610–621.
- (158) Herrmann, K. M. The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant Physiol.* **1995**, *107* (1), 7–12.
- (159) Xie, M.; Zhang, J.; Tschaplinski, T. J.; Tuskan, G. A.; Chen, J.-G.; Muchero, W. Regulation of Lignin Biosynthesis and Its Role in Growth-Defense Tradeoffs. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1427.
- (160) Barros, J.; Serrani-Yarce, J. C.; Chen, F.; Baxter, D.; Venables, B. J.; Dixon, R. A. Role of Bifunctional Ammonia-Lyase in Grass Cell Wall Biosynthesis. *Nat. Plants* **2016**, *2* (6), 16050.
- (161) Nakano, Y.; Yamaguchi, M.; Endo, H.; Rejab, N. A.; Ohtani, M. NAC-MYB-Based Transcriptional Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Land Plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 288.
- (162) Kubo, M.; Udagawa, M.; Nishikubo, N.; Horiguchi, G.; Yamaguchi, M.; Ito, J.; Mimura, T.; Fukuda, H.; Demura, T. Transcription Switches for Protoxylem and Metaxylem Vessel Formation. *Genes Dev.* **2005**, *19* (16), 1855–1860.
- (163) Mitsuda, N.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Ohme-Takagi, M. The NAC Transcription Factors NST1 and NST2 of Arabidopsis Regulate Secondary Wall Thickenings and Are Required for Anther Dehiscence. *Plant Cell* **2005**, *17* (11), 2993–3006.

- (164) Zhong, R.; Demura, T.; Ye, Z.-H. SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of Arabidopsis. *Plant Cell* **2006**, *18* (11), 3158–3170.
- (165) Zhong, R.; Richardson, E. A.; Ye, Z.-H. The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **2007**, *19* (9), 2776–2792.
- (166) McCarthy, R. L.; Zhong, R.; Ye, Z.-H. MYB83 Is a Direct Target of SND1 and Acts Redundantly with MYB46 in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50* (11), 1950–1964.
- (167) Nakamura, Y.; Higuchi, T. Ester Linkage of P-Coumaric Acid in Bamboo Lignin. *Holzforschung* **2009**, *30* (6), 187–191.
- (168) Lu, F.; Ralph, J. Detection and Determination of P-Coumaroylated Units in Lignins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (5), 1988–1992.
- (169) Ralph, J.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. Lignin-Ferulate Cross-Links in Grasses: Active Incorporation of Ferulate Polysaccharide Esters into Ryegrass Lignins. *Carbohydr. Res.* **1995**, *275* (1), 167–178.
- (170) Ralph, J.; Lapierre, C.; Marita, J. M.; Kim, H.; Lu, F.; Hatfield, R. D.; Ralph, S.; Chapple, C.; Franke, R.; Hemm, M. R.; et al. Elucidation of New Structures in Lignins of CAD- and COMT-Deficient Plants by NMR. *Phytochemistry* **2001**, *57* (6), 993–1003.
- (171) Chen, F.; Tobimatsu, Y.; Jackson, L.; Nakashima, J.; Ralph, J.; Dixon, R. A. Novel Seed Coat Lignins in the Cactaceae: Structure, Distribution and Implications for the Evolution of Lignin Diversity. *Plant J.* **2013**, *73* (2), 201–211.
- (172) Chen, F.; Tobimatsu, Y.; Havkin-Frenkel, D.; Dixon, R. A.; Ralph, J. A Polymer of Caffeyl Alcohol in Plant Seeds. *PNAS* **2012**, *109* (5), 1772–1777.
- (173) Li, Y.; Shuai, L.; Kim, H.; Motagamwala, A. H.; Mobley, J. K.; Yue, F.; Tobimatsu, Y.; Havkin-Frenkel, D.; Chen, F.; Dixon, R. A.; et al. An “Ideal Lignin” Facilitates Full Biomass Utilization. *Sci. Adv.* **2018**, *4* (9), eaau2968.
- (174) Lan, W.; Rencoret, J.; Lu, F.; Karlen, S. D.; Smith, B. G.; Harris, P. J.; Río, J. C. del; Ralph, J. Tricin-Lignins: Occurrence and Quantitation of Tricin in Relation to Phylogeny. *Plant J.* **2016**, *88* (6), 1046–1057.
- (175) Río, J. C. del; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Kim, H.; Ralph, J. Hydroxystilbenes Are Monomers in Palm Fruit Endocarp Lignins. *Plant Physiol.* **2017**, *174* (4), 2072–2082.
- (176) Perkins, M.; Smith, R. A.; Samuels, L. The Transport of Monomers during Lignification in Plants: Anything Goes but How? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 69–74.
- (177) Boija, E.; Johansson, G. Interactions between Model Membranes and Lignin-Related Compounds Studied by Immobilized Liposome Chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (5), 620–626.
- (178) Boija, E.; Lundquist, A.; Edwards, K.; Johansson, G. Evaluation of Bilayer Disks as Plant Cell Membrane Models in Partition Studies. *Anal. Biochem.* **2007**, *364* (2), 145–152.
- (179) Pickett-Heaps, J. D. Xylem Wall Deposition. *Protoplasma* **1968**, *65* (1), 181–205.
- (180) Takabe, K.; Fujita, M.; Harada, H.; Saiki, H. Autoradiographic Investigation of Lignification in the Cell Walls of Cryptomeria (*Cryptomeria Japonica* D. Don). *J. Japan Wood Res. Soc.* **1985**, *31* (8), 613–619.
- (181) Kaneda, M.; Rensing, K. H.; Wong, J. C. T.; Banno, B.; Mansfield, S. D.; Samuels, A. L. Tracking Monolignols during Wood Development in Lodgepole Pine. *Plant Physiol.* **2008**, *147* (4), 1750–1760.

- (182) Miao, Y.-C.; Liu, C.-J. ATP-Binding Cassette-like Transporters Are Involved in the Transport of Lignin Precursors across Plasma and Vacuolar Membranes. *PNAS* **2010**, *107* (52), 22728–22733.
- (183) Whetten, R.; Sun, Y. H.; Zhang, Y.; Sederoff, R. Functional Genomics and Cell Wall Biosynthesis in Loblolly Pine. *Plant Mol. Biol.* **2001**, *47* (1–2), 275–291.
- (184) Paux, E.; Tamasloukht, M.; Ladouce, N.; Sivadon, P.; Grima-Pettenati, J. Identification of Genes Preferentially Expressed during Wood Formation in Eucalyptus. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *55* (2), 263–280.
- (185) Alejandro, S.; Lee, Y.; Tohge, T.; Sudre, D.; Osorio, S.; Park, J.; Bovet, L.; Lee, Y.; Geldner, N.; Fernie, A. R.; et al. AtABCG29 Is a Monolignol Transporter Involved in Lignin Biosynthesis. *Curr. Biol.* **2012**, *22* (13), 1207–1212.
- (186) Takeuchi, M.; Kegasa, T.; Watanabe, A.; Tamura, M.; Tsutsumi, Y. Expression Analysis of Transporter Genes for Screening Candidate Monolignol Transporters Using Arabidopsis Thaliana Cell Suspensions during Tracheary Element Differentiation. *J. Plant Res.* **2018**, *131* (2), 297–305.
- (187) Savidge, R. A. Coniferin, a Biochemical Indicator of Commitment to Tracheid Differentiation in Conifers. *Can. J. Bot.* **1989**, *67* (9), 2663–2668.
- (188) Morikawa, Y.; Yoshinaga, A.; Kamitakahara, H.; Wada, M.; Takabe, K. Cellular Distribution of Coniferin in Differentiating Xylem of *Chamaecyparis Obtusa* as Revealed by Raman Microscopy. *Holzforschung* **2009**, *64* (1), 61–67.
- (189) Aoki, D.; Hanaya, Y.; Akita, T.; Matsushita, Y.; Yoshida, M.; Kuroda, K.; Yagami, S.; Takama, R.; Fukushima, K. Distribution of Coniferin in Freeze-Fixed Stem of *Ginkgo Biloba* L. by Cryo-TOF-SIMS/SEM. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31525.
- (190) Liu, C.-J.; Miao, Y.-C.; Zhang, K.-W. Sequestration and Transport of Lignin Monomeric Precursors. *Molecules* **2011**, *16* (1), 710–727.
- (191) Lanot, A.; Hodge, D.; Jackson, R. G.; George, G. L.; Elias, L.; Lim, E.-K.; Vaistij, F. E.; Bowles, D. J. The Glucosyltransferase UGT72E2 Is Responsible for Monolignol 4-O-Glucoside Production in Arabidopsis Thaliana. *Plant J.* **2006**, *48* (2), 286–295.
- (192) Lin, J.-S.; Huang, X.-X.; Li, Q.; Cao, Y.; Bao, Y.; Meng, X.-F.; Li, Y.-J.; Fu, C.; Hou, B.-K. UDP-Glycosyltransferase 72B1 Catalyzes the Glucose Conjugation of Monolignols and Is Essential for the Normal Cell Wall Lignification in Arabidopsis Thaliana. *Plant J.* **2016**, *88* (1), 26–42.
- (193) Escamilla-Treviño, L. L.; Chen, W.; Card, M. L.; Shih, M.-C.; Cheng, C.-L.; Poulton, J. E. Arabidopsis Thaliana Beta-Glucosidases BGLU45 and BGLU46 Hydrolyse Monolignol Glucosides. *Phytochemistry* **2006**, *67* (15), 1651–1660.
- (194) Tobimatsu, Y.; Schuetz, M. Lignin Polymerization: How Do Plants Manage the Chemistry so Well? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 75–81.
- (195) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; et al. Lignins: Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenyl- Propanoids. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3* (1), 29–60.
- (196) Freudenberg, K.; Neish, A. C. *Constitution and Biosynthesis of Lignin*; Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics Molekularbiologie, Biochemie und Biophysik; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1968.
- (197) Demont-Caulet, N.; Lapierre, C.; Jouanin, L.; Baumberger, S.; Méchin, V. Arabidopsis Peroxidase-Catalyzed Copolymerization of Coniferyl and Sinapyl Alcohols: Kinetics of an Endwise Process. *Phytochemistry* **2010**, *71* (14–15), 1673–1683.

- (198) Harman-Ware, A. E.; Happs, R. M.; Davison, B. H.; Davis, M. F. The Effect of Coumaryl Alcohol Incorporation on the Structure and Composition of Lignin Dehydrogenation Polymers. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10* (281).
- (199) Terrett, O. M.; Dupree, P. Covalent Interactions between Lignin and Hemicelluloses in Plant Secondary Cell Walls. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 97–104.
- (200) Terashima, N.; Atalla, R. H.; Ralph, S. A.; Landucci, L. L.; Lapierre, C.; Monties, B. New Preparations of Lignin Polymer Models under Conditions That Approximate Cell Wall Lignification. II. Structural Characterization of the Models by Thioacidolysis. *Holzforschung* **2009**, *50* (1), 9–14.
- (201) Cathala, B.; Monties, B. Influence of Pectins on the Solubility and the Molar Mass Distribution of Dehydrogenative Polymers (DHPs, Lignin Model Compounds). *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, *29* (1), 45–51.
- (202) Li, Q.; Koda, K.; Yoshinaga, A.; Takabe, K.; Shimomura, M.; Hirai, Y.; Tamai, Y.; Uraki, Y. Dehydrogenative Polymerization of Coniferyl Alcohol in Artificial Polysaccharides Matrices: Effects of Xylan on the Polymerization. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (18), 4613–4620.
- (203) Davin, L. B.; Wang, H.-B.; Crowell, A. L.; Bedgar, D. L.; Martin, D. M.; Sarkanen, S.; Lewis, N. G. Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center. *Science* **1997**, *275* (5298), 362–367.
- (204) Hosmani, P. S.; Kamiya, T.; Danku, J.; Naseer, S.; Geldner, N.; Guerinot, M. L.; Salt, D. E. Dirigent Domain-Containing Protein Is Part of the Machinery Required for Formation of the Lignin-Based Casparian Strip in the Root. *PNAS* **2013**, *110* (35), 14498–14503.
- (205) Sterjiades, R.; Dean, J. F. D.; Eriksson, K.-E. L. Laccase from Sycamore Maple (*Acer Pseudoplatanus*) Polymerizes Monolignols. *Plant Physiol.* **1992**, *99* (3), 1162–1168.
- (206) Gavnholt, B.; Larsen, K. Molecular Biology of Plant Laccases in Relation to Lignin Formation. *Physiol. Plant.* **2002**, *116* (3), 273–280.
- (207) Brown, D. M.; Zeef, L. A. H.; Ellis, J.; Goodacre, R.; Turner, S. R. Identification of Novel Genes in Arabidopsis Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics. *Plant Cell* **2005**, *17* (8), 2281–2295.
- (208) Berthet, S.; Demont-Caulet, N.; Pollet, B.; Bidzinski, P.; Cézard, L.; Le Bris, P.; Borrega, N.; Hervé, J.; Blondet, E.; Balzergue, S.; et al. Disruption of LACCASE4 and 17 Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of Arabidopsis Thaliana Stems. *Plant Cell* **2011**, *23* (3), 1124–1137.
- (209) Zhao, Q.; Nakashima, J.; Chen, F.; Yin, Y.; Fu, C.; Yun, J.; Shao, H.; Wang, X.; Wang, Z.-Y.; Dixon, R. A. LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2013**, *25* (10), 3976–3987.
- (210) Sterjiades, R.; Dean, J. F. D.; Gamble, G.; Himmelsbach, D. S.; Eriksson, K.-E. L. Extracellular Laccases and Peroxidases from Sycamore Maple (*Acer Pseudoplatanus*) Cell-Suspension Cultures. *Planta* **1993**, *190* (1), 75–87.
- (211) Blee, K. A.; Choi, J. W.; O’Connell, A. P.; Schuch, W.; Lewis, N. G.; Bolwell, G. P. A Lignin-Specific Peroxidase in Tobacco Whose Antisense Suppression Leads to Vascular Tissue Modification. *Phytochemistry* **2003**, *64* (1), 163–176.
- (212) Herrero, J.; Fernández-Pérez, F.; Yebra, T.; Novo-Uzal, E.; Pomar, F.; Pedreño, M. Á.; Cuello, J.; Guéra, A.; Esteban-Carrasco, A.; Zapata, J. M. Bioinformatic and Functional Characterization of the Basic Peroxidase 72 from Arabidopsis Thaliana Involved in Lignin Biosynthesis. *Planta* **2013**, *237* (6), 1599–1612.
- (213) Lee, Y.; Rubio, M. C.; Alassimone, J.; Geldner, N. A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis. *Cell* **2013**, *153* (2), 402–412.

- (214) Yi Chou, E.; Schuetz, M.; Hoffmann, N.; Watanabe, Y.; Sibout, R.; Samuels, A. L. Distribution, Mobility, and Anchoring of Lignin-Related Oxidative Enzymes in Arabidopsis Secondary Cell Walls. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69* (8), 1849–1859.
- (215) Pesquet, E.; Zhang, B.; Gorzsás, A.; Puhakainen, T.; Serk, H.; Escamez, S.; Barbier, O.; Gerber, L.; Courtois-Moreau, C.; Alatalo, E.; et al. Non-Cell-Autonomous Postmortem Lignification of Tracheary Elements in *Zinnia Elegans*. *Plant Cell* **2013**, *25* (4), 1314–1328.
- (216) Lupoi, J. S.; Singh, S.; Parthasarathi, R.; Simmons, B. A.; Henry, R. J. Recent Innovations in Analytical Methods for the Qualitative and Quantitative Assessment of Lignin. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2015**, *49*, 871–906.
- (217) Hatfield, R.; Fukushima, R. S. Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Sci.* **2005**, *45* (3), 832–839.
- (218) Schuerch, C. Methods of Wood Chemistry. Vol. II. B. L. Browning, Ed., Wiley, New York, 1967. 498 Pp. \$18.75. *J. Polym. Sci. A-2* **1968**, *6* (11), 1943–1944.
- (219) JOHNSON, D. B. The Spectrophotometric Determination of Lignin in Small Wood Samples. *Tappi* **1961**, *44*, 793–798.
- (220) Freudenberg, K. Über Lignin. *Angew. Chem.* **1939**, *52* (20), 362–363.
- (221) Lapiere, C.; Monties, B.; Rolando, C. Thioacidolysis of Poplar Lignins : Identification of Monomeric Syringyl Products and Characterization of Guaiacyl-Syringyl Lignin Fractions. *Holzforschung* **1986**, *40*, 113–118.
- (222) Fergus, B. J.; Goring, D. A. I. The Distribution of Lignin in Birch Wood as Determined by Ultraviolet Microscopy. *Holzforschung* **2009**, *24* (4), 118–124.
- (223) Boeriu, C. G.; Bravo, D.; Gosselink, R. J. A.; van Dam, J. E. G. Characterisation of Structure-Dependent Functional Properties of Lignin with Infrared Spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **2004**, *20* (2), 205–218.
- (224) Mansfield, S. D.; Kim, H.; Lu, F.; Ralph, J. Whole Plant Cell Wall Characterization Using Solution-State 2D NMR. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (9), 1579–1589.
- (225) Meier, D.; Faix, O. Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In *Methods in Lignin Chemistry*; Lin, S. Y., Dence, C. W., Eds.; Springer Series in Wood Science; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1992; pp 177–199.
- (226) Vallet, C.; Chabbert, B.; Czaninski, Y.; Monties, B. Histochemistry of Lignin Deposition during Sclerenchyma Differentiation in Alfalfa Stems. *Ann. Bot.* **1996**, *78* (5), 625–632.
- (227) Pomar, F.; Merino, F.; Barceló, A. R. O-4-Linked Coniferyl and Sinapyl Aldehydes in Lignifying Cell Walls Are the Main Targets of the Wiesner (Phloroglucinol-HCl) Reaction. *Protoplasma* **2002**, *220* (1–2), 17–28.
- (228) Meshitsuka, G.; Nakano, J. Studies on the Mechanism of Lignin Color Reaction. XIII. Maule Color Reaction. 9. *J. Japan Wood Res. Soc.* **1979**, *25* (9), 588–594.
- (229) Yamashita, D.; Kimura, S.; Wada, M.; Takabe, K. Improved Maule Color Reaction Provides More Detailed Information on Syringyl Lignin Distribution in Hardwood. *J. Wood Sci.* **2016**, *62* (2), 131–137.
- (230) Dharmawardhana, D. P.; Ellis, B. E.; Carlson, J. E. Characterization of Vascular Lignification in Arabidopsis Thaliana. *Can. J. Bot.* **1992**, *70* (11), 2238–2244.
- (231) Kapp, N.; Barnes, W. J.; Richard, T. L.; Anderson, C. T. Imaging with the Fluorogenic Dye Basic Fuchsin Reveals Subcellular Patterning and Ecotype Variation of Lignification in Brachypodium Distachyon. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66* (14), 4295–4304.
- (232) Bond, J.; Donaldson, L.; Hill, S.; Hitchcock, K. Safranin Fluorescent Staining of Wood Cell Walls. *Biotech. Histochem.* **2008**, *83* (3–4), 161–171.

- (233) Sibout, R.; Eudes, A.; Mouille, G.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Jouanin, L.; Séguin, A. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D Are the Primary Genes Involved in Lignin Biosynthesis in the Floral Stem of Arabidopsis. *Plant Cell* **2005**, *17* (7), 2059–2076.
- (234) Kurihara, D.; Mizuta, Y.; Sato, Y.; Higashiyama, T. ClearSee: A Rapid Optical Clearing Reagent for Whole-Plant Fluorescence Imaging. *Development* **2015**, *142* (23), 4168–4179.
- (235) Ursache, R.; Andersen, T. G.; Marhavý, P.; Geldner, N. A Protocol for Combining Fluorescent Proteins with Histological Stains for Diverse Cell Wall Components. *Plant J.* **2018**, *93* (2), 399–412.
- (236) Rydahl, M. G.; Hansen, A. R.; Kračun, S. K.; Mravec, J. Report on the Current Inventory of the Toolbox for Plant Cell Wall Analysis: Proteinaceous and Small Molecular Probes. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 581.
- (237) Joseleau, J. P.; Ruel, K. Study of Lignification by Noninvasive Techniques in Growing Maize Internodes. An Investigation by Fourier Transform Infrared Cross-Polarization-Magic Angle Spinning ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Immunocytochemical Transmission Electron Microscopy. *Plant Physiol.* **1997**, *114* (3), 1123–1133.
- (238) Joseleau, J.-P.; Faix, O.; Kuroda, K.-I.; Ruel, K. A Polyclonal Antibody Directed against Syringylpropane Epitopes of Native Lignins. *C. R. Biol.* **2004**, *327* (9–10), 809–815.
- (239) Ruel, K.; Chevalier-Billosta, V.; Guillemain, F.; Berrio-Sierra, J.; Joseleau, J.-P. THE WOOD CELL WALL AT THE ULTRASTRUCTURAL SCALE - FORMATION AND TOPOCHEMICAL ORGANIZATION. *Maderas-Cienc. Tecnol.* **2006**, *8* (2), 107–116.
- (240) Fornalé, S.; Capellades, M.; Encina, A.; Wang, K.; Irar, S.; Lapierre, C.; Ruel, K.; Joseleau, J.-P.; Berenguer, J.; Puigdomènech, P.; et al. Altered Lignin Biosynthesis Improves Cellulosic Bioethanol Production in Transgenic Maize Plants Down-Regulated for Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase. *Mol. Plant.* **2012**, *5* (4), 817–830.
- (241) Kiyoto, S.; Yoshinaga, A.; Tanaka, N.; Wada, M.; Kamitakahara, H.; Takabe, K. Immunolocalization of 8-5' and 8-8' Linked Structures of Lignin in Cell Walls of *Chamaecyparis Obtusa* Using Monoclonal Antibodies. *Planta* **2013**, *237* (3), 705–715.
- (242) Chantreau, M.; Portelette, A.; Dauwe, R.; Kiyoto, S.; Crônier, D.; Morreel, K.; Arribat, S.; Neutelings, G.; Chabi, M.; Boerjan, W.; et al. Ectopic Lignification in the Flax Lignified Bast Fiber1 Mutant Stem Is Associated with Tissue-Specific Modifications in Gene Expression and Cell Wall Composition[C][W]. *Plant Cell* **2014**, *26* (11), 4462–4482.
- (243) Kiyoto, S.; Yoshinaga, A.; Takabe, K. Relative Deposition of Xylan and 8-5'-Linked Lignin Structure in *Chamaecyparis Obtusa*, as Revealed by Double Immunolabeling by Using Monoclonal Antibodies. *Planta* **2015**, *241* (1), 243–256.
- (244) Donaldson, L.; Radotić, K.; Kalauzi, A.; Djikanović, D.; Jeremić, M. Quantification of Compression Wood Severity in Tracheids of *Pinus Radiata* D. Don Using Confocal Fluorescence Imaging and Spectral Deconvolution. *J. Struct. Biol.* **2010**, *169* (1), 106–115.
- (245) Donaldson, L. Softwood and Hardwood Lignin Fluorescence Spectra of Wood Cell Walls in Different Mounting Media. *IAWA J.* **2013**, *34* (1), 3–19.
- (246) De Micco, V.; Aronne, G. Combined Histochemistry and Autofluorescence for Identifying Lignin Distribution in Cell Walls. *Biotech. Histochem.* **2007**, *82* (4–5), 209–216.
- (247) Donaldson, L. A.; Singh, A. P.; Yoshinaga, A.; Takabe, K. Lignin Distribution in Mild Compression Wood of *Pinus Radiata*. *Can. J. Bot.* **1999**, *77* (1), 41–50.
- (248) Billa, E.; Pastou, A.; Monties, B.; Romero, J.; Koukios, E. G. Multivariate Chemometric Analysis of the Fluorescence Spectra of Eucalyptus Wood. *Ind. Crops Prod.* **2000**, *11* (2), 187–196.
- (249) Donaldson, L. A.; Radotić, K. Fluorescence Lifetime Imaging of Lignin Autofluorescence in Normal and Compression Wood. *J. Microsc.* **2013**, *251* (2), 178–187.

- (250) Coletta, V. C.; Rezende, C. A.; da Conceição, F. R.; Polikarpov, I.; Guimarães, F. E. G. Mapping the Lignin Distribution in Pretreated Sugarcane Bagasse by Confocal and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6* (43).
- (251) Auxenfans, T.; Terryn, C.; Paës, G. Seeing Biomass Recalcitrance through Fluorescence. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (8838).
- (252) Gierlinger, N. New Insights into Plant Cell Walls by Vibrational Microspectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2017**, *53* (7), 517–551.
- (253) Zimmermann, B.; Bağcıoğlu, M.; Sandt, C.; Kohler, A. Vibrational Microspectroscopy Enables Chemical Characterization of Single Pollen Grains as Well as Comparative Analysis of Plant Species Based on Pollen Ultrastructure. *Planta* **2015**, *242* (5), 1237–1250.
- (254) Guo, X.; Wu, Y.; Yan, N. Characterizing Spatial Distribution of the Adsorbed Water in Wood Cell Wall of Ginkgo Biloba L. by μ -FTIR and Confocal Raman Spectroscopy. *Holzforschung* **2017**, *71* (5), 415–423.
- (255) Labbé, N.; Rials, T. G.; Kelley, S. S.; Cheng, Z.-M.; Kim, J.-Y.; Li, Y. FT-IR Imaging and Pyrolysis-Molecular Beam Mass Spectrometry: New Tools to Investigate Wood Tissues. *Wood Sci. Technol.* **2005**, *39* (1), 61–76.
- (256) Naumann, A.; Polle, A. FTIR Imaging as a New Tool for Cell Wall Analysis of Wood. *N. Z. J. For.* **2006**, *36*, 54–59.
- (257) Dokken, K. M.; Davis, L. C. Infrared Imaging of Sunflower and Maize Root Anatomy. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (26), 10517–10530.
- (258) Lacayo, C. I.; Malkin, A. J.; Holman, H.-Y. N.; Chen, L.; Ding, S.-Y.; Hwang, M. S.; Thelen, M. P. Imaging Cell Wall Architecture in Single Zinnia Elegans Tracheary Elements. *Plant Physiol.* **2010**, *154* (1), 121–133.
- (259) Pereira, L.; Flores-Borges, D. N. A.; Bittencourt, P. R. L.; Mayer, J. L. S.; Kiyota, E.; Araújo, P.; Jansen, S.; Freitas, R. O.; Oliveira, R. S.; Mazzafera, P. Infrared Nanospectroscopy Reveals the Chemical Nature of Pit Membranes in Water-Conducting Cells of the Plant Xylem. *Plant Physiol.* **2018**, *177* (4), 1629–1638.
- (260) Agarwal, U. P. Raman Imaging to Investigate Ultrastructure and Composition of Plant Cell Walls: Distribution of Lignin and Cellulose in Black Spruce Wood (*Picea Mariana*). *Planta* **2006**, *224* (5), 1141–1153.
- (261) Gierlinger, N.; Schwanninger, M. Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. *Plant Physiol.* **2006**, *140* (4), 1246–1254.
- (262) Hänninen, T.; Kontturi, E.; Vuorinen, T. Distribution of Lignin and Its Coniferyl Alcohol and Coniferyl Aldehyde Groups in *Picea Abies* and *Pinus Sylvestris* as Observed by Raman Imaging. *Phytochemistry* **2011**, *72* (14), 1889–1895.
- (263) Sun, L.; Simmons, B. A.; Singh, S. Understanding Tissue Specific Compositions of Bioenergy Feedstocks through Hyperspectral Raman Imaging. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (2), 286–295.
- (264) Man, Y.; Zhao, Y.; Ye, R.; Lin, J.; Jing, Y. In Vivo Cytological and Chemical Analysis of Casparian Strips Using Stimulated Raman Scattering Microscopy. *J. Plant Physiol.* **2018**, *220*, 136–144.
- (265) Perera, P. N.; Schmidt, M.; Schuck, P. J.; Adams, P. D. Blind Image Analysis for the Compositional and Structural Characterization of Plant Cell Walls. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702* (2), 172–177.
- (266) Liu, B.; Wang, P.; Kim, J. I.; Zhang, D.; Xia, Y.; Chapple, C.; Cheng, J.-X. Vibrational Fingerprint Mapping Reveals Spatial Distribution of Functional Groups of Lignin in Plant Cell Wall. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (18), 9436–9442.

- (267) Prats-Mateu, B.; Bock, P.; Schroffenegger, M.; Toca-Herrera, J. L.; Gierlinger, N. Following Laser Induced Changes of Plant Phenylpropanoids by Raman Microscopy. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (11804).
- (268) Donaldson, L. A.; Newman, R. H.; Vaidya, A. Nanoscale Interactions of Polyethylene Glycol with Thermo-Mechanically Pre-Treated *Pinus Radiata* Biofuel Substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (4), 719–725.
- (269) Chabbert, B.; Terryn, C.; Herbaut, M.; Vaidya, A.; Habrant, A.; Paës, G.; Donaldson, L. Fluorescence Techniques Can Reveal Cell Wall Organization and Predict Saccharification in Pretreated Wood Biomass. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *123*, 84–92.
- (270) Herbaut, M.; Zoghlami, A.; Paës, G. Dynamical Assessment of Fluorescent Probes Mobility in Poplar Cell Walls Reveals Nanopores Govern Saccharification. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11* (271).
- (271) Liesche, J.; Ziomkiewicz, I.; Schulz, A. Super-Resolution Imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS Enables Direct Visualization of Cellulose Orientation and Cell Connection Architecture in Onion Epidermis Cells. *BMC Plant Biol.* **2013**, *13* (226).
- (272) Paës, G.; Habrant, A.; Terryn, C. Fluorescent Nano-Probes to Image Plant Cell Walls by Super-Resolution STED Microscopy. *Plants* **2018**, *7* (1), 11.
- (273) Zhou, C.; Li, Q.; Chiang, V. L.; Lucia, L. A.; Griffis, D. P. Chemical and Spatial Differentiation of Syringyl and Guaiacyl Lignins in Poplar Wood via Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (18), 7020–7026.
- (274) Saito, K.; Watanabe, Y.; Shirakawa, M.; Matsushita, Y.; Imai, T.; Koike, T.; Sano, Y.; Funada, R.; Fukazawa, K.; Fukushima, K. Direct Mapping of Morphological Distribution of Syringyl and Guaiacyl Lignin in the Xylem of Maple by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Plant J.* **2012**, *69* (3), 542–552.
- (275) Araújo, P.; Ferreira, M. S.; de Oliveira, D. N.; Pereira, L.; Sawaya, A. C. H. F.; Catharino, R. R.; Mazzafera, P. Mass Spectrometry Imaging: An Expedient and Powerful Technique for Fast in Situ Lignin Assessment in Eucalyptus. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (7), 3415–3419.
- (276) Dalisay, D. S.; Kim, K. W.; Lee, C.; Yang, H.; Rübél, O.; Bowen, B. P.; Davin, L. B.; Lewis, N. G. Dirigent Protein-Mediated Lignan and Cyanogenic Glucoside Formation in Flax Seed: Integrated Omics and MALDI Mass Spectrometry Imaging. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1231–1242.
- (277) Fukushima, K.; Terashima, N. Heterogeneity in Formation of Lignin. XIII. Formation of p-Hydroxyphenyl Lignin in Various Hardwoods Visualized by Microautoradiography. *J. Wood Chem. Technol.* **1990**, *10* (4), 413–433.
- (278) Fukushima, K.; Terashima, N. Heterogeneity in Formation of Lignin. *Wood Sci. Technol.* **1991**, *25* (5), 371–381.
- (279) Tobimatsu, Y.; Davidson, C. L.; Grabber, J. H.; Ralph, J. Fluorescence-Tagged Monolignols: Synthesis, and Application to Studying In Vitro Lignification. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (5), 1752–1761.
- (280) Tobimatsu, Y.; Wagner, A.; Donaldson, L.; Mitra, P.; Niculaes, C.; Dima, O.; Kim, J. I.; Anderson, N.; Loque, D.; Boerjan, W.; et al. Visualization of Plant Cell Wall Lignification Using Fluorescence-Tagged Monolignols. *Plant J.* **2013**, *76* (3), 357–366.
- (281) Tobimatsu, Y.; Van de Wouwer, D.; Allen, E.; Kumpf, R.; Vanholme, B.; Boerjan, W.; Ralph, J. A Click Chemistry Strategy for Visualization of Plant Cell Wall Lignification. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (82), 12262–12265.
- (282) Bukowski, N.; Pandey, J. L.; Doyle, L.; Richard, T. L.; Anderson, C. T.; Zhu, Y. Development of a Clickable Designer Monolignol for Interrogation of Lignification in Plant Cell Walls. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (12), 2189–2196.

- (283) Pandey, J. L.; Wang, B.; Diehl, B. G.; Richard, T. L.; Chen, G.; Anderson, C. T. A Versatile Click-Compatible Monolignol Probe to Study Lignin Deposition in Plant Cell Walls. *PLoS ONE* **2015**, *10* (4), e0121334.
- (284) Pandey, J. L.; Kiemle, S. N.; Richard, T. L.; Zhu, Y.; Cosgrove, D. J.; Anderson, C. T. Investigating Biochemical and Developmental Dependencies of Lignification with a Click-Compatible Monolignol Analog in Arabidopsis Thaliana Stems. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1309.
- (285) del Río, J. C.; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Nieto, L.; Jiménez-Barbero, J.; Martínez, Á. T. Structural Characterization of Guaiacyl-Rich Lignins in Flax (*Linum Usitatissimum*) Fibers and Shives. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (20), 11088–11099.
- (286) Burmaoğlu, S.; Çelik, H.; Göksu, S.; Maraş, A.; Altundaş, R.; Seçen, H. Synthesis of Two Alnustone-Like Natural Diarylheptanoids via 4 + 3 Strategy. *Synt. Commun.* **2009**, *39* (9), 1549–1562.
- (287) Tannert, R.; Milroy, L.-G.; Ellinger, B.; Hu, T.-S.; Arndt, H.-D.; Waldmann, H. Synthesis and Structure-Activity Correlation of Natural-Product Inspired Cyclodepsipeptides Stabilizing F-Actin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (9), 3063–3077.
- (288) Ischay, M. A.; Lu, Z.; Yoon, T. P. [2+2] Cycloadditions by Oxidative Visible Light Photocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (25), 8572–8574.
- (289) Daquino, C.; Rescifina, A.; Spatafora, C.; Tringali, C. Biomimetic Synthesis of Natural and “Unnatural” Lignans by Oxidative Coupling of Caffeic Esters. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (36), 6289–6300.
- (290) Yang, Y.; Velmurugan, B.; Liu, X.; Xing, B. NIR Photoresponsive Crosslinked Upconverting Nanocarriers toward Selective Intracellular Drug Release. *Small* **2013**, *9* (17), 2937–2944.
- (291) Harkin, J. M.; Obst, J. R. Lignification in Trees: Indication of Exclusive Peroxidase Participation. *Science* **1973**, *180* (4083), 296–298.
- (292) Feng, L.; Hong, S.; Rong, J.; You, Q.; Dai, P.; Huang, R.; Tan, Y.; Hong, W.; Xie, C.; Zhao, J.; et al. Bifunctional Unnatural Sialic Acids for Dual Metabolic Labeling of Cell-Surface Sialylated Glycans. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (25), 9244–9247.
- (293) Jao, C. Y.; Roth, M.; Welti, R.; Salic, A. Biosynthetic Labeling and Two-Color Imaging of Phospholipids in Cells. *Chembiochem* **2015**, *16* (3), 472–476.
- (294) Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Bioorthogonal Reaction Pairs Enable Simultaneous, Selective, Multi-Target Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (4), 920–922.
- (295) Nikić, I.; Plass, T.; Schraidt, O.; Szymański, J.; Briggs, J. A. G.; Schultz, C.; Lemke, E. A. Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (8), 2245–2249.
- (296) Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A. Chemical Synthesis of Dual Labeled Proteins via Differently Protected Alkynes Enables Intramolecular FRET Analysis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (43), 5918–5921.
- (297) Kishimoto, T.; Chiba, W.; Saito, K.; Fukushima, K.; Uraki, Y.; Ubukata, M. Influence of Syringyl to Guaiacyl Ratio on the Structure of Natural and Synthetic Lignins. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (2), 895–901.
- (298) Donaldson, L. A. Lignification and Lignin Topochemistry — an Ultrastructural View. *Phytochemistry* **2001**, *57* (6), 859–873.
- (299) Fergus, B. J.; Procter, A. R.; Scott, J. A. N.; Goring, D. A. I. The Distribution of Lignin in Sprucewood as Determined by Ultraviolet Microscopy. *Wood Sci. Technol.* **1969**, *3* (2), 117–138.
- (300) Simon, C.; Spriet, C.; Hawkins, S.; Lion, C. Visualizing Lignification Dynamics in Plants with Click Chemistry: Dual Labeling Is BLISS! *JoVE* **2018**, No. 131, e56947–e56947.

- (301) Simon, C.; Lion, C.; Huss, B.; Blervacq, A.-S.; Spriet, C.; Guérardel, Y.; Biot, C.; Hawkins, S. BLISS: Shining a Light on Lignification in Plants. *Plant Signal. Behav.* **2017**, *12* (8), e1359366.
- (302) Doblas, V. G.; Geldner, N.; Barberon, M. The Endodermis, a Tightly Controlled Barrier for Nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2017**, *39*, 136–143.
- (303) Terashima, N.; Ko, C.; Matsushita, Y.; Westermark, U. Monolignol Glucosides as Intermediate Compounds in Lignin Biosynthesis. Revisiting the Cell Wall Lignification and New ¹³C-Tracer Experiments with Ginkgo Biloba and Magnolia Liliiflora. *Holzforschung* **2016**, *70* (9), 801–810.
- (304) Willems, L. I.; Li, N.; Florea, B. I.; Ruben, M.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. Triple Bioorthogonal Ligation Strategy for Simultaneous Labeling of Multiple Enzymatic Activities. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (18), 4431–4434.
- (305) Hudak, J. E.; Alvarez, D.; Skelly, A.; von Andrian, U. H.; Kasper, D. L. Illuminating Vital Surface Molecules of Symbionts in Health and Disease. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17099.
- (306) Alamudi, S. H.; Su, D.; Lee, K. J.; Lee, J. Y.; Belmonte-Vázquez, J. L.; Park, H.-S.; Peña-Cabrera, E.; Chang, Y.-T. A Palette of Background-Free Tame Fluorescent Probes for Intracellular Multi-Color Labelling in Live Cells. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (8), 2376–2383.
- (307) Schart, V. F.; Hassenrück, J.; Späte, A.-K.; Dold, J. E. G. A.; Fahrner, R.; Wittmann, V. Triple Orthogonal Labeling of Glycans by Applying Photoclick Chemistry. *ChemBioChem* **2019**, *20* (2), 166–171.
- (308) Chio, T. I.; Gu, H.; Mukherjee, K.; Tumey, L. N.; Bane, S. L. Site-Specific Bioconjugation and Multi-Bioorthogonal Labeling via Rapid Formation of a Boron–Nitrogen Heterocycle. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (5), 1554–1564.
- (309) Fernández-Pérez, F.; Vivar, T.; Pomar, F.; Pedreño, M. A.; Novo-Uzal, E. Peroxidase 4 Is Involved in Syringyl Lignin Formation in Arabidopsis Thaliana. *J. Plant Physiol.* **2015**, *175*, 86–94.
- (310) Wi, S. G.; Singh, A. P.; Lee, K. H.; Kim, Y. S. The Pattern of Distribution of Pectin, Peroxidase and Lignin in the Middle Lamella of Secondary Xylem Fibres in Alfalfa (*Medicago Sativa*). *Ann. Bot.* **2005**, *95* (5), 863–868.
- (311) Nishimura, H.; Kamiya, A.; Nagata, T.; Katahira, M.; Watanabe, T. Direct Evidence for α Ether Linkage between Lignin and Carbohydrates in Wood Cell Walls. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 6538.
- (312) Smith, R. A.; Schuetz, M.; Roach, M.; Mansfield, S. D.; Ellis, B.; Samuels, L. Neighboring Parenchyma Cells Contribute to Arabidopsis Xylem Lignification, While Lignification of Interfascicular Fibers Is Cell Autonomous. *Plant Cell* **2013**, *25* (10), 3988–3999.
- (313) Meents, M. J.; Watanabe, Y.; Samuels, A. L. The Cell Biology of Secondary Cell Wall Biosynthesis. *Ann. Bot.* **2018**, *121* (6), 1107–1125.
- (314) Simon, C.; Lion, C.; Spriet, C.; Baldacci-Cresp, F.; Hawkins, S.; Biot, C. One, Two, Three: A Bioorthogonal Triple Labelling Strategy for Studying the Dynamics of Plant Cell Wall Formation In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (51), 16665–16671.
- (315) Huff, J. The Airyscan Detector from ZEISS: Confocal Imaging with Improved Signal-to-Noise Ratio and Super-Resolution. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 1205.
- (316) Junk, M. J. N. Electron Paramagnetic Resonance Theory. In *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*; J.N.Junk, M., Ed.; Springer Theses; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; pp 7–52.
- (317) Dhas, M. K.; Jawahar, A.; Benial, A. M. F. Electron Spin Resonance Spectroscopy Studies on Reduction Process of Nitroxyl Radicals Used in Molecular Imaging. *Eur. J. Biophys.* **2014**, *2* (1), 1–6.

- (318) Steffen-Heins, A.; Steffens, B. EPR Spectroscopy and Its Use in Planta—a Promising Technique to Disentangle the Origin of Specific ROS. *Front. Environ. Sci.* **2015**, *3*, 1–5.
- (319) Xu, M.; Khachatryan, L.; Baev, A.; Asatryan, R. Radicals from the Gas-Phase Pyrolysis of a Lignin Model Compound: P-Coumaryl Alcohol. *RSC Adv.* **2016**, *6* (67), 62399–62405.
- (320) Munk, L.; Andersen, M. L.; Meyer, A. S. Direct Rate Assessment of Laccase Catalysed Radical Formation in Lignin by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Enzyme Microb. Technol.* **2017**, *106*, 88–96.
- (321) Nakagawa, K.; Epel, B. Location of Radical Species in a Black Pepper Seed Investigated by CW EPR and 9 GHz EPR-Imaging. *Spectrosc. Acta A* **2014**, *131*, 342–346.
- (322) Nakagawa, K.; Hara, H. Investigation of Radical Locations in Various Sesame Seeds by CW EPR and 9-GHz EPR Imaging. *Free Radic. Res.* **2015**, *49* (1), 1–6.
- (323) Ramadoss, N. S.; Schulman, A. D.; Choi, S.; Rodgers, D. T.; Kazane, S. A.; Kim, C. H.; Lawson, B. R.; Young, T. S. An Anti-B Cell Maturation Antigen Bispecific Antibody for Multiple Myeloma. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (16), 5288–5291.
- (324) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55.
- (325) Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15* (3), 473–497.
- (326) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 676–682.