

Laboratoire Stress Abiotiques et
Différenciation des végétaux cultivés
UMR USTL-INRA 1281 UFR de Biologie,
USTL, 59650 VILLENEUVE D'ASCQ Cedex



Institut National de la Recherche Agronomique

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

PRESENTE

A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

PAR

Mohamed ADDI

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Ecole Doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Spécialité : Stratégies d'Exploitation des Fonctions Biologiques

**Caractérisation fonctionnelle d'une Beta-Xylosidase de lin
(*Linum usitatissimum* L.) : Rôle(s) potentiel(s) dans le
métabolisme pariétal**

N° d'ordre : 4326

Présentée publiquement le 18 Décembre 2008, devant le jury composé de :

Mr P. LEROUGE	Professeur, Université de Rouen	Rapporteur
Mme B CHABBERT	Chargée de recherche, INRA Reims	Rapporteur
Mr J.L HILBERT	Professeur, Université de Lille I	Examineur
Mme F. GILLET	Professeur, Université d'Amiens	Examineur
Mr S. HAWKINS	Professeur, Université de Lille I	Directeur de thèse
Mr G. NEUTELINGS	Docteur, Université de Lille I	Codirecteur de thèse

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	6
ABREVIATIONS	7
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
A - Biologie du lin (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	8
A.1 - Description générale, culture et utilisation agricole.....	8
A.2 - Développement et croissance du lin.....	10
A.3 - La dynamique de la croissance du lin	12
A.4 - Systématique et centre d'origine de l'espèce.....	12
A.5 - Centre d'intérêt des variétés de lin.....	13
A.6 - Procédés industriels (production de fibres).....	15
B – Composition de la paroi végétale.....	19
B.1 – Les polysaccharides	20
B.1.1 – La cellulose.....	20
B.1.2 – Les hémicelluloses.....	23
B.1.2.1 - Les xyloglucanes	23
B.1.2.2 - Les xylanes	24
B.1.2.2.1 - Les $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucanes	25
B.1.2.2.2 - Les mannanes	26
B.1.3 – Les pectines	27
B.1.4 – La callose	28
B.2 – Les composés phénoliques	29
B.3 – Les protéines et les enzymes pariétales	31
B.3.1 - Les protéines structurales	31
B.3.1.1 - Les extensines	31
B.3.1.2 - Les arabinogalactane protéines (AGPs)	32
B.3.1.3 - Les protéines riches en glycines (GRPs).....	33
B.3.1.4 - Les lectines et les protéines riches en prolines (PRPs)	34
B.4 – Architecture pariétale des fibres de lin	35
C- Les enzymes impliquées dans la dégradation et la modification des polysaccharides pariétaux	36
C.1 - Les endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8)	42
C.2 - La β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37)	42
C.3 - Les α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55).....	43
C.4 - Xyloglucan-endo-transglycosylases	44
OBJECTIFS DE LA THESE	47
MATERIEL ET METHODES.....	48
A -Matériel	48
A.1 - Matériel végétal.....	48
A.1.1 - Lins cultivés en champs	48
A.1.2 - Lins transgéniques.....	48
A.2 - Souches Bactériennes.....	49
A.2.1 - Souches d' <i>Escherichia coli</i>	49
A.2.2 - Souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
A.3 - Plasmides	50
A.3.1 - Vecteurs utilisés pour le sous clonage et le séquençage	50
A.3.2 - Vecteurs binaires.....	51
B - Méthodes	54

B.1 - Obtention de jeunes plantes axéniques de lin.....	54
B.2 - Culture et conservation des souches bactériennes	55
B.3 - Protocole de transformation du lin par <i>A. tumefaciens</i>	55
B.4 - Multiplication des clones de vitroplants.....	57
B.5 - Transfert des vitroplants en serre	57
B.6 - Techniques de biologie moléculaire.....	58
B.6.1 - Extraction et purification des acides nucléiques	58
B.6.1.1 - ADN génomique	58
B.6.1.2 - ADN plasmidique.....	58
B.6.1.3 - ARNs totaux	58
B.6.2 - Dosage des acides nucléiques	59
B.6.3 - Digestion de l'ADN plasmidique.....	59
B.6.4 - Purification de fragments digérés.....	59
B.6.5 - Clonage de fragments d'ADN.....	60
B.6.6 - Electrophorèse d'ADN	61
B.6.7 - Amplification d'ADN par PCR.....	61
B.6.8 - RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)	64
B.6.8.1 - Synthèse d'ADNc.....	64
B.6.8.2 - PCR	64
B.6.9 - Construction et exploitation d'une banque d'ADNc.....	64
B.6.9.1 - Construction de la banque	64
B.6.9.2 - Titration de la banque.....	65
B.6.9.3 - Obtention de plages de lyse.....	65
B.6.9.4 - Séquençage de fragments d'ADN et analyse des séquences.....	65
B.7 - Préparation de la paroi végétale	66
B.8 - Extraction séquentielle des pectines et hémicellulose.....	66
B.9 - Dialyse des fractions Oxalate et NaOH :	66
B.10 - Empreinte enzymatique des hémicelluloses.....	67
B.10.1 - Digestion des xyloglucanes et des xylanes pariétaux.....	67
B.10.2 - Analyse MALDI-TOF des xyloglucanes et xylanes	67
B.10.3 - Analyse HPAEC-PAD des fragments de xyloglucane et de xylane	68
B.11 - Activités β -xylosidase.....	68
B.12 - Techniques de cytologie	70
B.12.1 - Préparation des coupes	70
B.12.2 - Coloration au bleu de toluidine	70
B.12.3 - Réaction de Weisner.....	71
RESULTATS ET DISCUSSION.....	71
Chapitre I : Analyse d'expression et classification fonctionnelle d'ESTs issus des tissus externes de tiges de lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	72
Chapitre II : Transformation du lin par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : vers une optimisation du protocole pour un cultivar à fibres	85
Etude préliminaire du matériel biologique.....	86
A - Etude des capacités de régénération de différents cultivars de lin	86
B - Choix de l'agent de sélection et de sa concentration.....	89
C - Réalisation de la construction β -xylosidase IR-PTGS.....	91
D - Transformation avec construction IR-PTGS	94
E - Elongation et enracinement des lignées transformées	95
F - Rendement de transformation	97

G – Confirmation moléculaire de la présence des transgènes	100
Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle d'une β -xylosidase de lin	102
A. Analyse de la séquence d'une β -xylosidase (LuBXL1) de lin	103
B – Expression de LuBXL1 et activité enzymatique	106
B.1 – Profil de l'expression du gène β -D-xylosidase au cours du développement.....	106
B.2 – Cinétique de l'activité de la β -xylosidase au cours du développement.....	108
C – Sous-expression du gène LuBXL1 (IR-PTGS) chez le lin	111
C.1 – Sélection de lignées sous-exprimant la β -xylosidase	111
C.2 – Vérification de la sous-expression du gène <i>LuBXL1</i> dans la génération T1	113
D - Caractérisation des plantes sous-exprimant le gène LuBXL1.....	114
D.1 – Mesures des activités β -xylosidases	114
D.1.1 - Dans les plantes (génération T0) transférées en serre.....	114
D.1.2 - dans les plantes de la génération T1.....	115
D.2 – Caractérisation phénotypique	116
D.3 – Caractérisation microscopique	117
E - Analyses des polymères polysaccharadiques	123
E.1 – Différence entre tissus internes et tissu externes	123
E.2 - Enzymatic Oligosaccharide Fingerprinting (empreinte enzymatique des oligosaccharides).....	125
E.2.1 - Analyses HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection).....	127
E.2.2 - Analyses MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight).....	131
E.2.3 - Analyses CPG d'extraits hémicellulosiques digérés par la xylanase et l'endoglucanase	136
F – Discussion	138
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	148
ANNEXES.....	157
Publications	164

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie du lin	9
Figure 2 : Coupe transversale de tige de lin après coloration au TBO	14
Figure 3 : Lin à fibres et sa transformation	17
Figure 4 : Schéma simplifié de la paroi cellulaire	20
Figure 5 : Organisation supramoléculaire et moléculaire de la cellulose dans les parois cellulaires	22
Figure 6 : Structure schématique des xyloglucanes (XyG)	24
Figure 7 : Structure schématique des xylanes	25
Figure 8 : Structure schématique des (1→3)(1→4)-β-glucanes	26
Figure 9 : Structure schématique des glucomannanes	26
Figure 10 : Structure schématique des galactomannanes	26
Figure 11 : Structure schématique des pectines	28
Figure 12 : Voies de biosynthèses de monolignols	30
Figure 13 : Structure schématique de l'extensine de la tomate	32
Figure 14 : Structure putative des arabinogalactanes protéines (AGPs)	33
Figure 15 : Structure schématique des protéines riches en glycines (GRP), exemple du pétunia	34
Figure 16 : Structure schématique des protéines riches en proline (PRPs), exemple du soja	34
Figure 17 : Distribution des familles des GHs chez <i>Arabidopsis thaliana</i> et chez le riz. Les protéines sont classées en se basant sur la nomenclature CAZy	37
Figure 18 : Structure du xylane et site d'attaque des xylanases, xylosidase et arabinofuransosidase ..	44
Figure 19 : Schéma du mode d'action des XTHs dans la paroi primaire, illustration de l'activité hydrolase des chaînes xyloglucanes	Erreur ! Signet non défini.
Figure 20 : Illustration de l'activité endotransglycosylase des XTHs	46
Figure 21 Schéma du vecteur pMOSBlue	50
Figure 22 : Schéma du vecteur pHANNIBAL	51
Figure 23 : Schéma du vecteur pCAMBIA1300	52
Figure 24 : Schéma du vecteur pART27	53
Figure 25 : Schéma du vecteur pBluescript employé pour la construction de la banque d'ADNc	54
Figure 26 : Transformation du lin par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
Figure 27 : Hydrolyse de la 4-Nitophenyl β-D-xylopyranoside par la β-xylosidase	69
Figure 28 : Hydrolyse de la 4-Nitophenyl α-L-arabinofuranoside par la β-xylosidase	69
Figure 29 : Effet des différents milieux de culture sur la formation de bourgeons à partir de segments d'hypocotyles chez 3 cultivars	87
Figure 30 : Aspect des hypocotyles des 3 cultivars mis en culture dans les 3 milieux de régénération ..	88
Figure 31 : Effet de la kanamycine sur le bourgeonnement des segments d'hypocotyles des trois cultivars de lin	90
Figure 32 : Effet de l'hygromycine sur le bourgeonnement des segments d'hypocotyles des trois cultivars de lin	90
Figure 33 : Schéma résumant la double insertion de <i>LuBXL1</i> dans pHannibal	92
Figure 34 : Séquence nucléotidique de l'ADNc <i>LuBXL1</i>	93
Figure 35 : Elongation des bourgeons en tube dans le milieu de RoA	95
Figure 36 : Effet de l'ANA sur l'enracinement des plantules transformées	96
Figure 37 : Schéma montrant les amplifications par PCR et la taille des produits PCR	100

Figure 38 : Confirmation de la présence des transgènes chez les lignées résistantes à l'agent de sélection.....	101
Figure 39 : Caractéristiques des séquences nucléotidiques et protéique de la β -xylosidase isolée des tissus externes de tiges de lin.	104
Figure 40 : Alignement de la séquence protéique de la β -xylosidase de lin et d'autres espèces montrant la présence de zones conservées (encadrées en rouge).....	105
Figure 41 : Arbre phylogénétique de la β -D-xylosidase de lin et d'autres espèces végétales.....	105
Figure 42 : Suivi des hauteurs des plantes de lin sauvages (cultivars Diane)	107
Figure 43 : Cinétique de l'expression (RT-PCR semi-quantitative) du gène β -xylosidase au cours du développement au niveau des feuilles (A) et des tiges (B) de lin.....	107
Figure 44 : Suivi de la cinétique de l'activité β -D-xylosidase dans les tiges (A) et les feuilles (B) de lin.....	110
Figure 45 : Evaluation par RT-PCR de l'accumulation d'ARNm <i>LuBXL1</i>	112
Figure 46 : Plantes témoins et transformées de lin mises en serre	112
Figure 47 : Evaluation par RT-PCR semi-quantitative de l'accumulation d'ARNm <i>LuBXL1</i>	113
Figure 48 : Mesure des activités β -xylosidase au niveau des tiges (A) et des feuilles (B) chez les plantes témoins et transformées.....	114
Figure 49 : Mesure des activités β -xylosidase au niveau des tiges chez les plantes témoins et transformées.	115
Figure 50 : Organisation tissulaire d'une tige de lin.	117
Figure 51 : Coupes transversales dans les tiges de lin colorées au phloroglucinol.	120
Figure 52 : Tissus externes, coupes transversales dans les tiges de lin colorées au TBO.	121
Figure 53 : Tissus internes, coupes transversales dans les tiges de lin colorées au phloroglucinol. ...	122
Figure 54 : Teneur (% molaire) en sucres monomères après hydrolyse acide des tissus externes (A) et des tissus internes (B).....	124
Figure 55 : Empreintes enzymatiques des xyloglucanes (A) et des xylanes (B) montrant les différents oligosaccharides résultants avec leur poids moléculaire.	126
Figure 56 : Chromatogrammes HPAEC-PAD des standards.	128
Figure 57 : Chromatogrammes HPAEC-PAD montrant la différence entre tissus internes et tissus externes.....	129
Figure 58 : Chromatogrammes HPAEC-PAD montrant la différence entre les tissus internes des lignées W2, X9 et X15.	130
Figure 59 : Spectres MALDI-TOF montrant la différence des profils des xyloglucanes entre les tissus externes (A) et les tissus internes (B).	132
Figure 60 : Spectres MALDI-TOF montrant la différence des profils des xyloglucanes entre les tissus externes (A) et les tissus internes (B).	133
Figure 61 : Spectres MALDI-TOF montrant la différence des profils des xyloglucanes des tissus internes entre les lignées W2, X9, et X15.....	135
Figure 62 : Analyse des extraits hémicellulosiques par CPG après digestion à la xylanase.	136
Figure 63 : Analyse des extraits hémicellulosiques par CPG après digestion à la glucanase.	137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des glycosides hydrolases chez <i>Arabidopsis thaliana</i> obtenue par analyse bioinformatique	41
Tableau 2 : Composition du mélange réactionnel de PCR.....	62
Tableau 3 : Liste des amorces employées lors des différentes réactions de PCR.	63
Tableau 4 : Liste des amorces employées lors des différentes réactions de la RT -PCR.	63
Tableau 5 : Récapitulatif des résultats obtenus à chaque étape de la transformation génétique de lin.	97

ABREVIATIONS

ABBREVIATIONS

4CL	4-hydroxycinnamate-CoA ligase
Ac	acetyl group
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
AGP	arabinogalactane protéine
AMV	myéloblastome aviaire
ARAF	α -L-arabinofuranosidase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AtBX1	β -xylosidase 1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
C3H	4-coumarate 3 hydroxylase
C4H	cytochrome P450 oxydase
CAD	alcool cinnamylique déshydrogénase
CAZy	carbohydrate-active enzymes
CCoAOMT	caféoyl CoA O-méthyltransférase
CCR	cinnamoyl-CoA réductase
COMT	acide caféique/acide 5-hydroxyfêrulique O-méthyltransférase
CPG	chromatographie en phase gazeuse
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DHB	acide 2,5-dihydrobenzoïque
EST	expressed sequence tag
F5H	fêrulate 5-hydroxylase
fer	ferulic acid
GH	glycoside hydrolase
GRP	protéine riche en glycine
HCT	hydroxycinnamoyltransférase
HG	homogalacturonane
HPEA-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
HPLC	high performance liquide chromatography
HRGP	protéine riche en hydroxyproline
IR-PTGS	inverse repeat post transcriptional gene silencing
Lac	laccase
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization- time of flight
PAL	phénylalanine ammonialyase
pcou	<i>p</i> -coumaric acid
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
Per	peroxydase
pfu	unité de formation de plages
PRP	protéine riche en proline
RG	rhamnogalacturonanes
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SAD	alcool sinapylique déshydrogénase
tampon TE	tris EDTA
TBO	toluidine-blue-O
Ti	tumor inducing
XEH	xyloglucan endohydrolase
XET	xyloglucan endotransglycosylase
XTH	xyloglucan-endotransglycosylase/hydrolase
α -4-O-Me-GlcUA	α -4-O-methylglucuronic acid

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A - Biologie du lin (*Linum usitatissimum* L.)

A.1 - Description générale, culture et utilisation agricole

Le nom du lin (*Linum usitatissimum* L.) est dérivé d'un mot celtique signifiant enfilature et le mot usitatissimum est un mot latin signifiant « le plus utilisé » (Kolodziejczyk & Fedec, 1995). C'est une espèce annuelle hermaphrodite qui produit des graines dans des capsules. Le lin est une plante à port herbacé dont le système racinaire est peu développé, ce qui justifie les besoins importants de la plante en eau. Autogame à plus de 99%, cette plante est fortement homozygote. L'espèce comprend des variétés oléagineuses cultivées pour leurs graines riches en huile. Ces variétés sont relativement courtes à ramifications secondaires nombreuses. Les variétés dites à fibres, ou lin textile, dont la tige produit des fibres, sont plus élevées et moins ramifiées (Gill, 1987). Le lin se présente sous forme d'une tige unique se terminant par une cyme multipare (Figure 1). Le système racinaire se présente sous l'aspect d'une courte racine pivotante émettant des radicelles fibreuses pouvant atteindre 90 à 120 cm en sol léger. La plante atteint une hauteur comprise entre 0,8 et 1,2 mètre pour un diamètre à la base de l'ordre de 1 à 2 millimètres. A densité de peuplement plus faible, la plante grandit davantage, et le diamètre à la base peut dépasser 3 millimètres.

Les feuilles sont allongées, sessiles et ont trois nervures. Elles sont insérées sur la tige selon une disposition spiralée formée par trois hélices à partir de la troisième feuille, les deux premières ayant une disposition opposée alterne par rapport aux cotylédons (Meicenheimer, 1992). La fleur, hermaphrodite et hypogyne, a un pédoncule dressé et allongé. Elle est de type 5 : 5 sépales, 5 pétales (bleus), 5 étamines et un pistil formé de 5 carpelles séparés par autant de fausses cloisons. Après fécondation, elle donne une capsule à 5 loges contenant deux graines chacune, et à maturité les capsules sont plus ou moins déhiscentes. La graine est de forme ovale, lisse, aplatie longue de 4 à 6 mm et de couleur généralement brun-rouge. La graine peut contenir de 35 à 45 % d'huile et de 20 à 25 % de protéines (Gill, 1987; Fernald, 1950).

La culture du lin nécessite un climat tempéré et humide, ce qui explique qu'en France, elle est cultivée en Normandie (61 %), dans le Nord Pas-de-Calais (20 %) et en Picardie (12 %). La France est le 1^{er} pays producteur du monde de lin à fibres pour sa qualité, et le 3^{ème} pour la production en surfaces ensemencées, derrière la Russie et la Chine.



Figure 1 : Morphologie du lin

Le lin doit être mis dans des conditions de sol qui permettent, par une bonne structure, le développement et la pénétration des racines. La plante trouvera ainsi l'alimentation en eau et en éléments nutritifs. Pour éviter la fatigue des terres et la propagation des maladies dues aux champignons du sol (la flétrissure fusarienne), le lin doit être cultivé dans un intervalle de 6 à 7 ans (Source ITL, 1988). La meilleure place du lin serait après une culture de céréale (maïs) et, plus particulièrement, une céréale précédée d'une graminée fourragère (Sultana, 1992).

Le lin aime les terres à tendance légèrement acide, riches, limoneuses et profondes (Sultana, 1992).

A.2 - Développement et croissance du lin

Durant le cycle végétatif, le lin subit deux processus d'évolutions simultanées : développement et croissance.

Le développement concerne la formation d'organes nouveaux tels que les racines, feuilles, fleurs, etc. L'initiation de ces organes n'est très souvent même pas visible. L'apex au sommet de la tige développe l'appareil végétatif jusqu'à une taille de 10 à 15 cm selon la précocité des variétés. Il se transforme ensuite en système reproducteur. Avant cette évolution, le nombre de feuilles est totalement défini, ainsi que l'espérance de production fibreuse. Toutes les conditions de culture pendant cette période auront une incidence sur le potentiel de la plante.

La croissance est l'expression plus au moins complète des organes initiés au cours du développement. Elle intervient tout au long du développement et au-delà. Les conditions climatiques jouent un rôle important : ainsi la croissance en début de végétation donne des intervalles foliaires plus courts, notamment à cause des températures plus basses à cette période de l'année.

A.3 - La dynamique de la croissance du lin

Les stades marquants la végétation ne sont pas aussi nets que ceux d'autres espèces telles que les céréales ou le colza. Chez le lin, la croissance est plus rapide ; de la levée à la maturité, il s'écoule un peu plus d'une centaine de jours au cours desquels la tige atteint sa hauteur maximale. Les étapes les plus évidentes sont au nombre de 5 (Morvan et al., 1989, Abdul Hafez, 1991) :

- De la levée au stade 15 cm : elle a de l'importance en tant que "point de départ" de la végétation, c'est le stade où commence la croissance et il se termine par le virage floral (Jacquemart et al., 1961).
- Du stade 15 cm à la floraison : pendant cette étape, le lin passera d'une hauteur de 15 cm à 70-80 cm, stade de préfloraison et de l'épanouissement des fleurs. C'est une phase marquée par une grande sensibilité à la verse.
- Du stade floraison à la fructification : cette étape débute par l'épanouissement des fleurs et se termine par la formation des capsules vertes
- Du stade capsules vertes au stade capsules jaunes-brunes : cette étape coïncide avec la maturation des fibres périphloémiennes.
- Du stade capsules jaunes-brunes au stade capsules brunes : cette phase se termine par le brunissement des capsules et la maturation des graines.

A.4 - Systématique et centre d'origine de l'espèce

Dans la classification végétale le lin cultivé se situe de la façon suivante :

- Classe : Dicotylédones
- Famille : Linacées
- Genre : *Linum*
- Section : *Eulinum*
- Groupe : *Protolinum*
- Espèce : *usitatissimum*

Le genre *Linum* comprend plus de deux cents espèces classées en cinq sections, à savoir : *Cathartolinum*, *Eulinum*, *Clicocca*, *Linastrum* et *Syllinum*. Le lin cultivé est rangé dans la section *Eulinum*. Celle-ci est subdivisée en deux groupes :

Protolinum et *Adenolinum* d'après la forme des stigmates. *L. usitatissimum* appartient au premier groupe qui se particularise par des stigmates allongés. Le groupe *Protolinum* comprend deux espèces : *Linum usitatissimum* et *Linum angustifolium*. Toutes les deux possèdent 15 paires de petits chromosomes ($2n = 30$). L'ancêtre le plus probable du *L. usitatissimum* est *L. angustifolium* (Plonka et al., 1956)

A.5 - Centre d'intérêt des variétés de lin

On cultive deux types de *L. usitatissimum* ; le lin oléagineux, dont la graine produit de l'huile, est une plante relativement courte à ramifications secondaires nombreuses, tandis que le lin textile, dont la tige produit des fibres, est plus élevé et moins ramifié (Gill, 1987)

Les graines des variétés oléagineuses sont exploitées à des fins industrielles pour ses huiles qui entrent dans la composition de peintures, vernis et revêtements de sol. En plus de ses intérêts industriels, le lin est utilisé comme alicament, notamment en raison de la richesse de son huile en acides gras insaturés et de la présence des lignanes. La graine est également utilisée pour son mucilage en pharmacie, comme laxatif doux.

Des études ont montré qu'une consommation de graines de lin protège des cancers hormono-dépendants (étude *in vitro* et *in vivo*) (Jacobs & Metzler, 1999). En effet, des lignanes ont été mis en évidence en quantités non négligeables dans le genre *Linum* (Mazur, 1998). Les graines de lin contiennent 75 à 800 fois plus de lignanes que les autres graines oléagineuses (céréales, fruits et légumes) (Nesbitt et al., 1999).

Les variétés à fibres

La tige de lin renferme des fibres longues à parois celluliques. Ces fibres jouent un rôle de soutien au niveau de la tige (McDougall et al., 1993 ; Roland et al., 1995) et sont douées de propriétés exceptionnelles. L'observation microscopique d'une coupe transversale d'une tige montre plusieurs couches cellulaires (Crozier, 1950 ; Maertens et al., 1965) de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 2):

- Les tissus externes contiennent l'épiderme à paroi épaisse (5 μm), sorte de membrane protectrice formée d'une assise de cellules recouvertes sur leur face extérieure d'une pellicule cireuse « la cuticule ». Plus profondément on observe le parenchyme cortical, ou cortex, formé de cellules irrégulières plus ou moins comprimées, et parfois mortes.

Ces cellules possèdent des parois avec une épaisseur de 0,5 μm , renforce les systèmes de respiration et régule le processus d'évaporation. En dessous de cette couche se trouve le liber, c'est dans cette zone que se différencient précocement les cellules fibreuses ou fibres periphloémiennes, à partir de cellules initiales courtes situées en périphérie du protophloème (Esau, 1977). Très rapidement les cellules fibreuses, ou fibres élémentaires, forment une couronne de 20 à 30 faisceaux fibreux (chaque faisceau contenant 20 à 30 fibres élémentaires). Les fibres (plusieurs mm de longueur pour 15 à 25 μm de diamètre), sont caractérisées par une très épaisse paroi secondaire de 10 à 15 μm .

- Le tissu interne est constitué de bois (xylème), un tissu lignifié conducteur de la sève brute. Il délimite une couche de parenchyme bordant une importante cavité centrale appelée lacune centrale.

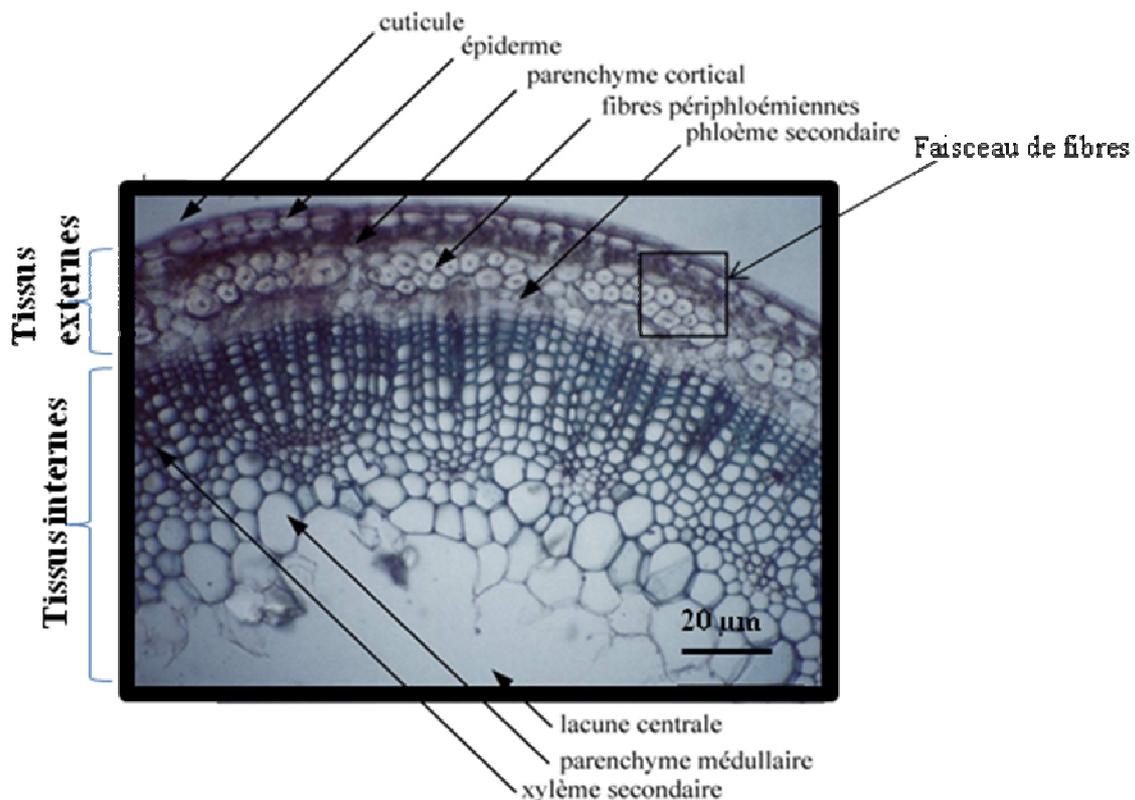


Figure 2 : Coupe transversale de tige de lin après coloration au TBO

A.6 - Procédés industriels (production de fibres)

La production du lin fibre orientée vers le textile suit une des filières les plus longues, sinon la plus longue de tous les produits agricoles. Le lin, comme les autres fibres végétales se caractérise par une excellente aptitude à la conservation, sous réserve d'une récolte dans un état de siccité convenable et d'un stockage à l'abri de l'humidité. Cela justifie un traitement tout au long de l'année, au rythme habituel de l'industrie. Plusieurs opérations sont nécessaires pour l'obtention des fibres dites techniques (Figure 3).

- L'arrachage

L'arrachage intervient au cours du mois de juillet. Il commence normalement lorsque les tiges ont perdu leurs feuilles sur le tiers de leur longueur à partir du sol. Les capsules contenant les graines ont alors une couleur jaune-brun. On arrache pour conserver toute la longueur des tiges, et on le dépose sur le sol en andains. L'andain est une nappe de lin qui occupe au sol une largeur d'environ 1 mètre.

- Le rouissage

Le but du rouissage est de décoller la fibre (faisceau de fibrilles) de l'aubier (bois de la tige) en dissolvant le ciment pectique qui les lie. Après arrachage, les tiges sont exposées au champ plusieurs semaines sur le sol de façon à ce que les micro-organismes telluriques, principalement des champignons sécrétant des cocktails enzymatiques (riche en pectinases mais aussi en cellulases) qui attaquent l'écorce. Cette étape demande par conséquent un savoir-faire particulier. Il faut en effet que l'attaque soit suffisamment avancée pour produire la séparation des faisceaux fibreux, sans que la digestion n'ait le temps d'endommager les fibres.

- Le teillage

Les tiges dénudées sont soumises à un traitement mécanique pour éliminer l'épiderme sous forme de poussière (ITL, 1998). Le teillage, sépare les faisceaux du reste de la plante, aboutissant à la production de groupes de fibres élémentaires plus ou moins grossières. Il consiste à battre, à broyer et à étirer le lin dans des turbines. Deux opérations sont nécessaires : le broyage qui est destiné à briser la tige centrale en minces fragments appelés 'anas' ; et le battage qui élimine les anas de la filasse.

- Le peignage

Grâce à cette technique, on est en mesure de démêler et de paralléliser les fibres. En outre sont éliminées les étoupes de peignage contenant les fibres courtes.

- La filature

C'est l'ensemble des opérations qui consistent à produire, en tordant des fibres textiles parallèles, un cylindre appelé 'fil'. La première opération consiste en une séparation grossière de la filasse. Vient ensuite le filage proprement dit pour obtenir le fil à tisser. On distingue : la filature au mouillé et la filature au sec, la filature des longs brins et la filature des étoupes. Les longs brins sont en général filés au mouillé pour produire des fils fins et de qualité. Les étoupes sont surtout filées au sec pour produire des fils plus gros et de qualité plus ordinaire.

La présence de composés ligneux dans les fibres de lin est rapportée comme le corollaire des difficultés de transformation de ce matériau ligno-pectocellulosique. En effet les traces de lignine peuvent à elles seules être responsables de forts phénomènes de cohésion inter-fibres voir inter-tissulaire nécessitant la mise en œuvre de fortes contraintes mécaniques pour obtenir une dissociation suffisante des fibres, ceci au détriment de l'exploitation de leurs propriétés textiles intrinsèques

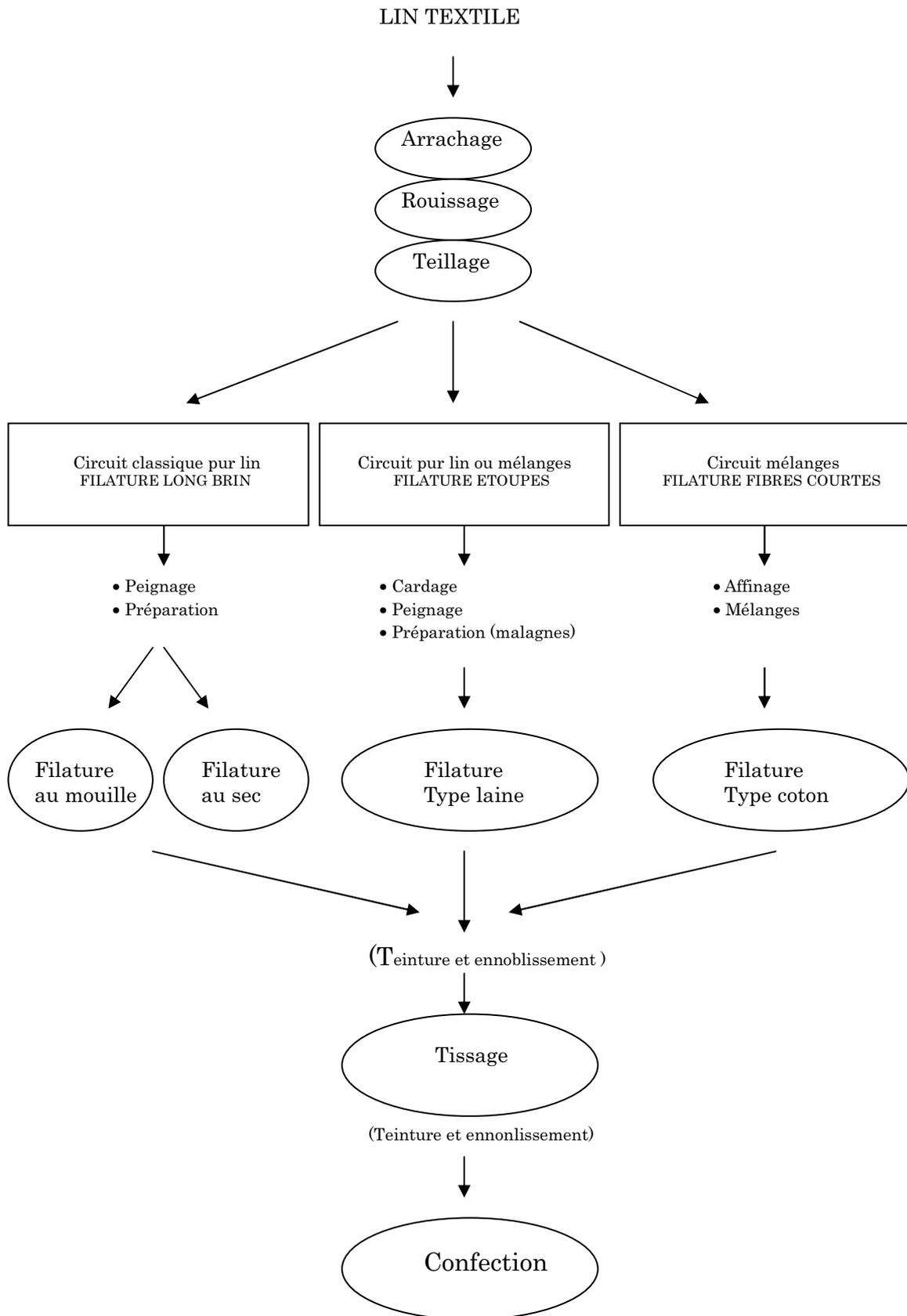


Figure 3 : Lin à fibres et sa transformation

Les fibres periphloémiennes (bast fibers) du lin possèdent un nombre de qualités (finesse, faible densité, résistance, faible allongement à la rupture...) apprécié par les industries textiles et dans le domaine des bio-polymères (Baley, 2002). Les fibres de lin sont dotées d'une étonnante réactivité à l'eau, cela leur donne un haut pouvoir d'absorption d'eau. Morvan et al., (1990) ont déterminé que les fibres de lin après peignage pouvaient absorber une quantité d'eau au moins égale à leur masse sèche. Les fibres de lin présentent aussi une résistance exceptionnelle, elles sont considérées comme les plus solides des fibres végétales. Elles présentent des performances comparables aux matériaux synthétiques et se qualifient comme étant des fibres écologiques non polluantes. Cela est dû à leur élaboration peu coûteuse en énergie et du fait qu'ils sont recyclables.

Ces propriétés physico-chimiques et mécaniques de la fibre de lin dépendent de l'architecture pariétale de ces cellules.

B – Composition de la paroi végétale

Une des caractéristiques essentielles des cellules végétales est la présence d'une paroi cellulaire. La paroi est une matrice extracellulaire entourant chaque cellule végétale est composée de 90 % de polysaccharides (pectines, cellulose et hémicelluloses) et de 10 % de glycoprotéines. Elle garantit une structure qui évite l'explosion des cellules due à la pression vacuolaire. Elle permet à la plante de s'isoler de l'extérieur et d'éviter les pertes d'eau notamment par la superposition d'une couche autour des cellules de l'épiderme. Cette paroi permet aussi à la plante un soutien contre le stress physique et une barrière efficace contre les pathogènes et les insectes.

La paroi végétale est une structure dynamique et active qui subit des modifications durant toute la vie de la cellule. Ces remaniements entraînent un changement des propriétés physiologiques de la cellule. La lamelle moyenne ou couche intercellulaire (Figure 4) : est constituée majoritairement de pectine et de glycoprotéines. Cette couche se forme par la cellule mère durant la division cellulaire. Les parois primaires se mettent en place après la formation de la lamelle moyenne, dès les premières étapes de la division mitotique. Elles sont composées d'un squelette rigide de microfibrilles de cellulose inclus dans une matrice de pectine, d'hémicellulose et de glycoprotéines. Certaines cellules élaborent une paroi secondaire une fois leur croissance terminée. Cette paroi est déposée entre la membrane plasmique et la paroi primaire. Elle est extrêmement rigide car composée de cellulose, hémicellulose et lignine.

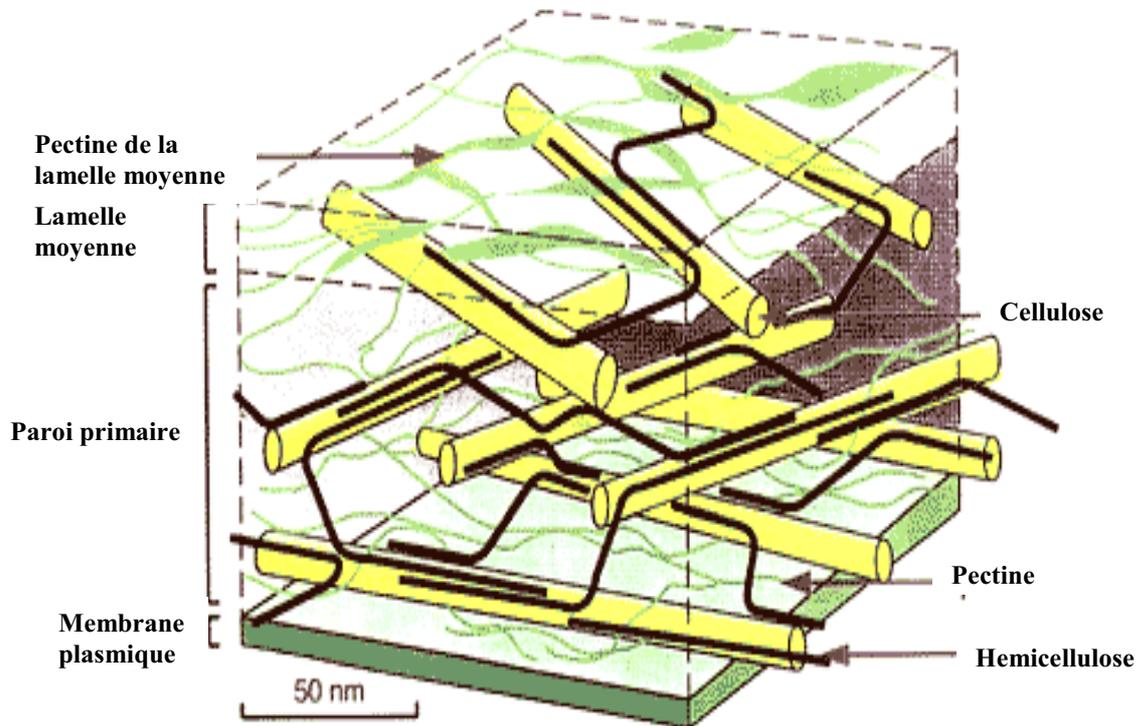


Figure 4 : Schéma simplifié de la paroi cellulaire.

(D'après McCann & Roberts, 1991)

B.1 – Les polysaccharides

Les polysaccharides, longues chaînes de molécules de sucres représentent jusqu'à 90% des constituants pariétaux. La cellulose, les hémicelluloses et les pectines sont les trois composés polysaccharidiques majeurs présent chez la paroi des cellules végétales (Carpita et al., 1993). Dans certaines cellules un autre polysaccharide "la callose" peut être présent.

B.1.1 – La cellulose

En termes de biomasse, la cellulose est le polymère le plus abondant à l'échelle de la planète. La cellulose est un homopolymère formé de 2 000 à 25 000 résidus de D-glucose en liaison β -(1,4). C'est une molécule stable, insoluble et élastique représentant 15 à 30 % de la masse sèche de la paroi primaire. Elle est synthétisée par des organismes aussi différents que

les bactéries, les champignons et les plantes. Ce polymère a la capacité de s'associer par des liaisons hydrogènes formant des microfibrilles (Figure 5). La biosynthèse se réalise au niveau de la membrane plasmique par le complexe cellulose synthétase à partir des résidus UDP-D-Glucose (Delmer & Amor, 1995). Ce dernier provient du cytoplasme où il est produit par une saccharose synthase membranaire. Le complexe cellulose synthétase, appelé rosette est constitué de six sous-unités responsables de la formation des microfibrilles de cellulose. Chez les végétaux on peut distinguer 36 polymères de cellulose qui s'assemblent en une microfibrille paracristalline via des interactions hydrogènes intrachânes et interchânes entre groupements hydroxyles (Delmer, 1999). La macrofibre de cellulose est ainsi formée de plusieurs microfibrilles parallèles entre elles, de 1 à 5 micromètres de long et de 4 à 10 nanomètres de diamètre (Brown et al., 1996 ; 2000). La cellulose assure la rigidité et l'élasticité de la paroi. Chez la paroi, on distingue plusieurs types d'organisation de la cellulose. Par exemple, la cellulose I appelée aussi cellulose native (Sugiyama et al., 1991) qui est une molécule synthétisée par les êtres vivants. La cellulose I est constituée de deux phases cristallines : les allomorphes I α et I β dont les proportions varient selon l'origine de la cellulose (Nishiyama et al., 2003). Les chaînes de cette cellulose s'organisent parallèlement, d'une manière à ce que toutes les extrémités réductrices des molécules soient organisées d'une façon « antiparallèle ». La cellulose II correspond à une réorganisation des chaînes par traitements chimiques ou thermiques de la cellulose native (Yamamoto et al., 1996). C'est la cellulose que l'on trouve par exemple dans le papier.

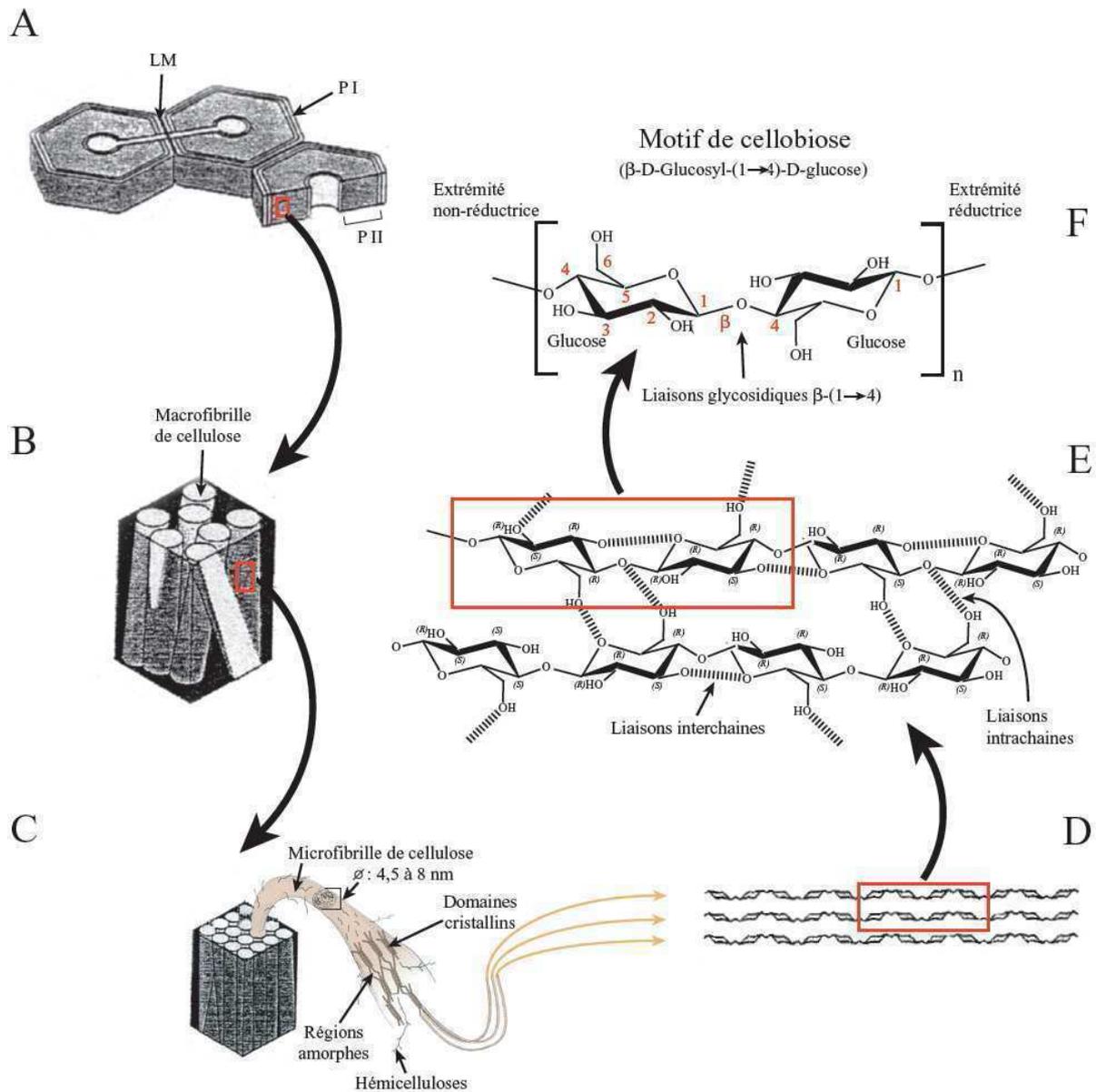


Figure 5 : Organisation supramoléculaire et moléculaire de la cellulose dans les parois cellulaires

(d'après McDougall et al., 1993)

- A : Coupe transversale d'une cellule possédant une importante paroi secondaire.
 B : Macrofibrilles de cellulose (en clair) enrobées par un ciment ligno-polysaccharidique non cellulosique (en noir).
 C : Arrangement parallèle des microfibrilles de cellulose dans les macrofibrilles.
 D : Molécules de cellulose disposées parallèlement dans les microfibrilles.
 E : Liaisons intra- et inter-chaînes permettant le maintien d'une organisation parallèle des chaînes de cellulose.
 F : Structure moléculaire de l'unité constitutive de base de la cellulose, la cellobiose.

B.1.2 – Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont définies comme des couches formées de différents polymères non-cellulosiques contenant une variété de sucres : xylose, glucose, arabinose, mannose. La particularité des hémicelluloses est le mélange de monomères ainsi que de nombreuses ramifications. Les xyloglucanes sont les composants majeurs des hémicelluloses chez les dicotylédones où ils représentent entre 10 à 30% de la masse sèche des parois cellulaires (Fry, 1998) et 15% de la masse sèche des fibres matures du lin (Morvan et al., 1989 ; Morvan et al., 1991).

Les hémicelluloses des parois primaires des dicotylédones sont composées essentiellement de xyloglucanes (20%) de xylanes (5%) et des $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ glucanes (Fry, 1988 ; Carpita & Gibeaut, 1993). Par contre, les hémicelluloses des parois secondaires sont constituées majoritairement par les xylanes (20%), mais également galactanes et glucomannanes (Selvendran, 1985).

B.1.2.1 - Les xyloglucanes

Les xyloglucanes sont des hétéropolymères neutres constitués d'une chaîne principale de résidus glucoses liés en $\beta(1-4)$, avec des chaînes latérales au niveau du carbone 6. Ces chaînes latérales contiennent des résidus de xylose, galactose et souvent un fucose en position terminale (Figure 6). Ils sont constitués d'unités oligosaccharidiques répétitives, des hepta-, nona- et des deca-saccharides (Kato & Watanabe , 1993) Ils sont synthétisés dans l'appareil de Golgi par une série d'enzymes dont une xyloglucane xylotransférase et une fucosyltransférase (Hayashi & Matsuda., 1981). Les liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ rigidifient la molécule et lui permettent de se lier aux microfibrilles de cellulose par de nombreux ponts hydrogènes pour former un véritable réseau dans la paroi (Hayashi et al., 1987). Les résidus fucosyls interviennent dans ces liaisons (Levy et al., 1997).

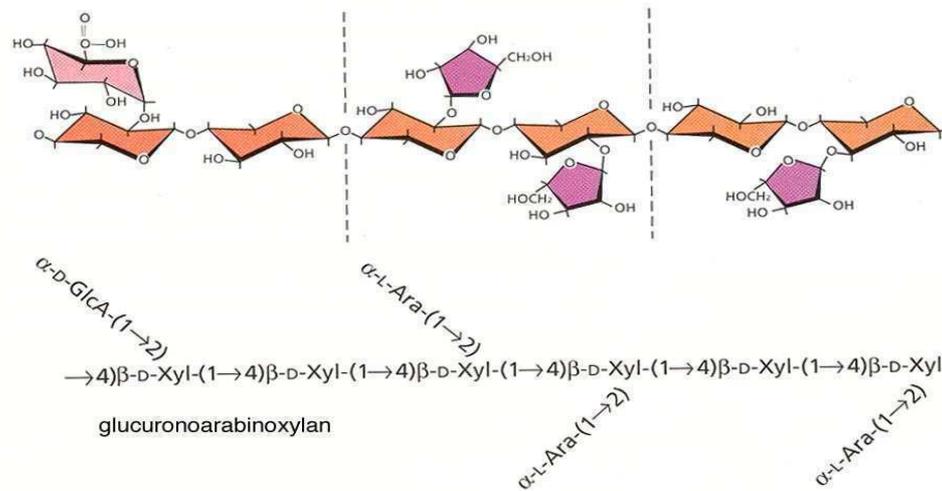


Figure 7 : Structure schématique des xylanes

(d'après Carpita et al., 2000)

Les glucuronoxylanes sont abondamment retrouvées dans les parois secondaires des dicotylédones et à des teneurs plus faibles, dans la paroi primaire (Goodwin & Mercer, 1990; Brett & Waldron, 1996). Par contre, chez les monocotylédones, les arabinoxylanes constituent les principales hémicelluloses de la paroi primaire et des glucuroarabinoxylanes sont trouvées dans leurs parois secondaires (Fry, 1988; Carpita, 1996).

B.1.2.2.1 - Les $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucanes

Les $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucanes sont des polymères non ramifiés de glucose qui contiennent en moyenne 30% de liaisons $\beta(1\rightarrow3)$ et 70% de $\beta(1\rightarrow4)$. Ces blocs sont répartis aléatoirement le long de la chaîne glucane. Les chaînes peuvent être constituées d'une répétition d'un motif de base de 3 à 4 glucanes liés en $\beta(1\rightarrow4)$ séparé par des liaisons $\beta(1\rightarrow3)$ isolées altérant la rigidité de la chaîne (Figure 8). Leur existence a été décelée chez le lin par Goubet et al. (1995).

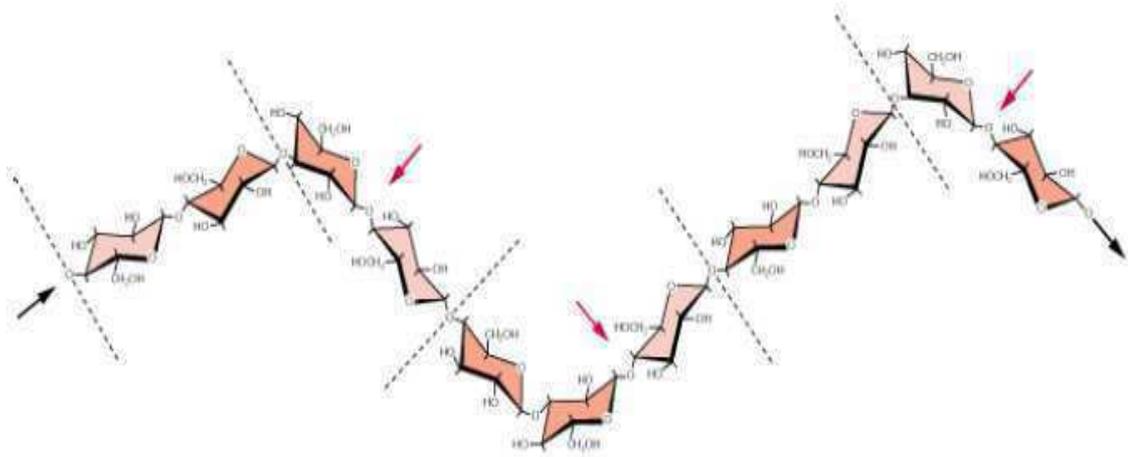


Figure 8 : Structure schématique des (1→3)(1→4)-β-glucanes

(Carpita et al., 1993)

B.1.2.2.2 - Les mannanes

Les mannanes regroupent les glucomannanes (Figure 9) et des galactomannanes (Figure 10). La chaîne principale est constituée d'unités mannoses et glucoses liées en β (1→4). Les glucomannanes ne sont composés que de la chaîne principale de glucoses et de mannoses dans les proportions respectives de 1:3 chez les conifères et de 1:2 chez les dicotylédones (Figure 9). Les galactomannanes (Figure 10) présente une substitution au niveau de leur carbone 6 des résidus mannoses par des galactoses via une liaison α(1-6). Chez les angiospermes, les mannanes sont absents ou faiblement représentés, ces hémicelluloses sont abondantes dans les parois secondaires du bois des gymnospermes (Salmen & Olsson, 1998).

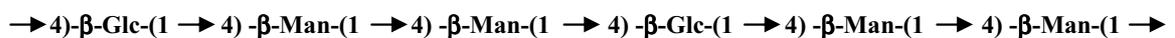


Figure 9 : Structure schématique des glucomannanes

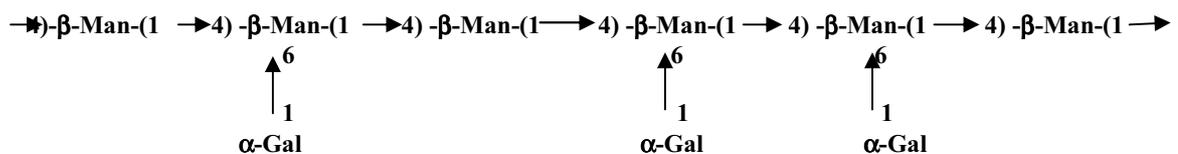


Figure 10 : Structure schématique des galactomannanes

B.1.3 – Les pectines

Les pectines représentent toute une famille de composés amorphes contenant des acides galacturoniques liés en $\alpha(1-4)$. Elles sont les éléments majeurs de la paroi primaire des dicotylédones (50% de la masse de la matière sèche) (O'Neill et al., 1990). Elles sont également abondantes dans la lamelle moyenne des cellules végétales (ciment pectique). Au niveau de la paroi secondaire, elles sont quasiment absentes (Morvan et al., 1989). Au total elles représentent 10 à 15 % de la masse des fibres de lin matures (Morvan et al., 1991). La matrice pectique constitue un réseau adapté à l'extension du réseau hémicellulose/cellulose, qui d'une part contrôle la porosité cellulaire et qui d'autre part est un acteur de l'adhésion entre les cellules. Les pectines sont impliquées dans les mécanismes de défense, et de signalisation (Darvil et al., 1992 ; Aldington & Fry, 1993 ; Carpita et al., 1993).

Les pectines sont synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi à partir de monomères en trois étapes : initiation, élongation et arrêt de la biosynthèse. Après synthèse, ces polymères gagnent le plasmalemme par le biais de vésicules sécrétrices. Celles-ci déversent ensuite leur matériel dans la paroi par exocytose.

La famille des pectines est composée d'une part par les homogalacturonanes (HGs), les rhamnogalacturonanes-I (RG-I), les rhamnogalacturonanes-II (RG-II) et d'autre part les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes.

Les HGs (Figure 11) sont constitués d'un enchaînement régulier d'acides galacturoniques. Ce bloc présente le plus souvent plusieurs modifications telles que les méthylestérification des fonctions carboxyliques (Mort et al., 1993) sur le carbone 6 ou une acétylation (substitution des acides galacturoniques par l'acide acétique) sur les fonctions alcools secondaires portées par le carbone 2 ou 3.

Les RG-I (Figure 11) sont des polysaccharides dont le squelette est formé de la répétition du motif $[4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1-2) -}\alpha\text{-L-Rha-(1)]$. Rihouey et al. (1995) ont montré que les RG-I présents dans les jonctions intercellulaires des fibres de lin étaient estérifiés par l'acide acétique, au niveau des carbones 2 et/ou 3 de l'acide galacturonique (Lerouge et al., 1993).

Les RG-II sont des polysaccharides hétérogènes très ramifiés caractérisés par un faible degré de polymérisation (~ 60) et une faible masse moléculaire (~ 5 kDa) (Brett et al., 1996).

Les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes (Figure 11) sont des polymères neutres, ils sont minoritaires mais présents dans la matrice pariétale.

On trouve aussi des polysaccharides pectiques plus rares, tels que les xylogalacturonanes chez certaines plantes. Ils présentent un rapport xylose/acide galacturonique variant entre 0,4 et 0,9 (Schols et al., 1995).

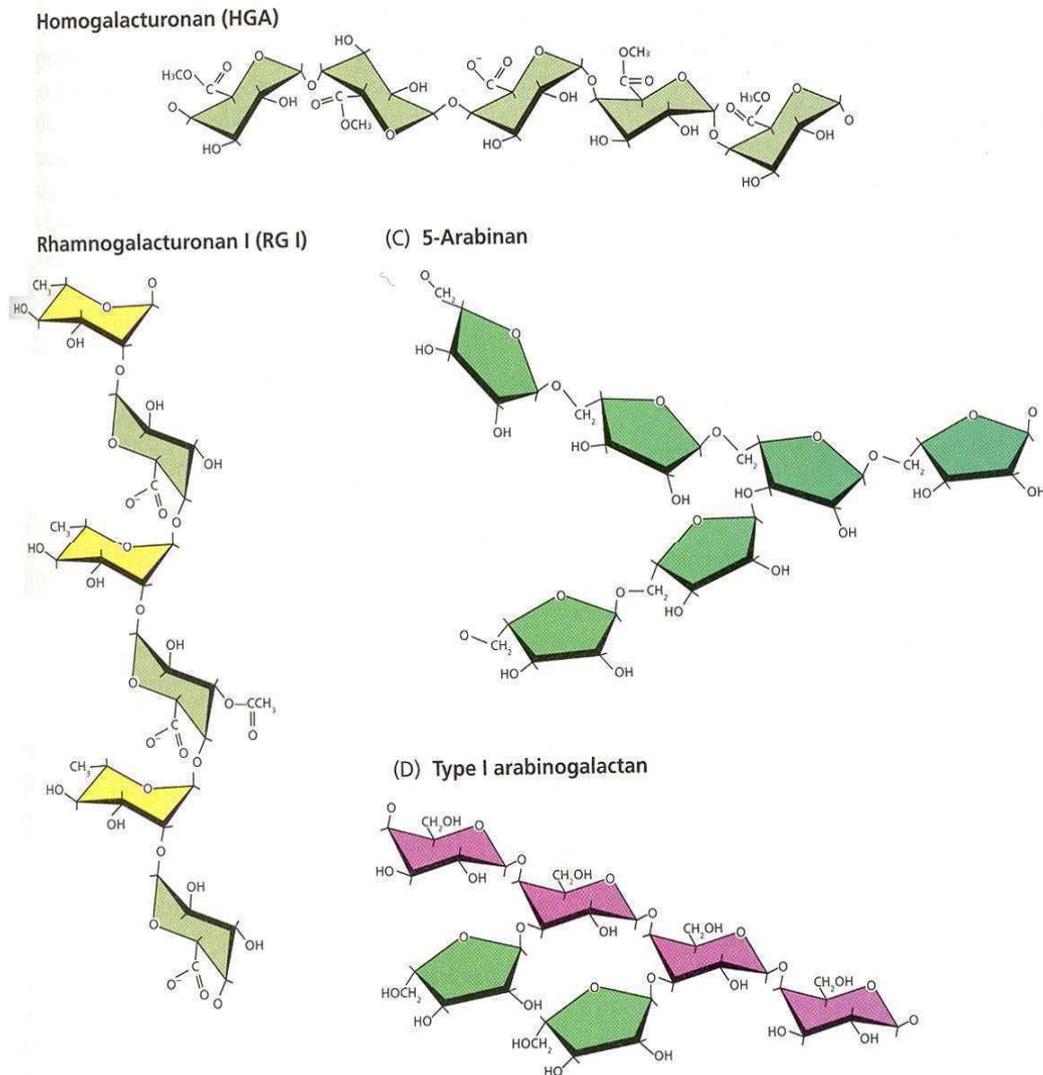


Figure 11 : Structure schématique des pectines

(d'après Carpita et al., 2000)

B.1.4 – La callose

La callose est composée d'une chaîne de $\beta(1-3)$ -D-Glucose. La callose est synthétisée par certains types cellulaires durant une phase définie du développement de la paroi, par exemple dans la formation des tubes polliniques ou dans le mécanisme de défense.

B.2 – Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont caractérisés par un cycle benzénique portant une fonction alcool (Fry, 1988). Chez les plantes, ces composés possèdent des propriétés et des structures différentes. Ils peuvent exister sous forme de monomères (acides hydroxycinnamiques, acides féruliques), sous forme de dimères (acides déhydrodiféruliques, les lignanes) ou de polymères tels que les lignines et les tanins.

Les lignines sont les principaux composés phénoliques des parois des végétaux. Ce sont des polymères complexes et hétérogènes. Les lignines sont issues du métabolisme des phénylpropanoïdes qui aboutit à la formation des monolignols (Weisshaar & Jenkins, 1998). Le principal précurseur de la voie des phénylpropanoïdes est la phénylalanine (Figure 12). Celle-ci est convertie en acide cinnamique par une désamination catalysée par la phénylalanine ammonialyase (PAL) (Koukol & Conn, 1961). Ensuite une hydroxylation aromatique mène à la formation de l'acide *p*-coumarique catalysée par une cytochrome P450 oxydase (C4H), NADPH dépendante (Russel, 1971). La voie métabolique conduisant préférentiellement à l'alcool coniférylique nécessite l'activation de l'acide *p*-coumarique en ester de CoenzymeA par la 4 hydroxycinnamate-CoA Ligase (4CL). La 4-coumarate 3 hydroxylase (C3H) est responsable de l'ajout d'un groupe hydroxyle en position méta des phénylpropanoïdes pour produire l'acide cafféique (Lewis et al., 1999). Le coumaryl-CoA subit ensuite une hydroxylation sur le carbone 3 suivie d'une *O*-méthylation respectivement catalysées par la cinnamoyl-CoA-3-hydroxylase et une caféoyl CoA-3-*O*-méthyltransférase. Enfin les transformations dues aux réductions NADPH dépendantes sont catalysées par la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et par l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD) (Gross et al., 1973) pour former successivement le coniféraldéhyde puis l'alcool coniférylique (monolignol).

La biosynthèse des autres monolignols (alcools coumarylique, 5-hydroxyconiférylique et sinapylique) fait intervenir des *O*-méthylations différentielles dont la signification est encore inconnue. Peut-être interviennent-elles pour distinguer les métabolites spécifiques de différents types cellulaires ou tissulaires, ou encore pour différencier les voies de biosynthèse des lignanes et des lignines (Lewis & Davin, 1996). C'est à partir de ces monolignols qu'est réalisé la polymérisation pour former les lignines.

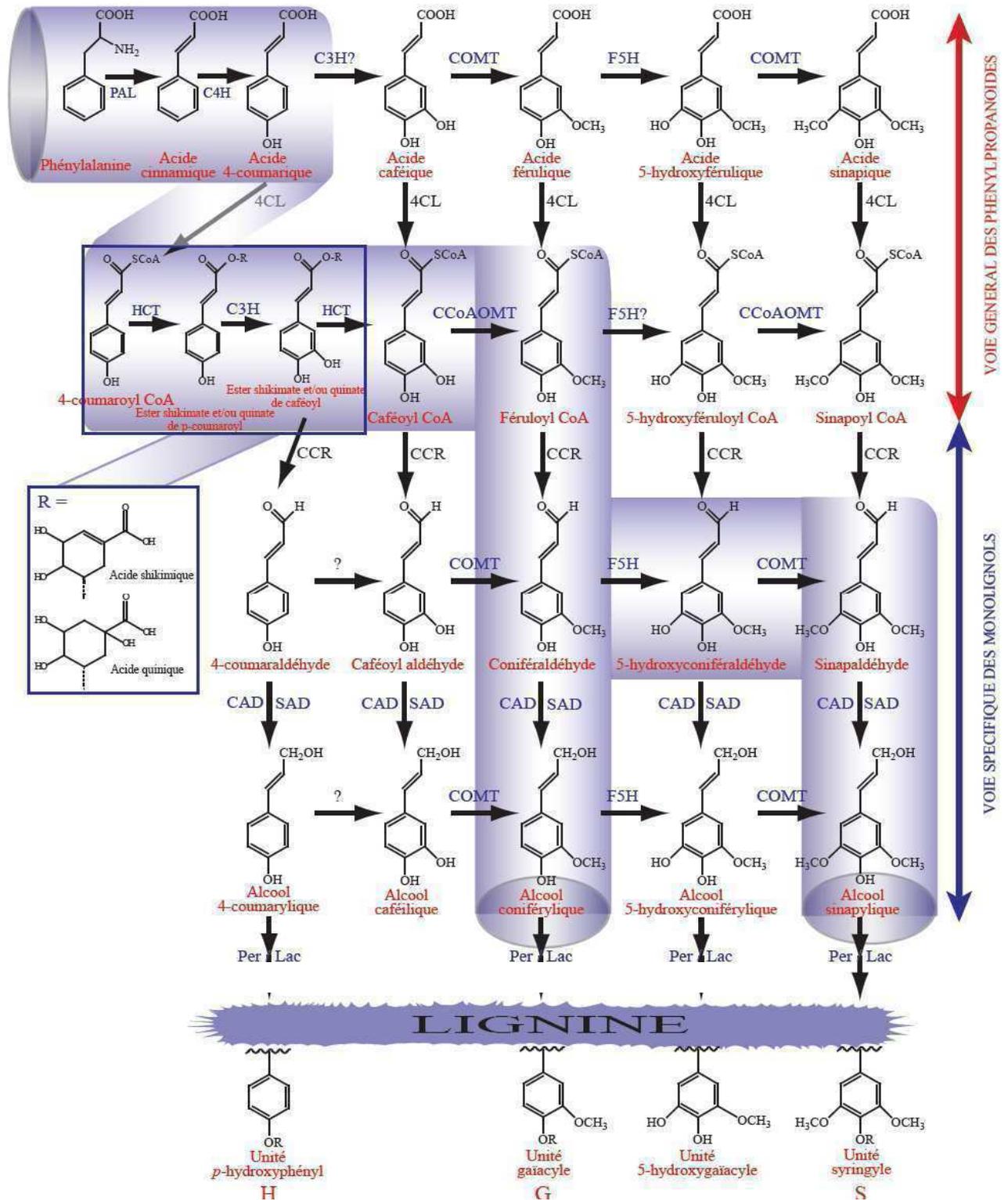


Figure 12 : Voies de biosynthèses de monolignols

(d'après Dixon et al., 2001 et Baucher et al., 2003)

Les enzymes mentionnées sous forme abrégée sont les suivantes : la phénylalanine ammonia lyase (PAL), la cinnamate 4-hydroxylase (C4H), la coumarate 3-hydroxylase (C3H), l'acide caféïque/acide 5-hydroxyférulique *O*-méthyltransférase (COMT), la férulate 5-hydroxylase (F5H), la 4-hydroxycinnamate CoA ligase (4CL), l'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransférase (HCT), la caféoyl CoA *O*-méthyltransférase (CCoAOMT), la cinnamoyl CoA réductase (CCR), l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD), l'alcool sinapylique déshydrogénase (SAD), les peroxydases (Per) et les laccases (Lac). La voie surlignée en violet semblerait être la plus courante chez les angiospermes. D'autres voies ont toutefois été identifiées chez certaines espèces et/ou dans différentes conditions environnementales ne permettant pas une "canalisation" certaine de la biosynthèse des monolignols.

Les monomères sont formés dans le cytoplasme, puis exportés et réticulés *in muro* par des peroxydases et/ou des laccases.

Day et al., (2005) ont montré par une approche microscopique la présence de lignine au niveau des zones mitoyennes et dans la paroi secondaire des cellules fibreuses de lin. Des lignines de types guaïcyle ont été détectées au niveau de la lamelle moyenne, des jonctions tricellulaires et dans la couche S1. Ils ont montré que les teneurs en lignines au niveau des fibres periphloémiennes varient entre 1,5 et 4,2% de la masse sèche des résidus pariétaux, une teneur faible comparée à celle des xylèmes 23,7% et 31,4% de la masse sèche des résidus pariétaux.

B.3 – Les protéines et les enzymes pariétales

La paroi comprend d'une part un grand nombre de protéines structurales renforçant sa cohésion et sa stabilité et d'autre part un arsenal d'enzymes impliquées dans la modification et le remaniement de la paroi. Ces protéines représentent 1 à 10% de la matière sèche des parois cellulaires chez les dicotylédones (Showalter, 1993 ; 2001 ; Cassab, 1998).

B.3.1 - Les protéines structurales

Les protéines pariétales de structure sont divisées en plusieurs familles, on cite la superfamille des protéines riches en hydroxyprolines (HRGPs) caractérisées par des motifs Ser-(Hyp) n ($n \geq 3$) séparés par des régions riches en Tyr, Lys, His et Val. Cette famille englobe les extensines et les arabinogalactanes (AGPs). Les deux autres familles majeures des protéines structurales sont les protéines riches en glycine (GRPs) et les protéines riches en proline (PRPs). Ces protéines qui forment la partie azotée de la matrice pariétale constituent une structure rigide et inextensible par l'intermédiaire de liaisons avec les polysaccharides.

B.3.1.1 - Les extensines

Les extensines (Figure 13) sont des protéines structurales de la paroi primaire des cellules végétales caractérisées par des motifs structuraux communs Ser-(Hyp) n ($n \geq 3$) séparés par des régions riches en Tyr, Lys, His et Val. Ces protéines sont fortement O-glycosylées et elles ont un point isoélectrique basique. Le caractère basique des extensines est dû à sa

richesse en résidus lysine, permettant l'interaction de ces derniers avec les groupements acides des pectines (Miller & Fry, 1992). Normalement les extensines sont *O*-glycosylées respectivement au niveau des motifs hydroxyproline et de la sérine par des chaînes d'arabinose et de galactose (Kieliszewski & Lamport, 1994 ; Kieliszewski et al., 1994). Cette protéine a la particularité de pouvoir former des liaisons covalentes avec d'autres extensines par leurs résidus tyrosine. L'extensine a une structure en hélice du fait de sa forte proportion d'hydroxyproline. Cette structure ainsi que les nombreux ponts formés avec la cellulose renforce la cohésion de la paroi. Les extensines sont impliquées dans les réactions de défense.

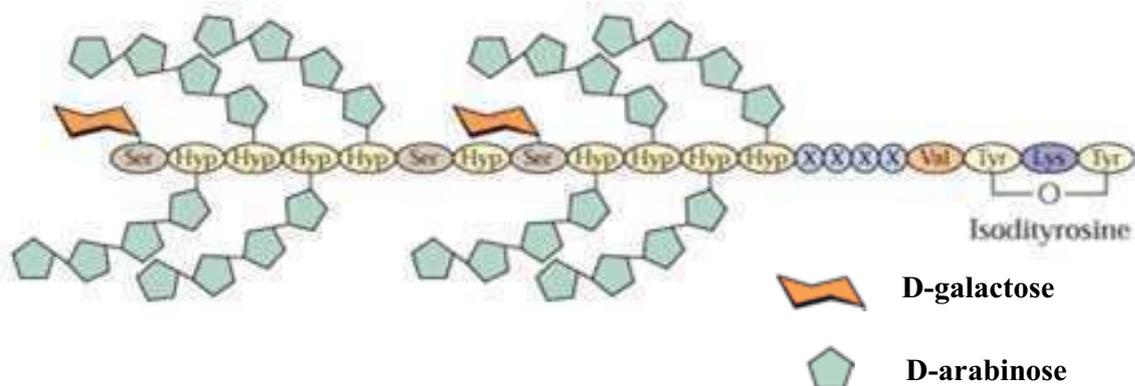


Figure 13 : Structure schématique de l'extensine de la tomate

(Carpita et al., 2000)

B.3.1.2 - Les arabinogalactane protéines (AGPs)

Les arabinogalactanes protéines (Figure 14) sont des protéoglycanes solubles et hautement glycosylées par des résidus de galactose et d'arabinose (José-Estanyol & Puigdomènech, 2000). La partie protéique représente seulement 1 à 10% de la masse totale des AGPs, elle est constituée majoritairement d'hydroxyproline mais peut contenir aussi Ala, Ser, Thr et Gly (Showalter, 1993). La teneur en chacun de ces acides aminés est très variable d'une AGP à une autre et d'une espèce à une autre cependant l'Hyp reste l'acide aminé majoritaire dans presque toutes les AGPs (Nothnagel, 1997). Elles sont codées par une famille multigénique et sont associées à la membrane plasmique et la paroi pour constituer une connexion entre ces deux compartiments. Les AGPs contribueraient au contrôle de la différenciation cellulaire, le développement et les interactions cellules-

cellules, elles pourraient aussi être impliquées dans l'embryogenèse somatique et zygotique et la réponse de la plante aux pathogènes (José-Estanyol & Puigdomènech, 2000 ; Kreuger & Van Holst, 1995). Girault et al. (2000) ont montré l'existence d'arabinogalactane-protéines dans les parois secondaires isolées à partir des fibres de lin. Ils suggèrent que celles-ci peuvent être impliquées dans la détermination de leurs propriétés mécaniques. Elles pourraient participer au processus de cohésion entre le plasmalemme des fibres péripholésiennes (Roberts, 1994).

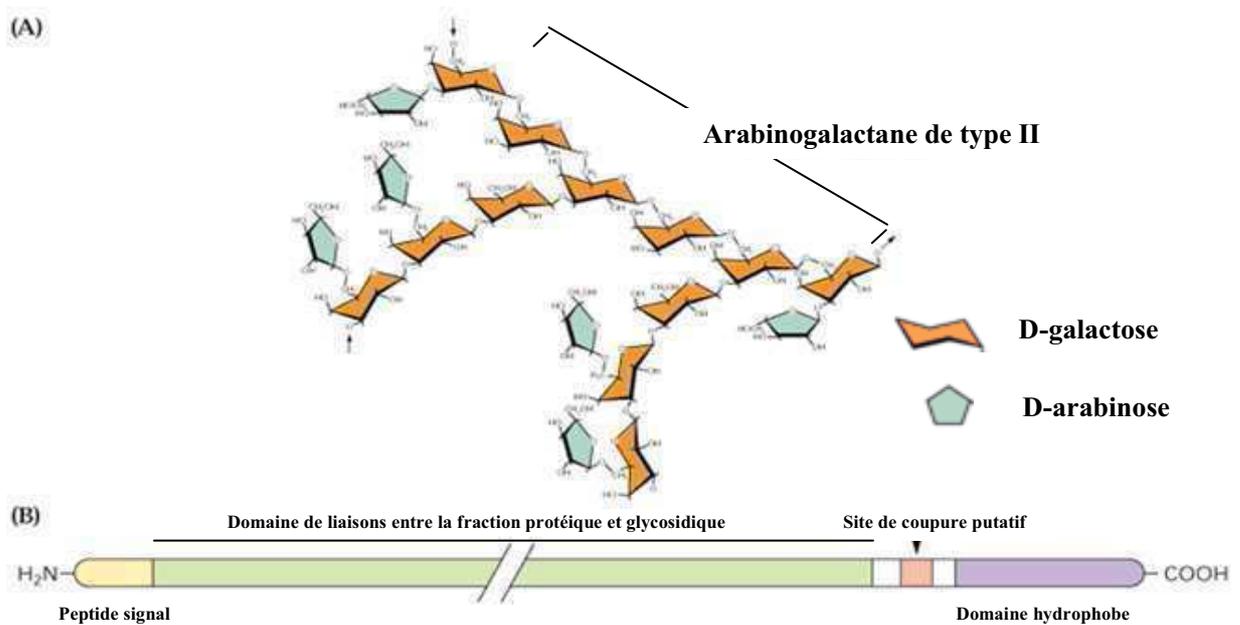


Figure 14 : Structure putative des arabinogalactanes protéines (AGPs)

(d'après Carpita et al., 2000)

B.3.1.3 - Les protéines riches en glycines (GRPs)

Les GRPs (Figure 15) sont des protéines codées par une famille multigénique. Elles présentent des séquences répétitives contenant plus de 60% de glycine (Ringli et al., 2001). Les séquences des GRPs présentent souvent le motif (Gly-X), dans la région riche en glycine le X représente fréquemment une glycine, mais il peut représenter un autre acide aminé (exemple : Ala, Ser, Val, His, Phe, Tyr ou Glu) (Ringli et al., 2001). Ce sont des protéines structurales insolubles qui jouent aussi un rôle de défense (Bradley et al., 1992). Les gènes GRPs sont exprimés dans les parois des tissus conducteurs du phloème (Condit et al., 1990) et du protoxylème (Keller et al., 1989).

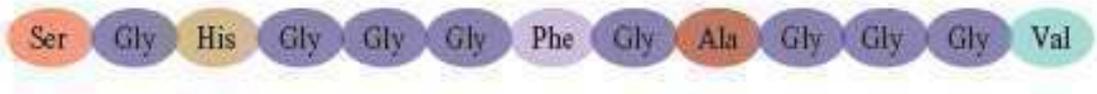


Figure 15 : Structure schématique des protéines riches en glycines (GRP), exemple du pétunia

(d'après Carpita et al., 2000)

B.3.1.4 - Les lectines et les protéines riches en prolines (PRPs)

Les lectines des solanacées et les PRPs sont des glycoprotéines structurellement proches des extensines. Les lectines des solanacées présentent une classe unique des lectines végétales car elles sont distinguées par leur capacité à agglutiner les oligomères de N-acetylglucosamine. Elles sont composées majoritairement par l'hydroxyproline et de l'arabinose (Showalter & Varner, 1989).

Les PRPs (Figure 16) se caractérisent par la répétition d'un motif pentamère (Pro-Pro-Val-Tyr-Lys) $_n$ et sont des protéines faiblement ou pas O-glycosylés (Cassab, 1998). Comme les GRPs, les PRPs sont présentes dans les mêmes types cellulaires que les extensines, ce qui indique une possible interaction entre ces trois composants.



Figure 16 : Structure schématique des protéines riches en proline (PRPs), exemple du soja

(d'après Carpita et al., 2000)

B.3.2 - Les enzymes pariétales

Outre les protéines structurales, la paroi comporte aussi un très grand nombre d'enzymes qui interviennent dans le métabolisme cellulaire mais principalement dans les processus de dégradation ou modification des polymères pariétaux au cours des différents

stades du développement et de différenciation cellulaire (Fry, 1995). On trouve ainsi des invertases, des peroxydases (E.C.1.11.1.7), des phosphatases ou diverses déshydrogénases. La paroi renferme aussi :

- Des hydrolases telles que les endoglucanases (E.C.3.2.1.4), les pectinases (E.C.3.2.1.15), les β -xylosidases (EC 3.2.1.37), les α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.37)... qui interviennent dans la dégradation directe ou indirecte des composants pariétaux.
- Des transglycosidases comme les xyloglucanes endotransglycosyases/hydrolases « XTHs » (2.4.1.207)... permettant la rupture puis la reformation des liaisons glycosidiques des xyloglucanes.
- Des protéines dites « à activité non-enzymatique » (exemple : expansines) qui interviennent dans l'élongation cellulaire provoquée par la turgescence (Cosgrove, 1999).

B.4 – Architecture pariétale des fibres de lin

L'architecture pariétale des cellules fibreuses de lin est un véritable assemblage supramoléculaire où la cellulose représente un peu près les deux tiers de la masse des fibres matures de lin et constituent 65 à 80 % de leur parois secondaires (Morvan et al., 1989 ; Focher, 1992 ; Baley, 2002).

Baley et al. (2002) ont montré que le pourcentage de la cristallinité de cette cellulose est d'environ 74 % dans les parois secondaire des fibres de lin. Cette cellulose cristalline est constituée d'environ 60 % de cellulose I β et de 25 % de cellulose I α . Schématiquement, les premiers dépôts de cellulose s'effectuent avec le début du fonctionnement cambial, elle atteint son apogée au moment de la floraison et se poursuit pendant la fructification (Sugiyama et al., 1994 ; Roland & Mosiniak, 1996).

En ce qui concerne les hémicelluloses, plusieurs auteurs (McDougall, 1993 ; Goubet & Morvan, 1994 ; Goubet et al., 1995 et Mooney et al., 2001) ont mis en évidence l'existence des xyloglucanes, des glucomannanes acétylés et/ou galactosylés, des xylanes et des $\beta(1-3) \beta(1-4)$ glucanes dans les parois cellulaires de lin.

Les pectines des fibres de lin sont composées essentiellement de HGs localisées dans les lamelles moyennes et montrant un degré de méthylestérification (Morvan et al., 1984) et de chaînes de RGI sur lesquelles sont branchées des galactanes (Morvan et al., 1989).

Andème-Onzighi et al. (2000) ont montré par les techniques immunocytochimiques que les RGII sont localisées dans les parois secondaires des fibres, et que les épitopes acide polygalacturonique/RGI sont situés au niveau des lamelles moyennes et des jonctions cellulaires. Ils ont montré aussi l'existence des galactanes et des AGPs au niveau de la moitié de la paroi secondaire qui est située à côté de la membrane plasmique.

Les parois cellulaires des fibres de lin sont réputées pour être hypolignifiées. Des teneurs condensées de types gaïacyle ont été détectées au niveau de la lamelle moyenne, des jonctions cellulaires et de la couche S1 de la paroi secondaire. La quantification de cette lignine révèle une hypolignification marquée dans les fibres par rapport au xylème (Day et al., 2005).

C- Les enzymes impliquées dans la dégradation et la modification des polysaccharides pariétaux

La dégradation des polysaccharides pariétaux nécessaire au développement et à la maturation de la paroi lors de la croissance de la plante, dépend de l'action de plusieurs glycosides hydrolases (GHs) appelées également glycosidases. Fry (2004) a classé ces enzymes en trois groupes : les exopolysaccharidases, les endopolysaccharidases et les autres hydrolases qui n'appartiennent pas à ces deux groupes. Les exopolysaccharidases hydrolysent les poly- ou oligosaccharides de faible degré de polymérisation à partir de leur extrémité non réductrice pour libérer des monosaccharides ou parfois des disaccharides. Les endopolysaccharides attaquent les chaînes des polysaccharides à n'importe quel endroit. Elles ont un large et immédiat impact sur la masse moléculaire des polysaccharides. Les hydrolases appartenant au troisième groupe peuvent casser certaines liaisons entre les groupements de substitution non-carbohydriques (O-acetyl, O-methyl, O-feruloyl...) et les polysaccharides pariétaux (Fry, 2004).

Les glycosides hydrolases (GHs) sont également classés sur des données de séquences d'acides aminés dans la banque de données CAZy "carbohydrate-active enzymes" (Henrissat 1991, 1998; Henrissat et al. 2001). Les glycosides hydrolases représentent la classe d'enzymes la plus importante au sein de CAZy. Elle regroupe les enzymes qui dégradent les glycoconjugués, oligo- et polysaccharides par hydrolyse. Les activités d'hydrolyse des liaisons glycosidiques sont regroupées sous le numéro 3.2.1.X dans la nomenclature de l'Enzyme, où le X représente la spécificité de substrat. *Arabidopsis thaliana* contient plus de

730 gènes correspondants aux 2 classes majeures des CAZy à savoir les GHs et les glycosyles transférases. 379 de ces gènes représentent 29 familles appartenant à la classe des GHs (Henrissat et al., 2001) (Figure 17). Parmi les 29 familles des GHs, les GH1, GH17 et GH28 sont les plus abondantes. La famille GH1 est impliquée dans différentes fonctions physiologiques telles que la défense, la signalisation, le métabolisme de la paroi cellulaire et la lignification.

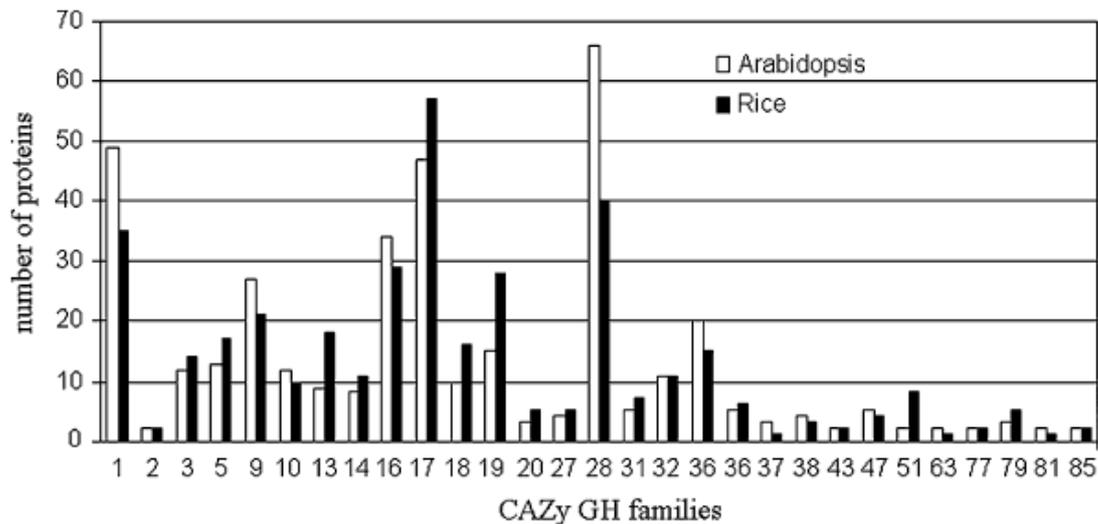


Figure 17 : Distribution des familles des GHs chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz. Les protéines sont classées en se basant sur la nomenclature CAZy

(Henrissat 1998; <http://www.cazy.org/>)

Chez *Arabidopsis*, GH1 comprend 47 gènes (Tableau1) codant pour la même enzyme à savoir la β -glucosidase (Henrissat et al., 2001). La famille 17 des GHs comprend des enzymes des activités endo-1,3- β -glucosidase. Cette famille très répandue dans le génome du riz (57 gènes) pourrait être impliquée dans le mécanisme de défense contre les attaques des agents pathogènes et d'autres fonctions physiologiques telles que le développement des pollens, la division cellulaire, la germination, la floraison et le stockage des réserves (Simmons 1994 ; Yokoyama & Nishitani 2004). La famille 28 des GHs comprend les exo et endo-glycoside hydrolases qui dégradent les homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes composant la pectine. Les GHs pourraient participer à la symbiose, à la mobilisation d'énergie et au métabolisme des lipides ainsi qu'au métabolisme secondaire chez les plantes.

Gène	nom d'enzyme	No EC	Loc Cell	EST
Famille 1 (total 47: 24 outside or plasma membrane)				
At1g02850	beta-glucosidase	n.d.	outside	17
At1g52400	beta-glucosidase	3.2.1.21	outside	85
At1g61810	beta-glucosidase	n.d.	outside	6
At1g60260	beta-glucosidase	n.d.	outside	10
At1g60270	beta-glucosidase	n.d.	outside	0
At1g60090	beta-glucosidase	n.d.	outside	0
At1g66270	beta-glucosidase	3.2.1.21	outside	40
At1g66280	beta-glucosidase	n.d.	outside	8
At1g75940	beta-glucosidase	n.d.	outside	4
At2g44450	beta-glucosidase	n.d.	outside	4
At2g44470	beta-glucosidase	n.d.	outside	11
At2g44480	beta-glucosidase	n.d.	plasma mem	3
At3g03640	beta-glucosidase	n.d.	outside	3
At3g21370	beta-glucosidase	n.d.	outside	14
At3g18070	beta-glucosidase/beta-mannosidase	n.d.	outside	0
At3g18080	beta-glucosidase/beta-mannosidase	n.d.	outside	37
At3g60140	beta-glucosidase	n.d.	plasma mem	16
At3g62750	beta-glucosidase.	n.d.	outside	4
At4g22100	beta-glucosidase	n.d.	outside	1
At4g27820	beta-glucosidase	n.d.	outside	2
At4g27830	beta-glucosidase	n.d.	outside	9
At5g24540	beta-glucosidase	n.d.	outside	0
At5g24550	beta-glucosidase	n.d.	outside	0
At5g54570	beta-glucosidase	n.d.	plasma mem	1
Famille 3 (total 15; 11 outside or plasma membrane)				
At1g02640	beta-xylosidase	n.d.	outside	15
At1g78060	beta-xylosidase	n.d.	plasma mem	9
At3g19620	beta-xylosidase	n.d.	outside	0
At3g62710	beta-glucosidase	n.d.	outside	3
At5g04885	beta-glucosidase	n.d.	plasma mem	9
At5g09730	beta-xylosidase	n.d.	plasma mem	7
At5g10560	beta-xylosidase	n.d.	plasma mem	12
At5g20940	beta-glucosidase	n.d.	plasma mem	3
At5g20950	beta-glucosidase	n.d.	plasma mem	26
At5g49360	α -arabinofuranosidase/ β -xylosidase	3.2.1.55/3.2.1.37	outside	92
At5g64570	beta-xylosidase (XYL4)	3.2.1.37	outside	31
Famille 5 (total 13; 11 outside or plasma membrane)				
At1g13130	endo-glucanase/cellulase	n.d.	plasma mem	1
At2g20680	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	n.d.	outside	5
At3g10890	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	n.d.	outside	1
At3g10900	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	n.d.	outside	0
At3g26130	endo-glucanase/cellulose	n.d.	outside	0
At3g30540	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	n.d.	outside	0
At4g28320	endo-glucanase/cellulase	n.d.	plasma mem	1
At5g01930	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	n.d.	plasma mem	10
At5g16700	endo-glucanase/cellulase	n.d.	outside	0
At5g17500	endo-glucanase/cellulose	n.d.	outside	0
At5g66460	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	n.d.	outside	5
Famille (total 25; 22 outside or plasma membrane)				
At1g19940	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	5
At1g22880	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	3
At1g23210	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	0
At1g48930	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	7
At1g64390	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	29
At1g70710	endo-beta-1,4-D-glucanase	3.2.1.4	outside	19
At1g71380	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	4
At1g75680	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	39

Gène	nom d'enzyme	No EC	Loc Cell	EST
At1g65610	endo-beta-1,4-D-glucanase	3.2.1.4	plasma mem	5
At2g32990	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	12
At2g44540	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	plasma mem	4
At2g44560	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	2
At2g44570	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	2
At3g43860	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	plasma mem	4
At4g09740	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	plasma mem	0
At4g11050	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	1
At4g23560	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	8
At4g38990	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	0
At4g39000	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	3
At4g39010	endo-beta-1,4-D-glucanase	n.d.	outside	4
At4g24260	endo-beta-1,4-D-glucanase	3.2.1.4	plasma mem	0
At5g49720	endo-beta-1,4-D-glucanase	3.2.1.4	plasma mem	64
Famille 10 (total 12; 5 outside)				
At2g14690	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	outside	3
At4g33820	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	outside	4
At4g33840	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	outside	1
At4g33860	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	outside	0
At4g38650	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	outside	3
Famille 16 (total 33; 30 outside or plasma membrane)				
At1g14720	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	22
At1g11545	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	14
At1g32170	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	10
At1g65310	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	1
At2g01850	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	17
At2g06850	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	54
At2g14620	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	6
At2g18800	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	0
At3g23730	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	10
At3g25050	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	2
At3g48580	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	2
At4g03210	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	11
At4g14130	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	26
At4g13080	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	0
At4g13090	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	0
At4g18990	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	1
At4g25810	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	13
At4g25820	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	9
At4g28850	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	0
At4g30270	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	43
At4g30280	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	13
At4g30290	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	10
At4g37800	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	9
At5g13870	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	1
At5g48070	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	plasma mem	4
At5g57530	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	4
At5g57540	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	14
At5g57550	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	outside	14
At5g57560	xyloglucan endotransglycosylase	2.4.1.207	plasma mem	26
At5g65730	xyloglucan endotransglycosylase	n.d.	outside	17
Famille 17 (total 49; 26 outside or plasma membrane)				
At1g30080	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	8
At1g32860	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	5
At1g33220	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	0
At1g66250	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	0
At1g77780	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	1
At1g77790	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	0

Gène	nom d'enzyme	No EC	Loc Cell	EST
At2g01630	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	10
At2g39640	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	1
At3g04010	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	0
At3g07320	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	11
At3g13560	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	7
At3g23770	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	1
At3g24330	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	0
At3g46570	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem 0.460 0	
At3g55430	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside 0.820 42	
At3g55780	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem 0.460 0	
At3g57260	endo-1,3-beta-glucanase	3.2.1.39	outside 0.709 [135] 22	
At3g57270	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	1
At3g61810	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	0
At4g16260	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	52
At4g17180	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	3
At4g34480	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	1
At5g20340	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	0
At5g20560	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	outside	15
At5g42720	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	11
At5g58090	endo-1,3-beta-glucanase	n.d.	plasma mem	17
Famille 27 (total 4; 4 outside or plasma membrane)				
At3g26380	alpha-galactosidase	n.d.	outside	9
At3g56310	alpha-galactosidase	n.d.	outside	30
At5g08370	alpha-galactosidase	n.d.	outside	7
At5g08380	alpha-galactosidase	n.d.	plasma mem	8
Famille 28 (total 66; 46 outside or plasma membrane)				
At1g02790	exopolygalacturonase-1	3.2.1.67	outside	18
At1g05650	pectinase	n.d.	plasma mem	0
At1g05660	pectinase	n.d.	plasma mem	0
At1g23460	pectinase	n.d.	outside	0
At1g70500	pectinase	n.d.	outside	0
At1g56710	pectinase	n.d.	outside	0
At1g65570	pectinase	n.d.	plasma mem	0
At1g78400	pectinase	n.d.	outside	0
At1g80170	pectinase	n.d.	outside	2
At2g23900	pectinase	n.d.	outside	0
At2g33160	pectinase	n.d.	outside	0
At2g41850	endo-polygalacturonase	n.d.	outside	2
At1g43090	pectinase	n.d.	plasma mem	0
At1g43100	pectinase	n.d.	plasma mem	0
At2g43860	pectinase	n.d.	outside	0
At2g43870	pectinase	n.d.	outside	0
At2g43890	pectinase	n.d.	outside	0
At3g06770	pectinase	n.d.	outside	12
At3g07820	pectinase	n.d.	outside	1
At3g07830	pectinase	n.d.	outside	3
At3g07840	pectinase	n.d.	outside	0
At3g07850	exopolygalacturonase	3.2.1.67	outside	11
At3g07970	pectinase	n.d.	outside	1
At3g14040	endo-polygalacturonase	3.2.1.15	outside	11
At3g15720	pectinase	n.d.	plasma mem	1
At3g16850	pectinase	n.d.	outside	18

Gène	nom d'enzyme	No EC	Loc Cell	EST
At3g42950	pectinase	n.d.	plasma mem	9
At3g48950	pectinase	n.d.	outside	0
At3g57510	endo-polygalacturonase	3.2.1.15	plasma mem	5
At3g57790	pectinase	n.d.	outside	5
At3g59850	pectinase	n.d.	outside	3
At3g61490	pectinase	n.d.	outside	6
At3g62110	pectinase	n.d.	outside	13
At4g01890	pectinase	n.d.	outside	1
At4g18180	pectinase	n.d.	outside	0
At4g23500	pectinase	n.d.	outside	4
At4g23820	pectinase	n.d.	outside	20
At4g33440	pectinase	n.d.	plasma mem	5
At4g35670	pectinase	n.d.	outside	0
At5g14650	pectinase	n.d.	outside	2
At5g17200	pectinase	n.d.	outside	0
At5g27530	pectinase	n.d.	plasma mem	0
At5g39910	pectinase	n.d.	outside	0
At5g41870	pectinase	n.d.	outside	3
At5g44840	pectinase	n.d.	outside	0
At5g48140	pectinase	n.d.	outside	5
Famille 31 (total 5; 4 outside)				
At1g68560	alpha-xylosidase	3.2.1.20	outside	56
At3g45940	alpha-xylosidase	n.d.	outside	0
At5g11720	alpha-glucosidase	3.2.1.20	outside	11
At5g63840	alpha-glucosidase/xylosidase	n.d.	outside	17
Famille 35 (total 18; 12 outside)				
At1g31740	beta-galactosidase	n.d.	outside	0
At1g72990	beta-galactosidase	n.d.	outside	8
At1g77410	beta-galactosidase	n.d.	outside	3
At2g16730	beta-galactosidase	n.d.	outside	3
At2g28470	beta-galactosidase	n.d.	outside	8
At2g32810	beta-galactosidase	n.d.	outside	12
At3g13750	beta-galactosidase	n.d.	outside	132
At3g52840	beta-galactosidase	n.d.	outside	16
At4g26140	beta-galactosidase	n.d.	outside	5
At5g56870	beta-galactosidase	n.d.	outside	26
At5g63800	beta-galactosidase	n.d.	outside	12
At5g63810	beta-galactosidase	n.d.	outside	6
Famille 43 (total 2; 2 outside)				
At3g49880	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	plasma mem	4
At5g67540	1,4-beta-xylan endohydrolase	n.d.	plasma mem	10
Famille 51 (total 2; 2 outside or plasma membrane)				
At3g10740	α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase	3.2.1.55/3.2.1.37	outside	30
At5g26120	alpha-L-arabinofuranosidase	n.d.	outside	10

Tableau 1 : Liste des glycosides hydrolases chez *Arabidopsis thaliana* obtenue par analyse bioinformatique

(Minic & Jouanin, 2006).

NoEC = numéro de classification de l'enzyme, nd = non déterminé, out side= extracellulaire, plasma mem = membrane plasmique et Loc Cell : localisation cellulaire

C.1 - Les endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8)

Ces enzymes sont des endoxylosidases communément appelées “xylanases”, Elles catalysent la rupture de la liaison glycosidique reliant deux résidus de xylose dans la chaîne principale des xylanes (Figure 18). Les endo- β -1,4-xylanases peuvent être d'origine fongique ou bactérienne. Les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les endoxylanases d'origine fongique, parmi lesquelles celles d'*Aspergillus niger* (Poutanen, 1988). Plusieurs espèces de *Trichoderma* produisent également des endoxylanases (Biely 1985, Hrmova et al. 1986, Wong et al. 1986, Wood et al. 1986)

C.2 - La β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37)

Les β -D-xylosidases sont, à la différence des endoxylanases, des exoglycosidases qui hydrolysent les xylo-oligosaccharides de faible degré de polymérisation à partir de leur extrémité réductrice (Figure 18) et de manière générale, n'attaquent pas les polymères de xylanes. Cependant, de rares exemples montrent l'aptitude de certaines β -D-xylosidases à libérer très lentement de la xylose à partir de xylanes (Dekker et Richards, 1976).

Les β -xylosidases sont présentes dans les familles des GHs (GH 3, 39, 43, 52 et 54). Ces enzymes sont des candidates potentiellement impliquées dans la modification de la structure des polysaccharides. Leurs propriétés biochimiques ont été étudiées chez *Arabidopsis*.

Trois activités β -xylosidases ont été mises en évidence dans des extraits de hampes d'*Arabidopsis* (Minic et al., 2004). Les protéines responsables de ces trois activités ont été purifiées et biochimiquement caractérisées. Les masses moléculaires (75 kDa, 67 kDa et 64 kDa) de ces enzymes ont été déterminées par SDS-PAGE. L'enzyme de 80 kDa, identifiée par MALDI-TOF, correspond à une α -L-arabinofuranosidase (ARAF) appartenant à la famille 51 des GHs. L'analyse de la spécificité de cette enzyme pour différents substrats montre qu'elle possède une plus grande activité α -L-arabinofuranosidase que β -xylosidase. L'enzyme de 65 kDa, identifiée par MALDI-TOF, correspond à une β -xylosidase (AtBX4) et l'analyse de sa spécificité pour les substrats le confirme. L'enzyme de 60 kDa a été identifiée par comparaison des profils d'activités d'*Arabidopsis* sauvages et de lignées anti-sens pour la β -xylosidase1 (AtBX1). Dans les lignées anti-sens, l'activité de cette enzyme est fortement réduite. L'analyse de la spécificité des substrats démontre que cette enzyme possède une

activité β -xylosidase mais également, parmi différentes activités, une forte activité α -L-arabinofuranosidase. XYL1 et XYL4 appartiennent à la famille GH3.

Itai et al. (2003) ont cloné et caractérisé l'expression de deux gènes d'une β -xylosidase *LeXYL1* et *LeXYL2* chez les fruits de la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Ils ont démontré d'une part, que l'expression du gène *LeXYL2* est relativement plus forte durant le développement du fruit, mais diminue après le début du mûrissement du fruit. D'autre part, le niveau d'expression du *LeXYL1* est quasi nul pendant le développement du fruit mais augmente après le développement et précisément après le mûrissement.

Plusieurs auteurs (Lee et al., 2001 ; Minic et al., 2004 ; Chavez Montes et al., 2008) ont démontré un rôle bi-fonctionnel des enzymes de la famille des GH3 avec des activités α -L-arabinofuranosidase et β -D-xylosidase à la fois. Par exemple chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) une α -L-arabinofuranosidase (ARA1) et une β -D-xylosidase XYL1 ont été purifiées à partir de jeunes plantules d'orge (Lee et al., 2003). ARA1 a une masse moléculaire de 67 kDa et un point isoélectrique de 5,5, cette enzyme hydrolyse les deux substrats à savoir le 4'-nitrophényl α -L-arabinofuranoside et le 4'-nitrophényl β -D-xyloside. En revanche, XYL1 qui a une masse moléculaire identique de 67 kDa et un point isoélectrique de 6,7 hydrolyse préférentiellement le 4'-nitrophényl β -D-xyloside (rendement catalytique 30 fois plus fort qu'avec 4'-nitrophényl α -L-arabinofuranoside).

Chávez Montes et al. (2008) ont montré chez *Arabidopsis* que le gène *arafl* (At3g10740) code pour une enzyme bi-fonctionnelle ayant les α -L-arabinofuranosidase et β -D-xylosidase. Cette enzyme appartient à la famille 51 des glycosides hydrolases. ARAF1 a été localisée dans différents types cellulaires (dans le système vasculaire des racines et des tiges). Les mutants d'insertion de ce gène ne montrent pas de phénotype. Par contre, les plantes transgéniques qui sur-expriment ce gène présentent un retard au niveau de l'émergence de l'inflorescence et une altération au niveau de l'architecture des tiges.

C.3 - Les α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55)

Ce sont des exoglycosides capables d'hydrolyser les liaisons reliant les L-arabinofuranosyles de la chaîne latérale des arabinanes, des arabinogalactanes et des arabinoxylanes (Kaji 1984) (Figure 18). Elles agissent principalement sur des oligosaccharides de faible degré de polymérisation, plus rarement sur des polymères (Poutanen 1988). Greve et al. (1984) ont observé que l'arabinose serait une limitation à la dégradation des arabinoxylanes par les

endoxyanases. Son action dénude la chaîne principale et permet la création de nouveaux sites pour l'action des xylanases. Néanmoins, peu de données existent actuellement sur des arabinofuranosidases capables d'agir efficacement sur les disubstitutions d'arabinose portées par les xyloses de la chaîne principale.

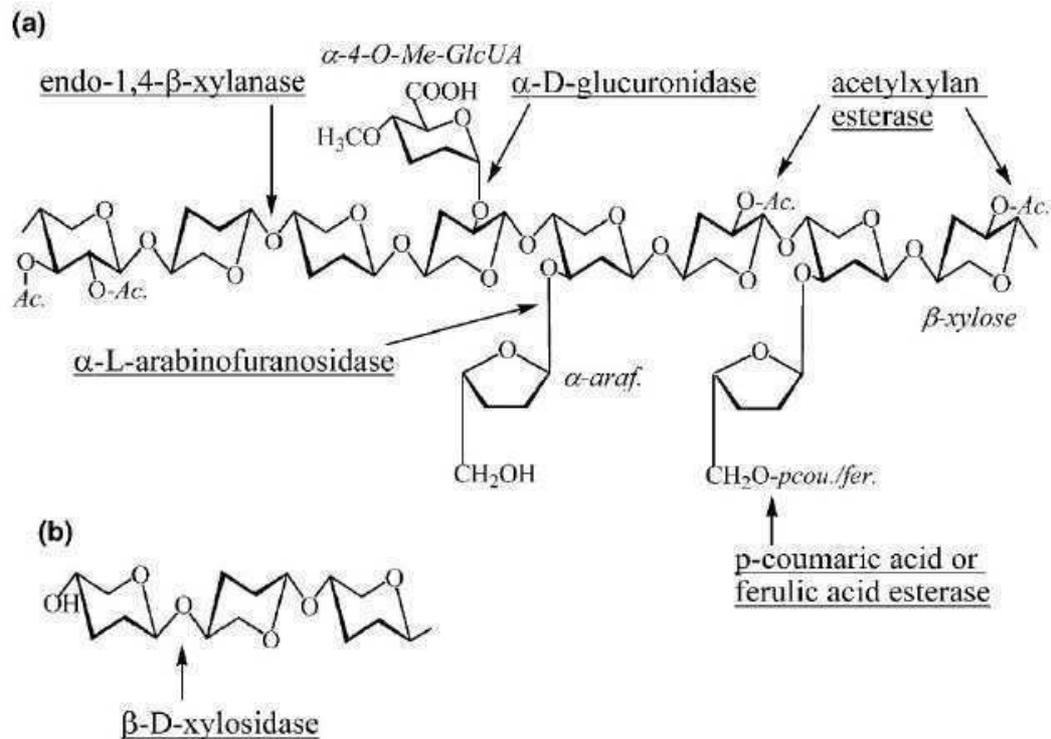


Figure 18 : Structure du xylane et site d'attaque des xylanases, xylosidase et arabinofuranosidase

(a) polymère de xylane, Ac., Acetyl group; α-araf., α-arabinofuranose; α-4-O-Me-GlcUA, α-4-O-methylglucuronic acid; p-cou., p-coumaric acid; fer., ferulic acid. (b) hydrolyse de xylo-oligosaccharides par la β-D-xylosidase (Collins et al., 2004).

C.4 - Xyloglucan-endotransglycosylases

Les xyloglucan-endotransglycosylases/hydrolases (XTHs) sont capables de cliver une chaîne de xyloglucanes et de lier l'extrémité réductrice néo-formée à l'extrémité non-réductrice d'un substrat donneur (Fry et al., 1992). Elles peuvent avoir une ou deux activités enzymatiques. La première est une activité XET (Xyloglucan endotransglycosylase) et la deuxième une activité XEH (Xyloglucan endohydrolase) (Figure 19 et 20). Cette réaction

permet l'expansion de la paroi des végétaux par transglycosylation d'une molécule de xyloglucane nouvellement sécrétée afin qu'elle s'intègre au réseau de xyloglucane-cellulose (Thompson & Fry, 1997). Les XTHs sont sécrétées dans l'apoplasme par le réticulum endoplasmique et le Golgi pendant l'interphase alors que, pendant la cytokinèse, elles sont transportées vers la plaque équatoriale (Yokoyama & Nishitani, 2001). Les XTHs sont donc impliquées dans les mécanismes de synthèse, croissance et dégradation de la paroi (Fry et al., 1992 ; Nishitani & Tominaga, 1992). Dans les fruits, les XTHs jouent potentiellement un rôle dans le grandissement cellulaire (Campbell & Braam, 1999) et le ramollissement au cours de la maturation (Rose & Bennett, 1999). Le profil d'expression de certaines XTHs est lié à la perte de fermeté chez le kiwi (Schroder et al., 1998) et la tomate (Maclachlan & Brady, 1994). Il est aussi possible que certaines XTHs soient aptes à utiliser les pectines comme substrat accepteur afin de créer des liaisons xyloglucan-pectine (Thompson & Fry, 2000).

Au-delà de leur rôle au sein de la paroi primaire, les XTH seraient encore actives dans la paroi secondaire. Bourquin et al. (2002) ont montré une activité XTH lors de l'initiation de la paroi secondaire dans le bois de peuplier. Ils joueraient un rôle au niveau de la surface externe de la paroi secondaire et interne de la paroi primaire. Cette activité a également été détectée dans des tissus dont la croissance a totalement cessé (Catala et al., 2001) ; ces enzymes seraient impliquées dans les interactions cellulaires et la formation de la paroi secondaire mais aussi dans la cohésion entre les parois primaire et secondaire (Mellerowicz et al., 2001).

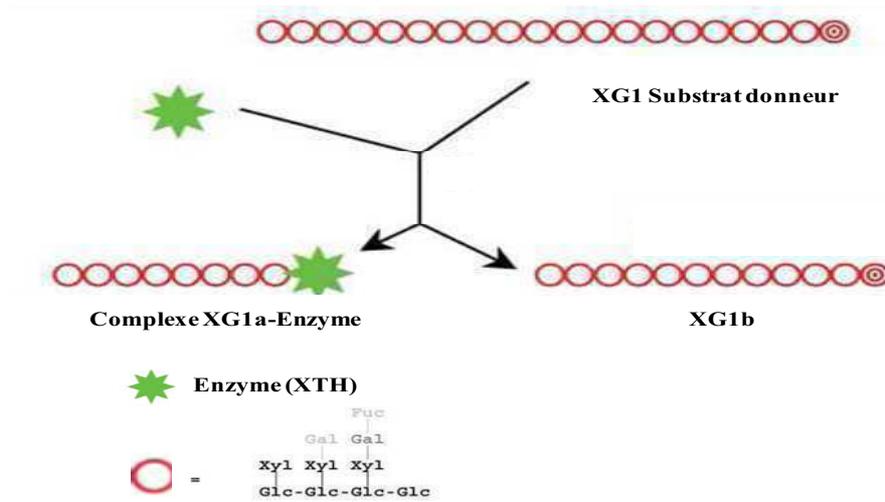


Figure 19 : Schéma d'action des XTHs dans la paroi primaire. Illustration de l'activité hydrolase des XTHs

(D'après Fry, 2004).

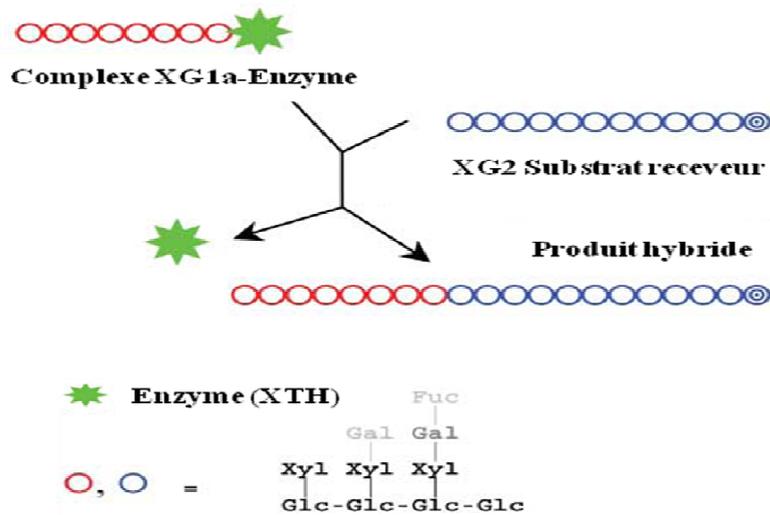


Figure 20 : Illustration de l'activité endotransglycosylase des XTHs

(D'après Fry, 2004).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

Le lin (*Linum usitatissimum*) fait partie de premières plantes cultivées dans le monde. Il a toujours été une source de fibres de très grande qualité pour l'industrie textile pendant des millénaires et connaît actuellement un nouvel intérêt dans l'industrie des biomatériaux. Les fibres periphloémiennes (bast fibers) de lin possèdent un nombre de qualités (finesse, résistances aux tensions et à l'usure, nervosité...) apprécié par les industries textiles et dans le domaine des bio-polymères (Baley, 2002). La qualité de ces fibres dépend de leur longueur, mais également de la structure et la composition de leur épaisse paroi secondaire qui représente environ 90 % de la section transversale de la fibre.

Afin d'approfondir nos connaissances concernant la régulation moléculaire de la mise en place de ce type particulier de paroi secondaire et la contribution de différents polymères pariétaux à l'élaboration de leur architecture tri-dimensionnelle des approches distinctes, la biologie moléculaire, la biochimie et la microscopie, ont été mises en œuvre afin de répondre aux questions biologiques.

C'est dans ce cadre qu'un programme de séquençage d'ESTs a été initié. La classification de ces ESTs a permis l'identification d'un nombre élevé de séquences codant une beta-xylosidase potentielle. Des enzymes de ce type sont potentiellement impliquées dans le développement des parois végétales. Dans ce contexte nous avons donc décidé de sous-exprimer le gène correspondant (*LuBXL1*). Pour ceci nous avons décidé d'utiliser une approche IR-PTGS.

Au préalable, nous avons essayé d'adapter le protocole de transformation génétique utilisé au laboratoire par les cultivars oléagineux des cultivars de lin fibres [résultats, Chapitre II]

Une fois le protocole de transformation amélioré notre objectif était de générer des lignées sous-exprimant le gène *LuBXL1* et d'utiliser une combinaison de techniques pour caractériser ces plantes, afin d'approfondir nos connaissances du rôle potentiel de ce gène dans la formation des parois chez le lin.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL ET METHODES

A -Matériel

A.1 - Matériel végétal

Des lins issus de culture en plein champ et des vitroplants ont été utilisés au cours de ces analyses.

A.1.1 - Lins cultivés en champs

Des prélèvements de lin (cv Hermès) ont été effectués en champs dans la commune de Tétéghem (Nord) lorsque les plantes étaient en floraison. La séparation des tissus externes riches en fibres périphloémiennes et des tissus internes essentiellement composés de bois s'effectue à l'aide d'un scalpel sur une plaque de verre posée sur de la glace. Ces échantillons sont ensuite congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C. Ils ont été employés pour les études biochimiques et moléculaires.

A.1.2 - Lins transgéniques

Nous disposons au laboratoire des graines issues de plusieurs variétés de lin cultivé fournies par la coopérative linière « **TERRE DE LIN** » (Seine Maritime).

- Variété oléagineuse : Barbara
- Variétés à fibres : Hermès et Diane

Pour les études préliminaires de la capacité de la régénération de bourgeons, les tests de sensibilité aux antibiotiques et les expériences de transformations génétique, nous avons choisi un même matériel de départ, des segments d'hypocotyles de jeunes plantes.

A.2 - Souches Bactériennes

Différentes souches bactériennes ont été utilisées au cours de ce travail.

A.2.1 - Souches d'*Escherichia coli*

Escherichia coli est une entérobactérie Gram négatif fréquemment utilisée en biologie moléculaire en tant qu'hôte biologique de plasmides contenant des gènes d'intérêts ou des fragments de gènes utilisables comme sonde moléculaire. Différentes souches de cette bactérie ont été utilisées lors des manipulations :

MOSBlue (Amersham): *endA1 hsdR17 (r_{k12}⁻m_{k12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac-[F' proA⁺ B⁺lac^gZΔM15: Tn10 (TcR)]*

La souche a été utilisée pour effectuer des multiplications de plasmides pMOSBlue portant des fragments amplifiés par PCR destinés au sous-clonage ou au séquençage.

JM109: *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-proAB) F' [traD36 proA⁺ B⁺lac^gZΔM15]*

Cette souche a été utilisée pour l'amplification d'ADN plasmidique fournie sous forme thermocompétente (Promega, Charbonnières, France).

XL1-Blue: *endA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 lambda- recA1 gyrA96 relA1 lac- [F' proA⁺ B⁺lac^gZΔM15: Tn10 (TcR)]*

Cette souche a été également utilisée pour l'amplification d'ADN plasmidique.

A.2.2 - Souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens est une agrobactérie Gram négatif vivant dans le sol et dont le type sauvage provoque des tumeurs au niveau des tissus végétaux par transfert d'oncogènes portés sur leur plasmide Ti (Tumor inducing). Nous avons utilisé la souche GV3101 de type C58 C1 Rif^r (pGV2260) (Deblaere et al., 1985) connue pour être plus virulente que la souche LBA4404. Elle porte un plasmide « helper » pGV2260 et peut recevoir un vecteur binaire.

A.3 - Plasmides

A.3.1 - Vecteurs utilisés pour le sous clonage et le séquençage

pMOSBlue

Nous avons utilisé le vecteur pMOSBlue (Amersham) (Figure 21). Il possède une origine de répllication pour *E.coli* (ori), un gène de résistance à l'ampicilline (*AmpR*) et une cassette de clonage en phase avec le peptide α de la β -galactosidase d'*E.coli* (*LacZ*).

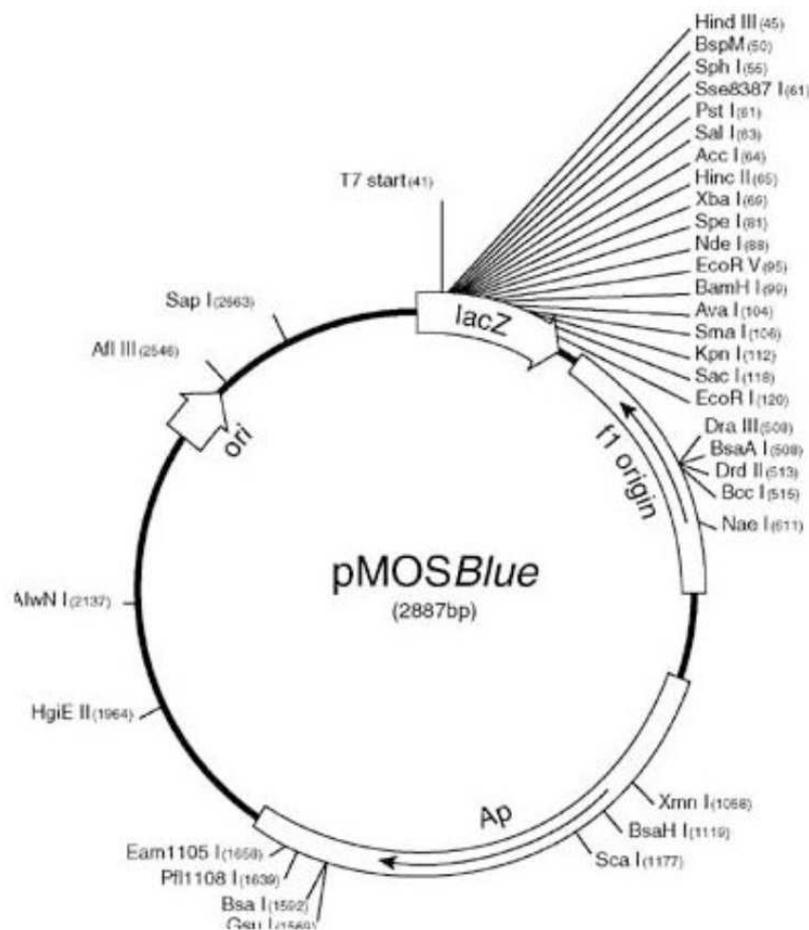


Figure 21 : Schéma du vecteur pMOSBlue.

Ap étant le gène conférant la résistance à l'ampicilline, ori : l'origine de répllication pour la bactérie, LacZ : le gène du peptide α de la β -galactosidase, f1 origin origine de répllication issue du bactériophage f1.

pHANNIBAL : (Wesley et al., 2001, Helliwell & Waterhouse, 2003) le vecteur pHANNIBAL (Figure 22) est un vecteur utilisé dans le but de provoquer du "gene silencing"

ou plus précisément de l'IR-PTGS pour Inverse Repeat Post Transcriptional Gene Silencing du gène d'intérêt. Ce vecteur possède deux sites multiples de clonage, l'un permettant l'insertion de la séquence codante du gène d'intérêt en position sens et l'autre de la même séquence codante mais en position antisens. La cassette d'expression ainsi réalisée est introduite dans un vecteur binaire en l'occurrence dans notre cas dans le vecteur pCAMBIA1300.

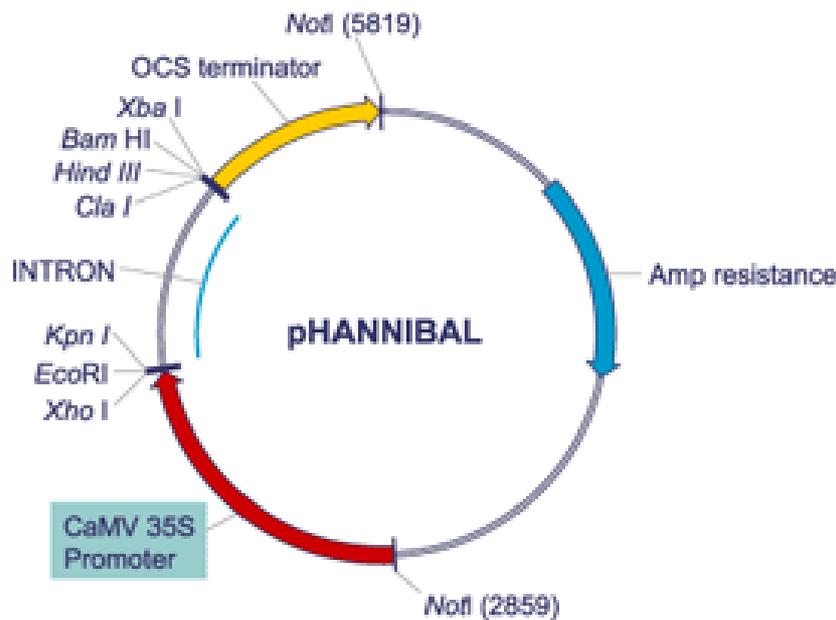


Figure 22 : Schéma du vecteur pHANNIBAL.

ocs terminator : terminateur du gène de l'octopine symthase, Amp resistance : gène conférant la résistance à l'ampicilline, CaMV35s : promoteur fort du gène codant pour l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

A.3.2 - Vecteurs binaires

Les vecteurs binaires sont porteurs d'un ADN de transfert (ADN-T) qui va être intégré dans le génome de la plante infectée. Les gènes portés sur l'ADN-T doivent être sous le contrôle de promoteurs pouvant être reconnus par des systèmes de transcription eucaryotes.

pCAMBIA1300 (CAMBIA) : Ce vecteur (Figure 23) possède le minimum de séquences nécessaires à la transformation des plantes et à leur sélection. Il permet l'insertion de gènes d'intérêt pour la transformation végétale mais requiert les séquences promotrices et terminatrices. Ce vecteur porte le gène *nptII* pour la sélection des bactéries hébergeant ce

vecteur et sur son ADN-T le gène *hptII* conférant la résistance à l'hygromycine sous le contrôle du promoteur 35S pour la sélection des plantes transformées.

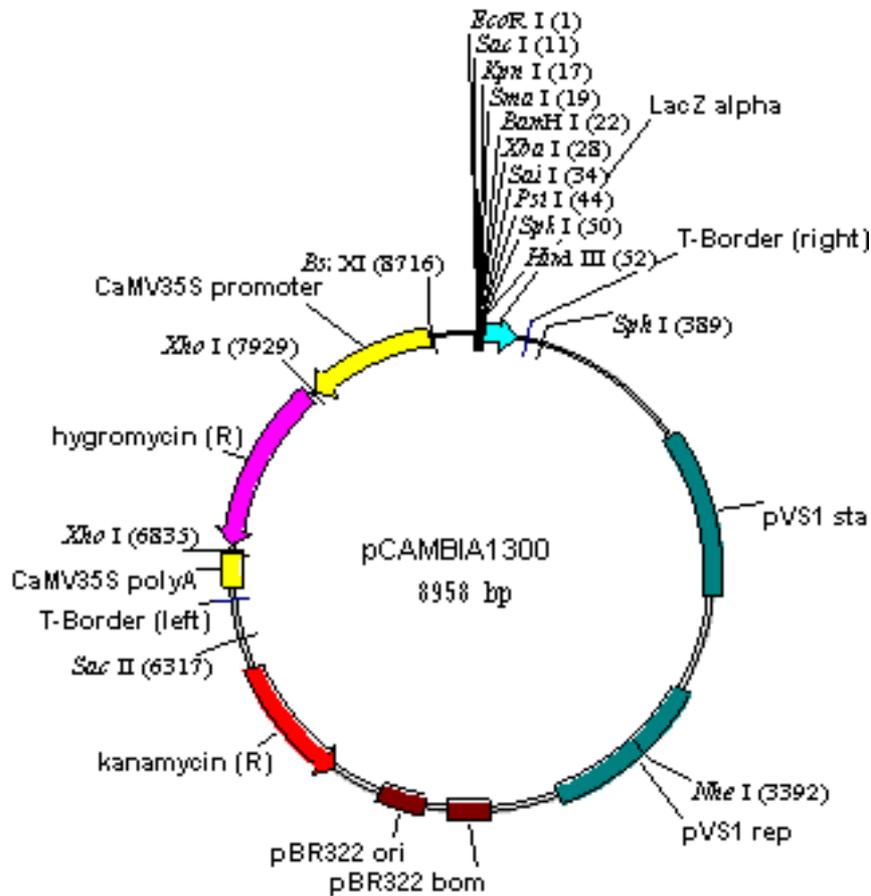


Figure 23 : Schéma du vecteur pCAMBIA1300.

pART27 : Ce vecteur (Figure 24) est utilisé aussi pour l'insertion des gènes d'intérêts pour la transformation végétale. La différence c'est que ce vecteur porte sur son ADN-T le gène *nptII* conférant la résistance à la kanamycine pour la sélection des plantes transformées et le gène qui confère la résistance à la spectomycine pour la sélection de bactéries hébergeant ce vecteur.

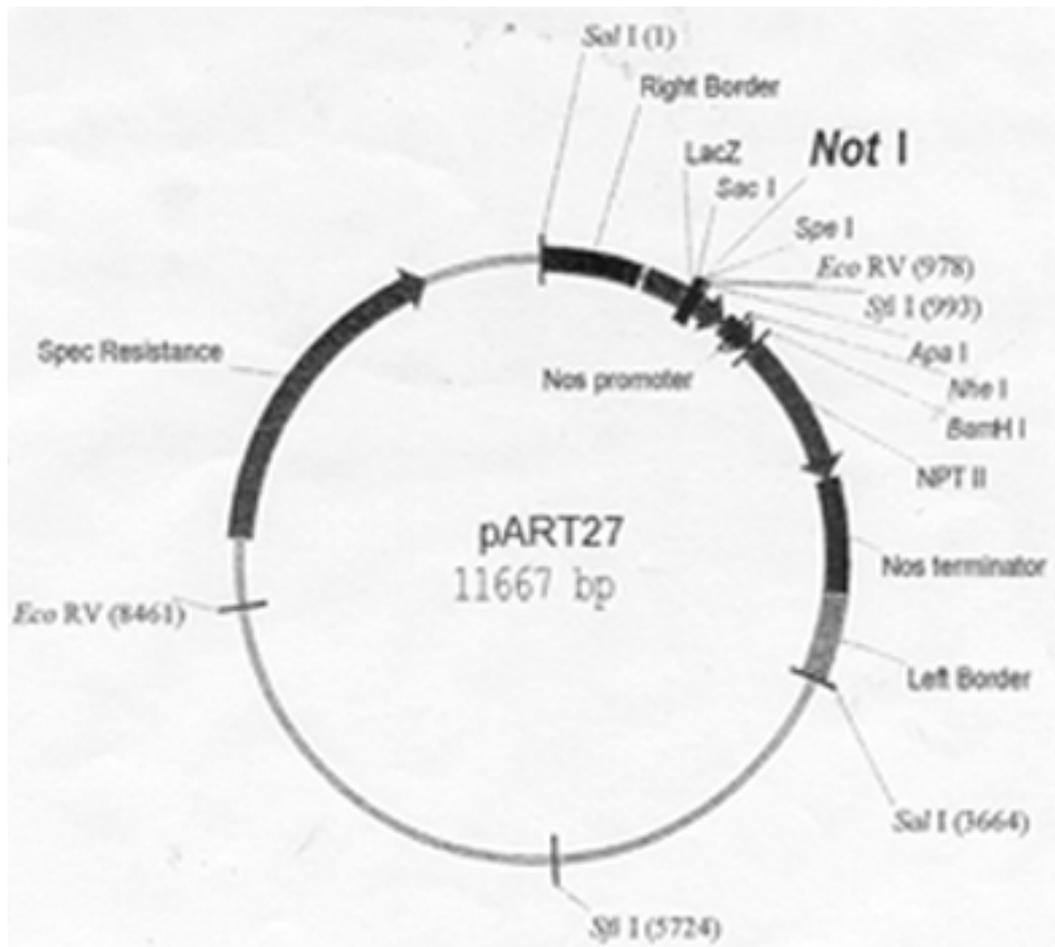


Figure 24 : Schéma du vecteur pART27.

Phagmide pBluescript

Ce vecteur (Figure 25) de 2958 pb est à l'origine inclus dans l'ADN viral des bactériophages UNIZAP-XR utilisés lors de la construction de la banque d'ADNc. Après son excision, il se comporte comme un plasmide classique dans les bactéries XL1-Blue. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et un fragment du gène *lacZ* interrompu par le site multiple de clonage permettant la sélection des bactéries recombinées. En outre, pBluescript porte les origines de répllication ColE1 et *f1* indispensables à la construction et l'amplification de la banque. Les ADNc sont insérés au niveau du site multiple de clonage entre les sites *EcoRI* et *XhoI* permettant de ce fait leur orientation dans le vecteur.

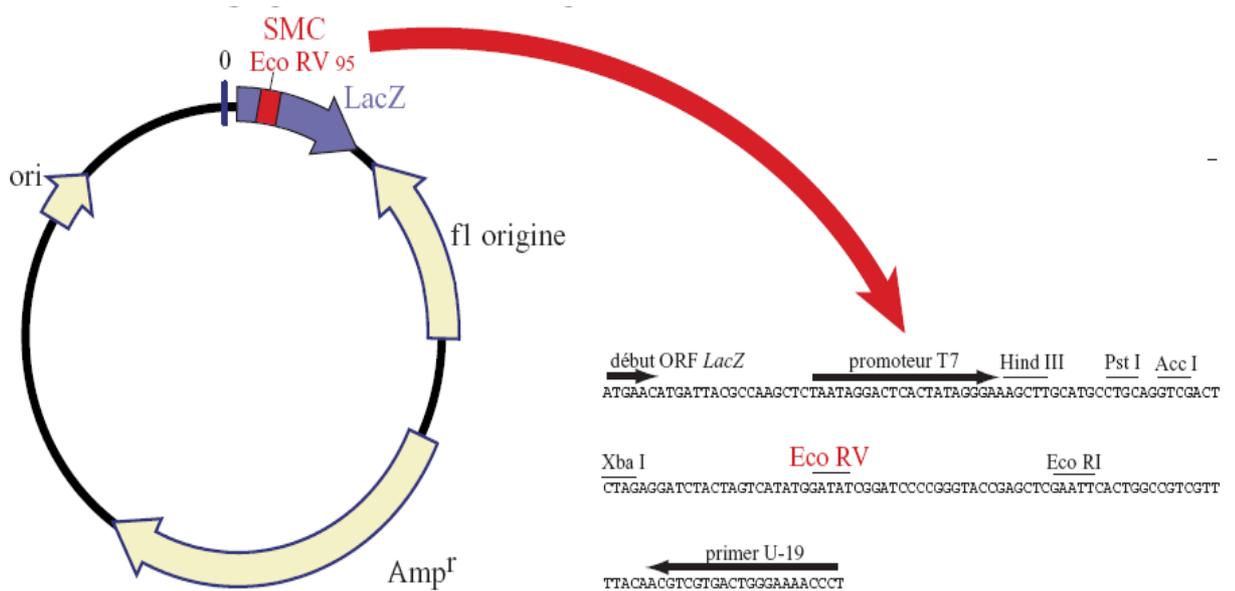


Figure 25 : Schéma du vecteur pBluescript employé pour la construction de la banque d'ADNc.

Le gène de l'ampicilline qui confère la résistance aux bactéries. Le détail du site multiple de clonage est indiqué à droite de la carte plasmidique : les sites de restriction KpnI et SacI employés pour l'insertion des fragments d'ADN d'intérêt.

B - Méthodes

B.1 - Obtention de jeunes plantes axéniques de lin

Des graines sont triées et stérilisées par un bain de 2 minutes dans l'éthanol 70 % puis de 20 minutes dans une solution commerciale d'eau de javel diluée contenant environ 2 % de chlore actif. Les graines sont agitées régulièrement. Après 3 rinçages de 5 minutes chacun dans de l'eau désionisée stérile, elles sont séchées sur du papier absorbant et déposées dans des pots à coprologie contenant 15 ml de milieu MS0 (annexe). Les pots sont placés dans une chambre de culture maintenue à 25°C, exposés à des conditions favorables de lumière (photopériode de 16 heures). Après 5 jours, les jeunes plantes possèdent un hypocotyle d'environ 1 cm de longueur.

B.2 - Culture et conservation des souches bactériennes

Culture sur milieu gélosé

Les souches bactériennes conservées à -80°C dans le milieu approprié contenant 15 % de glycérol sont étalées sur des boîtes de Petri contenant 25 mL de milieu gélosé additionné d'antibiotiques correspondant aux résistances portées par la souche concernée. Après 3 jours de culture à 28°C (*Agrobacterium tumefaciens*) ou une nuit à 37 °C (*Escherichia coli*), les boîtes de Pétri sont placées à 4°C pendant 1 mois maximum

Culture en milieu liquide

Un erlenmeyer contenant 25 mL de milieu liquide, additionné d'antibiotiques nécessaires à la sélection de la souche considérée, estensemencé avec une colonie prélevée sur milieu solide. La culture est alors incubée pendant une nuit à 28°C (*Agrobacterium tumefaciens*) ou à 37 °C (*Escherichia coli*) à 250 rpm.

B.3 - Protocole de transformation du lin par *A. tumefaciens*

Pour les expériences de transgénèse (Figure 26) nous avons utilisé un protocole établi par Frédéric Lamblin lors de sa thèse de doctorat (1999), dérivant de celui décrit par Mlynarova et al. (1994) et comprenant un certain nombre de modifications.

La culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (absorbance à 600nm proche de 1.0) est centrifugée durant 15 minutes à 3000 g et le culot est préalablement rincé avec du milieu MSR afin d'éliminer le reste de milieu YEB et d'antibiotiques avant d'être resuspendu dans 10 mL de ce milieu.

Les explants utilisés pour l'infection par *A. tumefaciens* sont des segments d'hypocotyles de 3 à 4 mm de longueur sectionnés à partir de plantes âgées de 5 jours.

Les explants sont immergés 2 heures dans la suspension bactérienne puis séchés sur papier filtre et repiqués sur du milieu de régénération MSR.

Après 2 jours de coculture, les hypocotyles sont lavés 3 fois dans une solution de timentin à 1 g.L^{-1} , séchés et repiqués dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MSR gélosé additionné de timentin à 500 g.L^{-1} et de la kanamycine à (250 g.L^{-1} pour le cv Barbara et 100 pour les cv Hermès et Diane).

Transformation du lin

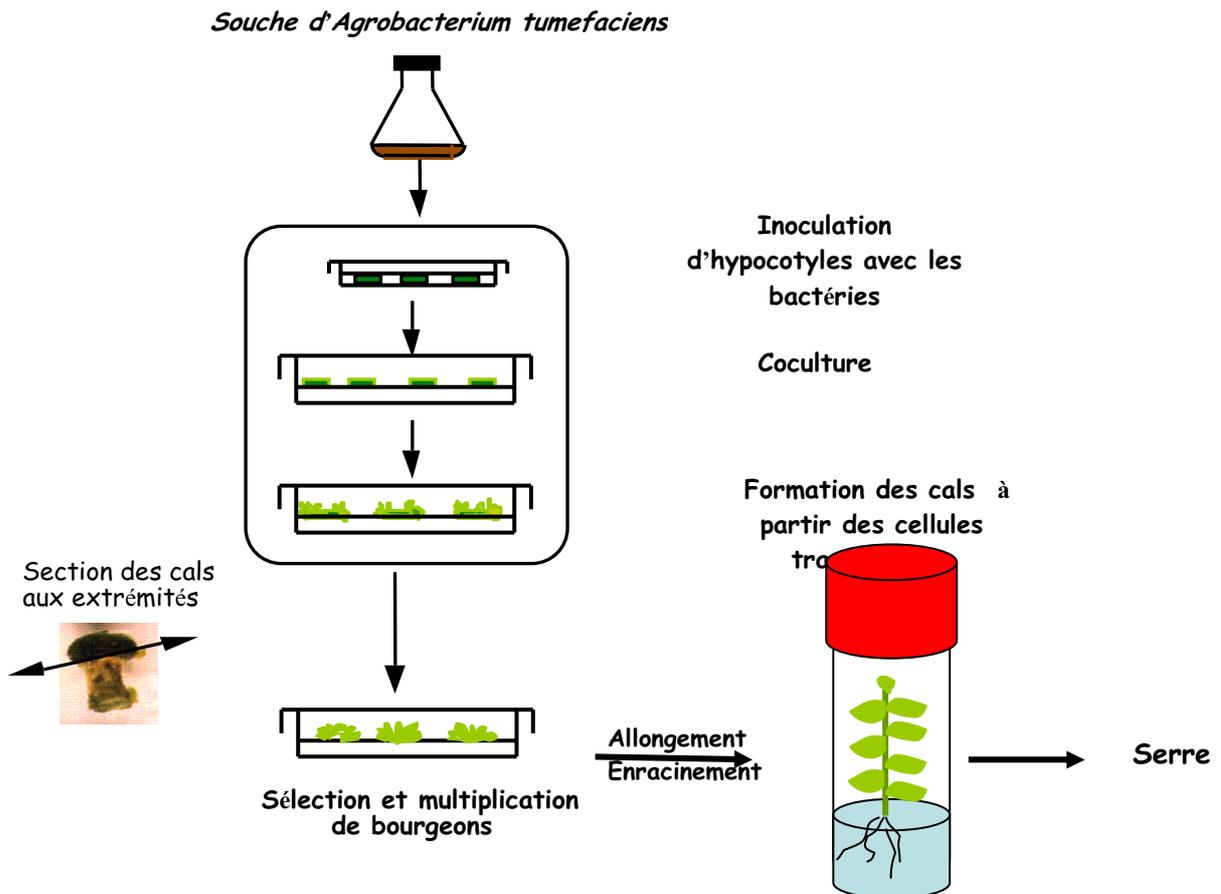


Figure 26 : Transformation du lin par *Agrobacterium tumefaciens*.

Après 2 semaines, les bourgeons se développant aux extrémités des hypocotyles sont sectionnés et repiqués sur le milieu de régénération contenant 500 g.L^{-1} de timentin et 200 g.L^{-1} de kanamycine pour la cv Barbara et 100 g.L^{-1} de kanamycine pour les cv Hermès et Diane). Les bourgeons chlorophylliens croissant activement sur milieu sélectif sont considérés comme potentiellement transgéniques et sont repiqués toutes les 3 semaines sur milieu MSR + kanamycine (200 g.L^{-1} cv Barbara et 100 g.L^{-1} cv Hermès et Diane) et timentin 250 g.L^{-1} .

Les bourgeons sont isolés et repiqués sur milieu le milieu MSR + kanamycine 100 g.L⁻¹ + timentin 250 g.L⁻¹ dans des pots copros. Les bourgeons capables de s'allonger sur un tel milieu sont alors sectionnés et repiqués en tube pyrex sur milieu d'enracinement RoA + kanamycine 50 g.L⁻¹ + timentin 250 g.L⁻¹.

A ce stade, on réalise un test de « recallusing », c'est à dire un contrôle de la résistance à la kanamycine. Pour cela, des feuilles de vitroplants témoins et transformés sont repiquées sur milieu MSR + kanamycine 200 g.L⁻¹. Seules les feuilles de vitroplants potentiellement transformés et résistants à la kanamycine sont capables de former du cal.

B.4 - Multiplication des clones de vitroplants

Un **clone de vitroplant** provient de la multiplication d'une pousse feuillée unique isolée d'un bourgeon (issu lui-même d'un explant initial donné). Pour la multiplication, l'apex d'un vitroplant ayant séjourné trois semaines sur milieu RoA est sélectionné à 4 cm du sommet puis repiqué en tube sur le même milieu. Des bourgeons axillaires (1 à 4) se développent à l'aisselle des feuilles et peuvent à leur tour être individualisés après 10 jours de culture.

B.5 - Transfert des vitroplants en serre

Afin d'étudier l'impact de la transgénèse sur des plantes cultivées en conditions semi-naturelles, des vitroplants de lin ont été transférés en serre S2 (niveau 2 de confinement).

Après trois semaines de culture sur milieu R0 les vitroplants de lin sont transférés en pot. Les vitroplants débarrassés de la gélose au niveau des racines sont placés dans des pots contenant un mélange « terre de champ-terreau », 1/1 préalablement stérilisé par autoclavage. Après avoir attaché à un tuteur chaque plante, ces dernières sont recouvertes d'une protection adéquate transparente (couvercle plastique) permettant un confinement nécessaire au maintien d'une hygrométrie importante. Cette protection sera retirée progressivement et la floraison des plantes de lin apparaît au bout de deux à trois mois. Les capsules sèches sont récupérées et les graines sont récoltées.

Les plantes de lin sont maintenues à 22°C, exposées à un photopériode de 16 heures avec un éclairage de 170 μmol.m⁻².s⁻¹ PAR.

B.6 - Techniques de biologie moléculaire

B.6.1 - Extraction et purification des acides nucléiques

B.6.1.1 - ADN génomique

Le protocole utilisé permet l'extraction à partir d'un grand nombre d'échantillons et convient pour l'obtention de matrice pour la PCR. Le matériel végétal (100 mg de feuilles ou de plantes tiges) est broyé dans un tube eppendorf en présence de 200 µL de tampon d'extraction (annexe). Les tubes sont incubés à 60 °C pendant 1 h. Après centrifugation (12000g, 15 min), le surnageant est prélevé et 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M) et un volume d'isopropanol sont ajoutés. La solution est incubée pendant 15 min à température ambiante et centrifugée (12000g, 15 min). Le surnageant est jeté et le culot est rincé avec 500 µL d'éthanol (70 %). Après centrifugation (12000g, 5 min), le culot est séché pendant 5 min à l'air libre et resuspendu dans 100 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

B.6.1.2 - ADN plasmidique

A partir d'une colonie unique prélevée sur milieu gélosé, une culture d'une nuit en phase liquide est réalisée. Deux mL de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance sont prélevés et centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 20 °C. L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du kit Plasmide Mini (Qiagen) selon les instructions de fournisseur.

B.6.1.3 - ARNs totaux

La qualité des extractions et purifications d'ARN est fortement liée à l'inactivation des RNases, des enzymes très actives et thermostables. Ainsi, la verrerie, les pinces et les spatules sont chauffées une nuit à 200°C ; le matériel plastique et les solutions sont traités pendant une nuit avec 0,1% de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (V/V) (Sigma). Le DEPC réagit

avec les groupements histidine et tyrosine des protéines. Après autoclavage détruisant le DEPC, le matériel est séché à 80°C et les solutions stockées jusqu'à l'emploi.

Les ARNs totaux sont extraits à partir de 100 mg de matière fraîche congelé à -80°C en utilisant le kit RNeasy plant kit (Qiagen). Les consignes d'utilisation du fabricant ont été suivies scrupuleusement.

B.6.2 - Dosage des acides nucléiques

Une analyse de la variation de l'absorbance dans une gamme de longueurs d'onde comprises entre 210 nm et 300 nm permet d'estimer :

- la quantité d'acides nucléiques dans l'extrait sachant qu'une unité DO à 260 nm correspond à une concentration de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ADN double brin ou d'ARN respectivement.
- Le niveau de pureté de l'extrait. Le rapport DO à 260 nm / DO à 280 nm donne une estimation de la contamination par des composés aromatiques. Le rapport DO à 260 nm / DO à 230 nm informe de la contamination par les polysaccharides. Idéalement, ces deux rapports doivent être compris entre 1,8 et 2.

B.6.3 - Digestion de l'ADN plasmidique

La digestion des plasmides s'effectue à l'aide d'enzyme de restriction (Roche) pendant 2 h à 37 °C. Le rapport [quantité de plasmide / quantité d'enzyme] était de 1 μg / 4 unités. Les enzymes de restriction sont ensuite inactivées pendant 15 min à 65 °C puis les fragments ainsi obtenus sont déphosphorylés en présence d'une unité de phosphatase (Roche) pendant 10 min à 37 °C puis l'enzyme est inactivée pendant 15 min à 65 °C. Les différentes étapes du clonage sont détaillés dans le chapitre "résultats".

B.6.4 - Purification de fragments digérés

Les fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique d'un plasmide sont séparés dans un gel d'agarose (1%). Les bandes sont visualisées sur le banc U.V, puis prélevées à

l'aide d'une lame de scalpel. La purification des fragments est effectuée à l'aide du Kit QiAquick (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

Si nécessaire, une précipitation en présence de 2 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium pendant 2 h à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ permet une concentration de l'ADN. Après centrifugation (13000g, 30 min), le culot est rincé à l'éthanol (70 %) et le tube est centrifugé à nouveau (13000g, 15 min). Le culot est séché puis repris dans l'eau.

Afin d'évaluer la concentration d'ADN, 1 μL est chargé dans un gel d'agarose (1 %) et l'intensité de fluorescence de la bande est comparée à celle d'un marqueur de taille de concentration connue (Smart ladder, Eurogentec). Ainsi, on peut en déduire la concentration d'ADN purifié.

B.6.5 - Clonage de fragments d'ADN

Les fragments purifiés sont clonés dans un vecteur plasmidique linéarisé. En présence de T4 ADN ligase (Roche), catalysant la formation de ponts phosphodiester entre les extrémités 3' OH et 5' phosphate, les fragments vont pouvoir être intégrés dans le vecteur qui va ainsi se recirculariser.

La ligation s'effectue dans le tampon optimisé pour l'enzyme (66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM ATP) du vecteur, de l'insert purifié et d'une unité de T4 ADN ligase. Le rapport molaire entre le vecteur et l'insert est de 1/3. Ainsi la quantité d'insert est déterminée selon le calcul suivant :

$$Q \text{ insert} = \frac{\text{Taille d'insert} \times Q \text{ vecteur}}{\text{Taille du vecteur}} \times 3$$

La réaction a lieu pendant 16 h à $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis 1 μL du mélange précédent est incubé avec 40 μL de solution bactérienne (électrocompétente) et soumis au champ électrique (200Ω , 2,5 kV) pendant 5 msec dans un électroporateur (Bio-Rad). Puis 960 μL de milieu SOC (annexe 2) sont immédiatement ajoutés et mélangés avec une pipette pasteur. Le mélange réactionnel est transféré dans un tube Falcon de 15 mL et incubé à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h à 200 rpm. Les bactéries contenant les plasmides sont sélectionnées par étalement sur un milieu LB solide contenant de l'antibiotique qui permet la sélection de bactéries transformées.

B.6.6 - Electrophorèse d'ADN

Le gel d'électrophorèse est préparé par dissolution de l'agarose dans 50 ml de tampon TAE (annexe) contenant du BET (150 µg/ml). On ajoute aux échantillons d'ADN 0,2 volumes de tampon de charge (voir annexe) et on procède aux dépôts dans les puits. Un marqueur de taille (voir Annexe) contenant une gamme de fragments d'ADN de longueur connue, est également déposé. La migration a lieu dans le tampon TAE sous une tension de 100 V. Après migration, le gel est observé sous un rayonnement Ultra-Violet à 312 nm. La taille est déterminée par comparaison avec le marqueur de taille. L'intensité de la coloration des fragments à analyser est comparée à celle du marqueur de taille et permet une estimation de la concentration de l'ADN.

B.6.7 - Amplification d'ADN par PCR

La PCR, réaction de polymérisation en chaîne, permet l'amplification d'une séquence d'intérêt à partir d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques (environ 20 nucléotides) spécifiques de la séquence d'ADN à amplifier. Cette technique est couramment utilisée pour détecter la présence de transgènes dans l'ADN de plantes transformées, la synthèse d'ADNc et le clonage. On choisira dans ce cas des amorces spécifiques des transgènes portés par l'ADN-T.

Un cycle de PCR comprend :

- Une étape de dénaturation (94 °C) durant laquelle les brins complémentaires de l'ADN matrice vont se séparer.

- Une étape d'hybridation (ou "annealing") des amorces sur chaque brin de la séquence à amplifier. La température d'hybridation (dépendant de la composition en bases des amorces, la teneur en GC notamment) joue un rôle primordial dans la spécificité de l'hybridation. Le maintien d'une température la plus élevée possible assure une plus forte stringence et limite les appariements non spécifiques.

- Une étape de polymérisation (72°C) au cours de laquelle une ADN polymérase (ou Taq polymérase) thermostable va synthétiser les brins complémentaires à partir des amorces. La durée de polymérisation varie avec la longueur de la séquence à amplifier (environ une minute pour 1 Kb).

Les réactions de PCR sont effectuées en utilisant l'ADN polymérase commercialisée par Proméga. Chaque réaction d'amplification (Volume réactionnel : 50 μ L) comprend les éléments suivants, aux quantités ou concentrations indiquées dans le Tableau 2 :

Matrice	ADN génomique	100 ng
	ADN Plasmidique	25 ng
Oligonucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP (dNTPs)		200 μ M de chaque
Tampon PCR		1 X
MgCl ₂		1,5 mM
Les 2 amorces spécifiques		1 μ M de chaque
Taq polymérase		2 unités

Tableau 2 : Composition du mélange réactionnel de PCR

Les tubes sont alors placés dans un thermocycleur dans lequel des cycles ont été programmés pour l'amplification de séquences données.

Les programmes de PCR comportent :

- 1 cycle de dénaturation de l'ADN matrice : 94 °C, 5 minutes
- 35 cycles d'amplification comprenant :
 - 1 étape de dénaturation : 94 °C, 1 minute
 - 1 étape d'hybridation : (entre 54 à 57°C), 1 minute
 - 1 étape de polymérisation : 72 °C, 1 minute
- 1 cycle de fin d'élongation : 4 minutes, 72°C

Les produits PCR sont ensuite conservés à -20 °C.

Dans le cadre de notre travail plusieurs amorces ont été choisi pour les différentes réactions de la PCR (Tableau 3) et la RT-PCR (Tableau 4).

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques de 5' en 3'	
NPTII1 NPTII2	GAGGCTATTCGGCTATGACTG ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	} Amorces du gène <i>nptII</i>
F2XTH10B10 R2XTH10B1	CTCGAGTCTAGACCTCCTCGACAAAACACTCAG GAATTCAAGCTTCCTTGTAGTGGGCCATGAAT	
F2XTH6B7 R2XTH6B7	CTCGAGTCTAGACTGGACTCATTCCCACATCA GGTACCAAGCTTGGTTTCCTCAGGTGCCTCTT	} Construction IR-PTGS
F2XTH9F12 R2XTH9F12	CTCGAGTCTAGAATTTGTGTCGCAGGAGCT GAATTCAAGCTTATGATGTGCGAATCAGTC	
F2XYL R2XYL	CTCGAGTCTAGATCAGACGACACACAGCAA GAATTCAAGCTTGGTCGAGTCCCATTACCA	
IntronA IntronB	CTTCTTCGTCTTACACATCACTTGTC CATTTGGATTGATTACAGTTGGGA	} Intron pHANNIBAL

Tableau 3 : Liste des amorces employées lors des différentes réactions de PCR.

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques de 5' en 3'	
F1CellS5B2 R1CellS5B2	ACACCAATTGGGGCTACAAG GTCGATCACTTTGCTCGTCA	} Amorces des gènes de la Cellulose Synthase
F1CellS7D6 R1CellS7D6	CGGTGGACCCATTAAAAGAA AAACCAGGACGTTTCTCACG	
F1CellS8C3 R1CellS8C3	TCAAGGGTTCTGCTCCAATC GAGCAAGGAGGTCCATTTGA	
F1CCR R1CCR	AGGCTACACTGTCAGAGGAACCGT CACTTGGTAGGGATAGGATACTCCGG	} Amoces de la Cinnamoyl CoenzymeA Reductase
F1Ubi R1Ubi	AGACCCTGACCGAAAGACAATCACT AGGGTTGACTCCTTCTGGATGTTG	} Amorces de l'ubiquitine
F1XET6B7 R1XET6B7	CTGGACTCATTCCCACATCA GGTTTCCTCAGGTGCCTCTT	} Amorces des gènes de la xyloglucane endo Transglycosylase/ Hydrolase
F1XET9F12 R1XET9F12	ATTTGTGTCGCAGGAGCTTT ATGATGTGCGAATCAGTCCA	
F1XET10B10 R1XET10B10	CCTCCTCGACAAAACACTCAG CCTTGTAGTGGGCCATGAAT	
F1Xyl R1Xyl	TCAGACGACACACAGCAACA GGTTCGAGTCCCATTACCAGA	} Amorces du gène de la \square -xylosidase
XYLINTUP XYLINTDOWN	CTTAACGGGTACATCGTCTCGGATTG GTTCTGAAGAAGGACGATACCTTG	
XYLUTRUP XYLUTRDOWN	GTAAGATAGGAGGCAGGGGCAAAG CTCTAGTCCATGAGTACATCCTC	

Tableau 4 : Liste des amorces employées lors des différentes réactions de la RT -PCR.

B.6.8 - RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)

La RT-PCR consiste à réaliser une PCR après transcription inverse d'un ARNm en ADNc (ADN complémentaire). Il s'agit donc d'une PCR « classique » réalisée sur des ADNc. Nous avons utilisé le kit « cloned AMV First-Strand cDNA synthesis Kit » (Invitrogen). Le déroulement se fait en deux étapes.

B.6.8.1 - Synthèse d'ADNc

La synthèse d'ADNc est réalisée par une transcriptase inverse, celle-ci est issue du rétrovirus du myéloblastome aviaire (AMV). Cette ADN polymérase utilise pour initier la synthèse d'ADNc une amorce oligo(dt) qui va hybrider avec la queue polyA des ARNm. Les ARNm sont extraits à l'aide du kit Rneasy Plant mini (Qiagen) et la synthèse d'ADNc est réalisée selon les instructions données par le fournisseur.

B.6.8.2 - PCR

La synthèse du second brin d'ADNc ainsi que la PCR sont effectués par la Taq polymérase. 1 μ L d'ADNc est utilisé pour réaliser la réaction PCR. Les amorces utilisées lors de la PCR sont précisées dans le tableau 3. Une amplification témoin est réalisée avec les amorces Ubi1 et Ubi2 (Tableau 3).

B.6.9 - Construction et exploitation d'une banque d'ADNc

B.6.9.1 - Construction de la banque

L'étude de l'ensemble des gènes exprimés dans un tissu à un moment spécifique implique l'analyse potentielle de tous les ARNm synthétisés dans ce tissu à ce moment. L'instabilité *in vitro* et la faible représentation de ces acides nucléiques nécessitent successivement leur copie en ADNc puis le clonage de ces derniers dans des bactériophages.

Une banque phagique d'ADNc a été construite à partir d'ARNm isolés des tissus externes de lin prélevés au stade floraison. L'ensemble des manipulations a été réalisé à partir de d'un kit commercialisés par la société Stratagène : cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA® Gigapack III. Les protocoles fournis ont été suivis sauf lors de la synthèse d'ADNc, effectué selon le protocole décrit précédemment.

B.6.9.2 - Titration de la banque

Ce facteur est déterminé par comptage des plages de lyse obtenues après culture des phages recombinants sur des bactéries XL1-Blue. Les phages étant inoculés à une dilution fixe, plusieurs dilutions doivent être testées afin de parvenir à un résultat présentant une faible marge d'erreur. Le résultat obtenu s'exprime en pfu.mL⁻¹ de banque (pfu : unité de formation de plages de lyse c'est à dire 1 phage).

B.6.9.3 - Obtention de plages de lyse

Les complexes bactéries XL1-Blue / phages recombinants sont obtenus en ajoutant à 600 µl de solution bactérienne XL1-Blue, 100 µL de banque diluée dans le tampon SM puis en incubant ce mélange à 37 °C pendant 30 min. La solution est ensuite ajoutée à 7 ml de milieu top-NZY qui est réparti avec homogénéité sur du milieu NZY coulé préalablement dans une boîte de Petri 12 x 12 cm. Les boîtes sont incubées à 37 °C jusqu'à l'obtention de plages de lyse de 1 mm de diamètre environ (~ 5 à 7 h), puis placées à 4°C.

B.6.9.4 - Séquençage de fragments d'ADN et analyse des séquences

Après culture liquide des bactéries, les plasmides ou les phagmides ont été purifiés, dosés et envoyés aux services de séquençage (Genoscreen, Lille).

Les séquences nucléotidiques obtenues sont comparées aux banques de données interrogeables en ligne à l'aide du programme BLAST disponible sur le serveur du National Center of Biotechnology Information à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

B.7 - Préparation de la paroi végétale

Les parois analysées sont obtenues, pour les tiges entières, les tissus internes et tissus externes de la manière suivante : 5g de matériel végétal congelé et broyé dans de l'azote liquide, et placé ensuite pendant 15 min à 70°C dans 20 mL d'éthanol 70% (V/V), afin d'inactiver les enzymes pariétales et de laver le contenu intracellulaire (Fry *et al.*, 1988). Après une centrifugation de 10 min à 5000g, la phase éthanol-soluble est alors prélevée et le culot est placé une deuxième fois dans 20 mL d'éthanol à 70% durant 15 min à 70°C. La phase éthanol est à nouveau éliminée, après une deuxième centrifugation de 10 min à 5000g, puis le culot est traité une troisième fois par 20 mL d'éthanol 70%. Une dernière fois, le surnageant éthanol est éliminé et le résidu éthanol-insoluble est assimilé à un extrait de parois brut. Cette paroi est lyophilisée et servira de base aux analyses pariétales.

B.8 - Extraction séquentielle des pectines et hémicellulose

Les polymères pectiques seront extraits par chauffage durant 2 heures à 100°C dans une solution d'oxalate d'ammonium 0,5% (p/v). Après centrifugation pendant 10 min à 5000g, cette extraction est effectuée une seconde fois. Les surnageants sont réunis, neutralisés par du NaOH et laissés en attente avant d'être dialysés. Le culot est lavé par deux fois 20 mL de NaOH 4 M, et laissé à agiter pendant une nuit à 4°C afin de solubiliser les composés hémicellulosiques. L'extrait NaOH est neutralisé par ajout de l'acide chlorhydrique (6N). Lors de la neutralisation, les hémicelluloses précipitent partiellement, et seule la partie soluble (séparée du précipité après centrifugation 10 min à 5000g) sera par la suite dialysée. A ce stade, le culot sera lavé à nouveau par deux fois 20 mL de ddH₂O, puis lyophilisé afin d'analyser son contenu en monosaccharides, permettant de vérifier ainsi la qualité de l'extraction séquentielle des pectines et des hémicelluloses.

B.9 - Dialyse des fractions Oxalate et NaOH :

La neutralisation des surnageants issus des extractions oxalate et NaOH est vérifiée à l'aide du pH-mètre, ces derniers sont alors filtrés et placés dans des membranes de dialyse ayant un seuil de coupure de 1000 Da (Spectra/Por® MWCO : 1000), et mis à dialyser contre de l'eau déionisée changée régulièrement durant 48 heures. Le contenu des membranes de dialyse est alors prélevé, congelé puis lyophilisé.

B.10 - Empreinte enzymatique des hémicelluloses

B.10.1 - Digestion des xyloglucanes et des xylanes pariétaux

Les xyloglucanes contenus dans la paroi peuvent être hydrolysés par une endo- β -glucanase afin de générer des xyloglucanes-oligosaccharides caractéristiques du polymère digéré. Les xylanes sont digérés par une endo-xylanase. Pour cela, l'extrait NaOH dialysé et lyophilisé est repris dans 2,5 mL d'acétate d'ammonium 10 mM pH 5,5. Pour l'hydrolyse des xyloglucanes, on rajoute à 0,5 mL de cet extrait 2,5 unités d'endo- β -glucanase (Mégazyme) le tout est placé sous agitation, afin de maintenir le matériel pariétal en suspension durant la digestion (18 heures à 37 °C). Au terme de la digestion, 3 volumes d'éthanol 95% sont rajoutés afin d'inactiver l'enzyme. Le surnageant est prélevé, et lyophilisé et repris dans de l'eau ultra pure. Pour l'hydrolyse des xylanes, le même volume est traité par 1 unité d'endo-xylanase (Mégazyme) et la digestion se fait à 28°C. 1 μ L de chaque extrait est analysé en spectrométrie de masse MALDI-TOF et 40 μ L seront nécessaires pour l'analyse en chromatographie HPEAC-PAD.

B.10.2 - Analyse MALDI-TOF des xyloglucanes et xylanes

Un microlitre de chaque échantillon (contenant les fragments de digestion de xyloglucanes et de xylanes) est co-cristallisé avec 1 μ L d'une solution d'acide 2,5 dihydrobenzoïque (DHB), obtenue par dissolution de 5 mg de DHB dans 500 μ l d'un mélange acétonétrile / TFA 0,1 %, 70/30 (v/v). Le mélange échantillon-matrice obtenu est homogénéisé et 1 μ L de cette solution est déposé sur une cible en inox. Le solvant est laissé évaporé à l'air libre et l'échantillon co-cristallise alors avec la matrice. Les mesures de spectromètre de masse MALDI-TOF ont été enregistrées sur un spectromètre à temps de vol TOF SPEC E commercialisé par la société Micromass (Manchester, Royaume-Uni), équipé d'une source à ionisation laser. Le temps d'impact du laser à azote ($\lambda = 337$ nm) est de 4 ns. Les vides réalisés au niveau de la source et de l'analyseur sont respectivement de l'ordre de 10^{-7} et 10^{-6} mbars. Tous les spectres MALDI-TOF présentés dans ce mémoire ont été obtenus en mode d'ionisation positif. Les spectres de masse sont enregistrés en mode réflectron mesurant ainsi les masses monoisotopiques. En mode réflectron, les ions sont accélérés sous une tension d'accélération de 20 kV. Le potentiel du réflectron est de 26 kV. L'énergie du

laser fixée initialement à 180 μJ est optimisée au moyen d'un filtre et d'un diaphragme lors de la réalisation de chaque spectre. Chaque spectre est obtenu en réalisant une moyenne de 100 tirs lasers par spectre. Tous les spectres ont été lissés et calibrés de façon externe avec un kit provenant de la société Applied Biosystems (Sequazme Peptide Mass Standards Kit).

B.10.3 - Analyse HPAEC-PAD des fragments de xyloglucane et de xylane

La chromatographie HPAEC-PAD des fragments des hémicelluloses générés par l'endo-glucanase et l'endo-xylanase est réalisée avec un système DX 500 (Dionex, sunnyval, CA) équipé d'une pompe à gradient GP 50. La séparation des oligosaccharides résultant de l'hydrolyse enzymatique est obtenue sur une colonne d'échange d'anions Carbopac-PA (6 x 250 mm, DIONEX) par chromatographie d'échange d'anions à pH élevé couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPEAC-PAD). L'HPEAC-PAD est un système chromatographique de type HPLC qui permet de séparer, sans dérivation préalable, les mono ou oligosaccharides de structures voisines. Pour cela, les fonctions alcools des sucres sont ionisées à pH basique et la séparation des mono ou oligosaccharides chargés se fait en fonction de leur pKa. Ensuite, les mono ou oligosaccharides sont visualisés grâce à un détecteur ampérométrique pulsé. Celui-ci détecte les sucres en utilisant leur caractère oxydo-réducteur. Ceci en suivant un mécanisme électrocatalytique basé sur une séquence de trois potentiels appliqués successivement sur des électrodes. Le premier potentiel de détection oxyde les fonctions secondaires des glucides sur une électrode en or, le deuxième oxyde tous les produits organiques restants tandis que le troisième potentiel réduit l'oxydation de l'électrode qui revient à son état initial. L'ampèremètre impulsif (PAD) gère les potentiels de la cellule et amplifie le signal qu'il transmet à un intégrateur/enregistreur de traitement des données. Le gradient utilisé pour la séparation des oligosaccharides passe de 100 mM NaOH (Solvant A) au solvant B contenant 1 M NaOAc dans 100 mM NaOH à un débit de 1 mL.min⁻¹, dans les conditions suivantes : 0 min, 100% A ; 5 min, 95% A ; 30 min, 92% A ; 35 min, 87% A ; 40 min, 85% A ; 42 min, 100% B ; 50 min, 100% A.

B.11 – Activités β -xylosidase

La β -xylosidase est une enzyme qui hydrolyse les chaînes de xylane. Pour mesurer cette activité nous avons utilisé comme substrat la 4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside (Figure 27) et le 4-Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside (Figure 28) (Sigma)

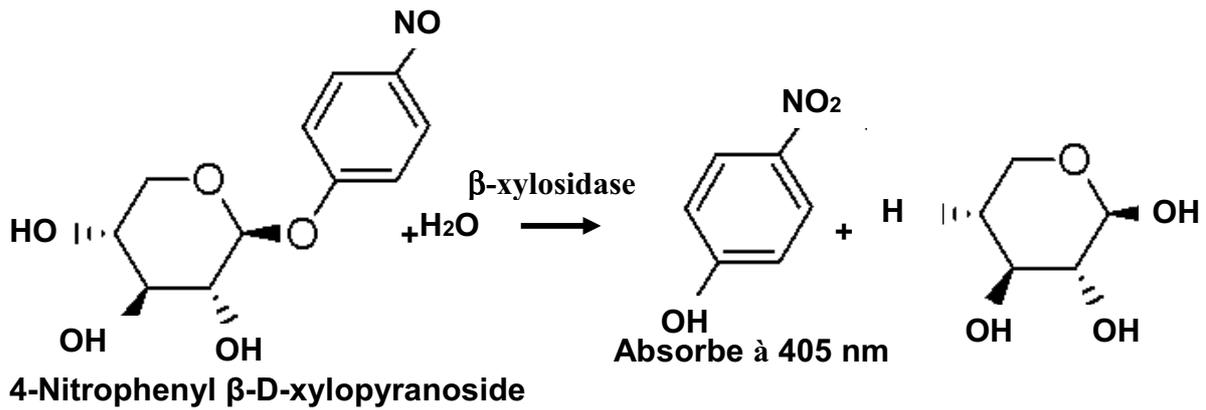


Figure 27 : Hydrolyse de la 4-Nitophenyl β -D-xylopyranoside par la β -xylosidase.

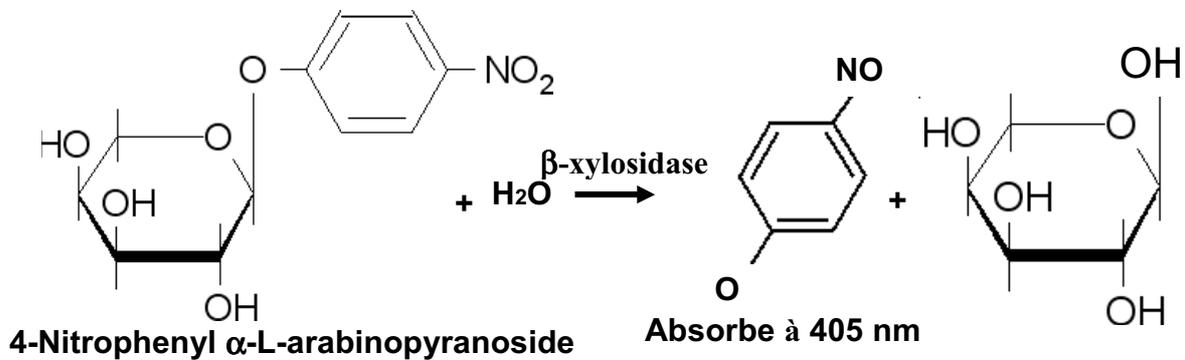


Figure 28 : Hydrolyse de la 4-Nitophenyl α -L-arabinofuranoside par la β -xylosidase.

Le protocole expérimental se déroule en 2 étapes :

- Préparation d'extrait protéique (D'après Minic et al., 2004)

Pour chaque échantillon (tissu externe, tissu interne et tige entière), 500 mg de matière fraîche congelée sont broyées sur la glace à l'aide d'un mortier dans 2 mL de tampon d'extraction (annexe). Le broyat est transféré dans un tube Falcon maintenu dans la glace.

Après une centrifugation (10000g pendant 5 min à 4°C), le surnageant est transféré dans un microtube puis centrifugé à 17000 g pendant 15 min. Le surnageant contenant les protéines solubles est transféré dans un nouveau tube conservé dans la glace. Le dosage protéique est effectué selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le réactif de Bradford (Biorad). A 790 μ L d'eau et 200 μ L de réactif, on ajoute 10 μ L d'extrait protéique. Après homogénéisation,

une lecture est faite au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration en protéines dans les extraits est déterminée par rapport à une gamme étalon de sérum albumine bovine.

- Réalisation de l'essai :

Le protocole expérimental est adapté de celui proposé par Minic et al. (2004). L'essai est réalisé dans un volume réactionnel de 500 μ L comprenant un tampon d'incubation contenant 0,1 M tampon acétate, 2 mM de sodium azide dans lequel on rajoute 2mM de substrats, et 100 μ L d'extrait protéique. Le mélange réactionnel est placé dans un bain marie à 37 °C. La réaction est arrêtée après 60 min en rajoutant 500 μ L de bicarbonate de sodium (0,4 M). La mesure de l'activité enzymatique est effectuée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 405 nm. Les activités enzymatiques, exprimées en nanokatal par mg de protéines, sont déterminées selon le calcul détaillé dans l'annexe.

B.12 – Techniques de cytologie

B.12.1 - Préparation des coupes

Les observations microscopiques sont réalisées sur les tiges de lins âgés de 1 et 2 mois. Les coupes sont réalisées à la main à l'aide d'une tige de moelle de sureau et une lame de rasoir. Toutes les observations ont été réalisées sur un microscope Olympus BH-2. Les prises de vue ont été faites à l'aide d'une caméra digitale Olympus C-3030.

B.12.2 - Coloration au bleu de toluidine

Les coupes sont colorées dans une solution aqueuse de bleu de toluidine à 0,5 % pendant 20 secondes puis rincées avec de l'eau déminéralisée et les coupes sont enfin montées dans de l'EUKITT.

B.12.3 -Réaction de Weisner

Lors de la réaction de Weisner, les coupes déposées sur une lame de verre ont été recouvertes d'une solution de phloroglucinol (Prolabo) à 2 % (p/v) dans l'alcool à 95 %. Après évaporation quasi totale de l'alcool, les sections de tiges sont montées entre lame et lamelle dans une solution d'HCl à 6 N puis observées et photographiées immédiatement, la coloration n'étant pas stable que 15 min environ.

RESULTATS ET DISCUSSION

**Chapitre I : Analyse d'expression et classification fonctionnelle
d'ESTs issus des tissus externes de tiges de lin (*Linum
usitatissimum*)**

Publication: Plant Biology

Article:**ESTs from the Fibre-Bearing Stem Tissues of Flax (*Linum usitatissimum* L.):
Expression Analyses of Sequences Related to Cell Wall****Résumé de l'article**

Pour mieux comprendre la diversité des gènes exprimés pendant la formation de la paroi cellulaire des fibres de lin, environ un millier d'ESTs ont été séquencés à partir de la banque d'ADNc de tissus externes de tiges de lin (cv Hermès) récoltés au stade mi-floraison. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Plant Biology*. L'emploi d'une approche globale génomique par le séquençage d'ESTs est prouvé comme extrêmement utile pour obtenir une vision générale du profil d'expression d'un tissu à un stade précis (Sterky et al., 1998; Carson et al., 2002). Après séquençage, 65 % des EST ont été identifiées par comparaison avec les banques de données disponibles en ligne (outil BLAST X : www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Les 35 % restants correspondent à des séquences inconnues (13%) ou codent pour des protéines retrouvées chez *Arabidopsis* mais de fonctions inconnues (22%).

Le regroupement fonctionnel des EST identifiées a conduit à établir 14 catégories. La proportion de chaque catégorie reflète la fonction physiologique du tissu dont est issue la banque. Dans les tissus externes au stade floraison, 4,4 % des gènes exprimés sont impliqués dans la synthèse de composés pariétaux. Cette proportion est un peu plus forte que chez un conifère, *cryptomeria*, 3 % (Ujino-Ihara et al., 2000), mais beaucoup plus faible que celle observée chez le peuplier, 7 % (Sterky et al., 1998). Parmi les 37 gènes identifiés, 29 correspondent à des gènes associés à la synthèse de composants polysaccharidiques et 6 à des peroxydases. Le nombre d'ESTs associé à des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes représente 0,2 %, soit 2 gènes, dont un code pour une COMT «acide Caféique/ acide 5-hydroxyférulique *O*-MéthylTransférase» et l'autre pour une C4H "Cinnamate 4-Hydrolase". Cette proportion est nettement inférieure à celle obtenue dans le peuplier à partir d'ESTs de cambium et de xylème en développement (21%) (Sterky et al., 1998). Ce faible pourcentage est en accord avec l'hypolignification marquée des fibres. Dans la collection d'ESTs on a également trouvé 3 ESTs correspondant aux gènes de la cellulose

synthase. Deux de ces séquences (EST 7D6 et 5B2) montrent une forte similarité avec les gènes d'*Arabidopsis* respectivement *AtCesA3* et *AtCesA1*. Le troisième EST (8C3) montre une forte similarité avec le gène *AtCesA1*. Sachant que la cellulose représente 65 à 85 % de la masse des fibres et constitue 65 à 80 % de la paroi secondaire de lin (Morvan et al., 1989), ces gènes peuvent être associés à la déposition accrue de la cellulose au niveau de la paroi secondaire.

Trois ESTs correspondant aux xyloglucane endotransglycosylase/hydrolases (XTHs) sont présentés dans la collection des EST. Ces gènes jouent un rôle primordial dans la mise en place et la modification de la paroi secondaire, ils sont responsables de la coupure et de la re-ligature des chaînes de xyloglucanes au niveau des fractions hémicellulosiques de la paroi primaire de la cellule (Carpita & Gibeaut, 1993). L'expansion cellulaire des parois durant la croissance dépend de la capacité de glissement des microfibrilles de cellulose, donc le relâchement de la paroi cellulaire peut se faire quand les xyloglucanes qui relient les microfibrilles de cellulose sont relâchés (Minorsky, 2002 ; Rose et al., 2002).

Le groupe d'ESTs le plus exprimé dans la banque correspond à un gène codant une β -xylosidase (15 séquences). La β -xylosidase est une enzyme impliquée dans le développement de la paroi. Plusieurs β -xylosidases ont été isolées de plusieurs champignons et bactéries, ces enzymes ont montré un rôle important dans l'hydrolyse des xylanes (Van Peij et al., 1997). D'une manière générale, ces composés sont constitués d'une chaîne linéaire principale de résidus xyloxyliques reliés par une liaison β -(1-4) sur laquelle sont branchés des résidus d'arabinose (arabinoxylanes) et/ou d'acide glucuronique (glucuronoxylane, glucuronoarabinoxylanes) qui sont abondamment retrouvés dans les parois secondaires des dicotylédones. Ces hémicelluloses jouent un rôle important dans l'organisation et la mise en place de la paroi cellulaire en interagissant à la fois avec la cellulose et les lignines.

ESTs from the Fibre-Bearing Stem Tissues of Flax (*Linum usitatissimum* L.): Expression Analyses of Sequences Related to Cell Wall Development

A. Day^{1,2}, M. Addi¹, W. Kim¹, H. David¹, F. Bert³, P. Mesnage⁴, C. Rolando⁵, B. Chabbert², G. Neutelings¹, and S. Hawkins¹

¹Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales UPRES EA 3568 USC-INRA, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

²Équipe Parois et Matériaux Fibreux, UMR FARE, BP 224, 51686 Reims cedex 2, France

³Institut Technique du Lin, Paris, France

⁴Institut Français Textile-Habillement, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

⁵Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, UPRES SA CNRS 8009, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received: July 14, 2004; Accepted: October 13, 2004

Abstract: In order to learn more about the diversity of genes expressed during flax fibre cell wall formation, expressed sequence tags (ESTs) were obtained from a cDNA library derived from the outer fibre-bearing tissues of flax (*Linum usitatissimum*) stems (cv Hermes) harvested at the mid-flowering stage. After elimination of vector and unreadable sequences, 927 ESTs were grouped into 67 clusters and 754 singletons. The flax ESTs have been submitted to the dbEST and GenBank databases with the accession numbers 25939634–25940560 (dbEST) and CV478070–CV478996 (GenBank). Functional analysis allowed the grouping of ESTs into 13 functional categories and revealed that 62% of ESTs were similar to known sequences, while 12.4% of ESTs presented no similarity to any known sequences and 25.6% of ESTs corresponded to proteins of unknown function. The most highly expressed transcripts belonged to four functional categories: protein maturation and metabolism (31 ESTs), signalling (22 ESTs), the cell wall (21 ESTs) and photosynthesis (19 ESTs). 4.4% (41) of the total ESTs were potentially related to cell wall formation and maturation. The most highly expressed cell wall EST (15 ESTs) corresponded to a β -xylosidase gene – potentially involved in cell wall remodelling during growth and development. Other cell wall-related ESTs corresponded to cellulose synthase, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH), β -galactosidases, and peroxidases. The expression patterns of different cell wall-related ESTs were determined at different developmental stages in flax plants grown under different field conditions. The potential roles of gene products associated with cell wall related ESTs in fibre cell wall development is discussed.

Key words: Fibres, flax, cell wall, expressed sequence tags (ESTs), cellulose, hemicelluloses.

Abbreviations:

CCR: cinnamoyl coenzyme A reductase

XTH: xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase

Introduction

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is an important source of cellulose-rich natural fibres (bast fibres) that are used in the textile and composite polymer industries (Van de Velde and Baetens, 2001; Baley, 2002). In the plant stem, individual fibres (elementary fibres) are "glued together" by their middle lamella with "a cementing material" to form fibre bundles. Both fibres and fibre bundles are orientated parallel to the longitudinal axis of the stem, thereby providing mechanical support to the plant (McDougall et al., 1993; Roland et al., 1995). In cultivars grown for the textile industry (e.g., Hermes), fibre bundles are the main components of the external stem tissues, together with smaller amounts of secondary phloem, cortex, and epidermis.

The physical properties of the fibres are determined by the chemical and structural properties of the different cell wall polymers, as well as their spatial organization within the cell wall. The mature fibre is characterized by an extremely thick secondary cell wall containing 60–70% cellulose, consisting of orientated microfibrils embedded in a matrix of different polymers, including hemicelluloses, pectins, proteins, and lignins (Gorshkova et al., 1996; Girault et al., 2000; Morvan et al., 2003). While cellulose is thought to play a predominant role in determining the mechanical properties of the fibre cell wall, other components of the cell wall matrix contribute to the overall properties of the fibres (Girault et al., 1997). For example, recent work in our laboratory (Day et al., unpublished) suggests that flax bast fibres contain low amounts of an atypical, highly condensed lignin rich in *p*-hydroxyphenyl (H) units. In this case, it is possible that it is the combination of high cellulose and low, "special" lignin that is responsible for the interesting physico-chemical properties of flax bast fibres.

However, the cell wall is a highly complex, dynamic structure and it is clear that many other genes (in addition to those involved in lignification) are involved in the process of fibre cell wall formation. In *Arabidopsis*, over 420 genes can be assigned probable roles in pathways responsible for the synthesis and modification of cell wall polymers, for example, 12 genes encode cellulose synthase and 29 other genes encode six families of structurally related enzymes thought to synthesize oth-

Zeitschrift	Plant Biology PB536	Satzbetrieb	Ziegler + Müller
AK-PDF	tt.mm.jj	Verlag	Thieme/Frau Schwägler
eF-Upload	tt.mm.jj	Datum	15.11.2004

2 Plant Biology 7 (2005)

A. Day et al.

er major polysaccharides (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Similarly, approximately 150 genes (polygalacturonases, pectate lyases, pectin esterases) are involved in pectin metabolism and modification. The elevated number of genes (130: β -1,3-glucanases, xyloglucan endotransglucosylases [XTHs], cellulases, expansins) reflects the importance of cell wall remodelling during growth. It is believed that the high degree of apparent redundancy in the genes for cell wall metabolism might actually reflect differences in substrate specificity by some of the enzymes necessary for the controlled heterogeneity of cell wall composition in different cell types (Carpita and Vergara, 1998). A large number of genes involved in wall metabolism have yet to be identified and it is therefore likely that a substantial number of genes of currently unknown function may be involved in cell wall metabolism.

While the majority of molecular and chemical investigations of secondary cell wall formation have concentrated on xylem formation in model plants such as *Arabidopsis thaliana*, hybrid poplar (*Populus tremula* L. \times *tremuloides*), and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Zhong et al., 2001), interest is now starting to be shown for the formation of bast fibres in a number of annual dicotyledonous plants such as flax (*Linum usitatissimum* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.), lucerne (*Medicago sativa* L.), kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), and jute (*Corchorus olitrius*). Bast fibres represent a biologically interesting and alternative model for the study of extensive secondary cell wall formation since their secondary cell walls are hypo-lignified, as opposed to the typically heavily lignified xylem tissues studied in *Arabidopsis* and poplar. In such a context, flax is particularly well placed since only ramie fibres contain less lignin, in addition, flax has already been proposed to represent a good model for such investigations, both at the genetic and biochemical level (Gorshkova et al., 1996). A better understanding of the molecular processes controlling fibre formation should allow improvement of fibre quality and processing.

As part of our investigation into the molecular mechanisms underlying fibre cell wall formation and maturation in flax plants, we decided to generate ESTs derived from a cDNA library of the outer fibre-bearing tissues of flax (cv Hermes) stems harvested at the mid-flowering stage. This stage was chosen since bast fibre maturation, as determined by the increase in secondary cell wall diameter, occurs between the initiation of flowering and capsule maturation (Morvan et al., 2003). The recent use of global genomic approaches through the generation of expressed sequence tags (ESTs) corresponding to different species and/or tissues is proving to be extremely useful in obtaining a general picture of gene expression patterns in specific tissues (Sterkey et al., 1998; Ujino-Ihara et al., 2000; Zhang et al., 2001; Carson et al., 2002; Channelière et al., 2002). In this paper, we present the functional analysis of our flax EST collection and discuss the potential roles of cell wall-associated genes. In addition, we have investigated the expression patterns of a number of potentially cell wall-related genes identified in the EST collection in flax plants at different developmental stages and grown under different agricultural conditions.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Flax plants (*Linum usitatissimum* L. cv Hermes) were grown under field conditions at Dunkerque (Northern France) by professional flax producers. Plants were harvested at the mid-flowering stage for the construction of the cDNA library; and at four different developmental stages for the expression studies: (1) vegetative, (2) first flower, (3) mid-flowering, (4) green capsule. Plants used for the expression studies were grown under four different conditions (Fisher blocks with four duplications): (1) absence of nitrogen (ammonium nitrate, 30 units ha⁻¹), absence of growth regulator (Parlay C, Syngenta Agro; 0.2 L ha⁻¹) (-N/-R), (2) absence of added nitrogen, presence of added growth regulators (-N/+R), (3) presence of added nitrogen, absence of added growth regulators (+N/-R), (4) presence of added nitrogen, presence of added growth regulators (+N/+R).

Following harvest, roots, leaves, and flowers were cut off and discarded, as were the bottom 10 cm of the stem. The following 15-cm section of the stem was then isolated and the outer fibre-bearing tissues peeled off and immediately frozen in liquid nitrogen.

Construction of the cDNA library

Total RNA was isolated from frozen outer stem tissues of flax plants harvested at the mid-flowering stage in 2001. Plant material was ground to a powder in liquid nitrogen and extraction reagent (0.18 M Tris-HCl pH 8.2, 4.5 mM EDTA, 90 mM LiCl, 1% SDS) was added (10 ml g⁻¹ f. wt.). One half volume of PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol) was further added and the mixture was centrifuged at 17 700 g for 20 min at 4°C. The aqueous phase was re-extracted twice with PCI and once with CI (chloroform/isoamyl alcohol). RNA was precipitated overnight at 4°C by addition of LiCl (2 M final concentration) and recovered by centrifugation at 17 700 g for 20 min at 4°C. The pellet was resuspended in water and RNA was precipitated by addition of 0.1 vol of 3 M sodium acetate and 2 vol of ethanol. After 2 h at -80°C, a pellet was recovered as above, rinsed with 70% ethanol and resuspended in water. Poly (A)⁺ RNA was isolated using the PolyATtract mRNA isolation system IV (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. The library was constructed with a cDNA library construction kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were directionally cloned into the λ ZAPII vector between *EcoR* I and *Xho* I. cDNA clones were excised with the ExAssist helper phage and individual bacterial colonies containing the pBlueScript phagemid were obtained.

DNA sequencing

Escherichia coli bacteria were plated at low density on petri dishes containing Luria-Bertani broth (Sambrook et al., 1989), 15 mg/L tetracycline and 50 mg/L ampicillin. Colonies were randomly picked and grown individually on the same liquid medium. Single run sequencing reactions were performed with the standard T3 sequencing primer and, thus, read into the presumed 5' end of each cDNA. Reactions were run and analysed on a capillary ABI 3700 (Applied Biosystems) automatic sequencer (Genoscreen, Lille, France).

Zeitschrift	Plant Biology P8536	Satzbetrieb	Ziegler + Müller
AK-PDF	tt.mm.jj	Verlag	Thieme/Frau Schwägler
ef-Upload	tt.mm.jj	Datum	15.11.2004

ESTs from Flax outer Stem Tissues

Plant Biology 7 (2005) 3

Sequence analysis

Data analysis was performed on Macintosh computer. Vector and poor quality sequences at the 3' end were eliminated manually. The similarity analysis for each sequence was performed using the Blastn and Blastx algorithms against GenBank at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Similarities between flax EST sequences and known sequences were considered as significant when *E* score values were below 10^{-5} . Only the lowest score was considered among all the Blast results obtained by the database search. When this score was higher than 10^{-5} , the sequences were classified in the "no hits" category. Other categories were built on the results of the Blast search and, in some cases, PubMed searches were performed. The 938 flax ESTs have been submitted to the dbEST and GenBank databases with the accession numbers 25939634–25940560 (dbEST) and CV478070–CV478996 (GenBank).

Determination of transcript levels using RT-PCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Plant Kit (Qiagen) and treated with "DNA-free" (Ambion). The reverse transcription reactions were performed using the AMV first strand synthesis kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The cDNA was used in 25 µl PCR reactions. Since we are primarily interested in fibre cell wall formation and maturation, we decided to investigate the expression patterns of a number of genes (all identified in our EST collection except for *Cinnamoyl Coenzyme A Reductase*) potentially associated with different cell wall polymers: (1) cellulose (3 cellulose synthase ESTs, 5B2, 7D6, 8C3); (2) hemicelluloses (3 XTH ESTs, 6B7, 9F12, 10B10; 1 β-xylidase EST, Xyl), (3) lignin (1 cinnamoyl Coenzyme A-reductase sequence, CCR). Different primer pairs, annealing temperatures, and cycle numbers were used for cDNA amplification: F1Xyl (TCA GAC GAC ACA CAG CAA) and R1Xyl (CGG TCG AGT CCC ATT ACC A) at 52 °C, 30 cycles for xylidase transcripts, F1CCR (AGG CTA CAC TGT CAG AGG AAC CGT) and R1CCR (CAC TTG GTA GGG ATA GGA TAC TCC GG) at 53 °C, 28 cycles for CCR transcripts, F1CS5B2 (ACA CCA ATT GGG GCT ACA AG) and R1CS5B2 (GTC GAT CAC TTT GCT CGT CA), F1CS7D6 (CGG TGG ACC CAT TAA AAG AA) and R1CS7D6 (AAA CCA GGA CGT TTC TCA CG), F1CS8C3 (TCA AGG GTT CTG CTC CAA TC) and R1CS8C3 (GAG CAA GGA GGT CCA TTT GA) at 55 °C, 32 cycles for the amplification of 3 cellulose synthase transcripts, F1XTH6B7 (CTG GAC TCA TTC CCA CAT CA) and R1XTH6B7 (GGT TTC CTC AGG TGC CTC TT), F1XTH9F12 (ATT TGT GTC GCA GGA GCT) and R1XTH9F12 (ATG ATG TGC GAA TCA GTC), F1XTH10B10 (CCT CCT CGA CCA AAA CTC AG) and R1XTH10B10 (CCT TGT AGT GGG CCA TGA AT) at 55 °C, 27 cycles for the amplification of 3 XTH transcripts. The different preparations were normalized by parallel amplification of the constitutively expressed ubiquitin transcripts with F1UBI (AGA CCC TGA CCG GAA AGA CAA TCA CT) and R1UBI (AGG GTT GAC TCC TTC TGG ATG TTG) at 55 °C, 30 cycles. Amplifications were conducted in an Eppendorf Mastercycler and 10 µl of each product was examined by electrophoresis on a 1.2% agarose gel.

Results and Discussion

Construction and characterization of the cDNA library

PolyA⁺ mRNA was purified from outer tissues (Fig. 1) of flax stems. These tissues, mainly fibre bundles but also including epidermis, cortical parenchyma, and secondary phloem, were peeled off the stems of plants at the flowering stage. The primary library contained 1×10^6 recombinant phages, indicating adequate representation of the expressed genes, and the recombination frequency was about 99%. The insert size, indicated by PCR amplification on 30 randomly picked clones, ranged between 500 and 1500 bp. The read-length after vector and quality clipping was about 600 bp. The plasmid-containing bacteria were obtained by *in vivo* excision and 950 clones were randomly picked for sequencing. A total of 927 individual 5'-ESTs were retained after non-recombinant plasmid and poor quality sequence removal.

Sequence analyses and functional classification

After elimination of vector and unreadable sequences (12), the remaining 927 flax outer stem ESTs were cluster analysed using TIGEM. Sequences could be grouped into 67 clusters (179 sequences) and 754 singletons. The redundancy of the EST collection was therefore calculated to be 19.1%. BlastX analyses of the flax EST collection were then used to group the ESTs into different functional categories (Fig. 2).

Such analyses revealed that 62% of the total ESTs (excluding vector and unreadable sequences) were similar to known sequences. Such a figure is comparable to that previously observed in other EST programmes (65%: poplar cambial region library, Sterkey et al., 1998; 61.6%: *Cryptomeria japonica* inner bark library, Ujino-Ihara et al., 2000). Of the remaining 38% (357 ESTs), 12.4% (117 ESTs) presented no similarity to any known sequences (no hits), while 25.6% (240 ESTs) corresponded to proteins of unknown function. 216 clones (90%) of these unknown proteins were similar to *Arabidopsis thaliana* proteins of unknown function.

Since the relative abundance of these functional categories in different species and tissues presumably reflects the different physiological functions of these tissues, it is interesting to compare their relative abundances (Fig. 3A). For example, the relative abundances of the signalling ESTs are very similar for flax outer stem tissues (5.8%, this study), poplar cambium (6%; Sterkey et al., 1998), and inner bark tissues from *Cryptomeria japonica* (5.2%; Ujino-Ihara et al., 2000). In contrast, while the percentage ESTs associated with metabolism was comparable in flax (15.6%) and *C. japonica* (12%), the metabolism of ESTs for poplar represented only 6% of total ESTs. Such an observation is interesting since, from a morphological and physiological point of view, flax outer stem tissues and inner bark tissues from *C. japonica* are comparable, while the poplar cambium represents a physiologically different tissue.

Interestingly, the percentage of no hit ESTs for *C. japonica* (27.1%) was very much higher than that observed for flax (12.4%) or poplar (9%), while the percentage of unknown ESTs presented a different pattern, with values of 22.4% (flax), 37% (poplar), and 11.3% (*C. japonica*). Such differences presumably reflect the fact that the inner bark of *C. japonica* is physiologi-

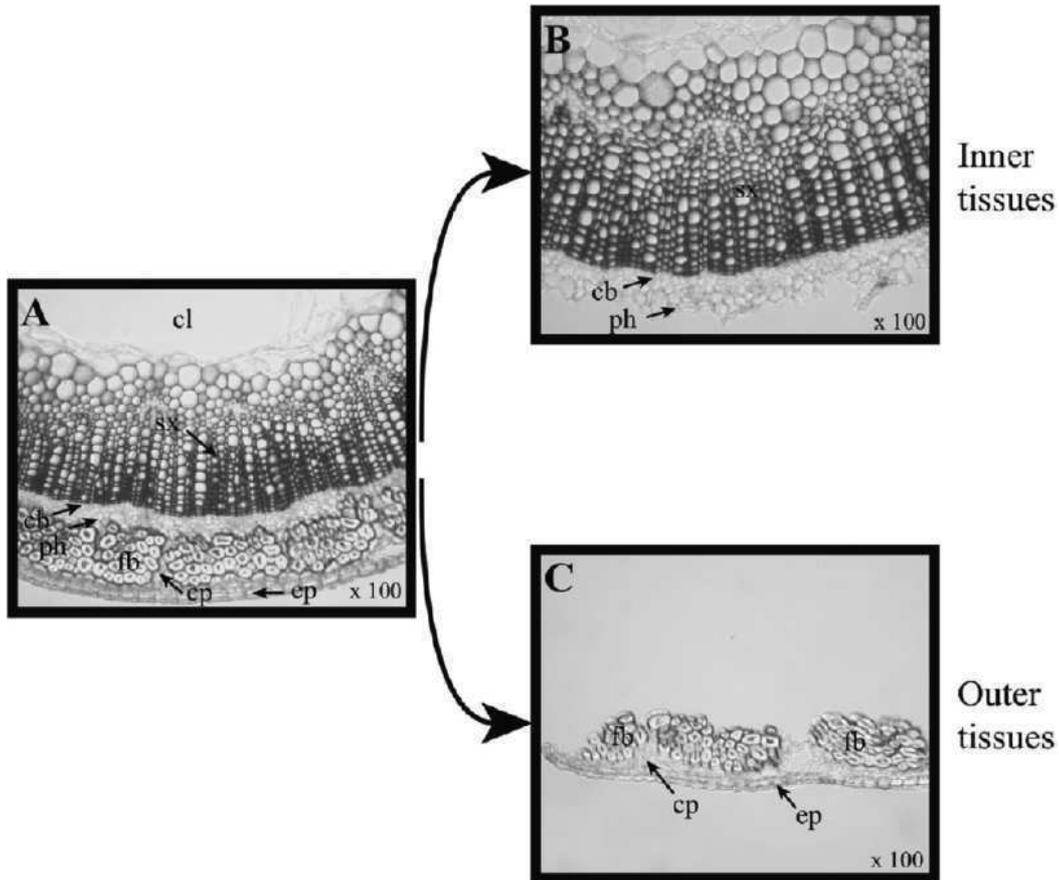


Fig. 1 Tissue arrangement in "outer fibre-rich tissues" used to construct the cDNA library. Microscopy after staining with phloroglucinol-HCl of freehand cross-sections of (A) the full flax stem and after separation by peeling into (B) outer (bast-fibre-rich) tissues and (C) inner

(xylem-rich) tissues. cl: central lacune; cb: cambium; cp: cortical parenchyma; ep: epidermis; fb: fibre bundles; ph: phloem; sx: secondary xylem.

cally and structurally more complex than the corresponding tissue in *Arabidopsis*. The percentage of ESTs associated with the cell wall was comparable in flax (4.2%) and *C. japonica* (3%), but lower than that observed in poplar (7%). Such a difference is perhaps to be expected, since the vascular cambium is a meristematic tissue associated with extensive new cell (and hence cell wall) production.

Comparison of the flax EST functional categories with those resulting from the systematic sequencing of the *Arabidopsis* genome (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) indicates that the percentage of ESTs associated with stress/defence, signaling, metabolism, and protein are similar for *Arabidopsis* and flax plants. However, the percentage of *Arabidopsis* genes associated with transcription is much higher than that observed for the flax ESTs in the same functional category. The percent-

age of *Arabidopsis* transcription genes is also much higher than the values observed for the corresponding ESTs in poplar and *C. japonica*. Whether such differences reflect the difficulty of comparing ESTs from different species and/or tissues with genomic data or, alternatively, indicate a possible evolutionary divergence of plant transcription factors requires further investigation.

Fig. 3B presents number of sequences in clusters and the number of singletons for each functional category. For two out of the 15 defined functional categories (cell wall and photosynthesis), the ESTs are distributed more or less equally between singletons and clusters. For the remaining 13 categories, the majority of ESTs occur as singletons.

ESTs from Flax outer Stem Tissues

Plant Biology 7 (2005) 5

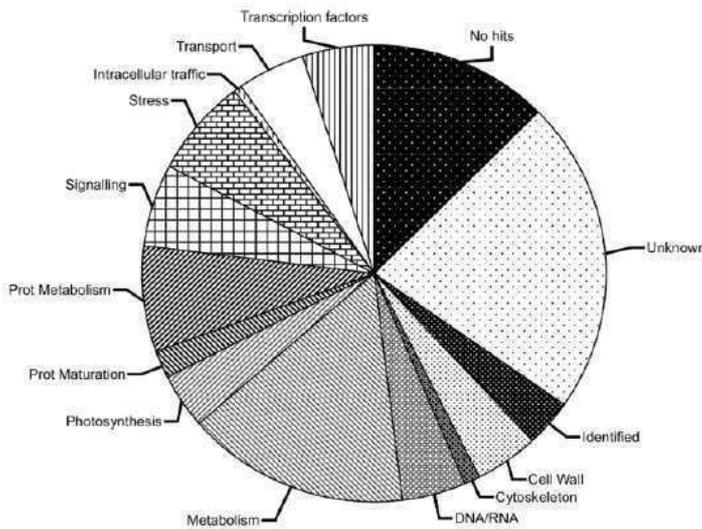


Fig. 2 Expression analysis of the ESTs from outer tissues of flax stems. cDNA clones were analysed with BlastX and classified according to the highest score result. No hits: no similarities with known sequences; unknown: similarities with identified sequences with unknown function; identified: similarities with unknown sequences for which expression profiles have been at least partially characterized; cell wall, cytoskeleton, DNA/RNA, metabolism, photosynthesis, prot. maturation, prot. metabolism, signalling, stress, intracellular traffic, transport, and transcription factors include sequences related to each category.

Highly expressed transcripts are given in Table 1. The most highly expressed cluster (15 ESTs) corresponds to a β -xylosidase gene – potentially implicated in cell wall (hemicellulose) metabolism. Two other highly expressed clusters (phosphatase 2C and kinase-like) present similarities to signal transduction genes. Three clusters (Rubisco, Rubisco-activase, and chlorophyll *a/b* binding protein) are associated with photosynthesis, in agreement with the fact that outer stem tissues are green. Other highly expressed clusters are associated with ATP-dependant membrane transport, protein maturation and metabolism, and DNA–RNA interactions. Of interest is the observation that one of the most highly expressed ESTs in the flax collection corresponds to an ABC transporter. Recently, an ABC transporter (*GhWBC1*) has been shown to be highly expressed in elongating fibre cells from wild-type cotton plants, but only weakly expressed in *li* (ligon-lintless) mutants defective in fibre elongation (Zhu et al., 2003).

In the context of our research on bast fibre formation, we were particularly interested to see which ESTs were associated with cell wall formation. 4.4% (41) of ESTs correspond to genes associated (or potentially associated) with cell wall formation (Table 2). As indicated above, the most highly expressed EST corresponds to a β -xylosidase gene, potentially involved in hemicellulose metabolism (Goujon et al., 2003). Other highly expressed ESTs correspond to peroxidases, involved in the modification and/or polymerisation of cell wall components (Fry, 1986; Higuchi, 1990; Boerjan et al., 2003). Other ESTs can be related to the metabolism of other cell wall polymers (cellulose, hemicelluloses, pectins, proteins).

Expression studies of cell wall polymer-related genes

Since we are primarily interested in fibre cell wall formation and maturation, we decided to investigate the expression patterns of a number of genes (identified in our EST collection) po-

tentially associated with cell wall polymers (cellulose, hemicelluloses, and lignin) at four different developmental stages. The results of the expression studies by RT-PCR are shown in Fig. 4. These results confirm that (i) the cell wall-related ESTs are expressed in flax outer stem tissues and (ii) the expression (depending upon the gene) varies as a function of the developmental stage and growth conditions.

In the flax EST collection, three ESTs (7D6, 5B2, and 8C3; dbEST Nos. 25940232, 25940017, and 25940306, respectively) corresponded to cellulose synthase genes. Two of these sequences (ESTs 7D6 and 5B2) showed high similarities to two maize genes (*ZmCesA9* and *ZmCesA4*) as well as to the *Arabidopsis* genes *AtCesA3* (flax EST 7D6) and *AtCesA1* (flax EST 5B2). The third translated flax EST (8C3) showed high similarity to the *Arabidopsis* gene *AtCesA1*. Since cellulose accounts for between 65 and 80% of the characteristic thick secondary cell wall of flax bast fibres (Morvan et al., 1989; Baley, 2002), it could be expected that the expression of these flax cellulose synthase genes should most probably be associated with the extensive cellulose deposition in the secondary cell wall of maturing flax fibres. However, these two *Arabidopsis* genes (*AtCesA1* and *AtCesA3*) have previously been shown to be closely associated with cellulose biosynthesis in the primary cell wall, while other *Arabidopsis* genes (*AtCesA4*, *AtCesA7*, and *AtCesA8*) have been associated with cellulose biosynthesis in secondary plant cell walls (Tanaka et al., 2003; Zhong et al., 2003). The characterization of further ESTs, as well as functional studies, should enable us to improve our knowledge concerning the size of the flax cellulose synthase gene family and the roles of different members of this family.

The expression patterns of the three ESTs (as determined by RT-PCR, Fig. 4) are similar, suggesting that the corresponding genes are transcriptionally regulated in the same way. The expression is affected both by the developmental stage and the

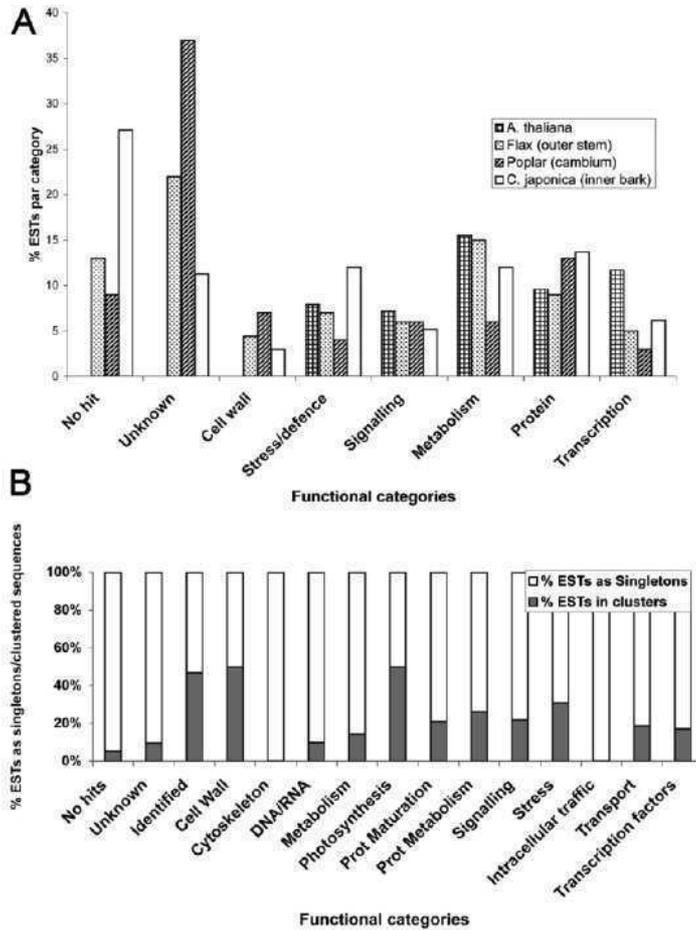


Fig. 3 (A) Comparison of the number of ESTs in the functional categories between different species: *Arabidopsis*, flax outer stem tissues, poplar cambium, and inner bark of *C. japonica*. (B) Relative abundance of ESTs present as singletons and clusters in each functional category.

growth conditions utilised. At all developmental stages, the addition of nitrogen leads to the inhibition of cellulose synthase gene expression. Such an effect is most noticeable at stage 3 (mid-flowering) where, in the absence of added nitrogen, all three ESTs are strongly expressed. The fact that the cellulose synthase ESTs are expressed at this stage is interesting because fibre maturation, as determined by the increase in fibre diameter and cellulose deposition, occurs between the flowering stage and capsule maturation (Gorshkova et al., 2003; Morvan et al., 2003). One interpretation is that the addition of nitrogen stimulates plant growth and inhibits extensive fibre formation, as observed in the case of greenhouse-grown flax plants (F. Bert, personal communication). However, as indicated above, further characterisation of the roles of different flax cellulose synthase genes during primary and secondary cell wall formation is necessary in order to understand the process of cellulose biosynthesis and deposition in flax fibres. The addition of growth regulator has little effect on the general

expression pattern, except at the green capsule stage where it appears to stimulate cellulose synthase gene expression. Our results demonstrate clearly that cellulose synthase gene expression varies according to the developmental stage. In addition, variations in the culture conditions also appear to have an impact on a number of different fibre characteristics of importance in the textile industry (F. Bert, personal communication).

Three flax ESTs corresponded to xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) that also play a central role in the construction and modification of primary cell wall architecture, where they cut and rejoin xyloglucan chains in the hemicellulosic fraction of primary cell walls (Carpita and Gibeau, 1993). The expansion of plant cell walls during growth depends upon the capacity of cellulose microfibrils to slide past one another, and it is believed that cell wall loosening (during growth) can occur when the xyloglucans cross-linking adjacent cellulose

Table 1 Most highly expressed transcripts

Function	Functional category	No. ESTs	No. clusters*
Xylosidase	cell wall	15	1
Kinase-like	signalling	9	8
Phosphatase 2C	signalling	8	7
ABC transporter	transport	8	7
DNA J	protein maturation	7	7
EF-1 α	protein metabolism	7	3 (1+4+2)
Helicase	DNA-RNA	7	7
Rubisco activase	photosynthesis	7	4 (3+2+1+1)
Rubisco	photosynthesis	6	1
Chlorophyll a/b binding protein	photosynthesis	6	4 (3+1+1+1)
Ubiquitin	protein metabolism	6	2 (5+1)
60S	protein metabolism	6	6
LTP	stress/defence	6	3 (4+1+1)
peroxidase	cell wall	6	4 (3+1+1+1)
Ring Zn finger	transcription factors	5	5
40S	protein metabolism	5	5
Ser/thr kinase	signalling	5	5

* Figures in brackets show number of sequences in each cluster

Table 2 Cell wall-related ESTs

Function	No. ESTs	No. clusters*	Cell wall polymer/function
β -xylosidase	15	1	hemicellulose
Peroxidase	8	5 (3+2+1+1+1)	reticulation/ polymerisation
β -galactosidase	4	1	pectins
Cellulose synthase	3	3	cellulose
Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH)	3	3	hemicellulose
Glucan synthase	2	2	callose
"Cell wall proteins"	2	2	protein
α -expansin	1	-	protein
Pectin acetyltransferase	1	-	pectins
Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)	1	-	lignin
Caffeic acid O-methyltransferase (COMT)	1	-	lignin

* Figures in brackets show number of sequences in each cluster

microfibrils are modified (Minorsky, 2002; Rose et al., 2002). In addition, recent work has demonstrated that XTH activity and/or gene expression is associated with the elongating zone in *Arabidopsis* roots (Vissenberg et al., 2003) and expanding cotton fibres (Ji et al., 2003). In this context, the presence of XTH ESTs in the flax outer stem tissues is consistent with cell wall growth and remodelling necessary for fibre cell formation.

The three XTH ESTs are all singletons, suggesting that they correspond to different XTH genes. In *Arabidopsis*, 33 XTH genes, belonging to three different families have been identified (Rose et al., 2002). Comparison of the flax XTH sequences with

the *Arabidopsis* XTH families indicated that one of the flax XTHs (XTH 10B10, dbEST No. 25940488, re-named *Lu-XTH1* in accordance with the international XTH nomenclature: <http://labs.plantbio.cornell.edu/xth/>) shows a high similarity to the *Arabidopsis At-XTH7* gene belonging to the group1 family of XTHs. Interestingly, *Lu-XTH1* showed a higher degree of similarity with cotton and tomato XTH sequences. The other two flax XTH sequences (XTH 6B7, dbEST No. 25940116, and XTH 9F12, dbEST No. 25940444, re-named *Lu-XTH2* and *Lu-XTH3*, respectively) showed high similarity with the *Arabidopsis At-XTH28* gene belonging to the group 3 family.

Both *Lu-XTH1* and *Lu-XTH3* are strongly expressed (Fig. 4) at all developmental stages analysed and under all different growth conditions. In contrast, the expression of *Lu-XTH2* varies depending on the developmental stage and growth conditions. Of interest is that its expression pattern mirrors that of the cellulose synthase genes, suggesting that it is transcriptionally regulated in a similar manner. Such an observation suggests that the control of cellulose synthesis and its integration into the cell wall (via XTH activity) are highly coordinated.

Of the other cell wall-related ESTs (and all ESTs), the most highly expressed corresponds to a single β -xylosidase gene. The 15 translated sequences could all be aligned with a single *Arabidopsis thaliana* gene (*AtBXL2*). A number of β -xylosidases have been isolated from a variety of fungal and bacterial sources, where it has been shown that these enzymes play a rate-limiting role in xylan hydrolysis (Van Peij et al., 1997). In plants, xyloans (consisting of a backbone of β -1,4-linked xylose residues) constitute the hemicellulose fraction of the secondary cell wall of dicotyledons and, depending upon the nature of the side chain sugars, can give rise to arabinoxyloans, glucuronoxyloans, and glucuronoarabinoxyloans. Hemicelluloses play an important role in the organisation and structure of the plant cell wall since they can interact with both cellulose and lignin (Hatfield et al., 1999; Awano et al., 2001; Bergander and Salmen, 2002).

Recently a novel *Arabidopsis* β -xylosidase gene (*AtBXL1*) has been identified and shown to belong to a small seven-member multigene family that also contains *AtBXL2* (Goujon et al., 2003; Minic et al., 2004). *GUS* reporter gene expression driven by the *AtBXL1* promoter was shown to be restricted to tissues undergoing secondary cell wall thickening (vascular tissue and fibres). Transgenic plants down-regulated for β -xylosidase (*BXL*) activity presented a marked phenotype, including reduced growth and curled leaves in mature plants. Analyses of sugar content in down-regulated plants also revealed that the xylose content was slightly, but significantly, reduced while the galacturonic acid content was increased.

The authors (Goujon et al., 2003) suggest that, *in planta*, the most likely natural substrates for *BXL* activity would be glucuronoarabinoxyloans (*GAX*) and arabinoxyloans (*AX*) belonging to the hemicellulose fraction of the secondary cell wall. Both of these cell wall components play important roles in the structural organisation of the cell wall, since they are able to interact with both cellulose and lignin. *AtBXL1* could be involved in the organisation and loosening of *GAX* (and *AX*) in the cell wall during cell growth and cellulose deposition. Analyses of the flax β -xylosidase gene expression pattern indicated that it was expressed at all the developmental stages analysed. The gene appeared to be more strongly expressed at the green cap-

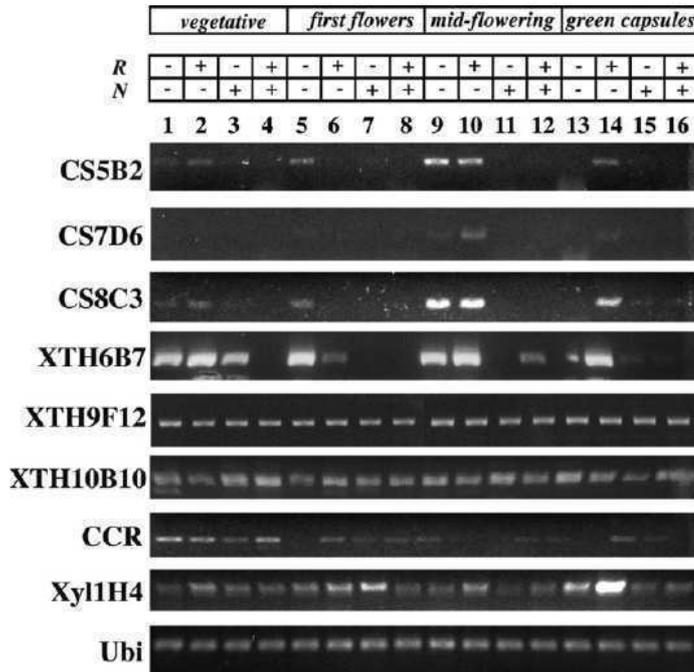


Fig. 4 RT-PCR analysis of the expression patterns of selected cell wall-expressed genes. RNA was extracted from plants at four different developmental stages (vegetative, first flowers, mid-flowering, green capsules) and four growth conditions (+R = addition of 0.2 L ha⁻¹ Parlay C; -R = absence of Parlay C; +N = addition of 30 units ha⁻¹ ammonium nitrate; -N = absence of added N). The following functions were assigned to genes: CS5B2, CS7D6, CS8C3: cellulose synthase, XTH6B7, XTH9F12, XTH10B10: xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, CCR: cinnamoyl coenzyme A reductase, Xyl1H4: β -xylosidase. Ubiquitin (Ubi) primers were used in each condition to control the equal amount of RNA used for cDNA synthesis.

sule stage, corresponding to fibre cell wall thickening, in the absence of nitrogen. As observed in the case of the flax cellulose synthase genes expression and *Lu-XTH2* gene expression, the addition of growth regulator appeared to stimulate gene expression. Given the expression pattern of the flax β -xylosidase gene, it is obviously tempting to speculate that, in flax, this gene is involved in fibre elongation.

Only two sequences corresponding to "lignification" genes (cinnamate 4-hydroxylase: *C4H*, caffeic acid *O*-methyltransferase: *C-OMT*) were identified in our EST collection. Such a value is much lower than that observed for the ESTs from the cambium (10.8%) and the developing xylem (21.5%) of poplar (Sterkey et al., 1998). Such differences are to be expected, since the bast fibres of flax outer stem tissues are hypolignified (2.9% dry cell wall, Day et al., submitted) while the cambium and developing xylem zones of poplar become extensively lignified. Nevertheless, such a representation is comparable to that observed in the inner bark tissue EST collection of *C. japonica* (0.6%) which, from an anatomical point of view, is closer to that of flax outer stem tissues.

Previous work (Day et al., 2001) in our laboratory has shown that *C-OMT* activity can be detected in flax stems. However, bast fibres are hypolignified and characterized by the presence of an atypical lignin rich in hydroxyphenyl (H-lignin) units and poor in syringyl (S-lignin) units (S/G = 0.2–0.4) (Day et al., unpublished). In such circumstances, the expression of all "lignification genes" could be expected to be relatively low and, in

particular, the expression of a gene (*C-OMT*) associated with the methylation of lignin precursors. In the light of these results, we decided to use the expression profile of the cinnamoyl coenzyme A reductase (*CCR*) gene as a marker for the lignification of flax bast fibres, rather than the two sequences identified in the EST collection. Such a decision was taken for several reasons, firstly, the *C4H* enzyme is involved in the general phenylpropanoid synthesis pathway leading to the formation of a variety of different secondary metabolites, the expression of the corresponding gene is therefore not necessarily associated with the lignification process. Secondly, the *CCR* gene is involved in the monolignol-specific branch pathway leading specifically to the formation of these lignin precursors (Goffner et al., 1994).

The *CCR* gene appears to be most strongly expressed at the vegetative stage prior to flowering, thereby suggesting that lignification is initiated before this stage. Such a hypothesis is in agreement with our previous chemical and immunocytochemical characterisation of flax bast fibre lignin (Day et al., unpublished) and with previous work showing that the activity of flax cell wall peroxidases increased between five weeks post-germination until the flowering period, after which it decreased (McDougall, 1991; McDougall, 1992). Differences in the culture conditions appear to have little effect on *CCR* expression at this stage. After the vegetative stage, *CCR* gene expression decreases and, while different culture conditions appear to affect the expression, it is difficult to detect any definite trends.

Zeitschrift AK-PDF ef-Upload	Plant Biology PB536 tt.mm.jj tt.mm.jj	Satzbetrieb Verlag Datum	Ziegler + Müller Thieme/Frau Schwäger 15.11.2004
------------------------------------	---------------------------------------------	--------------------------------	--------------------------------------------------------

ESTs from Flax outer Stem Tissues

Plant Biology 7 (2005) 9

Conclusions

Flax is an economically important plant (fibres, oil, and, more recently, lignans). The improvement of this plant through either a genetic engineering approach or molecular marker-based selection so as to produce fibres better suited to diverse industrial applications is dependent on a better understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying fibre cell production. Our characterization of 938 ESTs from the outer stem tissue (rich in cellulose fibres) and investigation of the expression patterns of cell wall-related ESTs at different developmental stages represents a first step towards such an improved understanding. It will also be interesting to continue the generation of more ESTs from the cDNA library. The redundancy is 19.1 %, indicating that the probability of finding novel sequences is 81 %. In addition, we are also using an associated proteomics approach (Tokarski et al., 2002) to analyse proteins isolated from flax outer stem tissues. The fact that both the proteins and the cDNA library have been prepared from the same tissue will greatly facilitate the identification of proteins and genes involved in flax fibre formation.

Acknowledgements

A. Day gratefully acknowledges the Champagne-Ardenne and Nord-Pas de Calais regions for financial support during the course of this work. M. Addi gratefully acknowledges the support of the French Ministry of Research for financial support. This work was carried out in the context of the regional project "Métabolisme pariétal et cohésion intercellulaire. Application à l'amélioration de la teillabilité et de la divisibilité des fibres de lin". We gratefully acknowledge the contribution of C. Hano for the flax CCR sequences.

References

Awano, T., Takabe, K., and Fujita, M. (2001) Xylan and lignin deposition on the secondary wall of *Fagus crenata* fibers. In *Molecular Breeding of Woody Plants* (Morohoshi, A. K. N., ed.), Elsevier Science B. V., pp.137 – 142.

Baley, C. (2002) Analysis of the flax fibres tensile behaviour and analysis of the tensile stiffness increase. *Compos. Part A – Appl. Sci. Manuf.* 33, 939 – 948.

Bergander, A. and Salmen, L. (2002) Cell wall properties and their effects on the mechanical properties of fibers. *J. Mat. Sci.* 37, 151 – 156.

Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003) Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519 – 546.

Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3, 1 – 30.

Carpita, N. and Vergara, C. (1998) A recipe for cellulose. *Science* 279, 672 – 673.

Carson, D. L., Huckett, B. I., and Botha, F. C. (2002) Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Plant Sci.* 162, 289 – 300.

Channelière, S., Rivière, S., Scalliet, G., Szecsi, J., Jullien, F., Dolle, C., Vergne, P., Dumas, C., Bendahmane, M., Huguency, P., and Cock, J. M. (2002) Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. *FEBS Letters* 515, 35 – 38.

Day, A., Dehorter, B., Neutelings, G., Czeszak, X., Chabbert, B., Belingheri, L., and David, H. (2001) Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase enzyme activity, protein and transcript accumulation

in flax (*Linum usitatissimum*) stem during development. *Physiol. Plant.* 113, 275 – 284.

Fry, S. C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37, 165 – 186.

Girault, R., Bert, F., Rihouey, C., Jauneau, A., Morvan, C., and Jarvis, M. (1997) Galactans and cellulose in flax fibres: putative contributions to the tensile strength. *J. B. M.* 21, 179 – 188.

Girault, R., His, I., Andème-Onzighi, C., Driouich, A., and Morvan, C. (2000) Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres. *Planta* 211, 256 – 264.

Goffner, D., Campbell, M., Campargue C., Clastre M., Borderies G., Boudet, A., and Boudet, A. M. (1994) Purification and characterization of cinnamoyl-coenzyme A: NADP oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiol.* 106, 625 – 632.

Gorshkova, T. A., Wyatt, S. E., Salnikov, V. V., Gibeaut, D. M., Ibragimov, M. R., Lozovaya, V. V., and Carpita, N. C. (1996) Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiol.* 110, 721 – 729.

Gorshkova, T. A., Sal'nikov, V. V., Chemiksova, S. B., Ageeva, M. V., Pavlencheva, N. V., and Van Dam, J. E. G. (2003) The snap point: a transition point in *Linum usitatissimum* bast fiber development. *Ind. Crops Prod.* 18, 213 – 221.

Goujon, T., El Amrani, A., Lerouxel, O., Aletti, E., Lapierre, C., Joseleau, J.-P., and Jouanin, L. (2003) *AtBXL1*, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *Plant J.* 33, 677 – 690.

Hatfield, R. D., Ralph, J., and Grabber, J. H. (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* 79, 403 – 407.

Higuchi, T. (1990) Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23 – 63.

Ji, S.-J., Lu, Y.-C., Feng, J.-X., Wei, G. W., Li, J., Shi, Y.-H., Fu, Q., Liu, D., Luo, J.-G., and Zhu, Y.-H. (2003) Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber developments by subtractive PCR and cDNA array. *Nucl. Acids Res.* 31, 2534 – 2543.

McDougall, G. J. (1991) Cell-wall-associated peroxidases and lignification during growth of flax fibres. *J. Plant Physiol.* 139, 182 – 186.

McDougall, G. J. (1992) Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. *Phytochem.* 31, 3385 – 3389.

McDougall, G. J. (1993) Accumulation of wall-associated peroxidases during wound-induced suberization of flax. *J. Plant Physiol.* 142, 651 – 656.

Minic, Z., Rihouey, C., Do, C. T., Lerouge, P., and Jouanin, L. (2004) Purification and characterization of enzymes exhibiting β -D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 867 – 878.

Minorsky, P. V. (2002) The wall becomes surmountable. *Plant Physiol.* 128, 345 – 353.

Morvan, C., Abdul-Hafez, A. M., Morvan, O., Jauneau, A., and Demarty, M. (1989) Etude physico-chimique et biochimique de polysaccharides extraits de lin sous-roui. *Plant Physiol. Biochem.* 27, 451 – 459.

Morvan, C., Andème-Onzighi, C., Girault, R., Himmelsbach, D. S., Driouich, A., and Akin, D. E. (2003) Building flax fibres: more than one brick in the walls. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 935 – 944.

Roland, J. C., Mosiniak, M., and Roland, D. (1995) Dynamique du positionnement de la cellulose dans les parois des fibres textiles du lin (*Linum usitatissimum*). *Acta Bot. Gallica.* 142, 463 – 484.

Rose, J. K. C., Braam, J., Fry, S. C., and Nishitani, K. (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43, 1421 – 1435.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Zeitschrift AK-PDF ef-Upload	Plant Biology PB536 tt.mm.jj tt.mm.jj	Satzbetrieb Verlag Datum	Ziegler + Müller Thieme/Frau Schwägler 15.11.2004
------------------------------------	---------------------------------------------	--------------------------------	---------------------------------------------------------

10 Plant Biology 7 (2005)

A. Day et al.

- Sterkey, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rohde, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerao, R., Larsson, M., Villarroel, R., Van Montagu, M., Sandberg, G., Olsson, O., Teeri, T. T., Boerjan, W., Gustafsson, P., Uhlén, M., Sundberg, B., and Lundberg, J. (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags. *P. N. A. S. USA* 95, 13330–13335.
- Tanaka, K., Murata, K., Yamazaki, M., Onosato, K., Miyao, A., and Hirochika, H. (2003) Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall. *Plant Physiol.* 133, 73–83.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Tokarski, C., Day, A., David, H., and Rolando, C. (2002) Differential proteomics of the fiber-bearing stem tissues in flax. *Journées du Réseau Français des Parois*, Reims, France, 29–30 May.
- Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Ugawa, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., and Tsumura, Y. (2000) Expression analysis of ESTs derived from the inner bark of *Cryptomeria japonica*. *Plant Mol. Biol.* 43, 451–457.
- Van de velde, K. and Baetens, E. (2001) Thermal and mechanical properties of flax fibres as potential composite reinforcement. *Macromol. Mater. Eng.* 286, 342–349.
- Van Peij, N. N. M. E., Brinkmann, J., Vrsanská, M., Visser, J., and de Graaff, L. H. (1997) β -xylosidase activity, encoded by *xlnD*, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger*, but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. *Eur. J. Biochem.* FEBS 245, 164–173.
- Vissenberg, K., Martínez-Vilchez, I. M., Verbelen, J.-P., Miller, J. G., and Fry, S. C. (2003) *In vivo* colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 12, 1229–1238.
- Zhang, L., Ma, X.-L., Zhang, Q., Ma, C.-L., Wang, P.-P., Sun, Y.-F., Zhao, Y.-X., and Zhang, H. (2001) Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene* 267, 193–200.
- Zhong, R. Q., Burk, D. H., and Ye, Z. H. (2001) Fibers, a model for studying cell differentiation, cell elongation and cell wall biosynthesis. *Plant Physiol.* 126, 477–479.
- Zhong, R., Morrison III, W. H., Freshour, G. D., Hahn, M. G., and Ye, Z.-H. (2003) Expression of a mutant form of cellulose synthase AtCesA7 causes dominant negative effect on cellulose biosynthesis. *Plant Physiol.* 132, 786–795.
- Zhu, Y.-Q., Xu, K.-X., Luo, B., Wang, J.-W., and Chen, X.-Y. (2003) An ATP-binding cassette transporter GhWBC1 from elongating cotton fibers. *Plant Physiol.* 133, 580–588.

S. Hawkins

Laboratoire de Physiologie des
Parois Végétales UPRES EA 3568 USC-INRA
Université des Sciences et Technologies de Lille
59655 Villeneuve d'Ascq
France
E-mail: simon.hawkins@univ-lille1.fr

Editor: M. Hawkesford

■ Author: Please refer to journals using their complete title, no abbreviations as e.g. Plant J. ■

Chapitre II : Transformation du lin par *Agrobacterium tumefaciens* : vers une optimisation du protocole pour un cultivar à fibres

Si la transgenèse *via A. tumefaciens* s'avère possible chez le lin, elle n'est pas pour autant aisée en dépit d'une grande aptitude à la régénération de cette plante, surtout les cultivars à fibres sur lesquels porte notre travail à savoir l'étude de la régulation moléculaire de la mise en place de la paroi cellulaire des fibres de lin et la contribution de différents polymères pariétaux à l'élaboration de leur architecture tri-dimensionnelle.

Etude préliminaire du matériel biologique

Dans un premier temps, nous avons décidé d'étudier les capacités de régénération à partir des différents explants initiaux. Nous nous sommes inspirés des travaux de Frédéric Lamblin, (1999), cette technique repose sur la régénération directe à partir d'hypocotyles.

A – Etude des capacités de régénération de différents cultivars de lin

Les capacités de régénération des explants végétaux peuvent différer selon le cultivars de lin étudié (Rakousky et al., 1999), la nature des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture (Bretagne et al., 1994), les paramètres physiques (Lumière, température, humidité), la nature de la souche d'agrobactérie utilisé (Mlynarova et al., 1994) ou encore le type d'antibiotique servant à la sélection des plantes transformées (Bretagne-Sagnard & Chupeau, 1996).

Une étude du bourgeonnement à partir des segments d'hypocotyles de différentes tailles (0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 cm) de jeunes plantes (âgées de 5 à 6 jours) a été réalisée pour trois cultivars (un oléagineux : Barbara ; deux à fibres : Hermès, Diane) sur trois milieux différents (MSD4X2, MS4, et MSR, voir annexe). Les bourgeons, dont les ébauches foliaires apparaissent dès le troisième jour pour Barbara, et dès le cinquième jour pour les deux cultivars à fibres, sont dénombrés après 10 jours.

Il s'avère que les meilleurs résultats de bourgeonnement ont été obtenus avec des fragments de 1 cm et que la partie basale (partie à coté du collet) est la partie la plus organogène produisant plus de bourgeons.

Le nombre de bourgeons observé varie en fonction des cultivars (oléagineux > 15 ; fibres < 13) (Figure 29). Le milieu MSD4X2 est plus favorable à la callogenèse au niveau des sections des hypocotyles (Figure 30). Le milieu MS4 engendre un grand nombre de

bourgeons (10 à 20) mais peu d'entre eux semblent conformes, certains développant des formes aberrantes avec des larges feuilles translucides incapables d'évolution ultérieure (tendance à la vitrification) (Figure 30). Le milieu MSR semble le plus adapté au bourgeonnement (8 à 15) avec apparition des bourgeons conformes et chlorophylliens avec moins de cals.

Le cultivar Hermès présente le plus faible taux de bourgeonnement (moins de 5 bourgeons par hypocotyle). Le bourgeonnement du cultivar Diane semble plus favorable au niveau du milieu MSR (5 à 10 bourgeons).

En conclusion le milieu MSR semble le plus favorable pour le bourgeonnement des trois cultivars car il permet à la fois un bon rendement de régénération et une formation de bourgeons chlorophylliens conformes.

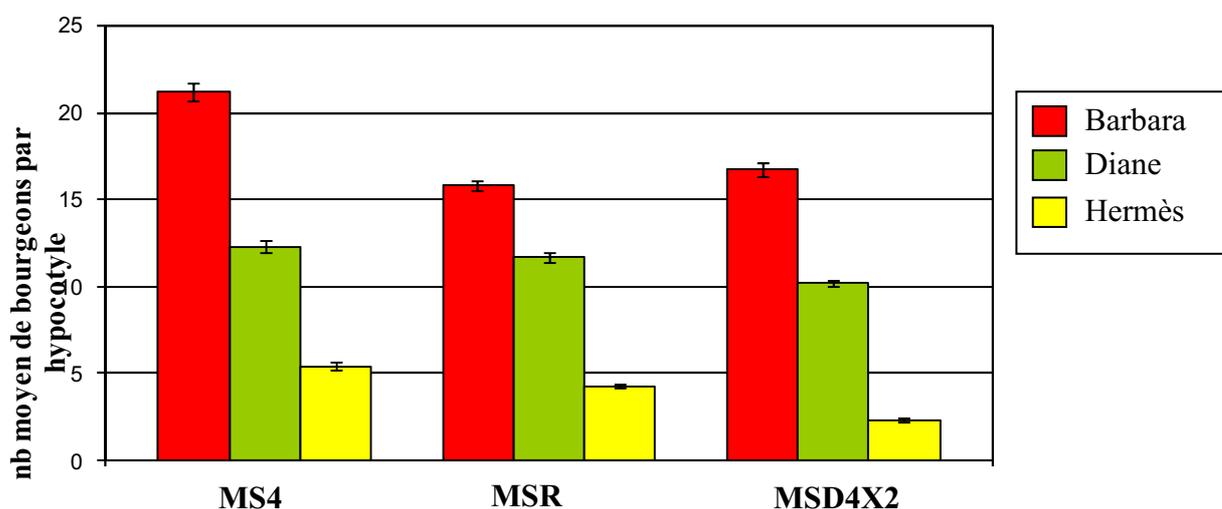


Figure 19 : Effet des différents milieux de culture sur la formation de bourgeons à partir de segments d'hypocotyles chez 3 cultivars.

Les barres d'erreur présentent les écarts types faits sur les moyennes des bourgeons sur 20 hypocotyles différents pour chaque cultivar et chaque milieu

Le milieu de base est le milieu MS0 (Annexe) auquel ont été additionnés des régulateurs de croissance.

MS4 : MS0 + 0,1 μ M TDZ + 0,01 μ M ANA (Bretagne et al., 1994)

MSD4X2 : MS0 + 4,4 μ M BA + 0,54 μ M ANA (Basiran et al., 1978)

MSR : MS0 + 0,01 TDZ + 0,1 μ M ANA



Figure 20 : Aspect des hypocotyles des 3 cultivars mis en culture dans les 3 milieux de régénération.

A : Hermès dans MS4, B : Hermès dans MSR, C : Hermès dans MSD4X2
D : Diane dans MS4, E : Diane dans MSR, F : Diane dans MSD4X2
G : Barbara dans MS4, H : Barbara dans MSR, I : Barbara dans MSD4X2

Bien que la littérature indique que l'hypocotyle est le matériel de choix pour la régénération de plantes chez le lin, nous avons étudié la capacité de régénération de bourgeons à partir des lambeaux de feuilles issues de jeunes plantes âgées de 5 jours. Les feuilles ne forment que des cals quelque soit le milieu de culture, avec parfois des rares apparitions de bourgeons surtout chez Barbara (cultivars oléagineux).

Nous avons aussi étudié l'influence de l'âge des hypocotyles âgés de 5, 7, 8 et 9 jours après germination. On a constaté que les cultivars âgés de 5 jours sont les plus aptes à donner le plus de bourgeons et que plus les hypocotyles sont âgés plus le taux de bourgeonnement diminue.

B - Choix de l'agent de sélection et de sa concentration

Le gène *nptII* porté par le vecteur pART27 et le gène *hptII* porté par le vecteur pCambia codent respectivement la néomycine phosphotransférase et l'hygromycine phosphotransférase. Ils confèrent la résistance aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides, l'antibiotique étant inactivé par phosphorylation. Les aminoglycosides, bloquant la synthèse protéique, provoquent chez les plantes n'exprimant pas un gène de sélection, un arrêt de la croissance, une chlorose puis une nécrose. Les tissus transformés contenant le gène *nptII* ou *hptII* détoxifient l'antibiotique correspondant et continuent de croître, permettant ainsi la sélection. Il est nécessaire de déterminer, préalablement à toute expérience de transgénèse, la concentration optimale en agent de sélection pour le cultivar considéré.

Pour cela, l'influence sur le bourgeonnement de 2 aminoglycosides à diverses concentrations a été étudiée chez les cultivars Barbara, Hermès et Diane : la kanamycine (0 à 400 mg.L⁻¹) et l'hygromycine (0 à 50 mg.L⁻¹). Les Figures 31 et 32 montrent le pourcentage de bourgeons néoformés après 14 jours de culture sur milieu MSR contenant différentes concentrations en antibiotique. Les résultats montrent que les deux cultivars à fibres (Hermès et Diane) sont plus sensibles aux antibiotiques par rapport au cultivar oléagineux. Sur hygromycine, on n'observe plus de bourgeons pour une concentration de 20 mg.L⁻¹ pour les cultivars oléagineux, 5 mg.L⁻¹ pour les cultivars à fibres et les explants sont nécrosés. La kanamycine a un effet analogue mais moins drastique car pour une concentration de 200 mg.L⁻¹ il n'y a pas de bourgeons formés pour Barbara. En ce qui concerne Diane et Hermès, la concentration létale est de 100 mg.L⁻¹. Ces résultats nous ont conduit à utiliser la kanamycine

(200 mg.L⁻¹ pour Barbara et 100 mg.L⁻¹ pour les deux cultivars à fibres) ou l'hygromycine (5mg.L⁻¹ pour les deux cultivars à fibre et 20 mg.L⁻¹ pour Barbara).

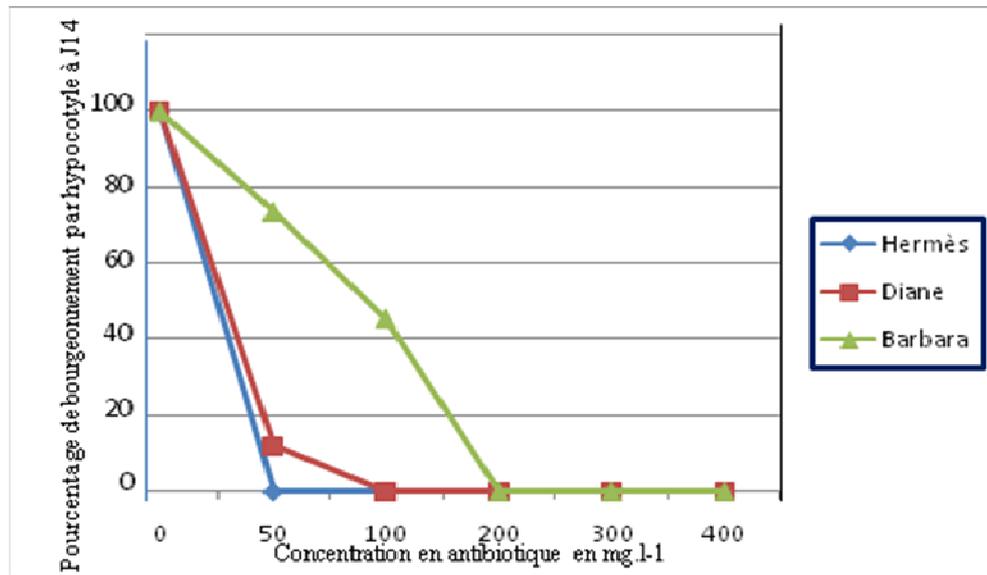


Figure 21 : Effet de la kanamycine sur le bourgeonnement des segments d'hypocotyles des trois cultivars de lin.

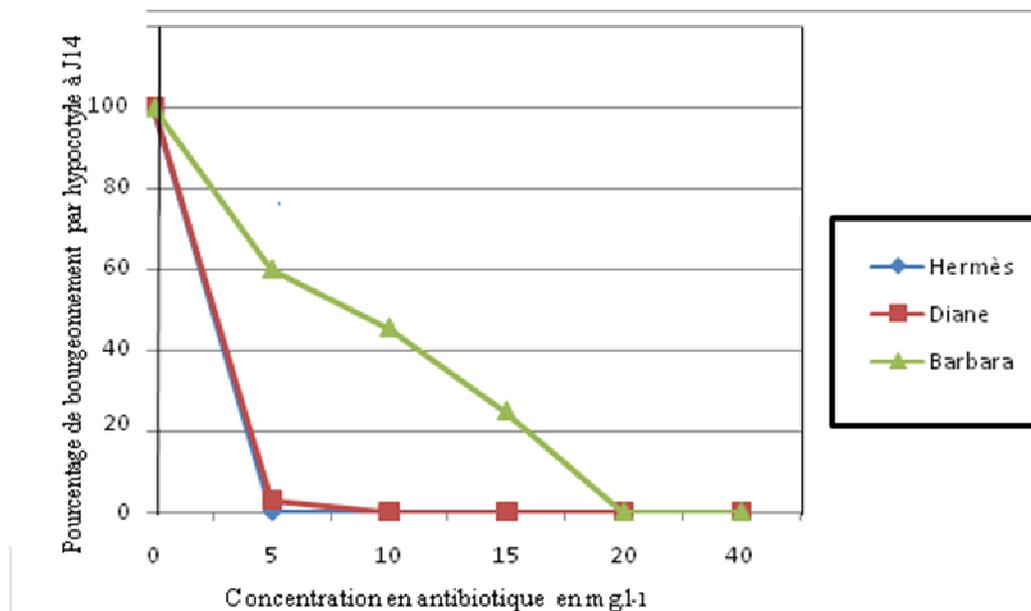


Figure 22 : Effet de l'hygromycine sur le bourgeonnement des segments d'hypocotyles des trois cultivars de lin.

Cette étude préliminaire nous a permis d'adapter le protocole de transformation déjà utilisé pour un cultivar oléagineux (Barbara) à un cultivar à fibres Diane. Le milieu MSR semble posséder la balance hormonale la plus adaptée pour la production des bourgeons. Le cultivar Diane a été retenu pour la suite du travail car il est à la fois riche en fibres et présente une capacité de régénération de bourgeons supérieurs (tant en quantité qu'en qualité) à l'autre cultivar à fibres testé (Hermès). La kanamycine et l'hygromycine apparaissent être efficaces pour la sélection.

C – Réalisation de la construction β -xylosidase IR-PTGS

Afin d'étudier le rôle biologique d'un gène codant pour une béta-xylosidase (voir chapitre I et III), nous avons décidé de le sous-exprimer. Pour ceci nous avons choisi une stratégie PTGS (Figure 33).

Ce type de construction consiste à faire exprimer un transcrit en répétition inversée, ce transcrit forme alors un ARN en « épingle à cheveux » intramoléculaire. Ce type d'ARN initie très fortement la PTGS des gènes homologues. Les fragments sens et anti-sens du gène de la β -xylosidase ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNc (Figure 34) et clonés dans le vecteur pHannibal. La ligature s'effectue en 2 étapes :

- La première consiste à digérer le fragment PCR par les enzymes *KpnI* et *XbaI* et ouvrir le vecteur pHannibal (Figure 21) avec les mêmes enzymes puis ligaturer le tout. Le fragment est alors en orientation sens.
- La seconde étape consiste à digérer le fragment PCR mais cette fois-ci par les enzymes *EcoRI* et *HindIII*. Le vecteur est également ouvert avec ces enzymes ; la ligature est ensuite effectuée. Ici, le site de clonage oblige le fragment à se placer en orientation antisens (Figure 33). La vérification de la présence des inserts (sens et antisens) a été réalisée par digestion enzymatique, en examinant si l'insert est libéré du vecteur recombiné.

La cassette d'expression β -xylosidase IR-PTGS est digérée puis insérée dans le vecteur binaire pART27 qui contient le gène de la résistance à la kanamycine et dans le vecteur binaire pCambia qui contient le gène de la résistance à l'hygromycine.

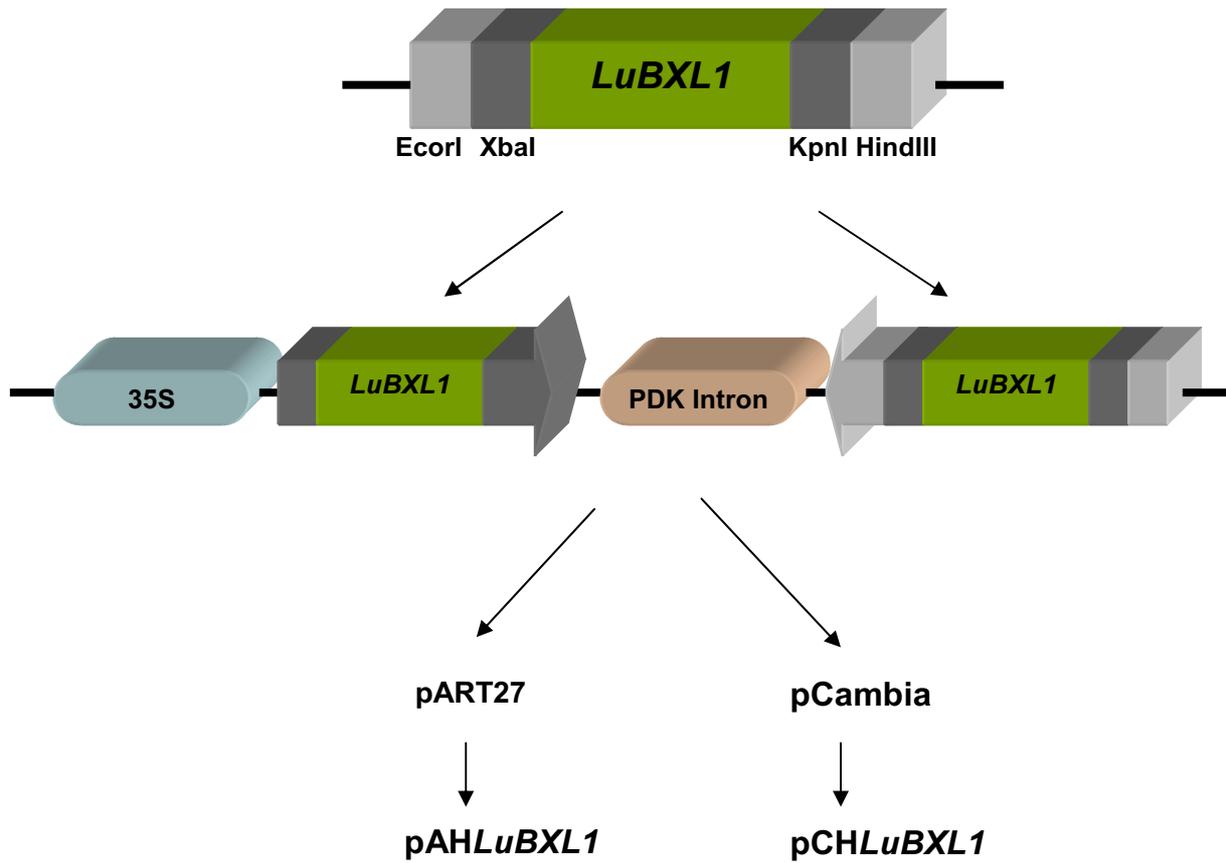


Figure 23 : Schéma résumant la double insertion de *LuBXL1* dans pHannibal.

35 S : promoteur fort du gène codant pour l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
 PDK Intron : séquence intronique du gène de la pyruvate orthophosphate dikinase

CTACAACACAATGGCTCAGACCAAAACGACACTACCCTTCCTCTCCTGTTCTTCTTCCTCCTCATT
 CATTGTCGGAGTCTAGGGTGGCGTTCGCCTGCGACCCTCGTAGCCCCGGAACCCGGAGCCTGAAG
 TTCTGCAGGGTTCGGGTGCCGTTGCACATCAGGGTGAGGGACTTGATCGGACGGCTGACATTGCAG
 GAGAAGATCAGGCTGCTTGTCAACAATGCTGCGGCGGTTCCCAGGCTCGGGATTCAAGGCTACGAG
 TGGTGGTCGGAGGCTCTCCACGGCTCTCCAATGTGGGTCCCAGGACCAAGTTTGGTGGGGCCTTC
 CCCGGCGCCACCAGCTTCCCTCAGGTTATCACCACCGCCGCTTCCTTCAACTCCACCCTTTGGGAGC
 AAATCGGCCCGGTGGTGTGCGACGAGGCGAGGGCGATGTACAACGGAGGGGCGGCAGGGCTGAC
 ATTTTGGAGCCGAACGTGAACATATTCAGGGACCCACGGTGGGGGAGAGGGCCAAGAGACTCCCG
 GAGAGGACCCATACCTCGCCGAAAGTACGCTGCCAGCTACGTCAAAGGACTCCAAAGTGTGTCA
 GGAACAGGCTCAAAGTGGCCCGCTGCTGCAAGCACTACACCGCTTACGATCTCGATAACTGGAAC
 GCGTGGATCGTTACCATTTCAATGCCAGGTGAGCAAGCAAGATTTGGCGGATACATACGACGTG
 CCGTTTAAGCCTGCGTGTAGGAAGGCAATGTTGCTAGTGTATGTGCTCCTACAATCAAGTCAAC
 GGCAGCCCACTGCGCTGACCCTGACCTCCTCAAGGGACCATCCGCGGCAATGGCACCTTAAC
 GGGTACATCGTCTCGGATTGTGACTCAGTTGGGGTCTTTACGACAACCAACATTTACCAAGACC
 CCAGAAG **AAGCCGCTGCAGCCACCATTAAAGCCGGGTTGGACTTGGATTGTGGCCCGTTCTTGGCAA**
TCCACACGGAGAACGCCGTTAAAGGCGGGCTGTTAACCGAGGAAGACGTTAACCTGGCGTTGGCTAA
CACGTTAACTGTCCAGATGAGATTGGGTATGTTTGACGGAGAACCCTCGGCCAGCCTTTTGGGCAT
TTGGGCCCAACTGACGTCTGCACTCCAGCCCATAAACCAGCTGGCCCTCGATGCAGCCCGACAAGGTA
TCGTCCTTCTTCAGAACC GCGGCAAGGCGTTGCCGCTTCAACAACCCGCCACCGCACTATCGCCGTC
ATCGGCCCAATT CAGACGTCACCGTCACCATGATCGGTAATTACGCCGGAGTTGCTTGGGGCTACA
CGACTCCCCTGCAAGGAATCGCCAGATATGCAAGGACGTTTACCAATCGGGATGCTCCGACGTTAC
CTGCGCCGGAACCAACAATTCAGCGCGGCGGAGTTGATTGCACGGCAGGCGGACGCTACTGTTCTG
GTAATGGGACTCGACCAATCCATTGAAGCAGAGTTTAGGGATAGGGCGGGTCTCTTGTTGCCAGGT
 CACCAACAAGAGCTTATCTCCAGAGTGGCCCGAGTTTCAAAGGCCCAACCATTTTGGTACTTATG
 AGCGGAAGCCCAATTGATGTCACATTCGCAAAGAACGATCCACGAATAAGCGCTATTATATGGGCC
 GGGTATCCGGGTCAGGCCGCGGTA CTGCAATCGCCGATGTATTGTTTCGGAAC TACCAATCCACAT
 GGAAGTTGCCGATGACATGGTACCCGCAAACTACATATCCAAGGTACCAATGACGGACATGGG
 AATGAGACCCGACCCTAGAAGAGGCTACCCGGGAAGAACCTACCGGTTCTACAAGGGACCCGTGG
 TTTACCCATTCGGCTACGGACTCACATATGCCAGATTCGGGGTGGCAATATCCAACGGTCCGAAAC
 AAGTGAATGTGCCACTCTCCACCACAAGTCTCACA ACTCTACAACAGGGCAACACTTCTTACTAC
 CTTCTCGGCTGCGATCCGAACCATCCACACAGACTGCGAAAGCCACGCGATGTCCCTGGATATCG
 AAGTGGATGTCAAGAACACCGGAAGCGTGGACGGAATCCACACACTCCTGGTGTCTCCAGCCCGC
 CAGAGGGTGATAAGTGGTCCGCTAACAAACAGCTGATCGGGTTCGAGAAGGTGAATTTGGTGGCC
 GGGTCGAGCAAACCTGGTTCGGGTCAATGTCCGGGTGTGTAAGCACCTGAGCGTAGTTGACCAGTAC
 GGGCACCGGAGGATTCCGTTCCGGTCAGCATCATCTTCACATCGGTGATCTCAAGCATTCCGTTTTGA
 TCCAATTGGGTTCCAATGCGATCATCAAGGCATGATTACGATGATGAATTGATGATGATTATTATTA
 TTATCATTATAAGTTAAACTGGAAACTGATTCTTTTGTCTTTAGCAAATGTAAGATAGGAGGCAGG
 GGCAAAGATTGGTAAACAGAATAGAATACTAAGATTGAAAATGATTTGGTCAATAAGGAGTGAGT
 GAGTGAATGACCAGCTTTTAAGGGTTCCTCTGCTGGGTTTGCAGTTTCTTTGTTTCATAGGGAAGCA
 ACTGTGAGATAAGGATTTCAAGATTTGCTTTACTATTTTGTGCTTTGTTTGTCTACTGTGAAAC
 AAACCTGAAGTTGTTGCCTCGAGGAAAACAGAGGATGTACTCATGGACTAGAGATTAAGAAAG
 GNTTGATTGTTCTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 24 : Séquence nucléotidique de l'ADNc *LuBXL1*.

La partie soulignée colorée en jaune représente le fragment utilisé pour la construction IR-PTGS.

D – Transformation avec construction IR-PTGS

Les expériences de transgénèse ont été menées sur les cultivars Diane et Hermès. Des hypocotyles sont inoculés par les souches CV1301 (pGV2260/pCHLuBXL1), (pGV2260/pAHLuBXL1), (pGV2260/pCambia vide) et (pGV2260/pART27 vide), cocultivés deux jours sur milieu MSR puis repiqués sur milieu MSR + kanamycine (100 mg.L⁻¹) + Timentin (500 mg.L⁻¹) ou MSR + hygromycine (10 mg.L⁻¹) + Timentin (500 mg.L⁻¹). Après une semaine quelques explants issus du cultivar Diane forment des bourgeons avec la sélection à la kanamycine (53 % des explants qui forment des bourgeons) et l'hygromycine (12 % des explants forment des bourgeons) (Tableau 4). Pour le cultivar Hermès, le taux de bourgeonnement est très faible quelque soit l'agent de sélection (moins de 5 % de bourgeonnement pour les deux agents de sélection).

Les explants Hermès semblent les plus récalcitrants à la transformation. Les explants Diane hautement organogènes, ont été choisis pour réaliser les expériences de transgénèse avec le vecteur pAHLuBXL1. La kanamycine semble être l'agent de sélection la plus adapté à la fois au bourgeonnement et à la sélection.

E – Elongation et enracinement des lignées transformées

Les essais de transgénèse sur le cultivar Hermès ont été peu concluants, ne permettant même pas la multiplication des bourgeons sur milieu de sélection. En ce qui concerne le cultivar Diane, les bourgeons qui se développent sur milieu MSR avec l'hygromycine comme agent de sélection ont été tous nécrosés. Au final, il n'est resté que les bourgeons (75) issus du cultivar Diane se développant sur le milieu MSR avec kanamycine (voir Tableau 5). Après plusieurs cycles de repiquage en milieu MSR avec kanamycine ces bourgeons ont été transférés sur milieu d'élongation et d'enracinement RoA (annexe). Après plusieurs cycles de repiquages, on a remarqué que 46 bourgeons sont allongés et 29 lignées sont nécrosées (Figure 35). Cependant, les vitroplants ne s'enracinaient pas et il y a eu une formation de cals aux extrémités de la tige, mais pas de racines.

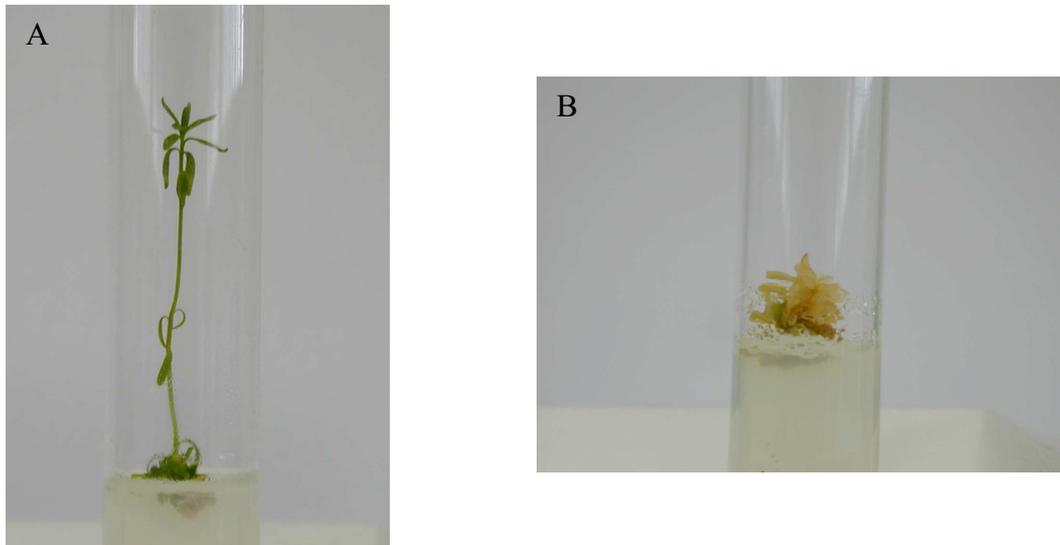


Figure 25 : Elongation des bourgeons en tube dans le milieu de RoA.

A : Vitroplant, B : Bourgeon nécrosé

Du fait que nous souhaitons transférer et caractériser ces plantes, en serre l'absence d'enracinement était problématique. Nous avons donc décidé de tester différentes concentrations d'ANA pour essayer de favoriser l'enracinement. La Figure 36 présente le pourcentage d'enracinement observé dans les différents milieux testés par les 46 lignées. On observe qu'une concentration de $0,01\mu\text{M}$ d'ANA (RoA1) favorise l'initiation et la continuation de l'enracinement chez les plantules transformées (75% d'enracinement). Une augmentation de la concentration d'ANA a une influence négative sur le taux d'enracinement. L'absence totale de l'ANA influence légèrement sur l'enracinement (60% de plantes sont enracinées).

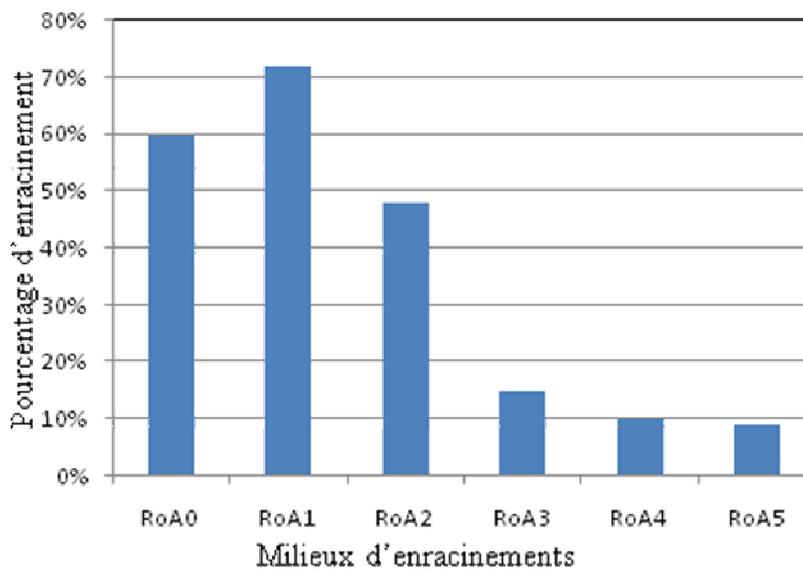


Figure 26 : Effet de l'ANA sur l'enracinement des plantules transformées.

- RoA0 : RoA sans ANA
- RoA1 : RoA0 + $0,01\mu\text{M}$ d'ANA
- RoA2 : RoA0 + $0,05\mu\text{M}$ d'ANA correspond au milieu RoA (annexe)
- RoA3 : RoA + $0,1\mu\text{M}$ d'ANA
- RoA4 : RoA + $0,15\mu\text{M}$ d'ANA
- RoA5 : RoA + $0,2\mu\text{M}$ d'ANA

F - Rendement de transformation

Le rendement de transformation se définit comme le nombre de plantes transformées obtenues par rapport au nombre d'explants de lin mis en co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens* au début de l'étude. Il se calcule de la manière suivante (Laplace, 2004).

$$\text{Rendement de transformation (en \%)} = \frac{\text{Nombre de plantules transformées}}{\text{Nombre d'explants}} \times 100$$

Dans nos travaux, les plantes considérées comme transformées sont celles qui ont développé un système racinaire sur le milieu d'enracinement sélectif attestant leur état transgénique probable. La caractérisation des transformants, au niveau moléculaire, sera détaillée dans la partie 1.7.

Dans nos travaux, 4 transformations ont été initiées : 2 cultivars (Hermès et Diane) chacun transformés avec deux vecteurs différents pAHLuBXL1, pART27 vide, pCHLuBXL1 et pCambia vide. Le Tableau 5 récapitule les résultats obtenus à chaque étape du protocole de transformation.

Récapitulatif	Diane				Hermès			
	pAHLuBXL1	pART27	pCHLuBXL1	pCambia	pAHLuBXL1	pART27	pCHLuBXL1	pCambia
Explants inoculés	2546	1938	2654	2156	2785	2320	2865	1978
Bourgeons produits	75	65	25	17	17	13	21	13
Bourgeons allongés	46	32	10	5	2	0	3	0
Plantules enracinées	15	8	0	0	0	0	0	0
Plantes transformées	15	8	0	0	0	0	0	0
Rendement de transformation	0,58	0,41	0	0	0	0	0	0

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats obtenus à chaque étape de la transformation génétique de lin.

Nous avons réussi à avoir des plantes transformées en utilisant le cultivar Diane et la kanamycine comme agent de sélection. Dans cette étude, l'hygromycine semble inhiber à la régénération des bourgeons et leur élongation. D'autres travaux viennent confirmer cette observation, Bretagne-Sagnard & Chupeau (1996) ont comparé l'efficacité de sélection de la septinomycine par rapport à celle de la kanamycine lors de la transformation de lin Antares. En utilisant la septinomycine comme agent de sélection, les auteurs ont obtenu un rendement de 15% alors qu'aucune plante n'a pu être sélectionnée avec la kanamycine. Mlyrnarova et al. (1994) ont obtenu un taux de transformation avec le cultivar Glenelg sur un milieu contenant de la kanamycine (17 plantes transformées pour 75 fragments d'hypocotyles mis en coculture avec *A. tumefaciens*). Ces rendements paraissent très élevés par rapport à nos rendements, cependant aucune information n'est donnée sur le caractère indépendant de chaque lignée transgénique régénérée. Cette valeur importante de rendement pourrait donc s'expliquer par le fait que tous les bourgeons produits par les cals organogènes ont été conservés et ont abouti à l'obtention de plantules transformées, mais pouvant provenir du même environnement de transformation. Les rendements affichés de transformations génétiques du lin peuvent aussi varier en fonction de la méthode de calcul utilisée. En effet dans leur étude sur le cultivar Norlin, Dong et MacHughen (1993) ont obtenu un rendement de transformation de 16,4% qui correspond au nombre de bourgeons transformés par rapport au nombre d'explants mis en coculture. Cette valeur n'est donc pas directement comparable à notre valeur de rendement de 0,58% qui correspond au nombre de plantes transformées par rapport au nombre d'explants inoculés.

En utilisant leur méthode de calcul, nous obtenons un rendement de 20% qui est comparable à ce que celui obtenu par Dong et MacHughen (1993).

Les rendements de transformation génétique du lin peuvent être affectés par le cultivar utilisé. Généralement, les efficacités de transformations par *Agrobacterium tumefaciens*, avec la kanamycine comme agent de sélection, sont assez faibles. Par exemple, Jaine et ses collaborateurs (1999) parlent d'un faible rendement de transformation avec le cultivar McGregor, sans pouvoir le quantifier réellement. Laplace. (2004), a montré que le cultivar Oliver permettait d'obtenir de meilleurs rendements de transformation que le cultivar Barbara : 0,63% contre 0,12 % respectivement. Bretagne et al (1994) ont montré que les cultivars à fibres présentent en général des capacités de régénération plus faibles que les cultivars oléagineux. Il

semble que le cultivar Hermès est le plus sensible au niveau bourgeonnement et le plus récalcitrant à la transformation.

En résumé nous avons effectué les transformations sur les cultivars à fibre Diane qui présentaient un taux de régénération favorable. Nous avons aussi choisi le milieu MSR pour le bourgeonnement et la kanamycine comme agent de sélection. Finalement, pour améliorer l'enracinement des plantes nous avons diminué la quantité d'ANA de 0,05 à 0,01 μ M.

G – Confirmation moléculaire de la présence des transgènes

Avant de multiplier les lignées pour des analyses ultérieures, une vérification de l'état transgénique des différentes lignées enracinées s'imposait. Ce contrôle a été réalisé par PCR sur les feuilles des lignées transformées. Pour cela, des amorces spécifiques du transgène *nptII* ont été choisis pour les clones transformés avec le vecteur vide pART27 (voir annexe). Pour les lignées transformées avec le vecteur pHALuBXL1 deux amplifications par PCR ont été effectuées à l'aide de deux couples d'amorces suivants : R2XYL (en 5') et intronA (en 3') (voir annexe) permettant l'amplification d'un fragment correspondant à l'insert en position sens et une partie de l'intron présent entre les deux inserts (Figure 37), et d'autre part l'intron B (en 5') et R2Xyl (en 3'). Permettant l'amplification du fragment qui correspond à l'insert en position antisens et à une autre partie de l'intron. A titre d'exemple, les résultats présentés dans la figure 38 correspondent aux amplifications réalisées sur quatre lignées indépendantes.

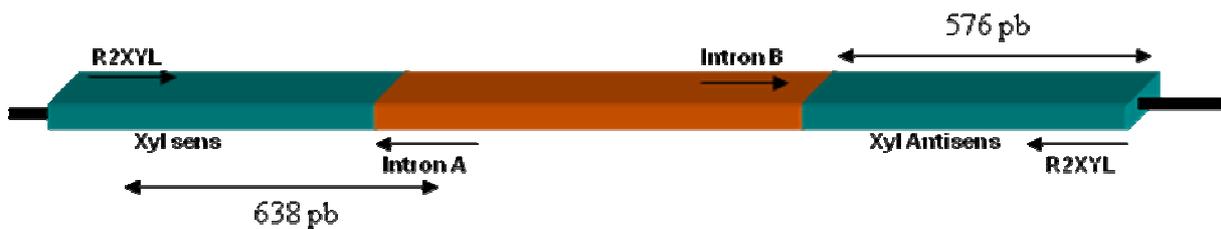


Figure 27 : Schéma montrant les amplifications par PCR et la taille des produits PCR.

Ces résultats, montrent que les séquences correspondant aux transgènes sont présentes dans le génome des lignées transformées. Au total, 15 clones provenant d'un événement de transformation indépendant ont été obtenus et nommés X1 à X15. Parallèlement à ces manipulations, des témoins Diane non transformés, notés « W », et des lignées notées « P » transformées par un vecteur vide ont été régénérés en suivant le même protocole de culture que les lignées X1-X15. Après multiplication de ces différents clones, les vitroplants ont été transféré en serre.

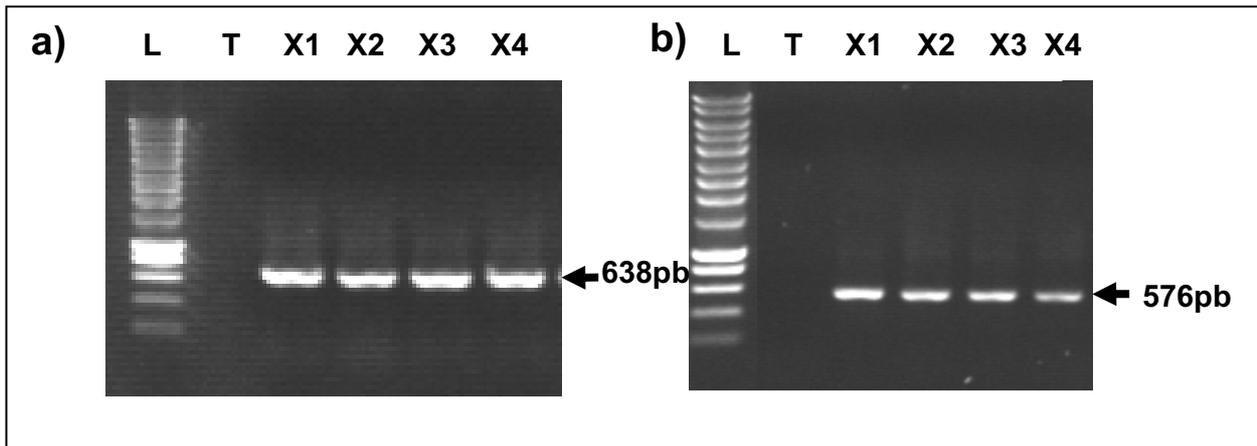


Figure 28 : Confirmation de la présence des transgènes chez les lignées résistantes à l'agent de sélection.

Les produits PCR sont obtenus à l'aide des amorces spécifiques R2XYL, intronA et intronB pour l'amplification de deux fragments de 638 pb et de 576 pb. Ils ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1,2 % en présence de bromure d'éthidium.

L : l'échelle de taille (SmartLadder)

T : Plante sauvage utilisé comme témoin négatif

X1, X2,X3,X4 : 4 lignées indépendantes transformées avec le vecteur binaire pAHLuBXL1

Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle d'une β -xylosidase de lin

A. Analyse de la séquence d'une β -xylosidase (LuBXL1) de lin

Après avoir fait une première classification fonctionnelle d'ESTs issus des tissus externes de tiges de lin (*Linum usitatissimum*), nous avons généré d'autres ESTs (2 000) à partir des mêmes tissus. Des analyses bioinformatiques ont indiqué que 43 ESTs sur 3 000 (1,4 % au total) correspondent à des β -xylosidases et que 42 de ces ESTs correspondent au même gène. La forte représentation d'un seul gène à savoir la β -xylosidase (*LuBXL1*) suggère que ce gène joue un rôle important au niveau des tissus externes et, potentiellement dans le développement des fibres phloémiennes.

La séquence complète d'ADNc *LuBXL1* (Figure 38) possède une longueur de 2661 pb et comporte des régions non traduites de 10 pb et 313 pb situées respectivement en amont (5' UTR) et en aval (3'UTR) d'une région codante putative avec une queue poly A de 18 nucléotides à l'extrémité 3'. L'ADNc code pour une protéine de 782 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 84 520 Da et un point isoélectrique calculé de 8,8. La prédiction des modifications post-transcriptionnelles indique la présence d'un peptide signal de 29 acides aminés et de 2 sites putatifs de N-glycosylation. L'étude de la séquence permet également de mettre en évidence la présence de deux motifs de la famille des glycosides hydrolase 3. Ces observations suggèrent que la protéine est extra-cellulaire et glycosylée et qu'elle appartient à la famille GH3.

Les alignements de la séquence protéique de lin avec d'autres espèces (figure 39) et l'analyse phylogénétique (Figure 40) montrent des zones conservées au niveau du motif C-terminal qui est un domaine impliqué dans la catalyse et peut être dans la fixation des β -glucanes. On note également la présence des motifs N-terminal caractérisant la famille GH3. Il existe une forte homologie (entre 83 à 91 %) de la séquence de lin avec la séquence d'une α -arabinofuranosidase de *Citrus unshiu*, d'une β -xylosidase de *Fragaria x ananassa* et d'une α -arabinofuranosidase/ β -xylosidase de *Pyrus pyrifolia*. L'arbre phylogénétique (Figure 40) montre que les protéines de la famille des GH3 englobent des enzymes qui ont des activités β -xylosidases et des enzymes qui possèdent des activités à la fois α -arabinofuranosidases et/ou β -xylosidases.

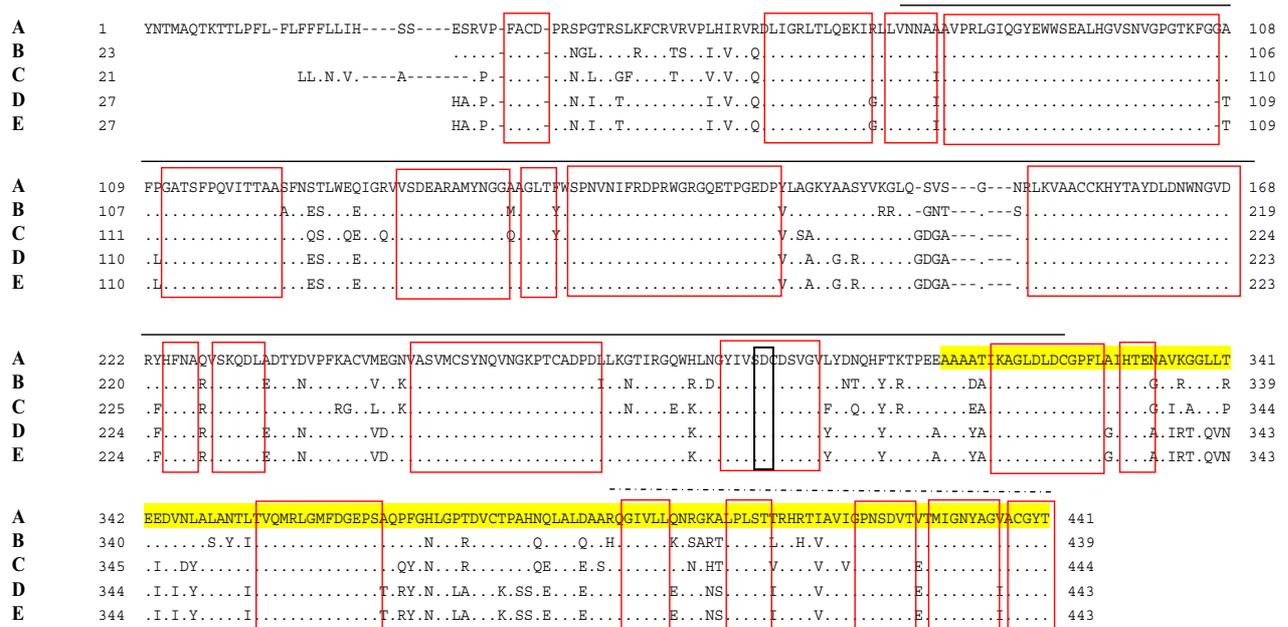


Figure 30 : Alignement de la séquence protéique de la β -xylosidase de lin et d'autres espèces montrant la présence de zones conservées (encadrées en rouge).

La partie colorée en jaune correspond à la séquence d'ADNc utilisé pour l'IR-PTGS. Le trait continu correspond au motif N-terminal caractérisant la famille GH3 et le trait discontinu correspond au motif C-terminal caractérisant la famille GH3. Le cadre noir montre l'acide aspartique 290 (D290) qui est une nucléophile catalytique

A : LuBXL1

B : α -arabinofuranosidase [*Citrus unshiu*] (BAG28345)

C : β -D-xylosidase [*Fragaria x ananassa*] (AAS17751)

D : β -D-xylosidase [*Pyrus pyrifolia*] (BAF79669)

E : α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase [*Pyrus pyrifolia*] (BAD98523)

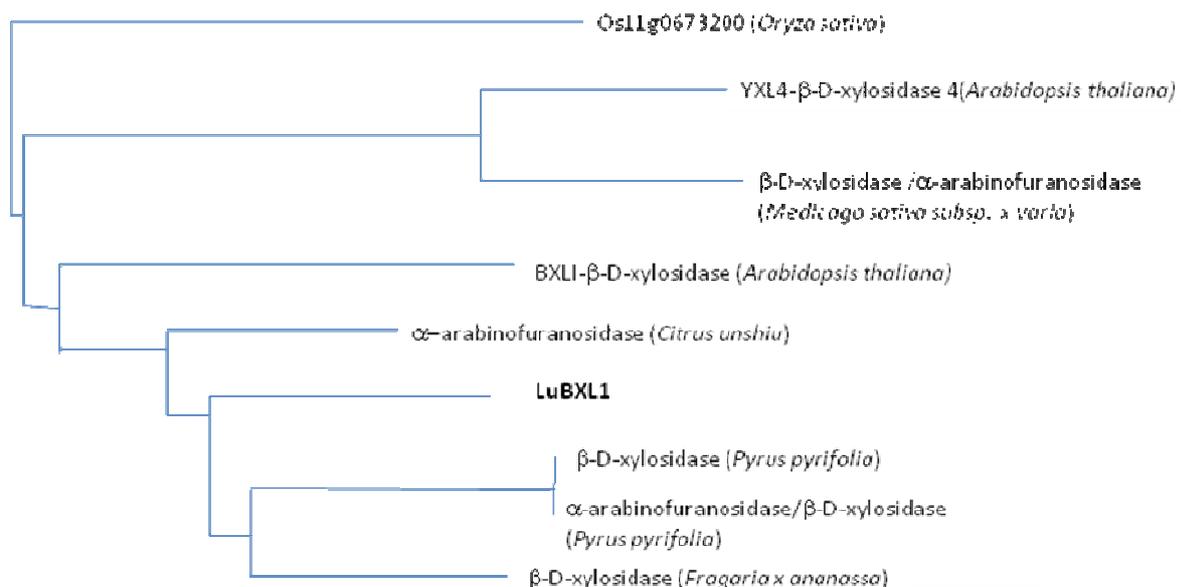


Figure 31 : Arbre phylogénétique de la β -D-xylosidase de lin et d'autres espèces végétales

B – Expression de *LuBXL1* et activité enzymatique

Afin d'en savoir plus sur le rôle biologique de *LuBXL1*, nous avons décidé de suivre l'expression du gène et de l'activité enzymatique pendant le développement des plantes sauvages de lin. Pour ceci, nous avons cultivé des plantes en serre à partir des graines (22°C, photopériode de 16 heures, éclairement de 170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR). Les plantes commencent à germer à partir de la deuxième journée après la mise en terre des graines, et les plantes atteignent une hauteur de 3 cm dès la première semaine (Figure 42). Ensuite la plante entre dans une phase de développement exponentiel à partir de la deuxième semaine (16 cm) pour atteindre une hauteur de 120 cm. Finalement, la plante commence à fleurir et à développer des capsules et la croissance s'arrête.

B.1 – Profil de l'expression du gène β -D-xylosidase au cours du développement

Nous avons suivi l'expression du gène *LuBXL1* par RT-PCR semi-quantitative (Figure 42 A et B). Pour cela nous avons utilisé les amorces XYLINT (annexe) et les amorces Ubi comme témoins (gène de l'ubiquitine utilisé comme gène de calibrage). Au niveau des feuilles (Figure 43A), l'expression du gène est un peu faible la première semaine, mais augmente dès la deuxième semaine et reste stable jusqu'à la fin de l'expérience (12 semaines). Au niveau des tiges (figure 43B), le profil d'expression est semblable à celui observé des feuilles. A partir de la huitième semaine, nous avons commencé à suivre l'évolution des transcrits au niveau des tissus externes et internes (période où il y a possibilité de séparer les deux tissus). Nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence au niveau de l'expression du gène de la β -D-xylosidase dans les deux tissus au cours du développement.

Les amorces utilisées pour l'amplification encadrent une région conservée ce qui n'exclut pas la possibilité de mesurer le niveau d'expression de plusieurs gènes de β -D-xylosidase. En effet, chez *Arabidopsis thaliana* les gènes de la β -xylosidase appartiennent à une famille multigénique et on trouve 7 gènes (Minic & Jouanin, 2006).

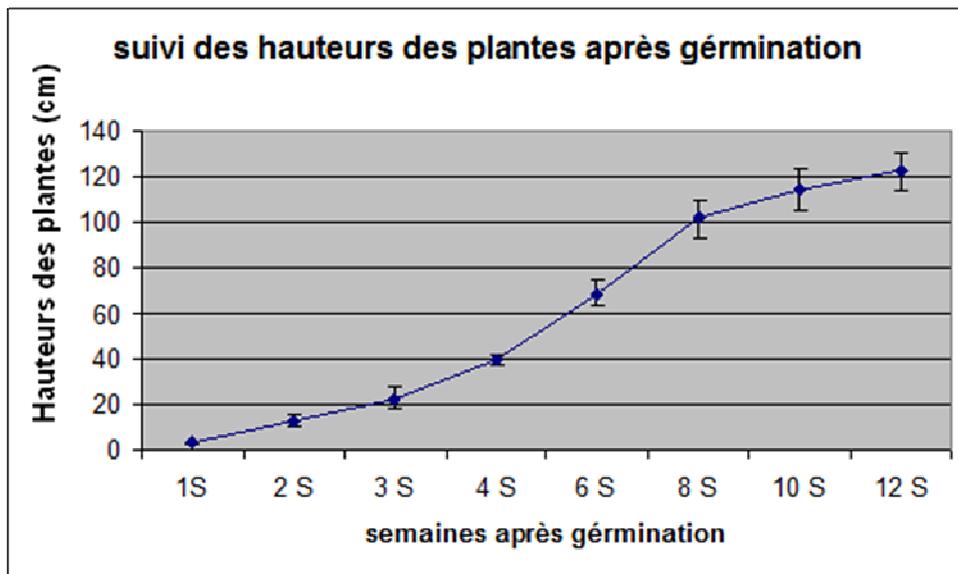


Figure 32 : Suivi des hauteurs des plantes de lin sauvages (cultivars Diane)

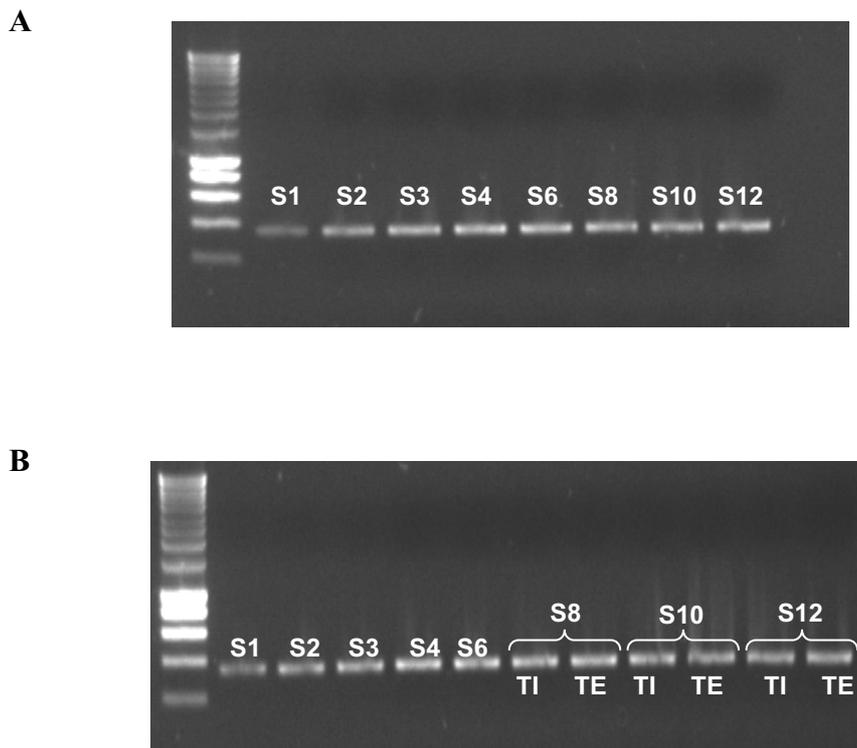


Figure 33 : Cinétique de l'expression (RT-PCR semi-quantitative) du gène β -xylosidase au cours du développement au niveau des feuilles (A) et des tiges (B) de lin.

S = Semaine
 TI = Tissus internes
 TE = Tissus externes

B.2 – Cinétique de l'activité de la β -xylosidase au cours du développement

Nous avons pris comme base de départ, pour la mesure de l'activité de la β -xylosidase les travaux réalisés par Minic & *al.* (2004). Ceux-ci reposaient sur la mesure des activités dans des extraits protéiques de tiges d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons mesuré l'activité enzymatique dans les tiges et les feuilles de lin en mesurant la variation de l'absorbance à 405 nm due à la formation du *p*-Nitrophenol. Nous avons testé deux substrats, à savoir la 4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside et la 4-Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside.

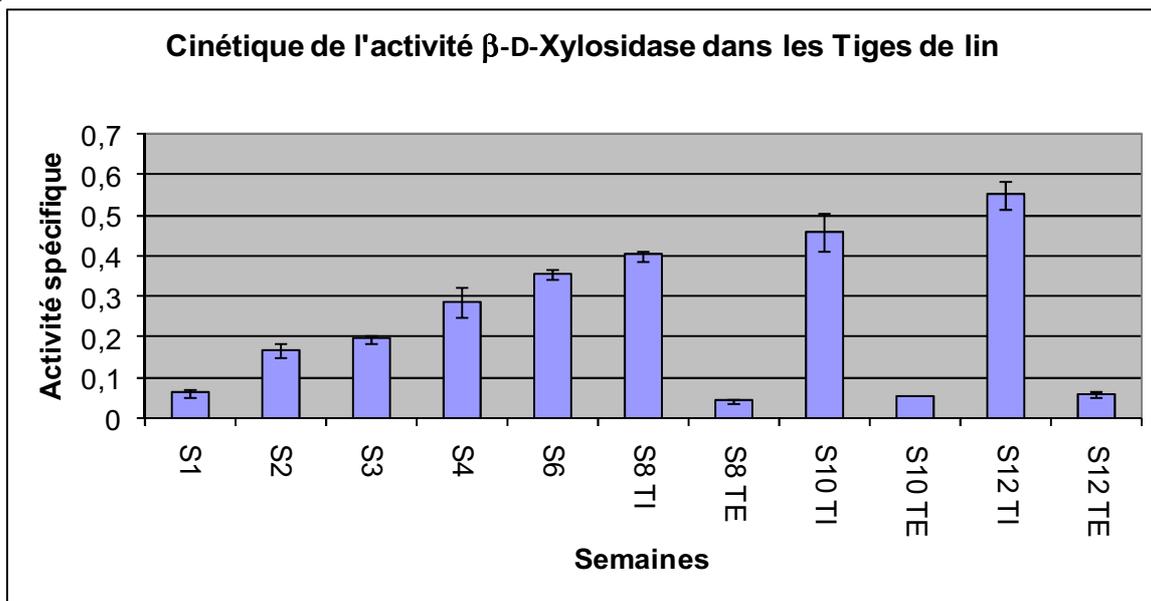
Selon la séquence protéique de la LuBXL1, la protéine possède un peptide signal et elle est donc, très probablement, une protéine pariétale. Dans ce cas, il est possible qu'elle reste accrochée à la fraction pariétale lors de l'extraction à partir de différents tissus. Pour tester cette possibilité, nous avons évalué l'effet des extractions avec ou sans sel (CaCl_2 , NaCl), et nous avons mesuré l'activité dans la fraction soluble et dans la fraction pariétale. Nos résultats ont indiqué que l'utilisation du sel (y compris une étape de dessalage) n'a pas pu mettre en évidence d'autre activité enzymatique (presque 100 % d'activité est associé à la fraction soluble). Ces mesures d'activités étaient obtenues en utilisant le substrat 4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside, seulement un niveau très bas d'activité était observé en utilisant le substrat 4-Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside.

Nous avons mesuré l'activité de la β -xylosidase pendant les 12 semaines qui suivent la mise en germination en serre. Les activités β -xylosidase ont été mesurées à partir des extraits protéiques bruts issus des tiges effeuillées, et des feuilles. Les résultats obtenus (Figure 44) sont exprimés en nanokatal par milligrammes de protéines. Au niveau des tiges on constate que l'activité de la β -xylosidase augmente dès le début du développement et continue à évoluer progressivement pour atteindre 0,35 nkat/mg de protéine pendant la sixième semaine. À partir de la huitième semaine nous avons analysé séparément les tissus internes des tissus externes. On remarque que les activités de la β -xylosidase sont 10 fois plus grandes au niveau des tissus internes que les tissus externes (0,4 nkat/mg de protéine au niveau des tissus internes contre 0,04 nkat/mg de protéine au niveau des tissus externes au cour de la huitième semaine). En ce qui concerne l'évolution de la cinétique de l'activité de la β -xylosidase au niveau des feuilles on constate que ces activités sont 5 à 6 fois plus faibles par rapport aux

tiges de lin (0,35 nkat/mg de protéines au niveau des tiges par rapport à 0,055 nkat/mg de protéine au niveau des feuilles, durant la sixième semaine).

Nos résultats indiquent que le profil de l'activité enzymatique est assez bien corrélé avec celui de l'expression du gène. Il faut souligner que les amorces utilisées pourraient très bien amplifier d'autres gènes β -xylosidases et que, en utilisant des extraits bruts, nous avons mesuré l'activité β -xylosidase globale. Dans les deux cas (expression et activité), il est possible que les profils observés soient les résultats des activités de plusieurs gènes de la même famille multigénique. Nous avons mesuré l'activité α -arabinofuranosidase dans les mêmes échantillons. Cependant, cette activité était très faible pendant toute la durée de l'expérience.

A



B

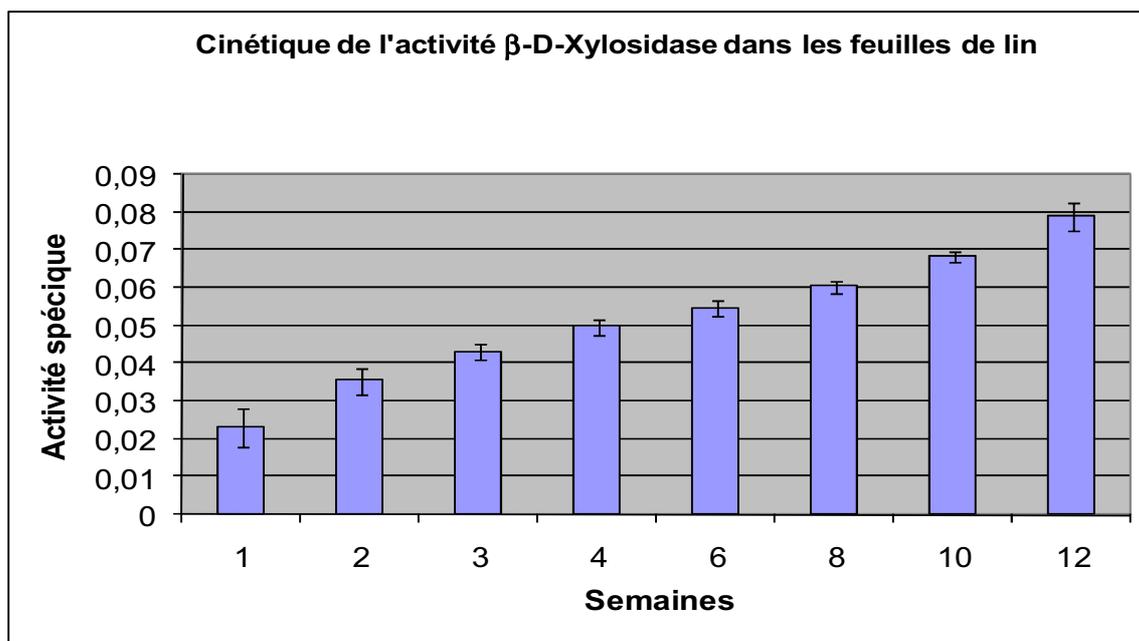


Figure 34 : Suivi de la cinétique de l'activité β -D-xylosidase dans les tiges (A) et les feuilles (B) de lin.

Activité exprimées en nkat.mg^{-1} de protéine

Barres d'erreur = écarts types

S = Semaine

TI = Tissus internes

TE = Tissus externes

C – Sous-expression du gène *LuBXL1* (IR-PTGS) chez le lin

Afin de mieux comprendre le rôle potentiel de la β -xylosidase dans le développement des plantes de lin, nous avons transformé des plantes (variétés Diane) dans l'objectif de sous-exprimer le gène correspondant (chapitre II).

C.1 – Sélection de lignées sous-exprimant la β -xylosidase

Des analyses (chapitre II) nous ont permis de sélectionner 15 lignées sous-exprimant la β -xylosidase. Ensuite, nous avons vérifié le niveau de sous-expression dans chacune des 15 lignées par RT-PCR semi-quantitative à l'aide des amorces XYLINT (issues d'une partie traduite conservée de l'ADNc, voir annexe), et les amorces XYLUTR située dans la partie non traduite 3'UTR (untranslated region). Le choix d'amorces situées dans les régions 5' ou 3'UTR sera parfois la seule alternative pour amplifier sélectivement le gène d'intérêt. En effet, soumises à une moindre pression de sélection que les régions codantes, les régions 5' ou 3'UTR présentent plus de divergence au sein d'une même famille de gènes. Nous avons utilisé comme gène de calibrage le gène de l'ubiquitine. Nos résultats (Figure 45) montrent que les lignées X9 et X15 produisent beaucoup moins d'ARNm du gène *LuBXL1* par rapport aux plantes sauvages (W1-W3) et aux plantes transformées avec le vecteur vide (P1-P6). Par contre, pour les autres lignées transformées (X1-X8, X10-X14) on observe une accumulation similaire à celle des plantes témoins. Cette expérience a été répétée trois fois et on a obtenu les mêmes résultats.

Pour la suite de nos études nous avons gardé les lignées transformées X15 et X9 qui sous-expriment le gène de la β -xylosidase et les lignées témoins W2 et P6. Nous avons également gardé une lignée transformée qui ne sous-exprime pas ce gène (lignée X6).

Ces résultats ont été obtenus avec des plantes en serre âgées d'un mois. Nous avons réussi à obtenir des graines à partir de ces plantes (W2, P6, X6, X9, et X15). Pour des analyses complémentaires, ces graines ont été mises en germination en serre (Figure 46) et l'état transgénique de plantes contrôlé par PCR.

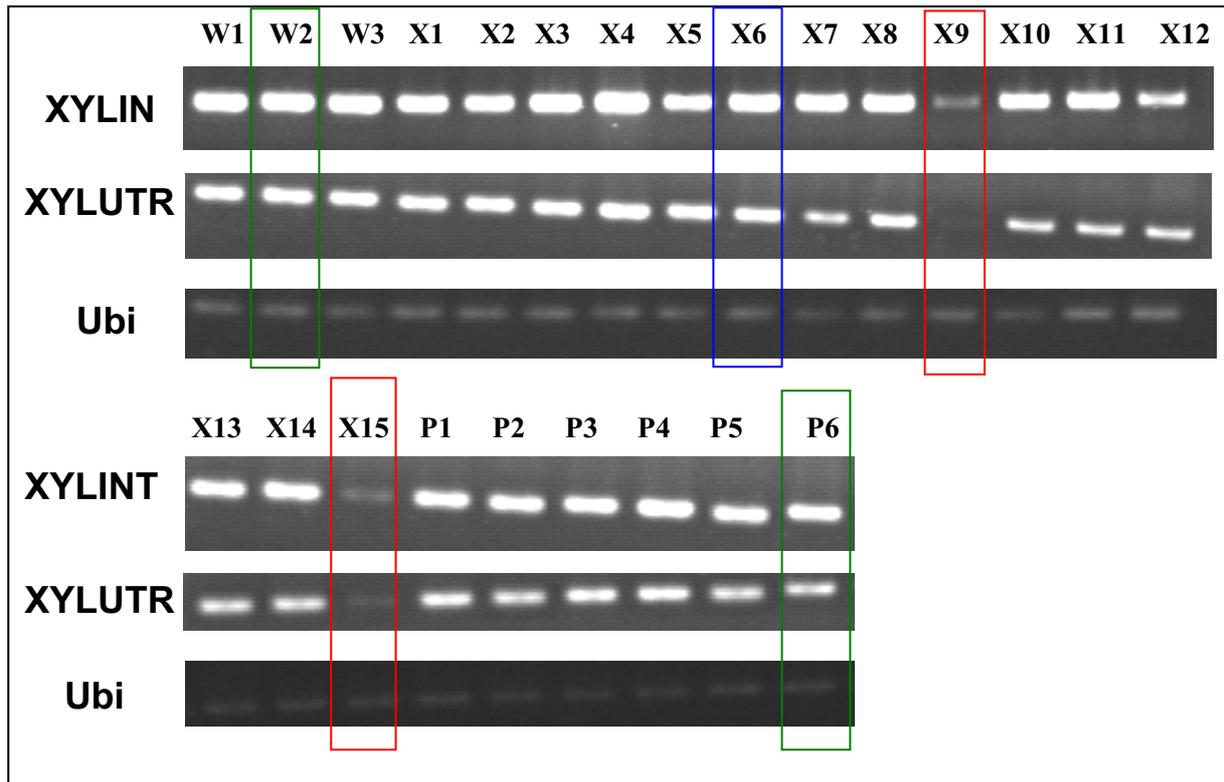


Figure 35 : Evaluation par RT-PCR de l'accumulation d'ARNm *LuBXL1*

au sein des tiges des 15 plantes transformées X1,X2....X15, des deux lignées sauvages W1 et W2 et des 6 lignées transformées avec le vecteur vide pART27 (P1...P6). Trois séries d'amplification ont été réalisées : une à l'aide des amorces Ubi (annexe) permettant l'amplification d'une séquence de 100 pb environ correspondant à l'ubiquitine. Les deux autres à l'aide des amorces XYLUTR spécifique de la séquence 3'UTR du gène *LuBXL1* et des amorces XYLIN spécifiques de la séquence interne du gène *LuBXL1*. Les extractions d'ARN ont été faites à partir des plantes *in vitro* âgées d'un mois après transfert en serre.



Figure 36 : Plantes témoins et transformées de lin mises en serre

C.2 – Vérification de la sous-expression du gène *LuBXL1* dans la génération T1

La figure 47 montre le profil de l'expression du *LuBXL1* par RT-PCR semi-quantitative chez les plantes témoins et transgéniques âgées d'un mois. On ne distingue qu'un faible signal dans les pistes correspondant aux lignées X9 et X15 (par rapport aux lignées W2, P6 et X6) ce qui signifie que ces plantes sous-expriment le gène de la β -xylosidase.

Donc on constate que les plantes X9 et X15 de la première génération gardent leur niveau de sous-expression de ce gène par rapport aux plantes témoins.

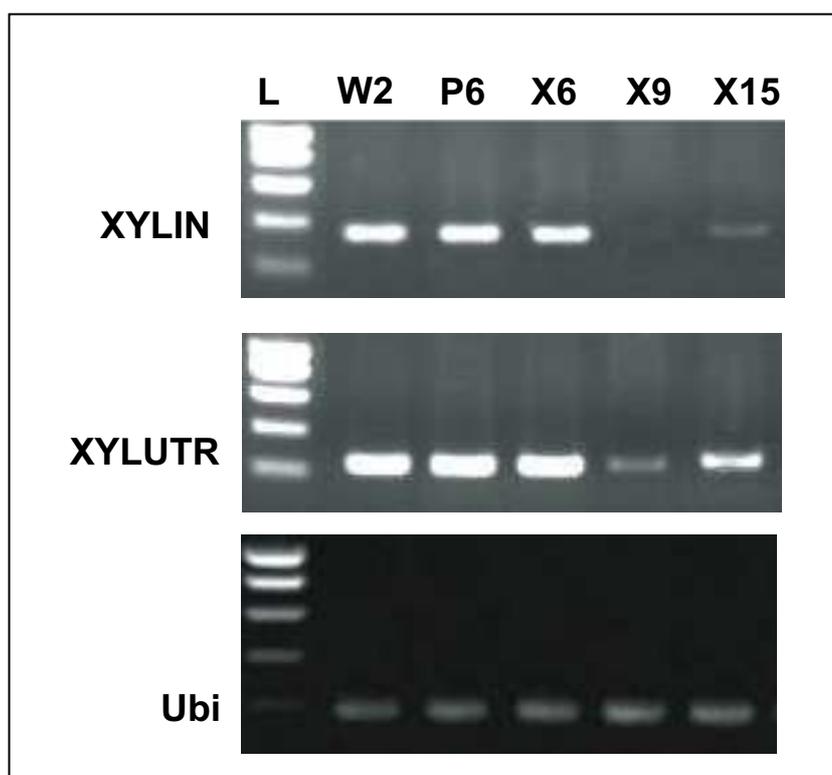


Figure 37 : Evaluation par RT-PCR semi-quantitative de l'accumulation d'ARNm *LuBXL1*

Evaluation au sein des tiges des 5 lignées W2, P6, X6, X9 et X15. Les extractions d'ARN ont été faites à partir des plantes en serre issues de la germination des graines (plantes de la génération T1 âgées de 1 mois).

D - Caractérisation des plantes sous-exprimant le gène LuBXL1

D.1 – Mesures des activités β -xylosidases

D.1.1 - Dans les plantes (génération T0) transférées en serre

Nos résultats ont indiqué que les 2 lignées X9 et X15 sous-expriment le gène de la β -xylosidase. Afin de vérifier que la sous-expression du gène était associée à une diminution de l'activité enzymatique, nous avons mesuré les activités β -xylosidases des extraits protéiques bruts issus des tiges effeuillées des clones *in vitro* W2, P6, X6, X9 et X15 échantillonnées après un mois de leur sortie en serre. Nos résultats (Figure 48 A) montrent que les lignées X9 et X15 présentent une diminution de l'activité xylosidase d'environ 50 % par rapport aux témoins (0,15 et 0,14 nkat.mg⁻¹ par rapport au témoin 0,3 nkat.mg⁻¹). La diminution des activités β -xylosidase concorde avec l'expression du gène (mise en évidence par RT-PCR). Il est également intéressant de constater que la lignée X6 (transformée mais qui ne sous-exprime pas) ne montre pas de diminution d'activité enzymatique.

Nous avons fait les mêmes mesures sur les feuilles. Nos résultats (Figure 48B) montrent que les activités chez les feuilles sont plus faibles par rapport aux tiges (4 à 10 fois plus faibles chez les feuilles que chez les tiges). En ce qui concerne les plantes transformées X9 et X15, on n'observe aucune différence significative d'activité par rapport aux témoins, Cependant il est difficile de comparer avec des niveaux d'activité si bas.

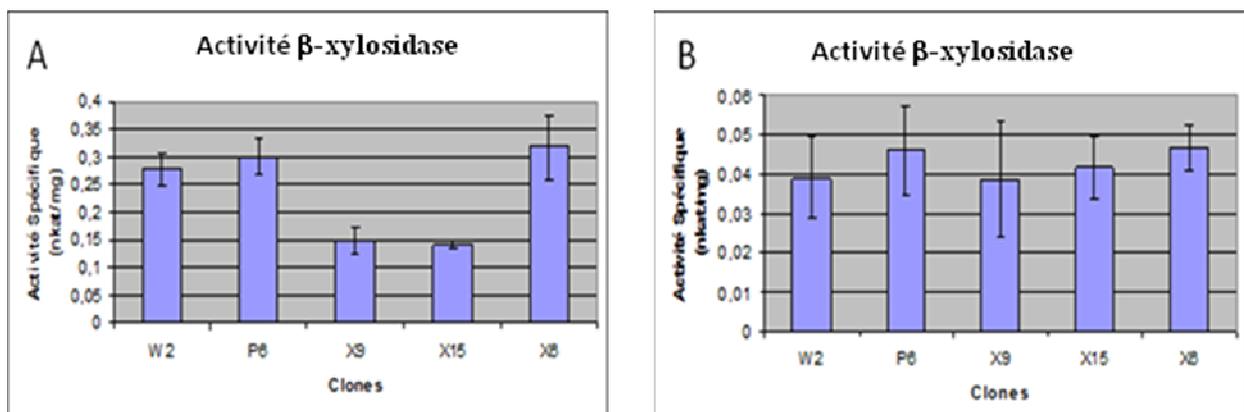


Figure 38 : Mesure des activités β -xylosidases au niveau des tiges (A) et des feuilles (B) chez les plantes témoins et transformées.

Les extraits protéiques bruts sont issus des clones *in vitro* échantillonnés après un mois de leur sortie en serre. L'activité est exprimée en nkat/mg de protéine.

D.1.2 - Dans les plantes de la génération T1

Ayant confirmé que la sous-expression du gène *LuBXL1* était associée à une forte diminution de l'activité β -xylosidase des tiges âgées d'un mois (génération T1), nous avons mesuré les activités dans les tiges de plantes de la génération T1 âgées d'un et deux mois.

La figure 49 montre une diminution significative des activités β -xylosidases chez les lignées X9 et X15 deux fois inférieure à celle du témoin au bout du premier mois (0,19 et 0,22 contre 0,4 nkat par mg de protéine). D'une façon intéressante, nous avons remarqué une diminution de l'activité au niveau de la lignée X6. Cependant, la diminution est moins importante que pour les lignées X9 et X15. On retrouve les mêmes profils des activités enzymatiques des tissus externes dans les différentes lignées qui sont plus basses au niveau des tissus externes par rapport aux tissus internes (8 fois plus faible dans les tissus externes).

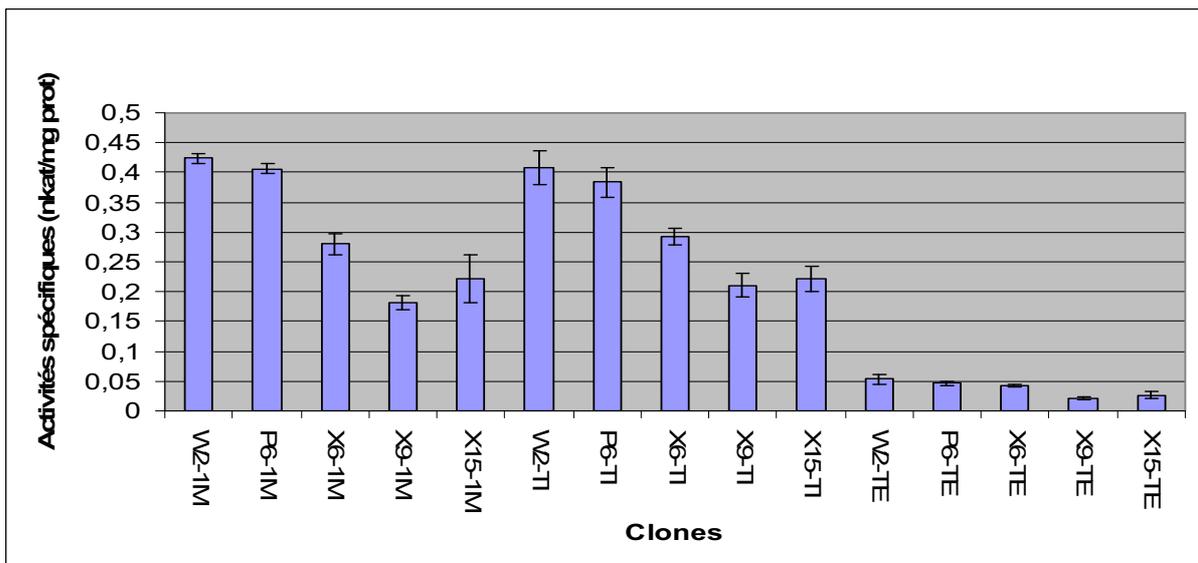


Figure 39 : Mesure des activités β -xylosidase au niveau des tiges chez les plantes témoins et transformées.

Les extraits protéiques bruts sont issus de tiges âgées d'un mois (1M) et de tissus internes (TI) et externes (TE) de tiges de plantes âgées de 2 mois. L'activité est exprimée en $\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine.

D.2 – Caractérisation phénotypique

Pour vérifier un impact éventuel de la sous-expression de *LuBXL1* sur le phénotype, nous avons réalisé des mesures des hauteurs des plantes des lignées transformées et témoins (génération T1) tout au long du cycle de développement. Nous n'avons remarqué aucune différence entre la plantes témoins et plantes transformées. Nous avons fait aussi une comparaison du nombre et de la taille et la forme des feuilles entre les différentes lignées. Nous n'avons constaté aucune différence notable.

En revanche, nous avons suivi le début de la floraison des plantes et nous avons constaté que les plantes W2 commencent à fleurir plus tôt que les autres lignées (à partir de la 10^{ème} semaine). Les autres lignées (transformées) ont commencé à fleurir une semaine après. La même chose a été observée pendant la formation des capsules. La formation des capsules a été décelée au début de la 14^{ème} semaine chez la plantes sauvages. La formation des capsules chez les autres lignées (P6, X6, X9, et X15) se fait un peu près 4 jours plus tard.

Nous avons également noté que le nombre des capsules et des graines (0 à 10 par capsule) étaient à peu près comparable entre les plantes sauvages et transformées.

En conclusion, Il semblerait que la sous-expression de *LuBXL1* n'est pas traduite par un phénotype important.

D.3 – Caractérisation microscopique

Nos résultats ont montré que la sous-expression du gène *LuBXL1* n'est pas associée à un phénotype visible. Nous avons donc décidé d'examiner de plus près la structure générale et l'organisation des différents tissus de la tige de lin. Pour cela nous avons réalisé des coupes transversales des tiges (niveau basal) de lin âgées de deux mois (la génération T1). Les coupes étaient colorées au Toluidine-Blue-O (TBO) pour visualiser la structure générale et au réactif de Weisner (Phloroglucinol-HCl) pour apporter des informations histochimiques sur la distribution de tissus lignifiés.

La figure 50 montre l'organisation tissulaire d'une tige de lin (cultivar Diane âgé de deux mois).

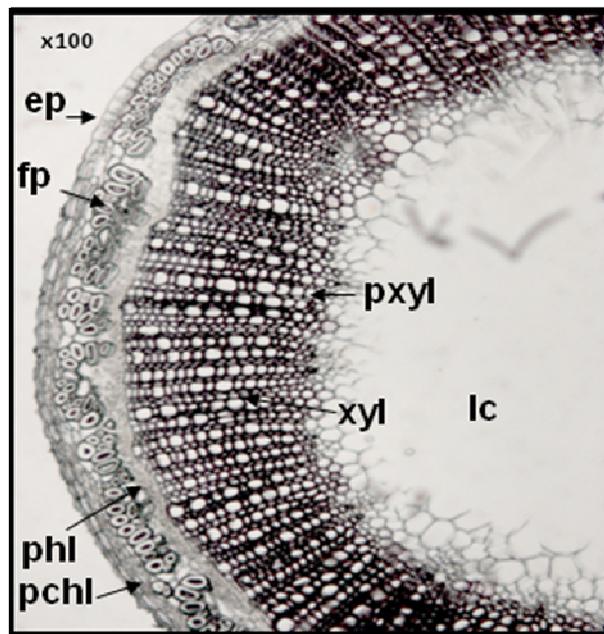


Figure 40 : Organisation tissulaire d'une tige de lin.

Observation au microscope optique d'une coupe transversale de tige de lin au stade mi-floraison après une coloration au phloroglucinol. De l'extérieur vers l'intérieur de la tige : épiderme (ep), parenchyme chlorophyllien (pchl), fibres périphloémiennes (fp), ploème (phl), xylème (xyl), protoxylème (pxyl) et lacune centrale (lc).

Le faible grossissement de la figure montre l'architecture générale de la tige : une gaine de fibre à paroi épaisse entoure les tissus conducteurs.

En partant de la périphérie, une première couche de cellules très jointives, à paroi épaisse est observable et constitue l'épiderme recouvert d'une cuticule cireuse protectrice.

Sous cette couche épidermique se trouve le parenchyme chlorophyllien constitué de cellules arrondies, plus ou moins rondes, montrant de nombreux et larges méats. La faible épaisseur des parois de ces cellules explique que ces tissus peuvent être parfois comprimés lors de la croissance des tissus plus internes (bois, faisceaux fibreux notamment). Vient ensuite une couche de cellules accolées les unes aux autres, à parois plus marquées et limitant le cortex : l'endoderme.

Sous-jacents à cet endoderme, entouré d'un parenchyme, apparaissent des groupes de cellules très différenciées à parois très épaisses et comportant un petit lumen : les faisceaux fibreux. Dans le lin à fibres, comme celui-ci, le nombre de faisceaux fibreux dans la tige varie entre 30 et 40 chaque faisceau comporte 2 à 5 couches de 4 à 12 cellules dénommées fibres élémentaires ou fibres périphloémiennes dont l'axe longitudinal est parallèle à celui du faisceau de la tige. Le nombre et la taille des faisceaux fibreux dépendent du diamètre de la tige : plus la tige est fine, plus les faisceaux seront réduits (en nombre et en taille).

Plus interne à cette assise fibreuse, apparaît le phloème secondaire formé de cellules à parois minces de natures cellulosiques. Sous ces tissus se trouve un anneau de cellules à parois minces difficilement observable car écrasé, correspondant au cambium cribro-vasculaire. Sous ce dernier, des cellules alignées, à parois épaisses, très jointives les unes aux autres colorées en rouge suggérant la nature lignifiée de leur parois : le xylème. Composé de vaisseaux de fibres et de parenchymes, ce bois hétéroxylé est formé par le cambium libéro-ligneux. Il possède les caractéristiques du bois des angiospermes mais présente toutefois certaines spécificités : les rayons parenchymateux sont difficilement distinguables et peu de variations sont observables entre le diamètre des vaisseaux et des fibres. Ces particularités morphologiques pourraient être spécifiques aux lins (Carlquist, 1988). Plus internes à ce tissu, des groupes de cellules se distinguent dans un parenchyme cellulósique qui évolue au cours de la croissance en se lignifiant à proximité du bois ou en se désagrégeant laissant une cavité centrale.

Une première observation (Figure 51) a révélé qu'aucune différence dans l'organisation générale des tissus, ni dans la distribution des tissus lignifiés, n'a pu être détectée entre les plantes témoins et les plantes transformées. La faible coloration avec le réactif de Weisner nous montre que les fibres phloémiennes possèdent des parois hypolignifiées.

Des agrandissements des tissus externes (Figure 52) montrent quelques différences potentielles entre les plantes transformées par rapport aux témoins. Chez les lignées X15 et X9, on observe que les parois de l'épiderme sont plus colorées et donc potentiellement plus

épaisses par rapport aux lignées W2, P6, et X6. Cependant, des analyses plus approfondies sont nécessaires. En ce qui concerne les fibres périphloémiennes, nous avons observé que, dans plusieurs coupes, il est possible que des différences existent au niveau de la taille et du taux de remplissage des parois. Nous avons observé que les fibres étaient plus ou moins petites chez les lignées X9 et X15 et moins remplies par rapport aux plantes témoins. Encore une fois, une étude plus détaillée est nécessaire pour confirmer ce point.

Des agrandissements des tissus internes (Figure 53) montrent que la formation des tissus xylémiens est potentiellement perturbée chez les clones X9 et X15. Le xylème est caractérisé par la présence de cellules collapsées suggérant une plus faible résistance mécanique, même si la paroi secondaire de ces cellules semble aussi épaisse que chez les plantes témoins.

La présence de cellules de ce type a été notée dans plusieurs études. Par exemple, Jones *et al.* (2001) ont observé ce phénotype chez les mutants *irx4* d'*Arabidopsis thaliana* (mutation au niveau du gène *CCR*). Persson *et al.* (2005) ont observé le même phénotype au niveau des mutants *irx8* et *irx13* (mutation de la cellulose synthase).

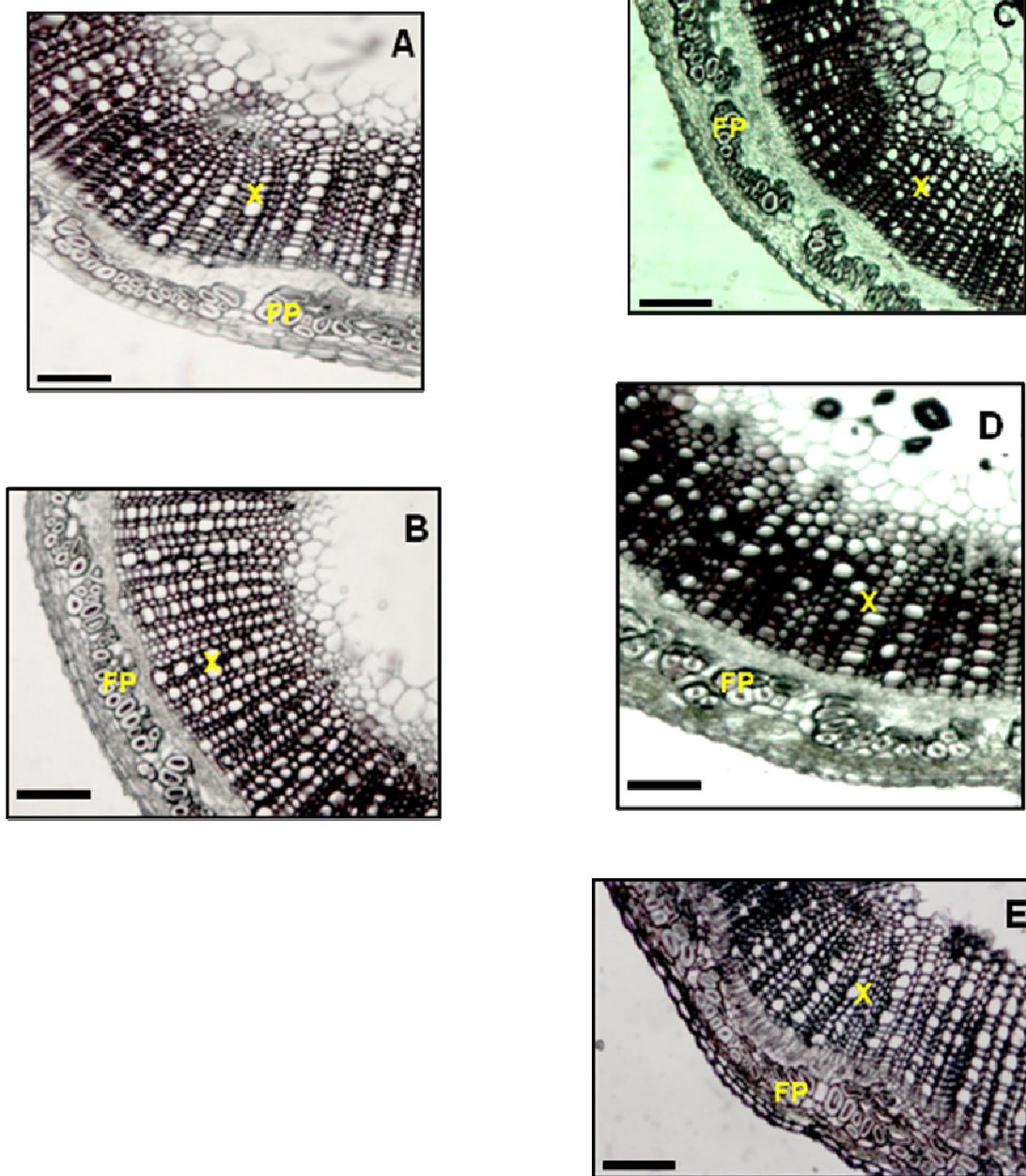


Figure 41 : Coupes transversales dans les tiges de lin colorées au phloroglucinol.

A=W1, B=P6, C=X9, D=X15 et E=X6. Les plantes sont âgées de 2 mois.
Xylème (X), fibres périphloémiennes (FP)
Barre d'échelle = 50µm

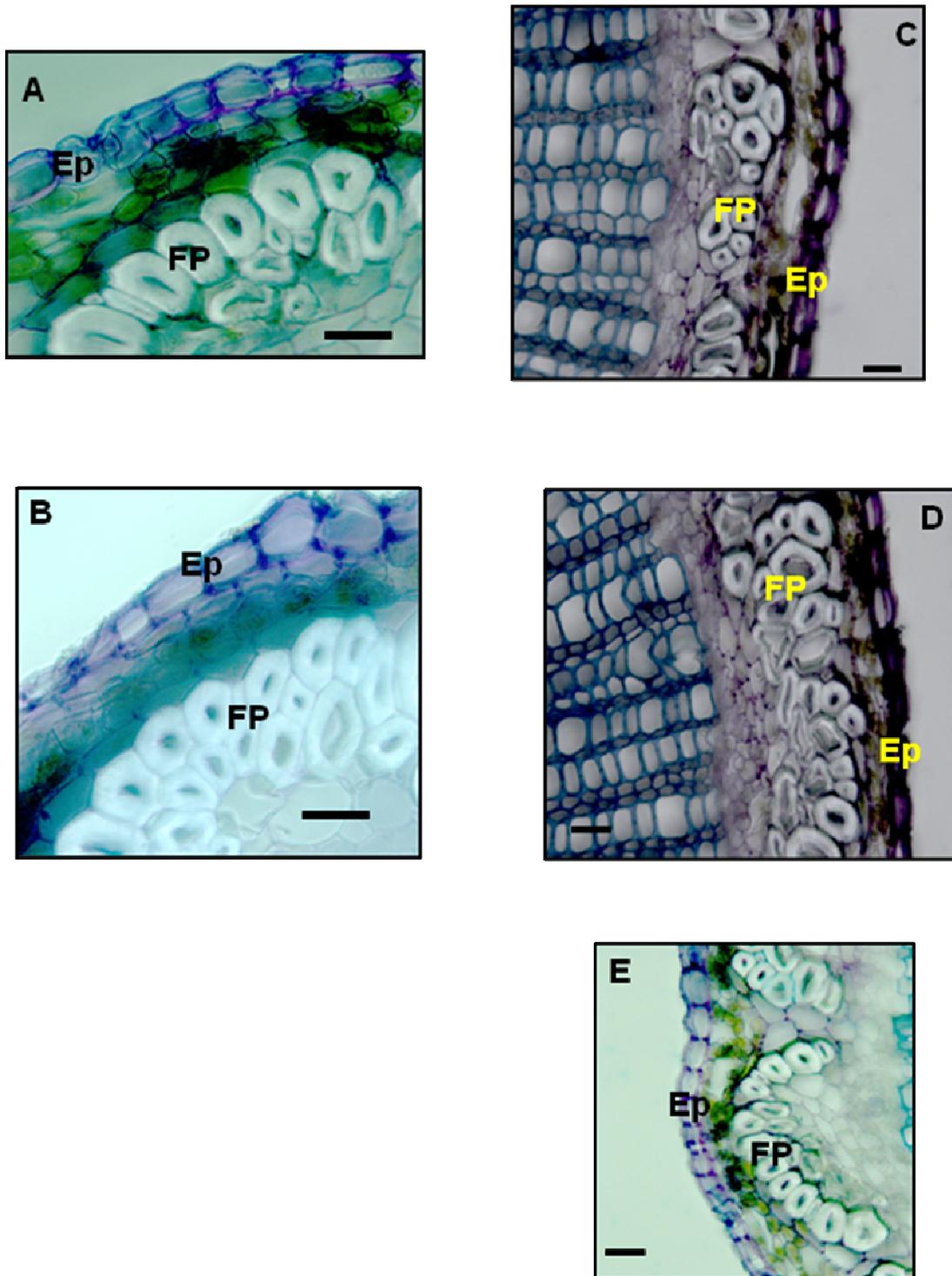


Figure 42 : Tissus externes, coupes transversales dans les tiges de lin colorées au TBO.

A=W1, B=P6, C=X9, D=X15 et E=X6. Les plantes sont âgées de 2 mois.
 Epiderme (E), fibres périphloémiennes (FP)
 Barre d'échelle = 10 μ m

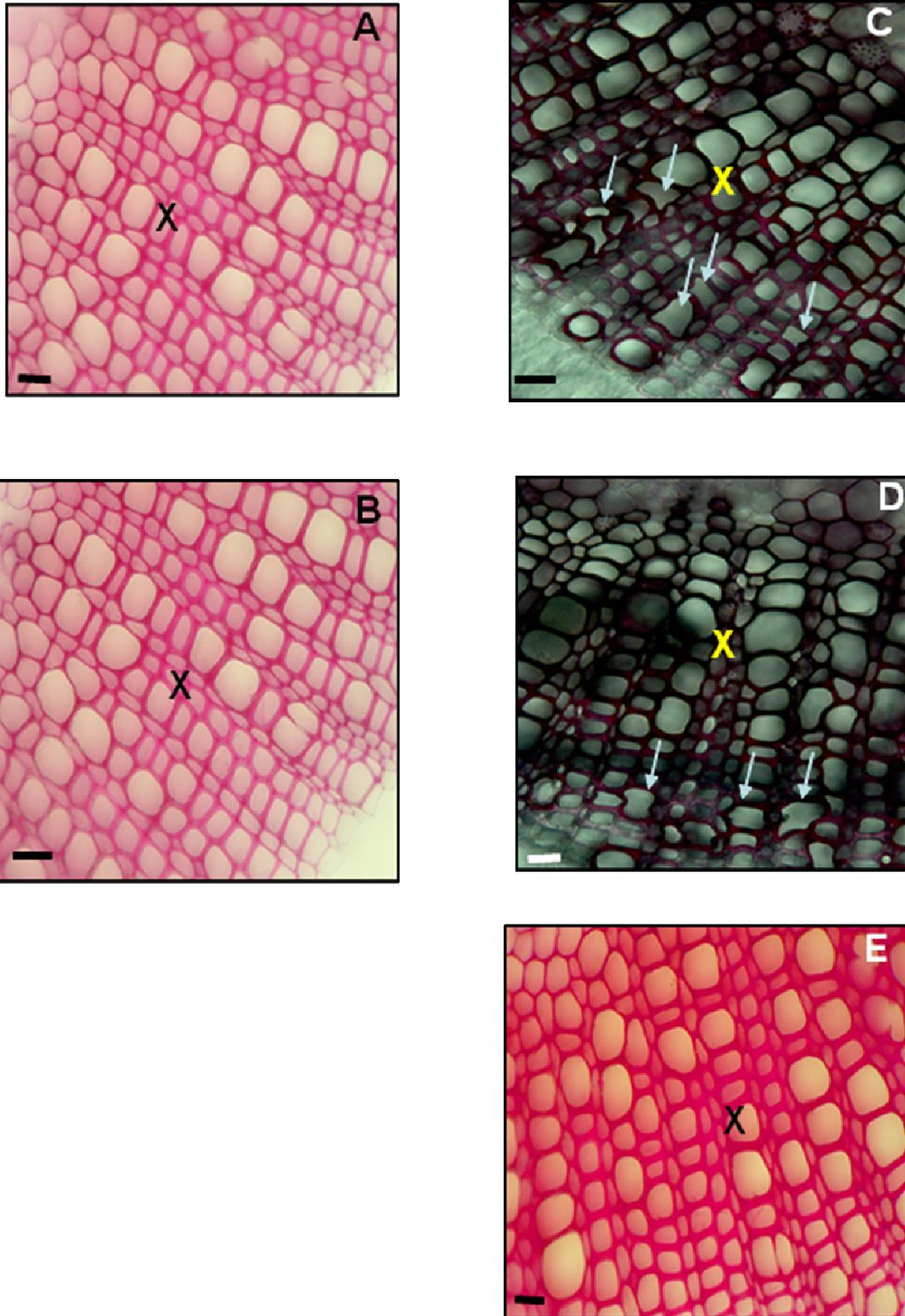


Figure 43 : Tissus internes, coupes transversales dans les tiges de lin colorées au phloroglucinol.

A=W1, B=P6, C=X9, D=X15 et E=X6. Les plantes sont âgées de 2 mois.

Xylème (X)

Barre d'échelle = 50µm

E - Analyses des polymères polysaccharadiques

On sait que notre gène *LuBXL1* code pour une β -xylosidase avec un peptide signal donc il s'agit d'une protéine extracellulaire et très probablement d'une enzyme pariétale. Ainsi les cibles d'une activité de ce type se trouvent dans la paroi, au niveau des polymères polysaccharadiques. Afin de détecter des modifications éventuelles des polymères polysaccharadiques pariétaux dues à la sous-expression du gène *LuBXL1*, nous avons réalisé une étude de résidus pariétaux. Dans un premier temps, des analyses de sucres totaux ont été réalisées à l'UMR FARE INRA de Reims, équipe de Dr Brigitte Chabbert. Ces analyses ont été faites par chromatographie d'échange d'anions à pH élevé couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPEAC-PAD) après hydrolyse des résidus éthanol-insolubles de la paroi.

E.1 – Différence entre tissus internes et tissu externes

La figure 54 montre les teneurs en monosaccharides pariétaux totaux par HPEAC-PAD après hydrolyse acide au niveau des tissus externes et internes des plantes (génération T0) âgées de 2 mois après leur transfert en serre.

Dans les tissus internes, les teneurs en glucose (Figure 54A), principal constituant de la cellulose et des xyloglucanes, varient entre environ 61 et 65%. Les teneurs en xylose, constituant majeur des xylanes, varient entre 26 et 30 %. Dans les tissus externes, ces valeurs sont très différentes. Les teneurs en glucose sont de l'ordre de 91% tandis que les teneurs en xylane sont comprises entre 1,5 à 1,9%. Ces résultats montrent que dans les tissus externes, le sucre majoritaire est le glucose (environ 91 %), constituant principal de la cellulose et des xyloglucanes. Cette observation est à mettre en rapport avec la présence des fibres phloémiennes, riches en cellulose. Il est à noter également une teneur relativement élevée en galactose, probablement dérivé des β 1-4-D-galactanes.

En revanche, les tissus internes (Figure 54B) sont moins riches en cellulose (teneur en glucose entre 61 et 65%), mais contiennent beaucoup plus de xylose suggérant une teneur plus élevée en xylanes.

La figure 54 montre qu'il n'y pas de grandes différences entre les plantes témoins et les plantes transformées. Bien que certaines variations peuvent être constatées, il serait souhaitable de répéter ces analyses avec d'autres échantillons biologiques.

A)

	P6TE	W2TE	X9TE	X15TE
Fucose	0,12 (0,00)	0,12 (0,03)	0,09 (0,01)	0,08 (0,01)
Arabinose	1,00 (0,02)	0,97 (0,15)	0,64 (0,02)	1,16 (0,03)
Rhamnose	0,40 (0,02)	0,34 (0,03)	0,31 (0,02)	0,33 (0,02)
Galactose	3,12 (0,01)	2,60 (0,16)	2,68 (0,03)	3,02 (0,17)
Glucose	91,13 (1,67)	91,44 (1,76)	92,22 (10,65)	90,76 (1,36)
Xylose	1,55 (0,09)	1,68 (0,17)	1,58 (0,10)	1,85 (0,06)
Mannose	1,53 (0,11)	1,83 (0,03)	1,55 (0,04)	1,83 (0,08)
Ac gal	0,14 (0,02)	0,12 (0,01)	0,12 (0,01)	0,12(0,02)
Ac Glu	1,01 (0,10)	0,90 (0,13)	0,81 (0,07)	0,85 (0,01)

B)

	P6TI	W2TI	X9TI	X15TI
Fucose	0,12 (0,01)	0,11 (0,00)	0,12(0,01)	0,12 (0,01)
Arabinose	1,03 (0,01)	0,81(0,01)	0,97 (0,01)	1,33 (0,06)
Rhamnose	0,68 (0,02)	0,63 (0,04)	0,70 (0,03)	0,74 (0,03)
Galactose	1,70 (0,03)	1,56 (0,04)	1,85 (0,04)	2,06 (0,05)
Glucose	61,16 (0,96)	63,22 (1,13)	63,10 (0,49)	64,81 (1,22)
Xylose	29,87 (0,24)	28,90 (0,16)	28,56 (0,31)	26,00 (0,37)
Mannose	1,69 (0,02)	1,71 (0,01)	1,35 (0,04)	1,57(0,06)
Ac gal	3,49 (0,35)	3,01(0,01)	3,31(0,11)	3,37(0,18)
Ac Glu	0,25 (0,18)	0,06 (0,01)	0,04(0,01)	0,06 (0,01)

Figure 44 : Teneur (% molaire) en sucres monomères après hydrolyse acide des tissus externes (A) et des tissus internes (B).

Les chiffres entre parenthèses représentent les écarts types

TI = Tissus Internes

TE = Tissus externes

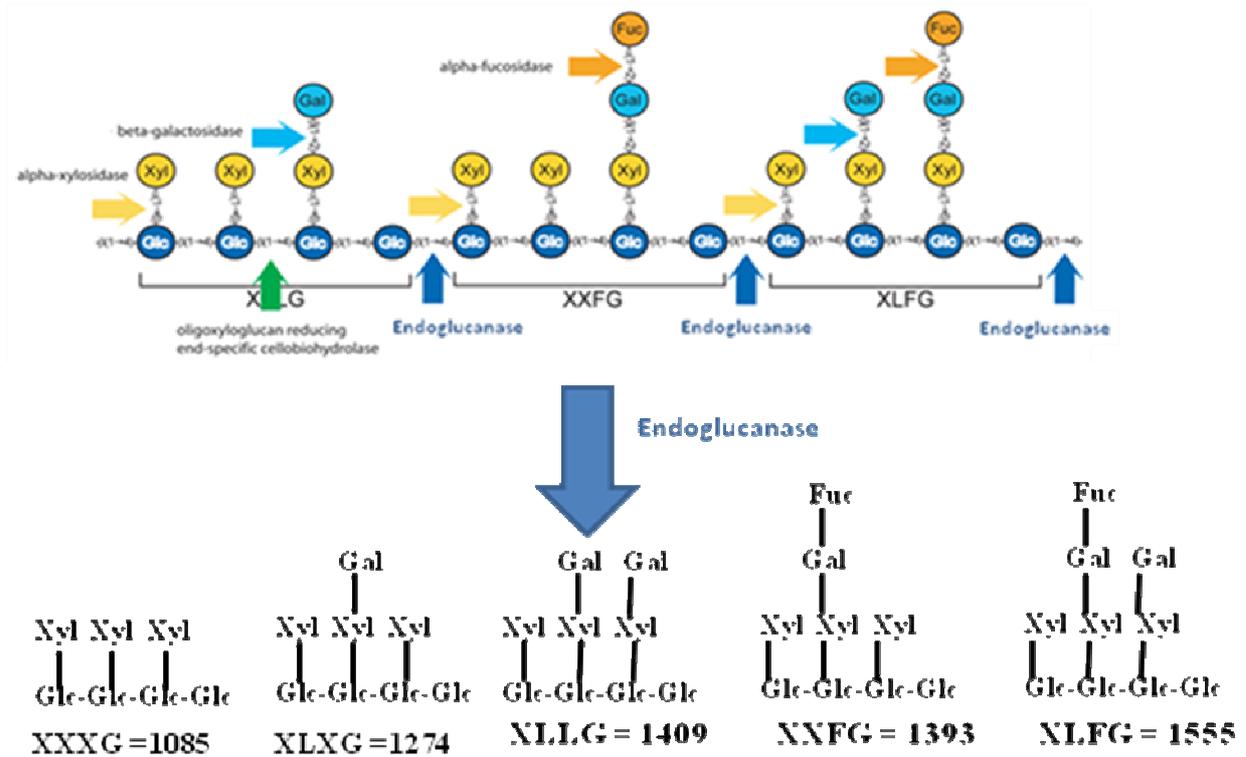
E.2 - Enzymatic Oligosaccharide Fingerprinting (empreinte enzymatique des oligosaccharides)

Les analyses des sucres totaux n'ont pas pu mettre en évidence des différences remarquables entre les lignées sous-exprimant *LuBXL1* et les plantes sauvages. Nous avons décidé d'utiliser une approche plus performante pour détecter des éventuelles modifications pariétales.

L'empreinte enzymatique des polysaccharides est une méthode utilisée pour l'analyse des modifications des aspects structurales de la paroi cellulaire. Cette technique a été utilisée, par exemple pour le criblage des mutants d'*Arabidopsis thaliana* qui ont subi une altération au niveau de la paroi cellulaire (*mur1*, *mur2* et *mur3*) (Lerouxel et al., 2002).

Cette technique se base sur la digestion des polysaccharides par des enzymes pariétales suivie d'une analyse chimique. Dans notre cas, nous avons essayé de voir l'effet de la sous-expression de *LuBXL1* sur la structure des hémicelluloses. Pour cela, des analyses de polymères pariétaux (analyses des oligosaccharides) ont été réalisées à l'UMR 6037 de Rouen, équipe de Pr Patrice Lerouge. Ces analyses ont été faites sur les plantes de la génération T1 âgées de un et deux mois. Sur ces dernières nous avons analysé les tissus externes et internes. A cause des cibles potentielles de l'activité β -xylosidase, nous avons décidé d'appliquer cette stratégie de criblage par empreinte enzymatique aux xylogucanes et xylanes. Ce sont des polysaccharides essentiels pour le développement des végétaux où ils jouent un rôle de cohésion entre les microfibrilles. Ces polymères présentent une structure répétitive simple qui peut être clivée par des endoglucanases dans le cas des xylogucanes (figure 55A) et par des xylanases dans le cas des xylanes (Figure 55B). Afin d'analyser les oligosaccharides issus de l'hydrolyse enzymatique des xylogucanes et des xylanes présents dans les fractions alcool-insolubles des plantes, différentes techniques de détermination de l'empreinte enzymatique ont été utilisées à savoir la HPAEC-PAD, le MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight), et la CPG

A)



B)

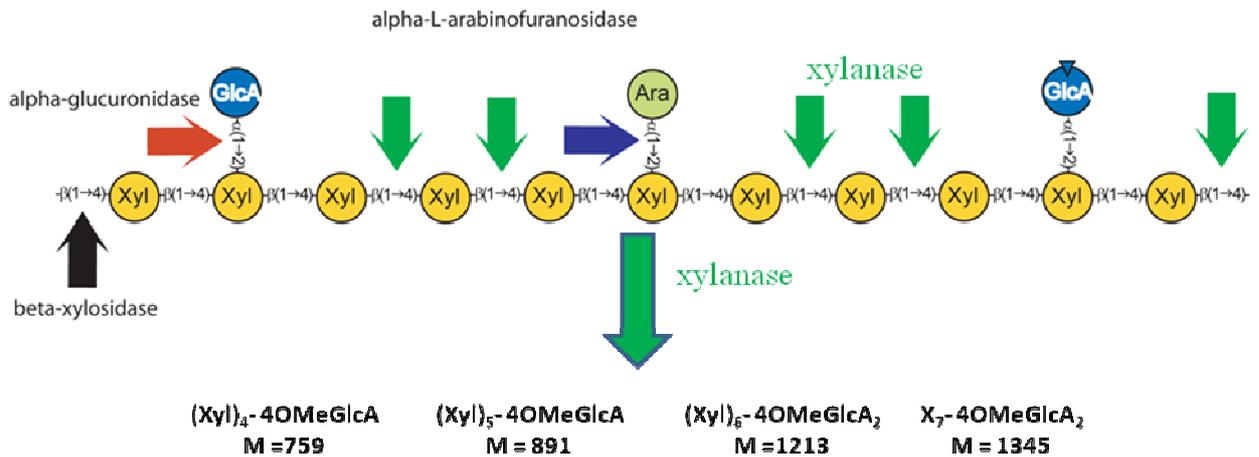


Figure 45 : Empreintes enzymatiques des xyloglucanes (A) et des xylanes (B) montrant les différents oligosaccharides résultants avec leur poids moléculaire.

E.2.1 - Analyses HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)

Dans un premier temps nous avons analysé les fractions digérées par l'endoglucanase et la xylanase par HPAEC-PAD pour avoir une idée sur la réussite des hydrolyses enzymatiques et faire une première comparaison des chromatogrammes obtenus. Pour cela nous avons injecté différents standards (xylose, arabinose, acide glucuronique, xyloglucane de tamarin digéré par l'endoglucanase, et l'arabinoxylane de l'orge digéré par la xylanase) (Figure 56).

Les analyses des chromatogrammes des plantes sauvages W2 (Figure 57) nous ont révélé qu'il y a une différence dans les profils des chromatogrammes entre les tissus externes et internes digérés soit par les endoglucanases soit par les xylanases. Les résultats des digestions enzymatiques ont montré que la xylanase libère davantage de matériel des tissus internes de la tige. Cette hydrolyse libère des xyloses ($t=5\text{min}$) et des xylobioses et ($t=10\text{min}$). Des oligomères plus gros sont élués à des temps de rétention correspondant à ceux des acides uroniques ($t=24\text{min}$). Les quantités de ces composés libérés sont très importantes au niveau des tissus internes en comparaison avec les tissus externes. Même chose observée pour l'endoglucanase, l'hydrolyse libère plusieurs oligosaccharides (XXXG, XLXG, XLLG...etc) et ceci dans des quantités plus importantes dans les tissus internes en comparaison avec les tissus externes. Ces résultats semblent confirmer les résultats obtenus par HPAEC-PAD sur les teneurs en sucres totaux dans les plantes *in vitro* sorties en serre (Section E.1, fortes teneurs en xylose dans les tissus internes).

Nous avons ensuite effectué des comparaisons de chromatogramme HPAEC-PAD des xyloglucanes et des xylanes des tissus internes des lignées W2, X9, et X15 (Figure 58). Les analyses des tissus externes n'ont montré aucune différence. En ce qui concerne les tissus internes, on constate qu'il n'y a pas de différence notable entre les profils des xylanes (Figures 58 A-C) au niveau des 3 lignées. En ce qui concerne les xyloglucanes on observe une différence (Figures 58 D-F) des profils des xyloglucanes dans les tissus internes de la lignée X9, mais pas X15 par rapport à la lignée témoin W2. On observe une augmentation des tailles des pics qui sortent à 20 minutes.

Ces résultats suggèrent que les tissus internes sont plus riches en hémicelluloses (xyloglucanes et xylanes) et que les tissus internes des lignées X9 présente un éventuelle changement au niveau des xyloglucanes par rapport aux témoins

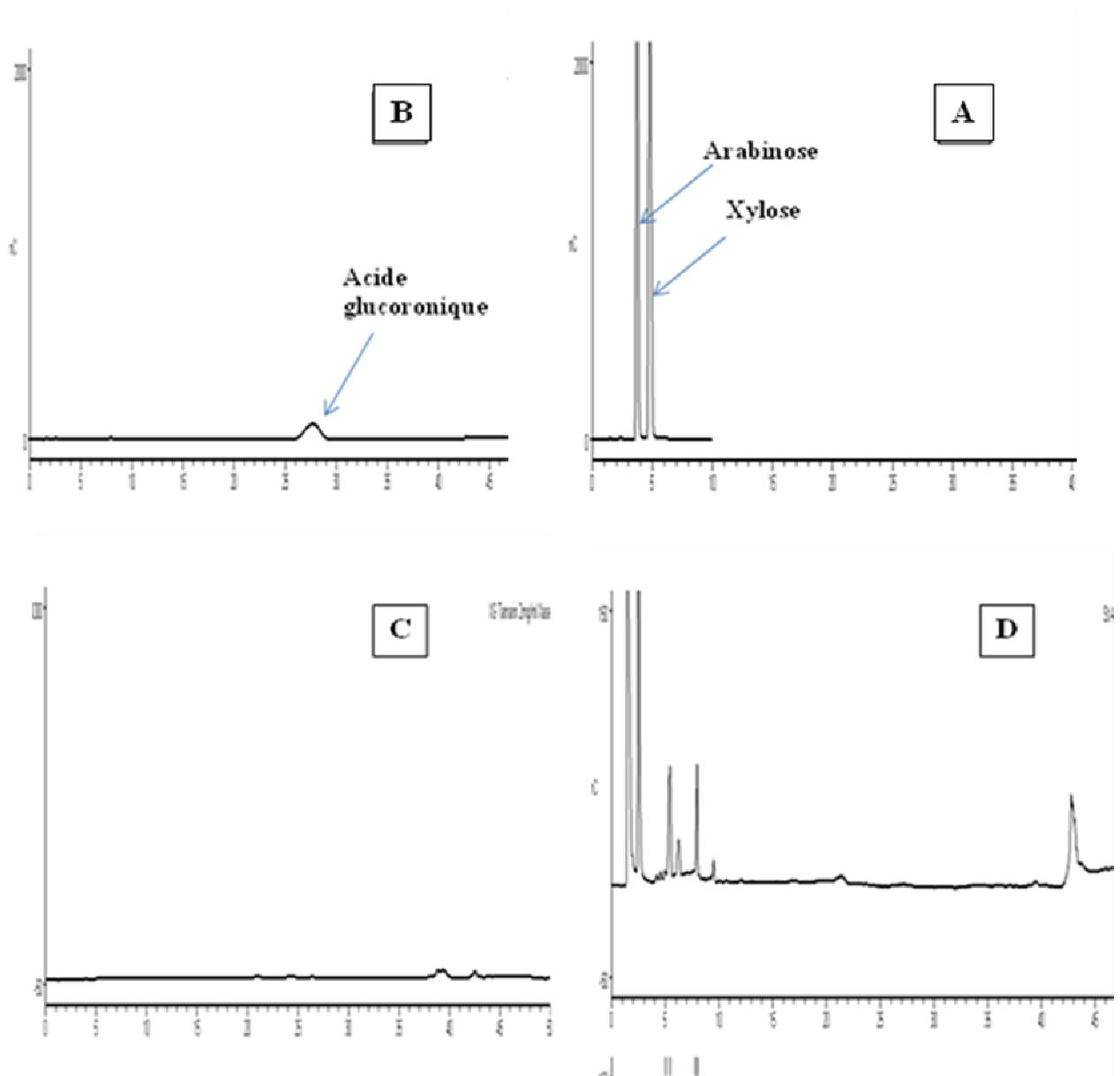


Figure 46 : Chromatogrammes HPAEC-PAD des standards.

- A) Arabinose et xylose
- B) Acide glucuronique
- C) solution de tamarin digérée par l'endoglucanase
- D) solution d'arabinoxylanes d'orge digérées par la xylanase

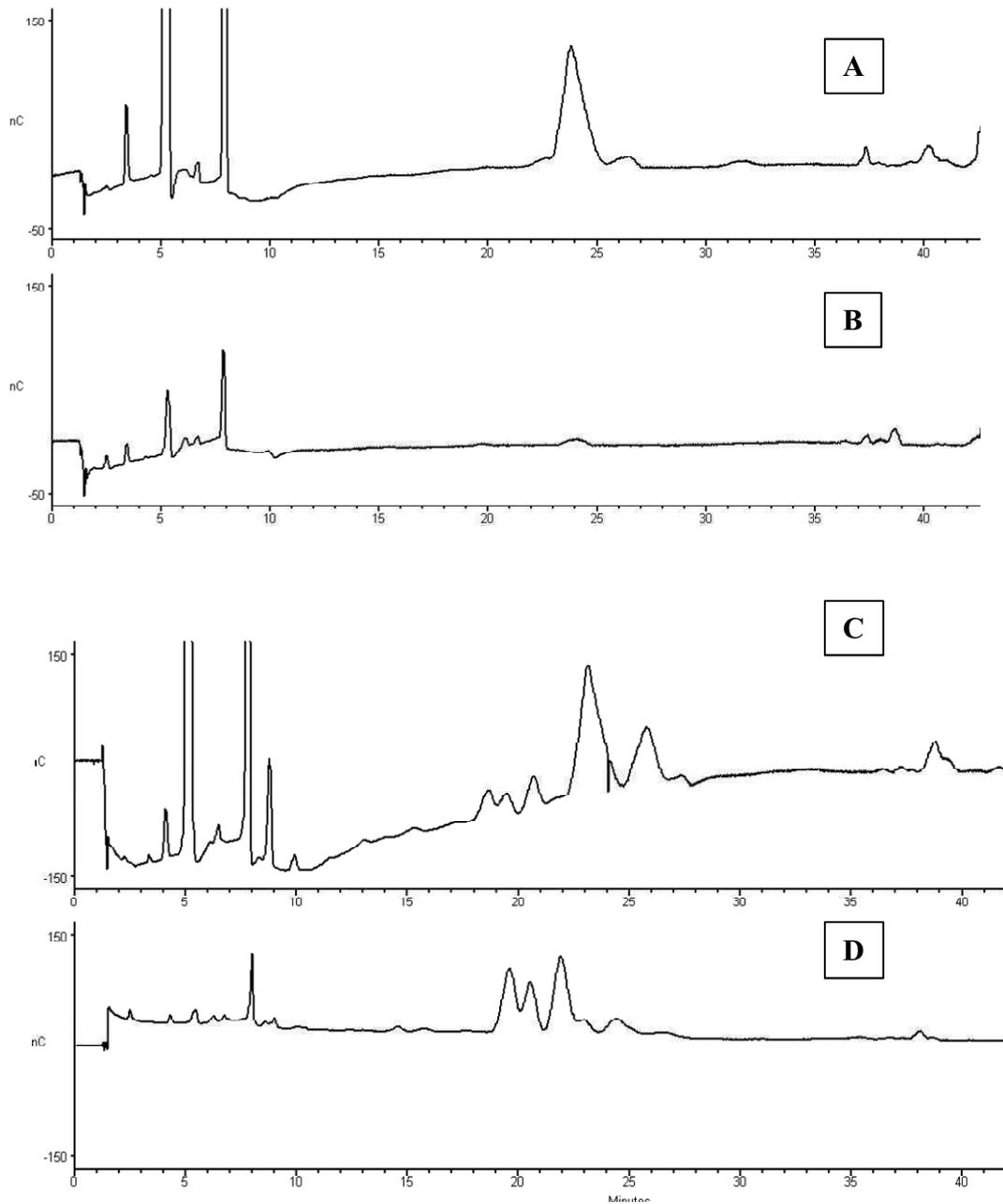


Figure 47 : Chromatogrammes HPAEC-PAD montrant la différence entre tissus internes et tissus externes.

- A) xylanes au niveau des tissus internes (xylanase)
- B) xylanes au niveau des tissus externes (xylanase)
- C) xyloglucanes au niveau des tissus internes (endoglucanase)
- D) xyloglucanes au niveau des tissus externes (endoglucanase)

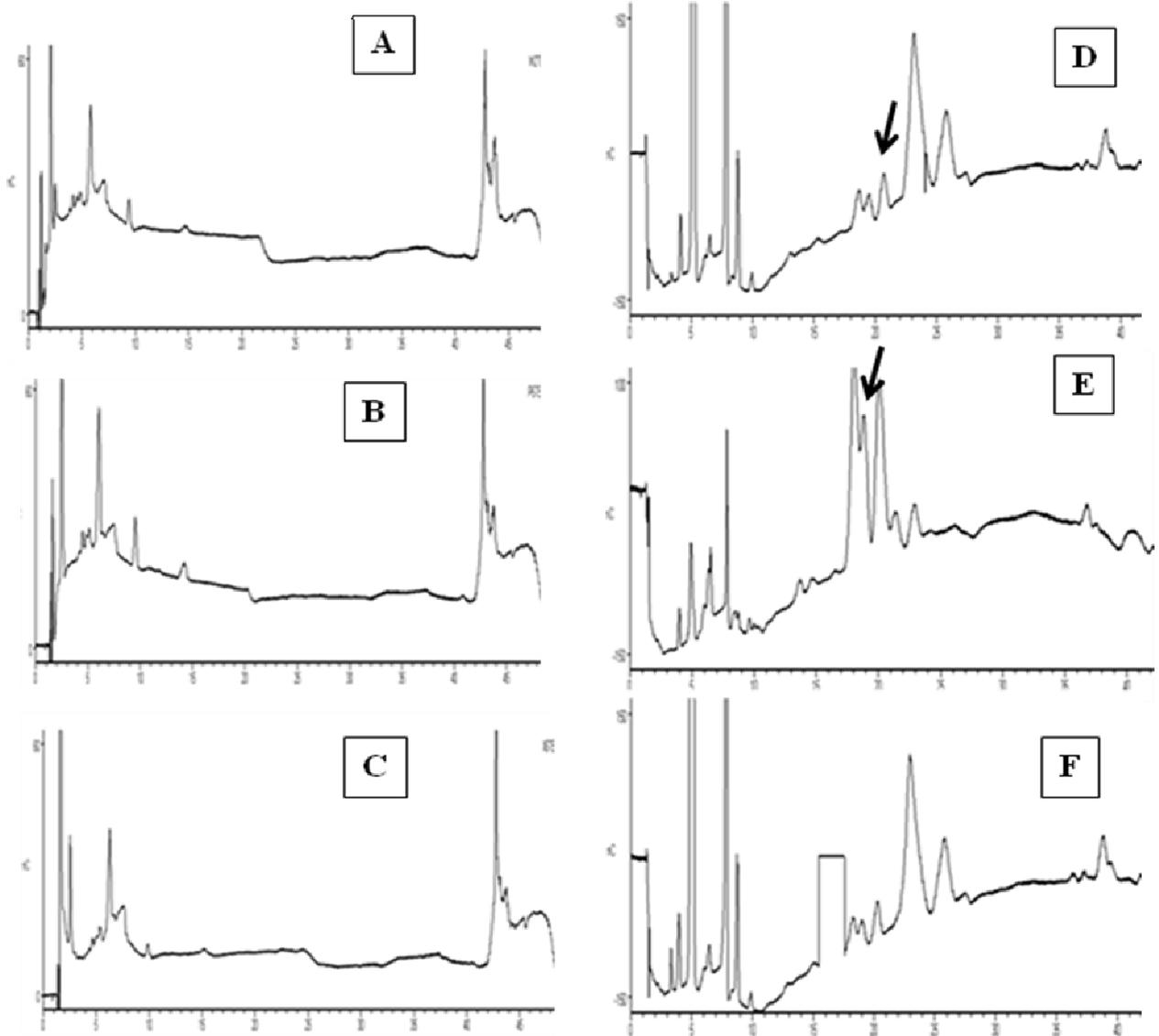


Figure 48 : Chromatogrammes HPAEC-PAD montrant la différence entre les tissus internes des lignées W2, X9 et X15.

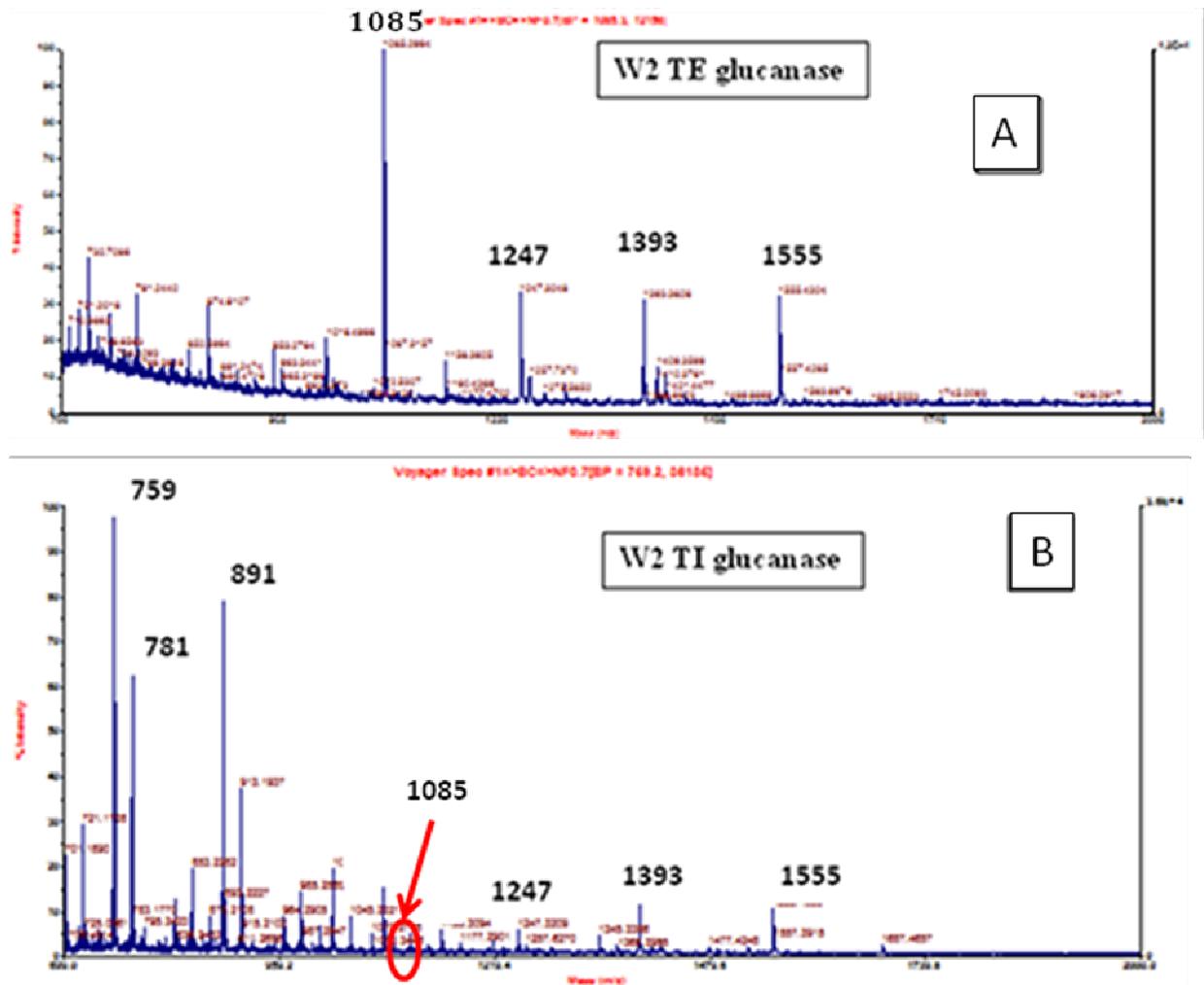
- A) xylenes (W2)
- B) xylenes (X9)
- C) xylenes (X15)
- D) xyloglucane (W2)
- E) xyloglucanes (X9)
- F) xyloglucanes (X15)

Les flèches montrent les pics qui sortent après un temps de rétention de 20 minutes

E.2.2 - Analyses MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight)

En comparaison avec la HPAEC-PAD, Les analyses MALDI-TOF présentent des qualités spécifiques, puisque l'acquisition d'un spectre combine une grande rapidité et une grande qualité d'information. De plus, cette méthode est la plus sensible, elle permet de visualiser les fragments acétylés (non visualisables par les autres techniques). L'analyse d'un spectre de tissus externes des plantes sauvages digérés par une glucanase montre la présence de plusieurs oligosaccharides (Figure 59A). Les plus importants sont les XXXG qui ont une masse moléculaire de 1085, les XLXG et les XXLG qui ont une masse moléculaire de 1247, les XXFG avec une masse moléculaire de 1393 et enfin les XLFG qui ont une masse moléculaire de 1555. Dans les tissus internes (Figure 59B), ces pics sont moins importants surtout celui des XXXG (1085). On aperçoit également des pics qui ont des masses moléculaires de l'ordre de 759 et 891 qui sont des oligosaccharides correspondants à des xylooligosaccharides (X_4 -4OMeGlcA et X_5 -4OMeGlcA) ce qui est intrigant car l'enzyme utilisé est une glucanase et non une xylanase. Ceci est peut-être dû à l'abondance des xylooligosaccharides au niveau des tissus internes qui peuvent être libérés sous l'action des glucanases ou peut-être dû à la pureté de l'enzyme. Mazumder et al. (2005) ont eu le même problème en digérant les hémicelluloses de *Benincasa hispida* par l'endoglucanase. L'analyse d'un spectre de tissu externe digéré par une xylanase (Figure 60A) montre la présence de quelques molécules seulement (X_4 -4OMeGlcA = 759). On note également l'absence des autres molécules (X_6 -4OMeGlcA = 1213). Dans les tissus internes (Figure 60B) on trouve X_4 -4OMeGlcA qui est majoritaire, on trouve aussi, à la différence des tissus externes, les X_4 -4OMeGlcA = 891, les X_7 -4OMeGlcA = 1345 X_6 -4OMeGlcA = 1213.

Ces résultats montrent qu'il y a une différence de composition en hémicelluloses entre les tissus externes et les tissus internes. Il paraît que les tissus externes possèdent une composition plus riche en xylooligosaccharides de type XXXG et XLXG ou XXLG qui sont beaucoup moins abondants dans les tissus internes. En revanche, les tissus internes semblent être plus riches en xylooligosaccharides ce qui n'est pas le cas pour les tissus externes qui ne donnent que les composés X_4 -4OMeGlcA suite à la digestion enzymatique par les xylanases.



Masse molaire	Nature de la molécule
1085	XXXG
1247	XLXG, XXLG
1393	XXFG
1555	XLFG
759	X ₄ -4OMeGlcA
781	X ₄ -4OMeGlcA + Na ⁺
891	X ₅ -4OMeGlcA

Figure 49 : Spectres MALDI-TOF montrant la différence des profils des xyloglucanes entre les tissus externes (A) et les tissus internes (B).

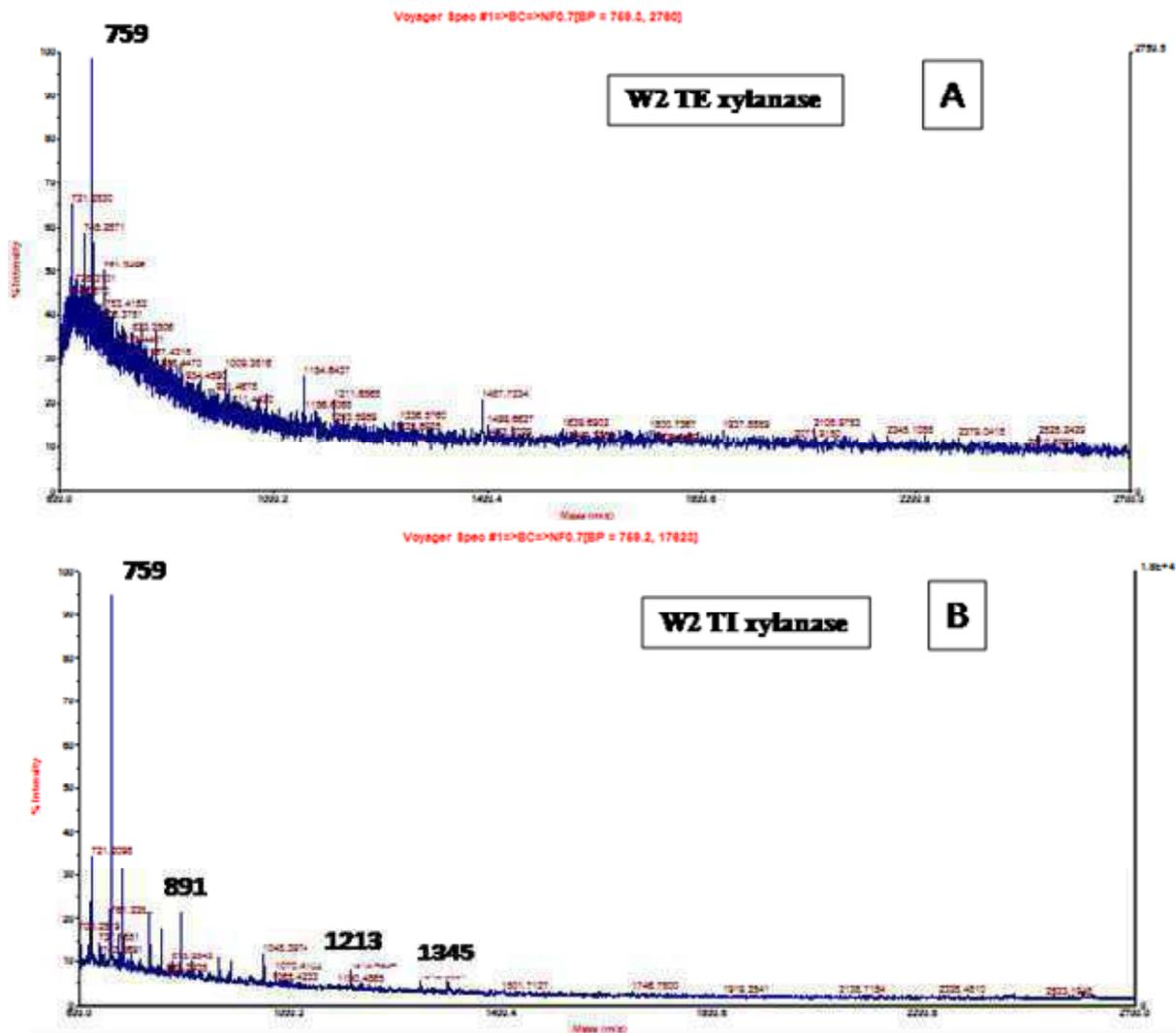


Figure 50 : Spectres MALDI-TOF montrant la différence des profils des xyloglucanes entre les tissus externes (A) et les tissus internes (B).

Nous avons ensuite comparé les spectres au niveau des tissus internes et externes dans les lignées W2, X9 et X15 (plantes âgées de deux mois). En ce qui concerne les xylanes (digestion xylanase) nous n'avons pas constaté de différences notables entre les lignées transformées X9 et X15 et les lignées témoins. Par contre, au niveau des xyloglucanes (digestion endoglucanase), nous avons remarqué une différence au niveau des tissus internes (Figure 61). On a constaté une présence plus importante des molécules XXXG (masse molaire = 1085) dans les deux lignées X9 et X15 (sous-exprimant *LuBXL1*) en comparaison avec la lignée W2 où ces composés sont très minoritaires. Nous avons également observé une diminution relative des oligosaccharides xylanes dans les lignées X9 et X15 à savoir les spectres 891, 1213, 1345, en comparaison avec le pic à 759. En ce qui concerne les tissus externes, aucune modification n'a été décelée. Des analyses de tiges entières âgées d'un mois nous n'ont pas révélé de différences. Cela est peut-être dû au mélange des tissus externes et internes.

On constate que la sous-expression des *LuBXL1* a un impact surtout sur les tissus internes. Cet impact se visualise au niveau des xyloglucanes où on observe l'abondance des oligosaccharides l'augmentation des gragements XXXG et la diminution des fragments xylanes (891, 1213 et 1345) correspondant aux X₅-4OMeGlcA, X₆-4OMeGlcA et X₇-4OMeGlcA.

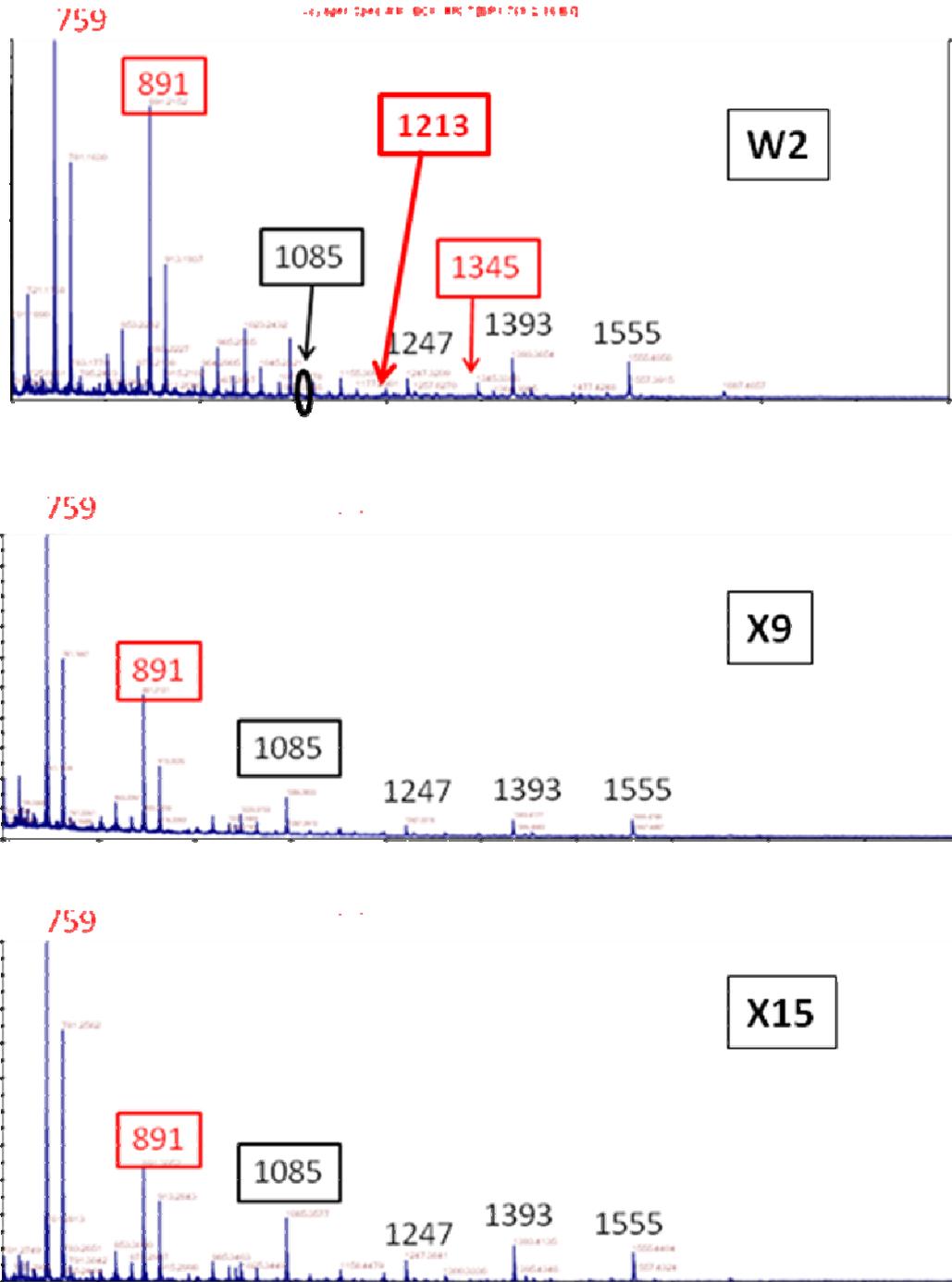


Figure 51 : Spectres MALDI-TOF montrant la différence des profils des xyloglucanes des tissus internes entre les lignées W2, X9, et X15.

E.2.3 - Analyses CPG d'extraits hémicellulosiques digérés par la xylanase et l'endoglucanase

Pour compléter ces analyses, nous avons étudié les différents extraits utilisés lors de la réalisation des empreintes enzymatiques sur les différents tissus des lignées transformées et témoins par chromatographie en phase gazeuse. Cette technique fournit une quantification précise et donc informative de la composition osidique d'une paroi. Cette approche est basée sur la quantification des dérivés triméthylsilyl méthylglycosides des monosaccharides libérés par méthanolyse. .

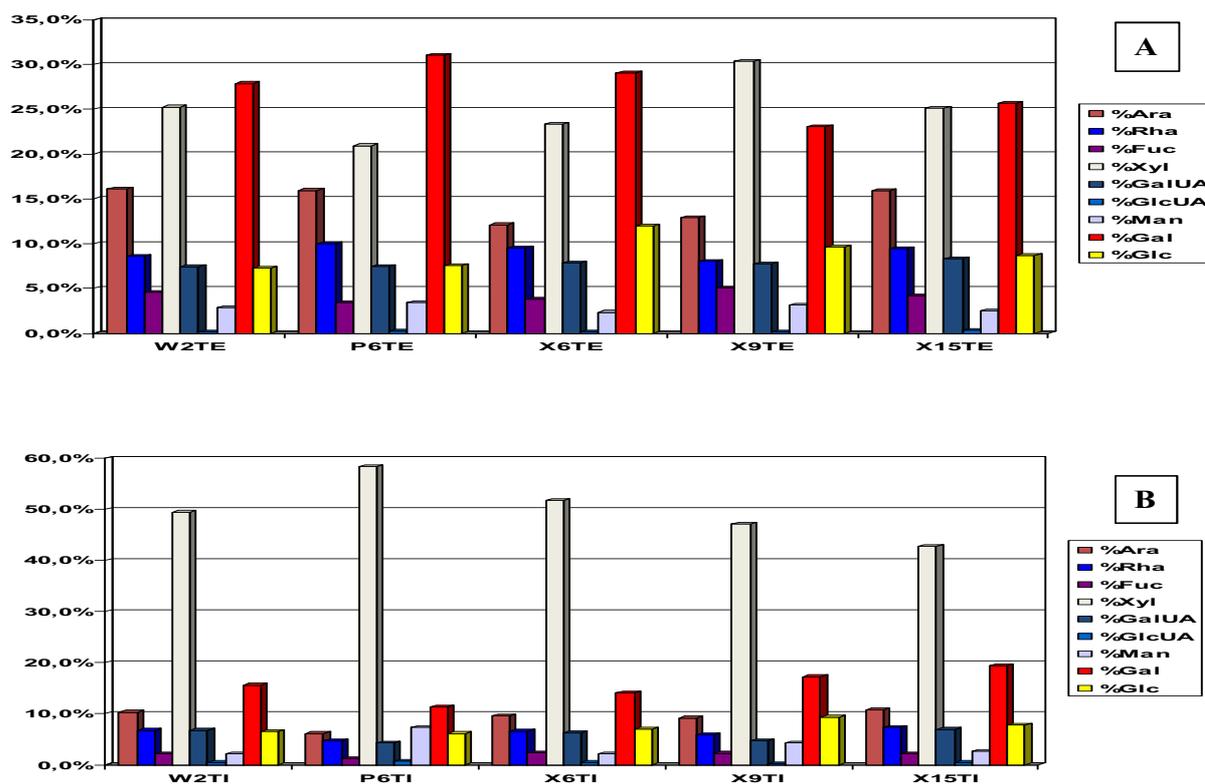


Figure 52 : Analyse des extraits hémicellulosiques par CPG après digestion à la xylanase.

A : tissus externes, B : tissus internes, les résultats sont exprimés en % molaire

La Figure 62 montre les pourcentages molaires des sucres obtenus après hydrolyse. Au niveau des tissus externes (Figure 62A), on constate en gros qu'il n'y a pas de différence entre la lignée transformée X 15 et la lignée témoin. Par contre, au niveau de la lignée X9, on constate une diminution des pourcentages en arabinose ce qui est en accord avec les analyses précédentes (Section E.1) faites sur les sucres totaux dans les mêmes tissus et la même lignée. On observe aussi une diminution des teneurs en galactose dans la lignée X9 et une augmentation des teneurs en xylose. Au niveau des tissus internes, on observe une diminution

des teneurs en xylose, mais on n'observe aucune différence importante entre les lignées témoins et transformées.

Entre tissus internes et tissus externes, on observe de forts pourcentages en xylose au niveau des tissus internes.

Au niveau des tissus externes (Figure 63A), on ne décèle aucune différence notable. Par contre, au niveau des tissus internes (Figure 63B), on constate que les teneurs en acide galacturonique sont plus élevées chez la lignée X15 par rapport aux autres lignées. On remarque aussi que les teneurs en arabinose sont plus faibles au niveau des lignées X9 et X15, ainsi qu'une disparition totale de l'acide glucuronique dans ces lignées. En plus, on remarque également une disparition totale du fucose dans la lignée X9.

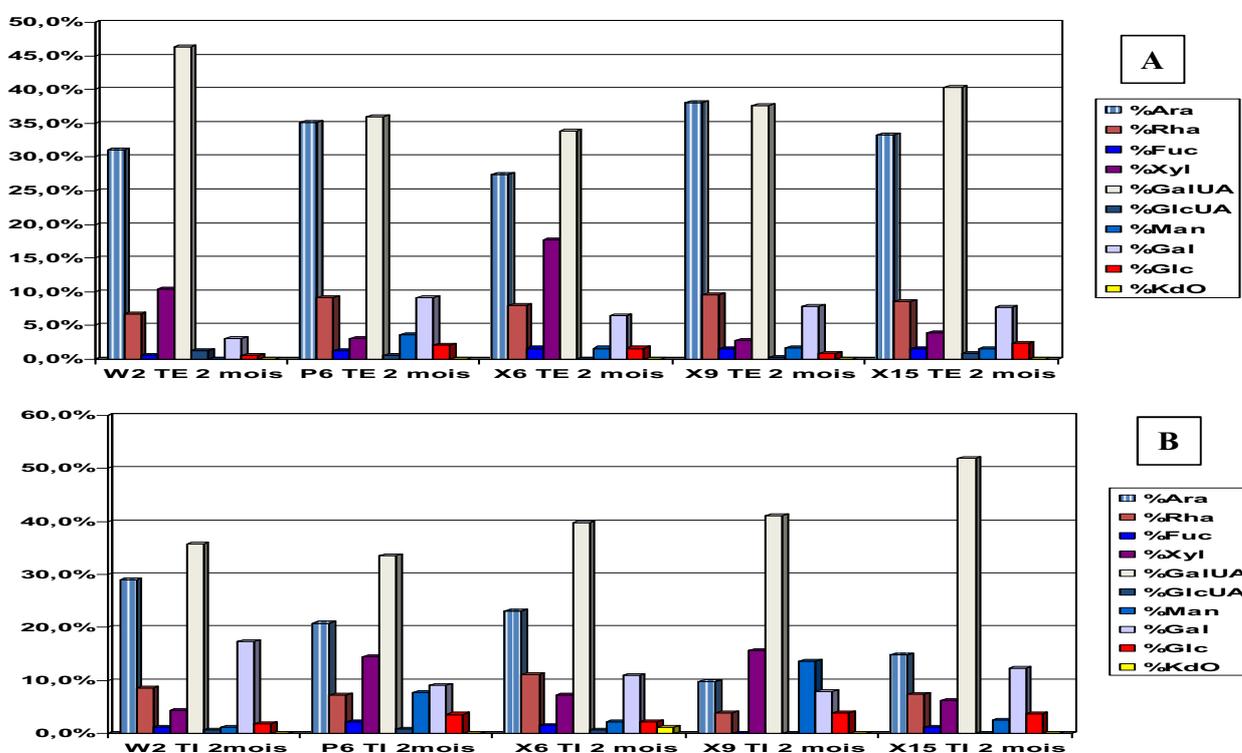


Figure 53 : Analyse des extraits hémicellulosiques par CPG après digestion à la glucanase.

A : tissus externes, B : tissus internes, les résultats sont exprimés en % molaire

F – Discussion

Le rôle de la β -xylosidase n'est pas encore bien élucidé chez les plantes. Chez les organismes pathogènes, cette enzyme est nécessaire pour la dégradation de la paroi cellulaire. Chez la plante, cette enzyme pourrait être impliquée dans le réarrangement de la structure pariétale. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, Goujon et al. (2003) ont proposé que, l'enzyme AtBXL1 pourrait agir sur les xylanes, et plus précisément sur les glucuronoarabinoxylanes (GAXs). Cette enzyme peut être impliquée dans l'organisation et le relâchement des GAXs dans la paroi cellulaire durant la déposition de la cellulose au niveau de la paroi secondaire pour faciliter la polymérisation des lignines dans la matrice polysaccharidique. La forte représentation d'une séquence unique d'une β -xylosidase (*LuBXL1*) dans la banque d'ESTs (43 sur 3000 ESTs) nous a conduit à rechercher un rôle potentiel de ce gène dans le développement de la paroi cellulaire chez le lin. Les analyses bioinformatiques ont montré qu'il s'agit d'une protéine pariétale glycosylée (présence de peptide signal et des sites de N-glycosylation), dont le poids moléculaire est de 84 520 Da et un point isoélectrique calculé de 8,8. La protéine possède également un motif conservé caractérisant la famille des glycosides hydrolases 3. L'alignement de la séquence protéique LuBXL1 a montré une forte homologie avec d'autres β -xylosidases. Par exemple, Xiong *et al.* (2007) ont cloné une β -xylosidase de *Medicago sativa* (*MsXyl*) correspondant à une protéine pariétale glycosylée, avec un poids moléculaire de 83 858 Da et un point isoélectrique de 5,0. Cette protéine possède aussi le motif caractérisant la famille GH3 et l'acide aspartique 290 (D290) participant au site catalytique. De même, la AtBXL1 possède une masse moléculaire de 83500 Da (Goujon et al., 2003) .

Structuralement (arbre phylogénétique), LuBXL1 se trouve très proche d'autres protéines montrant soit une activité α -arabinofuranosidase, soit une double activité α -arabinofuranosidase/ β -xylosidase. Plusieurs auteurs (Lee et al., 2001 ; Minic et al., 2004 ; Chavez Monttes et al., 2008) ont démontré un rôle bi-fonctionnel des enzymes de la famille des GH3 avec des activités α -L-arabinofuranosidases et β -D-xylosidases à la fois. Par exemple chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.), une α -L-arabinofuranosidase (ARA1) et une β -D-xylosidase XYL1 ont été purifiées à partir de jeunes plantules d'orge (Lee et al., 2003). ARA1 a une masse moléculaire de 67 000 Da et un point isoélectrique de 5,5. Nos résultats n'ont pas indiqué d'activité α -arabinofuranosidase. C'est pour cela qu'il sera nécessaire de purifier la

protéine ou de produire la protéine recombinante pour caractériser cette protéine « propriétés physico-chimique, caractéristiques enzymatiques (spécificité du substrat) ».

Une construction IR-PTGS contenant un fragment du gène *LuBXL1* a été introduite chez le lin. Le niveau d'expression du gène a été testé par RT-PCR semi-quantitative dans les différentes lignées obtenues. Deux d'entre elles (X9 et X15) montrent une forte diminution du taux de transcrits dans les tiges couplée à une diminution globale de l'activité β -D-xylosidase.

Chez *Arabidopsis*, Goujon et al. (2003) ont sélectionné 2 lignées (ASBX7 et ASBX12) qui sous-expriment (stratégie anti-sens) le gène *AtBXL1*. La lignée ASBX7 qui présente une diminution notable de l'activité β -xylosidase, ne présente pas de modifications phénotypiques remarquables. Cette observation concorde avec nos résultats chez le lin. Cependant, chez *Arabidopsis* il a été montré qu'un stress hydrique induisait un léger phénotype nain chez les transformants. De plus, les plantes transformées étaient aussi caractérisées par la présence de feuilles déformées et de siliques plus courtes par rapport aux témoins. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de vérifier l'impact d'un stress hydrique chez les lignées sous-exprimant du lin. Toujours chez *Arabidopsis*, les analyses de sucres n'ont montré aucune différence au niveau des tiges des plantes transformées. Les auteurs expliquent que la méthode anti-sens utilisée n'était peut être pas la meilleure pour avoir une extinction des autres gènes (*AtBXL2*, *AtBXL3*, et *AtBXL4*) (redondance fonctionnelle et effet de compensation des autres gènes). C'est pour cela que nous avons utilisé la stratégie IR-PTGS. Cette technique présente plusieurs avantages, d'abord, cette technique est beaucoup moins fastidieuse que la mutagenèse insertionnelle, où le criblage d'une banque de plusieurs milliers de graines est requis. La IR-PTGS conduit à la répression de toutes les copies d'un même gène, à l'opposé de la mutagenèse insertionnelle qui n'affecte que la copie génomique où le T-DNA s'est inséré. La IR-PTGS est applicable à tous les types de gènes dont la séquence a été clonée. Beaucoup plus efficace que l'ARN antisens, elle mène à une répression mesurable dans 60 à 100% des lignées produites (Chuang & Meyerowitz, 2000; Wesley et al., 2001). Pour la technique d'ARN antisens, ce nombre de lignées efficacement réprimées avoisine plutôt les 15 % (Wesley et al., 2001). De plus, plusieurs caractères généraux font du PTGS une technique avantageuse. La variation d'intensité de répression souvent constatée d'une lignée à une autre peut permettre l'observation de phénotypes nuancés ou encore la viabilité de mutants qui seraient autrement létaux lors d'une inactivation complète. Finalement, le phénotype de répression (qui est héréditaire) demeure constant au sein des générations et ségrége comme un caractère mendélien dominant, observable même chez l'hétérozygote (Chuang et Meyerowitz, 2000).

Chez le lin, Wróbel-Kwiatkowska et al. (2007) ont utilisé cette stratégie pour sous-exprimer le gène *CAD* chez le lin ce qui a provoqué une diminution de l'activité entre 20 à 40% et une diminution des teneurs en lignine de 40 %.

Dans notre cas, l'effet de la sous-expression du gène *LuBXYL1* était bien visible sur l'accumulation des transcrits et au niveau des activités enzymatiques. On a constaté chez les lignées X9 et X15 (en génération 0 et en génération 1) une diminution de l'expression du gène associée à une diminution de l'activité enzymatique d'environ 50%. Cependant, malgré les avantages certains d'une stratégie IR-PTGS, nous n'avons détecté aucun phénotype fort apparent relié à la sous-expression de ce gène. Il serait intéressant d'évaluer l'effet d'un stress chez le lin. Cette absence de phénotype a également été observée dans les mutants *araf1* qui sous-expriment une α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase (Chavez Montes et al., 2008). Par contre, les plantes qui sur-expriment ce gène sont caractérisées par un retard dans l'émergence florale et une altération de l'architecture des tiges (Chavez Montes et al., 2008).

Ayant montré que la sous-expression du gène *LuBXYL* n'est pas associée à un phénotype visible, nous nous sommes dirigés vers des analyses plus déterminées de la structure générale et l'organisation des différents tissus de la tige du lin. On a constaté une altération potentielle au niveau des vaisseaux xylémiens qui présentent des formes collapsées dans les lignées transformées. Au niveau des tissus externes, nous n'avons pas pu observer un phénotype marqué dans les fibres phloémiennes des lignées transformées. Il est possible que le taux de remplissage des fibres soit réduit, mais davantage d'observations microscopiques associées à des analyses statistiques sont nécessaires pour confirmer ce point. Dans certaines coupes, nous avons également observé des épaissements de la paroi des cellules épidermiques. Encore une fois, davantage d'observations sont nécessaires.

Dans la littérature, la β -xylosidase est une enzyme agissant sur les xylanes. Ces composés ont un rôle important dans l'architecture de la paroi secondaire où ils peuvent établir des liaisons covalentes avec les lignines (Hatfield et al., 1999) et une forte interaction avec la cellulose (Awano et al., 2001). Il est possible que *LuBXYL* soit impliqué dans l'organisation et le relâchement des xylanes dans la paroi cellulaire durant la déposition des celluloses au niveau de la paroi secondaire pour faciliter la polymérisation des lignines au niveau de la matrice polysaccharidique. Chez *Arabidopsis*, Goujon et al. (2003) ont montré que le gène *AtBXYL* s'exprime au niveau des tissus vasculaires et interfasciculaires, plus précisément au niveau du xylème et du cambium. Chavez Montes et al. (2008), quant à eux, ont montré que *ARAF1* est localisée dans les différents types cellulaires des systèmes vasculaires des racines et des tiges, et plus précisément au niveau des vaisseaux xylémiens,

des parenchymes, du cambium et du phloème. Actuellement, chez le lin, nous ignorons dans quels types cellulaires s'exprime le gène *LuBXL1* (nous savons qu'il est exprimé dans les tissus internes et externes). Il est clair qu'une idée plus détaillée de la localisation cellulaire *LuBXL1* nous aidera à comprendre son rôle biologique.

L'analyse des sucres totaux chez les plantes de la génération T0 a montré une légère diminution des teneurs en arabinose au niveau des tissus internes chez la lignée X9 (mais pas chez X15, où une augmentation a été observée). Cette observation est intéressante dans le contexte des travaux de Chavez Montes et al. (2008) qui ont constaté une augmentation des teneurs en arabinose dans les graines des mutants *araf1* et une augmentation des teneurs en xylose dans les racines et la partie basale des tiges des plantes qui sur-expriment ce gène. En revanche, la sous-expression du gène *AtBXL1* chez *Arabidopsis* n'était pas associée à une modification dans le contenu en sucre (Goujon et al., 2003).

Une étude plus avancée a été menée chez des plantes de la génération T1, il s'agit de la technique de l'empreinte enzymatique des hémicelluloses. Lerouxel et al. (2002) ont utilisé cette technique pour caractériser des mutants *mur1*, *mur2* et *mur3* présentant des altérations pariétales, particulièrement au niveau de leur composition saccharidique (Reiter et al., 1997). Mazumder et al., (2005) ont utilisé cette approche pour la caractérisation des polysaccharides hémicellulosiques de *Benincasa hispida*. Cette approche permet très rapidement d'établir une empreinte enzymatique des xyloglucanes et des xylanes chez les plantes transformées. Ainsi, il est possible d'identifier les perturbations structurelles par comparaison avec des empreintes obtenues à partir de plantes sauvages. Après une extraction séquentielle (NaOH 4M), l'extrait hémicellulosique est hydrolysé soit par des endoglucanases, soit par des xylanases afin de permettre d'établir les différences entre les hémicelluloses des tissus internes et des tissus externes chez les plantes sauvages d'un côté et d'un autre côté la différence entre les lignées sauvages et les lignées qui sous-expriment le gène *LuBXL1*.

La comparaison des tissus internes et externes a montré une grande différence en ce qui concerne les xyloglucanes et les xylanes. On a remarqué que les tissus externes sont riches en xyloglucanes à la différence des tissus internes. Dans les tissus externes, on a observé la présence de pics qui ont des masses moléculaires $[M+Na^+] = 1085, 1247, 1393$ et 1555 qui correspondent respectivement aux XXXG, XXLG (et/ou XLXG), XXFG, et XLFG. Au niveau des tissus internes, on a remarqué, en plus des fragments des xyloglucanes, la présence des fragments de xylanes à savoir les pics $759, 891, 1213$ et 1345 (X_4 -4OMeGlcA, X_5 -4OMeGlcA, X_6 -4OMeGlcA et X_7 -4OMeGlcA). Ce qui prouve que les tissus internes sont plus riches en xylanes par rapport aux tissus externes.

La comparaison des transformants par la digestion des extraits hémicellulosiques par la glucanase génère des profils différents, notamment au niveau des lignées transformées. On a remarqué, au sein des tissus des lignées sous-exprimant le gène *Lu-BXL1*, une augmentation significative du spectre correspondant aux XXXG qui sont très minoritaires chez le témoin. Ce qui est intéressant c'est qu'on a remarqué la diminution de ce fragment au niveau de la lignée P6 (transformée avec le vecteur vide) et X6 (lignée transformée qui ne sous-exprime pas *LuBXL1*). On a aussi constaté une diminution de la présence des spectres correspondants aux xylanes chez les transformants X9 et X15. On a remarqué la diminution des fragments X₅-4OMeGlcA (891) et la disparition totale des fragments X₆-4OMeGlcA (1213) et X₇-4OMeGlcA (1345).

Tout cela suggère que la sous-expression de la β -xylosidase a un effet marqué sur l'architecture pariétale des tissus internes (xylème) et surtout sur la composition des hémicelluloses (xyloglucanes et xylanes). Cette action est visible au niveau des teneurs en arabinose et au niveau des xyloses (analyse CPG des plantes G1). La β -xylosidase peut avoir d'autres substrats potentiels *in vivo* tels que les xylogalacturonanes d'où les éventuelles différences au niveau des teneurs en acide galacturonique (Minc & Jouanin, 2006). C'est pour cela qu'il faut envisager vers d'autres analyses comme les analyses des pectines.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le lin est une plante annuelle cultivée pour son huile et surtout, en Europe, pour sa richesse en fibres, situées dans la périphérie (tissus externes) de la tige. Ces fibres sont caractérisées par leurs parois épaisses riches en cellulose, et très peu lignifiées (environ 3% masse pariétale). De ce fait, les parois des fibres de lin se distinguent de celles des fibres de bois qui sont plus lignifiées (environ 30% masse pariétale).

Afin d'approfondir nos connaissances des bases moléculaires associées à la formation de ces fibres, nous avons généré environ 1000 ESTs. La classification fonctionnelle de ces ESTs [résultats chapitre I] indique la présence d'un certain nombre de séquences potentiellement associées avec la mise en place et le développement de la paroi des fibres de lin. Parmi ces séquences nous pouvons noter la présence de 3 séquences correspondant à des xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases (XTHs) potentiellement impliquées dans les remaniements de la paroi des fibres pendant le développement. Nous avons également observé la présence de 3 séquences correspondant à des cellulase synthases et des peroxidases.

La forte représentation d'une séquence unique d'une beta xylosidase (*LuBXL1*) dans la banque d'ESTs nous a conduit à rechercher le rôle potentiel de ce gène dans le développement des fibres phloémiennes. Pour ceci, nous avons décidé de sous-exprimer *LuBXL1* utilisant une stratégie IR-PTGS. Du fait que nous nous intéressons à la formation et le développement des fibres, nous avons essayé de transférer le protocole de transformation génétique de lin utilisé au laboratoire pour un cultivar oléagineux (Barbara), vers un cultivar fibre. Nos résultats [Chapitre II], ont indiqué qu'un tel transfert n'était pas facile et nous n'avons pas, par exemple, réussi à transformer le cultivar à fibres Hermès. En revanche, les modifications que nous avons apporté, nous ont permis de transformer le cultivar à fibres Diane. Cependant la transformation génétique du lin reste relativement difficile par rapport avec des espèces végétales modèles (*Arabidopsis*, tabac, peuplier).

Une construction IR-PTGS contenant un fragment du gène *LuBXL1* a été introduite chez le lin et nous avons pu générer 15 lignées indépendantes de la variété à fibres Diane [résultats Chapitre II]. Le criblage de ces 15 lignées [Chapitre III] nous a permis d'identifier 2 lignées (X9 et X15) qui sous-expriment le gène *LuBXL1*. Nous avons ensuite caractérisé fonctionnellement ces 2 lignées.

Dans un premier temps nous avons pu montrer que la sous-expression de ces deux lignées était corrélée à une diminution d'activité enzymatique. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en évidence une activité beta-xylosidase, mais non pas une activité alpha-arabinofuranosidase. Ceci est intéressant car, dans certains cas, les enzymes beta-xylosidase peuvent posséder une deuxième activité α -arabinofuranosidase. Cependant nos mesures étaient faites sur des extraits bruts et la purification de la protéine pure serait nécessaire pour caractériser les substrats de la beta-xylosidase.

Nous avons ensuite recherché l'effet de la transformation sur le développement de la plante dans ces deux lignées. Aucun phénotype macroscopique n'a pu être noté. Néanmoins, l'observation de certaines coupes histologiques semble montrer des cellules de xylème déformées. Dans certains cas, cette déformation ressemble au phénotype *irx* (irregular xylem) observé chez certains mutants d'*Arabidopsis*. Le phénotype *irx* est associé à des modifications structurelles importantes de la paroi ce qui pourraient suggérer que la sous-expression de *LuBXL1* est associée à des modifications des parois dans certaines cellules xylémiennes. Cependant, les éventuelles modifications observées restent légères. De même, la sous expression de *LuBXL1* dans les tissus externes n'était pas associée à des modifications majeurs de la structure des parois des fibres periphloèmiennes. Nous avons également observé des modifications éventuelles des parois des cellules épidermiques. Cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce point. Nos analyses des sucres totaux n'ont pas mis en évidence des différences importantes entre les lignées (témoins, vecteur vide) et les 2 lignées sous-exprimant *LuBXL1*. A noter que la sous-expression d'un gène beta-xylosidase chez *Arabidopsis* (Goujon et al., 2003) n'est pas non plus associée à une modification dans les quantités de sucres totaux.

Pour approfondir nos recherches nous avons utilisé la technique de l'empreinte enzymatique pour mieux caractériser les hémicelluloses au niveau des tissus internes et externes des plantes sauvages d'un côté, et d'un autre côté pour, mettre en évidence les différences structurales des hémicelluloses entre plantes sous-exprimant *LuBXL1* et plantes témoins. Cette technique se base sur l'utilisation d'enzymes appropriées pour libérer des oligosaccharides à partir des polysaccharides de la paroi d'intérêt. Dans notre cas nous avons utilisé une endoglucanase ou une endoxylanase pour caractériser les xyloglucanes ou les xylanes.

L'analyse des plantes sauvages a montré que les tissus externes sont plus riches en xyloglucanes par rapport aux tissus internes. On remarque l'abondance des fragments XXXG, XXLG(XXLG), XXFG et XLFG au niveau des tissus externes. On a remarqué la diminution des fragments XXXG au niveau des tissus internes. Au niveau de ces tissus on a constaté leur richesse en xylanes par rapport aux tissus externes, cela est caractérisé par l'abondances des oligomères classiques des xylanes (résidus β -(1-4)Xylosyl substitués avec l'acide 4-O-Methyl glucuronique) X₄-4OMeGlcA, X₅-4OMeGlcA, X₆-4OMeGlcA et X₇-4OMeGlcA

Nous avons pu montrer par la technique de l'empreinte enzymatique une différence de la structure des hémicelluloses au niveau des tissus internes des lignées X9 et X15 par rapport au témoin W2. Cette différence réside dans l'augmentation des fragments des xyloglucanes et la diminution des fragments de xylanes dans les lignées qui sous expriment le gène *LuBXL1*. Nous n'avons pas décelé de différences de xyloglucanes ou de xylanes au niveau des tissus externes chez les plantes transformées.

Nos premiers résultats avec l’empreinte enzymatique ont suggérer que la sous-expression du gène *LuBXL1* chez le lin est associée à des modifications au niveau des hémicelluloses (xyloglucanes et xylanes) des tissus internes. Dans un premier temps Il est nécessaire de confirmer ces résultats. La beta-xylosidase peut également avoir un effet sur les xylogalacturonanes et dans ce cas là, il serait intéressant d’utiliser la même approche (empreinte enzymatique) pour analyser les fractions pectiques des tissus internes et externes des plantes sous-exprimant *LuBXL1*.

Des travaux récents (Chavès Montes et al., 2008) ont indiqué que l’utilisation d’anticorps dirigé contre l’arabinan (LM6) et le xylane (LM10) a pu mettre en évidence des modifications de la structure pariétale dans une lignée d’*Arabidopsis* sur-exprimant un gène bi-fonctionnel α -arabinofuranosidase/ β -xylosidase. Une telle approche pourrait également permettre de mettre en évidence des modifications chez le lin. Nous avons déjà réalisé des inclusions d’échantillons de tige à cet effet.

Selon nos résultats, nous n’avons pas détecté d’activités de type α -arabinofuranosidase dans nos extraits bruts. Cependant, la protéine LuBXL1 est structurellement proche d’autres protéines présentant une activité bi-fonctionnelle (α -arabinofuranosidase/ β -xylosidase). Afin de mieux caractériser la gamme de substrats potentiels, notre laboratoire est en train de produire la protéine recombinante dans le système *Pichia pastoris*. La production de LuBXL1 chez la levure présente l’avantage de pouvoir obtenir la protéine en grande quantité, mais aussi de pouvoir la produire dans un état glycosylé. Ceci est important du fait que plusieurs travaux (Henriksson *et al.*, 2003, Kallas *et al.*, 2005) sembleraient indiqué que l’absence de la partie saccharidique peut modifier l’activité de l’enzyme.

Pendant ces travaux, nous avons choisi de se focaliser sur le rôle potentiel de la beta-xylosidase dans la formation et le développement des fibres de lin. Cette décision a été motivée par la forte représentativité de la séquence correspondante dans notre collection d’ESTs. Cependant, ces ESTs étaient générées à partir des tissus externes, riches en fibres, mais également caractérisés par la présence d’autres types cellulaires (phloème, cortec, épiderme). Nous avons également vu que le gène est exprimé dans les tissus externes. Afin d’obtenir une meilleure idée de l’expression spatial de ce gène, notre laboratoire est en train de transformer du lin avec une construction promoteur *LuBXL1-GUS*. Des études histochimiques nous permettraient d’établir le profil d’expression, au niveau cellulaire, de ce gène. De telles études faciliteraient une meilleure compréhension du rôle de ce gène.

Nous pouvons également imaginer de sur-exprimer le gène *LuBXL1* chez *Arabidopsis* afin de voir un éventuel impact sur le phénotype.

Il serait également nécessaire d'améliorer le protocole de transformation pour obtenir un rendement plus élevé. Dans ce cas, il semble nécessaire de modifier certains paramètres tels que les concentrations des régulateurs de croissance, les antibiotiques et la lumière car ces éléments sont déterminants pour le succès des transformations. D'autre part, la recherche d'autres variétés à fibres qui sont moins récalcitrants à la transformation peut être envisagée.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdul Hafez A. M. (1991). Mise en place des pectines dans les parois du lin et modifications de leur structure au cours des premiers stades de développement de la plante. **Thèse de doctorat**, université de rouen
- Aldington, S. and Fry, S. C. (1993). Oligosaccharins. **Adv Bot Res**, 19: 1-101.
- Andème-Onzighi, C, Lhuissier, F, Viché M, Yamada, H, Driouich, A. (2000). A (1-->3,6) beta D-galactosyl epitope containing uronic acids associated with bioactive pectins occurs in discrete cell wall domains in hypocotyl and root tissues of flax seedlings. **Histochem Cell Biol**, 113(1):61-70.
- Awano, T., Takabe, K. and Fujita, M. (2001) Xylan and lignin deposition on the secondary wall of *Fagus crenata* fibers. **In Molecular Breeding of Woody Plants** (Morohoshi, N. and Komamine, A., eds). The Netherlands: Elsevier Science B. V., pp. 137–142.

B

- Baley, C. (2002). Analysis of the flax fibres tensile behaviour and analysis of the tensile stiffness increase. **Compos Part A-Appl Sci Manuf**, 33 (7): 939-948.
- Baucher, M., Halpin, C., Petit-Conil, M. and Boerjan, W. (2003). Lignin: genetic engineering and impact on pulping. **Crit Rev Biochem Molec Biol**, 38: 305-350.
- Basiran, N., Armitage, P., Scott, R. J. and Draper, J. (1978). Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens* : Regeneration of transformed shoots *via* a callus phase. **Plant Cell Plant**, 6 : 396-399.
- Beg, Q. K., Kapoor, M, Mahajan L, Hoondal, G. S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl Microb Technol**, 56:326338.
- Biely P (1985) Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnology**, 3: 286-290.
- Bourquin, V., Nishikubo, N., Abe, H., Brumer, H., Denman, S., Ecklund, M., Chritiernin, M., Teeri, T. T., B. Sundberg and E. J. Mellerowicz. (2002). Xyloglucan endotransglycosylase have a function during formation secondary walls of vascular tissues. **Plant Cell**, 14: 3073-3088.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72: 248-254.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. and Lamb, C. J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a prolin-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. **Cell**, 70: 21-30.
- Bretagne-Sagnard, B., Chupeau, M. C., Chupeau, Y. and Fouilloux G. (1996). Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as cytokinin source. **Plant Cell Rep**, 14 : 120-124
- Bretagne-Sagnard, B, and Chupeau, Y (1996). Selection of transgenic flax plants is facilitated by spectinomycin. **Transgenic Research**, 5: 131-137
- Brett, C. and Waldron, K. (1996). **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London, Chapman and Hall, 255 pp.
- Brown, R. M., Jr., Saxena, I. M., and Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in plant science**, 1 : 149-165.
- Brown, R. M. Jr, Saxena, I. M. (2000) Cellulose biosynthesis: a model for. understanding the assembly of biopolymers. **Plant Physiol Biochem**, 38:57–67

Buchala, A. J., Wilkie, K. C. B. (1973). Total hemicelluloses from wheat at different stages of growth. **Phytochemistry**, 12, 499.

C

Campbell, P. Braam, J. (1999). Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions, **Trends Plant**, 4 : 361–366.

Carlquist, S. (1988). **Comparative wood anatomy**. Berlin, Springer-Verlag, 436 pp.

Carpita, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 47: 445-476.

Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J**, 3 (1): 1-30.

Carpita, N., McCann, M. and Griffing, L. R. (1996). The plant extracellular matrix: News from the cell's frontier. **Plant Cell**, 8 (9): 1451-1463.

Carpita, N. C. and McCann, M. C. (2000). The cell wall. In: **Biochemistry and molecular biology of plants**, Buchanan B. B., Gruissen W. and Jones R. L. (eds), Rockville, Maryland, pp: 52-108.

Carpita, N. C. and McCann, M. C. (2002). The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. **Plant Soil**, 247 (1): 71-80.

Carson, D. L., Hockett, B. I. and Botha, F. C. (2002). Sugarcans ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. **Plant Sci**, 162: 289-300.

Catalá, C., Rose, J. K. C., York, W. S., Albersheim, P., A. G. Darvill and A. B. Bennett. (2001). Characterisation of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. **Plant Physiol**, 127: 1180-1192.

Chavez Montes, R. A., Ranocha, P., Martinez, Y., Minic, Z., Jouanin, L., Marquis, M., Saulnier, L., Fulton, L. M., Cobbett, C. S., Bitton, F., Renou, J., Jauneau, A and Goffner, D. (2008). Cell wall modifications in *Arabidopsis* plants with altered α -L-arabinofuranosidase activity. **Plant Physiol**, 147 : 63-77.

Chuang, C. F., and Meyerowitz, E. M. (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, 97 : 4985-4990

Collins T., Gerday C., Feller G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, **FEMS Microbiology Reviews**, 29(1):3-23.

Condit, C. M., McLean, B. G., Meagher, R. B. (1990), Characterization of the expression of the petunia glycine-rich protein-1 gene product. **Plant Physiol**. 93, 596–606.

Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 50: 391-417.

Crozier, M. N. (1950). Microscopic examination of the sectioned stem of linen flax (*Linum usitatissimum*). **N Z J Sci Technol**, 6: 17-30.

D

Darvill, A., Augur C., Bergmann, C., Carlson, R. W., Cheong, J. J., Eberhard, S., Hahn, M. G., Lo, V. M., Marfa, V., Meyer, B., Mohnen, D., O'Neill, M. A., Spiro, M. D., van Halbeek, H., York, W. S., Albersheim, P. (1992) Oligosaccharins-Oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. **Glycobiology**, 2: 181–198.

- Day, A., Ruel, K., Neutelings, G., Crônier, D., David, H., Hawkins, S., Chabbert B. (2005). Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers. **Planta**, 222(2):234-45
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., van Montagu, M. Leemans J (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors from *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. **Nucl Acid Research** 13: 4777-4788
- Dekker RFH, Richards GN (1976) Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 32: 277-352.
- Delmer, D. P., Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis, **Plant Cell**, 7: 987-1000.
- Delmer, D. P. (1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 50:245-276.
- Dixon, R. A., Chen, F., Guo, D. J. and Parvathi, K. (2001). The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochem**, 57 (7): 1069-1084.
- Dong, J. Z. and McHughen. (1993). An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Sci**, 88 : 61-71.

E

- Esau, K. (1977) Anatomy of seed plant. **Second eds. (J. Wiley and sons)**, pp. 1-500, New York.

F

- Fernald, M. L. (1950). Gray's Manual of Botany. **Eight edition (Corrected Printing, R.C. Rollins, 1970). D. Van Nostrand Company**, New York, NY. 1632 p
- Focher, B. (1992). Physical characteristics of flax fibre. *In: The biology and processing of flax*, Sharma H. S. S. (eds), *Belfast*, pp: 11-32.
- Fry, S., C. (1988). The growing plant cell wall : Chemical and metabolic analysis. **Harlow, Essex, Longman Scientific and Technical**, 333 pp.
- Fry, S.C. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Rev Plant Physiol**, 46: 497 - 520.
- Fry S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. **Biochem J**, 332 (Pt 2):507-15.
- Fry, S., C. (2004). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, 161: 641-675.
- Fry, S. C., Smith, R. C., Renwick., K. F., Martin, D. J., Hodge, S. K., and Matthews, K. J. (1992). Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochem J**, 282 : 821-828.

G

- Gill, K. S. (1987). Linseed. **Publications and Information Division**, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 386 p.
- Girault, R., His, I., AndemeOnzighi, C., Driouich, A. and Morvan, C. (2000). Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres. **Planta**, 211 (2): 256-264.

- Goodwin, T. W. and Mercer, E. I. (1990). The plant cell wall. *In: Introduction to plant biochemistry*, Press P. (eds), *Oxford, New York*, pp: 55 - 91.
- Goubet, F. (1995). Structural features of galactans from flax fibres. **Carbohydr Polym**, 27: 221-227.
- Goubet, F., Morvan, C., (1994). Synthesis of cell wall galactans from flax (*Linum usitatissimum* L.) suspension-cultured cells. **Plant and cell physiology**, 35(5) : 719-727
- Goujon, T., Minic, Z., El Amrani, A., Lerouxel, O., Aletti, E., Lapierre, C., Joseleau, J. P., and Jouanin, L. (2003). AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. **Plant J**, 33:677–690
- Greve, L. C., Labavitch, J. M., Hungate, R. E., (1984). Alpha-L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus allus*: purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. **Appl. Environ. Microbiol.** 47(5):1135-1140.
- Gross, G. G., Stöckigt, J., Mansell, R. L. and Zenk, M. H. (1973). Three novel enzymes involved in the reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol in higher plant: ferulate:CoA ligase, feruloyl:CoA reductase and coniferyl alcohol oxidoreductase. **FEBS Lett**, 31: 283-286.

H

- Hatfield, R. D., Ralph, J. and Grabber, J. H. (1999). Cell wall crosslinking by ferulates and diferulates in grasses. **J. Sci. Food Agric**, 79: 403-407.
- Hayashi, T., M. P. F. Mardsen, and D. P. Delmer. (1987). Xyloglucan-cellulose interactions *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiol**, 83: 384-389.
- Hayashi, T., Matsuda K. (1981). Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells. Occurrence and some properties of xyloglucan 4-beta-D-glucosyltransferase and 6-alpha-D-xylosyltransferase. **J Biol Chem**, 256(21):11117–11122.
- Helliwell C, Waterhouse P (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30 (289-295)
- Henriksson, H., Denman, S. E., Campuzano, I. D. G., Ademark, P., Master, E. R., Teeri, T. T., and Brumer III, H. (2003). N-linked glycosylation of native and recombinant cauliflower xyloglucan endotransglycosylase 16 A. **Biochem. J**, 375 : 61-73.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**, 280 : 309-316
- Henrissat, B. (1998) Glycosidase families. **Biochem Soc Trans**, 26 : 153-156
- Henrissat, B., Coutinho, P. M., and Davies, G. J. (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol**, 47:55–72
- Hrmova, M., Biely P., Vrsanska M. (1986) Specificity of cellulase and beta-xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Arch. Microbiol**, 144: 307-311.

I

- Itai, A., Ishihara, K., and Bewley, J. D. (2003). Characterization of expression, and cloning, of β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. **Journal of Experimental Botany**, 54 (393) : 2615-2622.
- I.T.L. Le lin et ses principaux schémas de transformation. 19 pages.

I.T.L. (1988). La culture du lin à fibre. 58 pages.

J

Jacobs, E., and Metzler, M. (1999). Oxidative metabolism of the mammalian lignans enterolacton and enterodiol by rat, pig, human liver microsomes. **J. Agric Food Chem**, 47 : 1071-1077.

Jacquemart, J. and Fourcroy, M. (1961). Origine histologique des premières fibres de la tige de lin. **C R Acad Sci Paris**, 252: 2753-2755.

Jain, R. K., Thompson, R. G., Taylor, D. C., MacKenzie, S. L., McHughen, A., Rowland, G. G., Tenaschuk, D. and Coffey, M. (1999). Isolation and characterization of two promoters from linseed for genetic engineering. **Crop Sci**, 39 (6): 1696-1701.

Jones, L., Ennos, A. R. and Turner, S. R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. **Plant J**, 26 (2): 205-216.

Jose-Estanyol, M and Puigdomènech, P. (2000). Plant cell wall glycoproteins and their genes, **Plant Physiol Biochem**, 38 : 97-108

K

Kaji, A. (1984). L(arabinosidases). **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, 42: 383-394.

Kallas, A. M., Piens, K., Denman, S. E., Henriksson, H., Fäldt, J., Johansson, P., H. Brumer III and T. T. Teeri. (2005). Enzymatic properties of native and deglycosylated hybrid aspen xyloglucan endotransglycosylase 16A expressed in *Pichia pastoris*. **Biochemical Journal** Immediate Publication. Published on 1 Apr 2005 as manuscript BJ20041749.

Kato, Y., and Watanabe, T. (1993). Isolation and characterization of a xyloglucan from Gobo (*Arctium lappa* L.). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 57(9) : 1591-1592

Keller, B., Schmid, J., and Lamb, C. J. (1989). Vascular expression of a bean cell wall glycine-rich protein - β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco. **Embo J**, 8 : 1309-1314.

Kieliszewski, M. J., Kamyab, A., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A., (1992). A histidine-rich extensin from *Zea mays* is an arabinogalactan protein. **Plant Physiol**, 99 : 538-547.

Kieliszewski, M. J., and Lamport, D. T. A. (1994). Extensin: repetitive motifs, functional sites, posttranslational codes and phylogeny. **Plant Journal**, 5 : 157-172.

Kolodziejczyk, P. P., and Fedec, P. (1995). Processing flaxseed for human consumption. In Cunance, S. C., and Thompson, L. U. (eds). **Flaxseed in Human Nutrition**, AOCS Press, Champaign, IL, pp. 261-280.

Koukol, J., and Conn, E. E. (1961). Metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. **J Biol Chem**, 236 : 2692-2698.

Kreuger, M. and Van Holst, G. J. (1995). Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L, **Planta**, 197:135-141.

L

Lamblin, F. (1999). Modulation des activités S-adénosylméthionine synthétase et pectine méthylestérase chez le lin (*Linum usitatissimum*) par transgénèse sens et antisens via *Agrobacterium tumefaciens*. **Thèse de Doctorat**, Université de Picardie Jules Verne, 144 pages.

Laplace, C. (2004). Etudes préliminaire sur la production d'acides gras cyclopropanes, par génie génétique, dans les embryons de lin. **Thèse de Doctorat**, Université de Technologie de Compiègne.

- Lee, R. C., Burton, R. A., Hrmova, M., and Fincher, G. B. (2001). Barley arabinoxylan arabinofuranosidases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones, **Biochem J**, 356 : 181-189.
- Lee, R. C., Hrmova, M., Burton, R. A., Lahnstein, J., and Fincher, G. B. (2003). Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity. **J Biol Chem**. 278 : 5377-5387.
- Lerouge, P., O'Neill, M. A., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1993). Structural characterisation of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. **Carbohydr Res**, 243: 359-371.
- Lerouxel, O., Choo, T. S., Séveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., and Pauly, M. (2002). Rapid Structural Phenotyping of Plant Cell Wall Mutants by Enzymatic Oligosaccharide Fingerprinting (2004). **Plant Physiology**, 130 : 1754-1763
- Levy, S., Maclachlan, G., and Staehelin, L. A. (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. **Plant J**, 11 : 373-386.
- Lewis, N. G., and Davin, L. B. (1996). Lignin and lignan biosynthesis : Distinctions and structure during lignan and lignin biosynthesis in lignin and lignan biosynthesis. Ed. **Lewis N. G. & Sarkanen S.** pp. 334-361.
- Lewis, N. G., Davin, L. B., and Sarkanen, S. (1999). The nature and function of lignins. In DHR Barton, K Nakanishi, O Meth-Cohn, eds, **Comprehensive Natural Products Chemistry**, Vol 3. Elsevier, London, pp 618-745

M

- Maclachlan, G., and Brady, C. (1994). Endo-1,4- β -glucanase, xyloglucanase, and xyloglucan endo-transglucosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. **Plant Physiol**, 105 : 963-974.
- Maertens, S. C., Raes, G., and Vandermeersshe, G. (1956). La structure fine du lin. I - Etude au microscope électronique de la fibre de lin par les méthodes de répliques et de coupes ultrafines. **Annales textiles**, 4(12) : 148-157.
- Mazumdera, S., Lerouge, P., Loutelier-Bourhis, C., Driouich, A., and Raya, R. (2005). Structural characterisation of hemicellulosic polysaccharides from *Benincasa hispida* using specific enzyme hydrolysis, ion exchange chromatography and MALDI-TOF mass spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, 59 : 231-238.
- Mazur, W. (1998). Phytoestrogen content in foods. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, 12 : 729-742.
- McCann, M. C., Roberts, K. (1991). Architecture of the primary cell wall, in:C.W. Lloyd (Ed.), The cytoskeletal basis of plant growth and form, Academic Press, Inc, New York, N.Y. , pp. 109-129.
- McDougall, G. J. (1993). Isolation and partial characterisation of the non-cellulosic polysaccharides of flax fibre. **Carbohydr Res**, 241: 227-236.
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D., Weyers, J. D. B. and Hillman, J. R. (1993). Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **J Sci Food Agric**, 62: 1 - 20.
- Meicenheimer, R. D. (1992). Cellular basis for growth and tissue differentiation patterns in *linum usitatissimum* (linaceae) stems: the stem unit. **Ann Bot**, 79 (8): 914-920..

- Mellerowicz, E. J., Baucher, M., Sundberg, B. and Boerjan, W. (2001). Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Mol Biol**, 47 (1-2): 239-274.
- Miller, J. C., and Fry, S. C. (1992). Production and harvesting of ionically wall-bond extensin from living *cell*. expansion cultures. **Plant Cell Tiss Cult**, 31: 61-66.
- Minic, Z., Rihouey, C., Do, C. T., Lerouge, P., and Jouanin, L. (2004). Purification and characterization of enzymes exhibiting beta-D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, 135:867–878
- Minic, Z., and Jouanin, L. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharides degradation. **Plant Physiol Biochem**, 44:435–449
- Minorsky, P. V. (2002). The Wall Becomes Surmountable. **Plant Physiol**, 128 : 345-353.
- Mlynarova, L., Bauer, M., Nap, J. P. and Pretova, A. (1994). High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfert to flax. **Plant Cell Rep**, 13: 282-285.
- Mooney, C., Stolle-Smits, T., Schols, H. and de Jong, E. (2001). Analysis of retted and non retted flax fibres by chemical and enzymatic means. **J Biotechnol**, 89 (2-3): 205-216.
- Mort, A. J., Qiu, F., and Maness, N. (1993). Determination of pattern of methylesterification in pectin. Distribution of contiguous non esterified residus. **Carbohydr Res**, 247 : 21 - 35.
- Morvan, C., Morvan, O., Juneau, A., and Demarty M. (1984). Prpréités physico-chimiques des pectines de lin; action des microorganismes sur les fibres. In : International Workshop on plant polysaccharides, structure and function, Nantes, July 9-11, 1984. **INRA-CNRS eds**, 253-254.
- Morvan, C., Abdul-Hafez, A. M., Morvan, O., Jauneau, A. and Demarty, M. (1989a). Etudes physico-chimique et biochimique de polyssacharides extraits de lin sous-roui. **Plant Physiol Biochem**, 27 (3): 451-459.
- Morvan, C., Jauneau, A., Voreux, H., Morvan, O. and Demarty, M. (1990). Contribution des ciments aux caractéristiques physicochimiques des fibres de lin : application à un rouissage enzymatique. **C R Soc Biol**, 184: 18-30.
- Morvan, C., Abdul-Hafez, A. M., Jauneau, A. and Demarty, M. (1991). Les composés pectiques, marqueurs de la croissance du lin. **Bull Soc Bot Fr., Actual Bot**, (3/4) : 339-350.
- Morvan, O., Jauneau, A., Voreux, H. and Demarty, M. (1989b). Biosynthèse des pectines et différenciation des fibres cellulosiques au cours de la croissance. **Can J Bot**, 67: 135-139.

N

- Nesbitt, P. D., Lam, Y., and Thompson, L. U. (1999). Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. **American Journal of clinical Nutrition**, 69 : 549-555.
- Nishitani, K., and Tominaga, R. (1992). Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. **J Biol Chem** 267: 21058-21064
- Nishiyama, Y., Kim, U. J., Kim, D. Y., Katsumata, K. S., May, R. P., Langan, P. (2003) Periodic disorder along ramie cellulose microfibrils. **Biomacromolecules**. 4, 1013.
- Nothnagel, E. A. (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. **Int Rev Cyt**, 174: 195-291.

O

- O'Neill, M. A., Albersheim, P. and Darvill, A. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: **Methods in plant biochemistry**, Dey P. M. (eds), London, pp: 415-441.

P

- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G.P., and Somerville, C.R. (2005). Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 8633–8638.
- Plonka, F. and Anselme, C. L. (1956). **Les variétés de lin et leurs principales maladies cryptogamiques**. INRA, *Versailles, Paris*, 190 pages pp.
- Poutanen K (1988) Characterization of xylanolytic enzymes for potential applications. Technical Research Centre of Finlind. **Publications 47**, Espoo.

R

- Rakousky, S., Tejklova, E., Wiesner, I., Wiesnerova, D., Kocabek, T., and Ondrej, M. (1999). Hygromycin B - an alternative in flax transformant selection. **Biol Plant**, 42 : 361-369.
- Reiter, W. D., Chapple, C. C. S., and Somerville, C. R. (1997). Mutant of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. **Plant J**, 12:335–345.
- Rihouey, C., Morvan, C., Borissova I., Jauneau A., Deamrty, M., and Jarvis, M. (1995). Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls. **Carbohydr Polym**, 28 : 159-166.
- Ringli C., Keller B., Ryser U. (2001). Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 357-384.
- Roberts, K. (1994). The plant extracellular matrix : a new expansive mood. **Current Opinion in Cell Biology**, 6 : 688-694.
- Roland, J. C. (1980). Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales. *In: Les Polymères Végétaux*, Monties B. (eds), *Paris*, pp: 46-65.
- Roland, J. C., Mosiniak, M. and Roland, D. (1995). Dynamique du positionnement de la cellulose dans les parois des fibres textiles du lin (*Linum usitatissimum*). **Acta Bot Gallica**, 142 (5): 463-484.
- Roland, J. C., and Mosiniak, M. (1996). Biogénèse et recyclage de la cellulose, première biomasse renouvelable du globe. **La vie des Sciences, Académie des Sciences**, 13(3) : 193-212.
- Rose, J. K., Braan, Fry, S. C., and Nishitani. K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature, **Plant Cell Physiol**, 43: 1421–1435.
- Rose, J. C., and Bennett, A. B. (1999). Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends in Plant Sci**, 4:176-183.
- Russell, D . W. (1971). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. **Journal of Biological Chemistry**, 246 : 3870-3878.

S

- Salmen, L. and Olsson, A. (1998). Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: Structure-property relationships. **Journal Pulp Pap Sci**, 24 (3): 99-103.
- Schols, H. A., Vierhuis, E., Bakx, E. J. and Voragen, A. G. J. (1995). Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. **Carbohydr Res**, 275 (2): 343-360.

- Schroder, R., Atkinson, R. G., Langenkamper, G., and Redgwell, R. J. (1998). Biochemical and molecular characterization of xyloglucan endotransglucosylase from ripe kiwifruit. **Planta**, 204: 242–251.
- Selvendran, R. R. 1985, Development in the chemistry an biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. **J Cell Sci Suppl**, 2 : 51-88.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall protein. **Plant Cell**, 5: 5-23.
- Showalter, A. M. (2001). Introduction : plant cell wall proteins. **Cell Mol Life Sci**, 587: 1361-1362.
- Showalter, A. M., Varner., J. E. (1989) Plant hydroxyproline-rich glycoproteins. **The Biochemistry of Plants**, 15 : 485-520.
- Simmons, C. R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -glucanases and 1,3;1,4- β -glucanases. **Crit Rev Plant Sci**,13:325-387.
- Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rohde, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerao, R., Larsson, M., Villarroel, R., Van Montagu, M., Sandberg, G., Olsson, O., Teeri, T. T., Boerjan, W., Gustafsson, P., Uhlen, M., Sundberg, B. and Lundeberg, J. (1998). Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5, 692 expressed sequence tags. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 95 (22): 13330-13335.
- Sugiyama, J., Persson, J., Chanzy, H. (1991) Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymprphism of Native Celluloses. **Macromolecules**, 24, 2461.
- Sugiyama, J., Chanzy, H. Revol, J. F. (1994). On the polarity of cellulose in the cell wall of Valonia. **Planta**, 193 : 260-265.
- Sultana, C. (1992). Growing and harvesting of flax. *In: The biology and processing of flax*, Sharma H. S. S. (eds), *Belfast*, pp: 83-109.

T

- Thompson, J. E. and Fry, S. C. (1997) . Trimming and solubilization of xyloglucan after deposition in the walls of cultured rose cells. **J. Exp. Bot**, 48, 297-305
- Thompson, J. E., Fry S. C. (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucanand acidic pectins in suspension-cultured rose cells, **Planta**, 211: 275-286.

U

- Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Ugawa, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K. and Tsumura, Y. (2000). Expression analysis of ESTs derived from inner bark of *Cryptomeria japonica*. **Plant Mol Biol**, 43 (4): 451-457.

V

- Van Peij, N. N. M. E., Brinkmann, J., Vrsanska, M., Visser J., and De Graaff, L. H. (1997). Beta-Xylosidase activity, encoded by xlnD, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. **Eur J Biochem**, 245: 164-173.

W

- Weisshaar, B. and Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Curr Opin Plant Biol**, 1 (3): 251-257.
- Wesley, S. V., Helliwell, C., Smith, N., Wang, M., Rouse, D., Liu, Q., Gooding, P, Singh S, Abott D, Stoutjesdijk P, Robinson S, Gleave A, Green A, and Waterhouse P. (2001). Construct design for efficient, effective and high-troughtput gene silencing in plants. **Plant Journal**, 27(6): 581-590

Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., Saddler, J. N., and Yaguchi, M. (1986). Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol**, 32: 570-574.

Wood, T. M., and McCrae, S. I. (1986). Studies of two low-molecular-weight endo-(1,4)-beta-D-xylanases constitutively synthesised by the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. **Carbohyd. Res**, 148: 321-330.

Wrobel-Kwiatkowska, M., Starzycki, M., Zebrowski, J., Oszmianski, J., and Szopa, J. (2007). Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties, **Journal of Biotechnology**, 128(4) : 919-934.

X

Xiong, J., Balland-Vanney M., Xie Z., Schultze, M., Kondorosi, A., Kondorosi, E., and Staehelin, C. (2007). Molecular cloning of a bifunctional {beta}-xylosidase/{alpha}-l-arabinosidase from alfalfa roots: heterologous expression in *Medicago truncatula* and substrate specificity of the purified enzyme. **J Exp Bot**, 58: 2799-2810

Y

Yamamoto, H., Horii, F., and Hirai, A. (1996). In situ crystallization of bacterial cellulose .2. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I-alpha and I-beta at the early stage of incubation. **Cellulose**, 3, 229.

Yokoyama, R., and Nishitani, K. (2001). Endoxyloglucan transferase is located both in the cell plate and in the secretory pathway destined for the apoplast in tobacco cells. **Plant Cell Physiol**. **42** : 292–300.

Yokoyama, R., and Nishitani, K (2004). Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*, **Plant Cell Physiol**, 45 : 1111–1121.

ANNEXES

Composition des solutions mères utilisées pour les milieux de cultures**Macroéléments (Murashige et Skoog) (x10)**

- KNO ₃	18,8	mM
- MgSO ₄	1,5	mM
- CaCl ₂	2,99	mM
- NH ₄ NO ₃	20,6	mM
- KH ₂ PO ₄	1,25	mM

Microéléments (Murashige et Skoog) (x100)

- CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,11	μM
- CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,10	μM
- H ₃ BO ₃	0,10	μM
- KI	5	μM
- MnSO ₄ , H ₂ O	0,10	μM
- Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1,03	μM
- ZnSO ₄ , 7H ₂ O	29,91	μM

Composition de la solution de vitamines Morel et Wetmore (x200)

- Myo inositol	5,55	mM
- Thiamine HCL	3	μM
- Acide nicotinique	8,1	μM
- Pyridoxine HCL	4,9	μM
- Panthoténate de calcium	2,1	μM
- Biotine	0,041	μM

On filtre stérilement cette solution que l'on répartit dans des tubes falcons et que l'on congèle, de façon à pouvoir conserver cette solution.

Fer-EDTA (Murashige et skoog) (x100)

- FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1	mM
- Na ₂ EDTA	0,1	mM

Composition des milieux de culture pour le lin

Milieu de germination (ou MS0)

- Macroéléments (MS x10)	100 ml.l ⁻¹
- Microéléments (MS x 100)	10 ml.l ⁻¹
- FerEDTA (MS x100)	10 ml.l ⁻¹
- Saccharose	30 g.l ⁻¹
- MES	750 mg.l ⁻¹
- pH	5,7-5,8
- Phytigel	2,8 g.l ⁻¹
- Vitamine (MW x200)	5 ml.l ⁻¹

Milieu de régénération (MSR)

Milieu MS0 auquel on ajoute après autoclavage

- ANA	0,1 µM
- TDZ	0,01 µM

Milieu d'enracinement RoA

- Macroéléments (MS x10)	75 ml.l ⁻¹
- Microéléments (MS x 100)	10 ml.l ⁻¹
- FerEDTA (MS x100)	10 ml.l ⁻¹
- Saccharose	15 g.l ⁻¹
- MES	3,5 mM
- pH	5,7-5,8
- Plant agar	6 g.l ⁻¹
- Vitamine (MW x200)	5 ml.l ⁻¹
- ANA	0,05 µM

Composition de milieux pour Bactéries**MD Minimum dextrose**

Yeast Nitrogen Base	1,34 %
Biotine	4×10^{-5} %
Dextrose	2 %

LB (Luria-Bertani)

Tryptone	1%
Extrait de levure	0,5%
Chlorure de sodium	1%
pH	7,0
d'agar	15g/l

LB Low salt

Tryptone	1%
Extrait de levure	0,5%
Chlorure de sodium	0,5%
pH	7,0
Agar	1,5%

SOC

Tryptone	2%
Extrait de levure	0.5%
Chlorure de sodium	10 mM
Chlorure de potassium	2.5 mM
Chlorure de magnésium	10 mM
Sulfate de magnésium	10 mM
Glucose	20 mM

YEB

Bacto beef extract	5 g/l
Peptone	5 g/l
Extrait de levure	1 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2 mM
Saccharose	15 mM

Le pH est ajusté à 7,2.

Pour le milieu gélosé, on rajoute de l'Agar 15 g/l

NZY

NaCL	85,6 mM
MgSO ₄	8,1 mM
Extrait de levure	5 g.l ⁻¹
Hydrolysat de caséine	10 g.l ⁻¹
pH	5,7
Bacto-agar	15 g.l ⁻¹

Top-NZY

NaCL	85,6 mM
MgSO ₄	8,1 mM
Extrait de levure	5 g.l ⁻¹
Hydrolysat de caséine	10 g.l ⁻¹
pH	5,7
Agarose	10 g.l ⁻¹

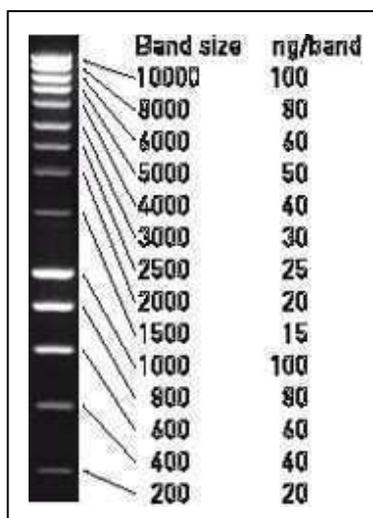
TAE

TRIS	40 mM
Acétate de sodium	5 mM
EDTA	1 mM
pH	7,8

Tampon de charge ADN

Blue de bromophénol	0,25 %
Xylène cyanol	0,25 %
Glycérol	30 %

Marqueur de taille (Eurogentec, Smart Ladder 200 à 1000 pb)



Composition du gel d'électrophorèse

TAE	x 1
Agarose	(0,8 à 1,2 %) (m/v)
BET	150 µg.µl ⁻¹

Tampon d'extraction des protéines

- Bis-Tris	25 mM
- Glycerol	10 %
- CaCl ₂	200 mM
- Na-cacodylate	4 µM
-Cocktail inhibiteur de protéase	1/200 (v/v)

Mode de calcul de l'activité β-xylosidase

L'activité β-xylosidase est mesurée en calculant la variation d'absorbance due à la formation de 4-nitrophenol à 405 nm.

$$\text{Activité spécifique nKat.mg}^{-1} \text{ de protéines} = \text{DO} \times 10^{-3} / \epsilon(4\text{-nitrophenol}) \times 3600 \times \text{qté prot}$$

$$\epsilon(4\text{-nitrophenol}) = 18000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}$$

Listes des amorces employées lors des différentes réactions de RT-PCR

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques de 5' en 3'	
F1CellS5B2 R1CellS5B2	ACACCAATTGGGGCTACAAG GTCGATCACTTTGCTCGTCA	} Amorces des gènes de la Cellulose Synthase
F1CellS7D6 R1CellS7D6	CGGTGGACCCATTAAGAA AAACCAGGACGTTTCTCACG	
F1CellS8C3 R1CellS8C3	TCAAGGGTTCTGCTCCAATC GAGCAAGGAGGTCCATTTGA	
F1CCR R1CCR	AGGCTACACTGTCAGAGGAACCGT CACTTGGTAGGGATAGGATACTCCGG	} Amocnes de la Cinnamoyl CoenzymeA Reductase
F1Ubi R1Ubi	AGACCCTGACCGGAAAGACAATCACT AGGGTTGACTCCTTCTGGATGTTG	} Amorces de l'ubiquitine
F1XET6B7 R1XET6B7	CTGGACTCATTCCCACATCA GGTTTCCTCAGGTGCCTCTT	} Amorces des gènes de la xyloglucane endo Transglycosylase/ Hydrolase
F1XET9F12 R1XET9F12	ATTTGTGTGCGCAGGAGCTTT ATGATGTGCGAATCAGTCCA	
F1XET10B10 R1XET10B10	CCTCCTCGACCAAACTCAG CCTTGTAGTGGGCCATGAAT	
F1Xyl R1Xyl	TCAGACGACACACAGCAACA GGTCGAGTCCCATTACCAGA	} Amorces du gène de la β -xylosidase
XYLINTUP XYLINTDOWN	CTTAACGGGTACATCGTCTCGGATTG GTTCTGAAGAAGGACGATACCTTG	
XYLUTRUP XYLUTRDOWN	GTAAGATAGGAGGCAGGGGCAAAG CTCTAGTCCATGAGTACATCCTC	

Listes des amorces employées lors des différentes réactions de PCR

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques de 5' en 3'	
NPTII1 NPTII2	GAGGCTATTCGGCTATGACTG ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	} Amorces du gène <i>nptII</i>
F2XTH10B10 R2XTH10B1	CTCGAGTCTAGACCTCCTCGACCAAACTCAG GAATTCAAGCTTCCTTGTAGTGGGCCATGAAT	
F2XTH6B7 R2XTH6B7	CTCGAGTCTAGACTGGACTCATTCCCACATCA GGTACCAAGCTTGGTTTCCTCAGGTGCCTCTT	} Construction IR-PTGS
F2XTH9F12 R2XTH9F12	CTCGAGTCTAGAATTTGTGTCGCAGGAGCT GAATTCAAGCTTATGATGTGCGAATCAGTC	
F2XYL R2XYL	CTCGAGTCTAGATCAGACGACACACAGCAA GAATTCAAGCTTGGTTCGAGTCCCATTACCA	} Intron pHANNIBAL
IntronA IntronB	CTTCTTCGTCTTACACATCACTTGTC CATTGGATTGATTACAGTTGGGA	

Publications

C. Hano · M. Addi · L. Bensaddek · D. Crônier
S. Baltora-Rosset · J. Doussot · S. Maury · F. Mesnard
B. Chabbert · S. Hawkins · E. Lainé · F. Lamblin

Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures

Received: 10 June 2005 / Accepted: 15 September 2005 / Published online: 16 November 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Lignin and lignans share monolignols as common precursors and are both potentially involved in plant defence against pathogens. In this study, we investigated the effects of fungal elicitors on lignin and lignan metabolism in flax (*Linum usitatissimum*) cell suspensions. Cell suspension cultures of flax were treated with elicitor preparations made from mycelium extracts of *Botrytis cinerea*, *Phoma exigua* and *Fusarium oxysporum* f. ssp. *lini*. Elicitors induced a rapid stimulation of the monolignol pathway, as confirmed by the increase in PAL (phenylalanine ammonia-lyase, EC 4.1.3.5), CCR (cinnamoyl-CoA reductase EC 1.2.1.44) and CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.195) gene expression and PAL activity. At the same time, CCR activity only increased significantly in *F. oxysporum*-treated cells 24 h post elicitation. On the other hand, CAD activity measured for coniferyl alcohol formation

was transiently decreased but a substrate-specific activation of CAD activity was observed in *F. oxysporum*-treated cells when using sinapyl alcohol as substrate. The accumulation of monolignol-derived products varied according to the elicitor used. *B. cinerea* or *P. exigua*-elicited cell cultures were characterised by a reinforcement of the cell wall by a deposit of 8-O-4'-linked non-condensed lignin structures and phenolic monomers, while at the same time no stimulation of 8-8'-linked lignan or 8-5'-linked phenylcoumaran lignan accumulation was observed. Additionally, elicitation of cell cultures with *F. oxysporum* extracts even triggered a strong incorporation of monolignols in the non condensed labile ether-linked lignin fraction concomitantly with a decrease in lignan and phenylcoumaran lignan accumulation. Several hypotheses are proposed to explain the putative role of these compounds in the defence response of flax cells against pathogens.

Electronic Supplementary Material Supplementary material is available for this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-0156-1> and is accessible for authorized users.

C. Hano and M. Addi contributed equally to this work.

C. Hano (✉) · J. Doussot · S. Maury · E. Lainé · F. Lamblin
Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures,
UPRES EA 1207, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres,
21 rue de Loigny la Bataille, 28000 Chartres, France
E-mail: christophe.hano@univ-orleans.fr
Tel.: +332-37-309753
Fax: +332-37-910863

M. Addi · S. Hawkins
Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales,
UPRES EA 3568/USC-INRA, UFR de Biologie Bât SN2,
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve
d'Ascq cedex, France

L. Bensaddek · S. Baltora-Rosset · F. Mesnard
Laboratoire de Phytotechnologie, UPRES EA 3900, Faculté de
Pharmacie d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne,
1 rue des Louvels, 80037 Amiens cedex 01, France

D. Crônier · B. Chabbert
INRA Parois Végétales et Matériaux Fibreux UMR FARE,
2 esplanade Roland Garros, BP224, 51686 Reims, France

Keywords Elicitation · *Fusarium* · Lignans · Lignin ·
Linum · Monolignol pathway

Abbreviations ANHSEC: Anhydro-secoisolariciresinol
CAD: Cinnamyl alcohol dehydrogenase · CCR:
Cinnamoyl-CoA reductase; · DCG: Dehydrodiconiferyl
alcohol glucoside · PAL: Phenylalanine ammonia lyase
PCBER: Phenylcoumaran benzylic ether reductase PLR:
Pinoresinol lariciresinol reductase · SAD: Sinapyl
alcohol dehydrogenase · SECO: Secoisolariciresinol

Introduction

Phenylpropanoids are secondary metabolites widely distributed in plants, with a range of important functions such as structural components (lignin) or pigments (anthocyanins). Many of these metabolites also play an important role in the resistance of plants to pathogen attack as they belong to the antimicrobial defence arsenal (Dixon et al. 2002). These defence compounds have been classified into three main groups: signalling

molecules (e.g., salicylic acid), preformed phytoantipins and inducible phytoalexins. One group of phenylpropanoids, the monolignols (hydroxycinnamyl alcohols) have received much attention because they are the common precursors of lignin (the second most abundant plant biopolymer after cellulose) and lignans diphenolic compounds that display a broad range of biological activities.

The monolignol biosynthetic pathway (Fig. 1a) starts by the deamination of L-phenylalanine leading to *trans*-cinnamic acid, via the action of phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5), the branchpoint enzyme

between primary (shikimate pathway) and secondary (phenylpropanoid) metabolism. *Trans*-cinnamic acid is then converted to 4-coumaric acid by a cytochrome P450 monooxygenase, cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11). Then 4-Coumarate:coenzyme A ligase (4CL, EC 6.2.1.12) activates hydroxycinnamic acids in the high energy ester intermediates at the branchpoint between flavonoids and monolignols. The coenzyme A esters are converted into monolignols through two successive reduction steps catalysed by cinnamoyl-CoA reductase (CCR, EC 1.2.1.44) leading to the formation of cinnamaldehydes, as intermediates,

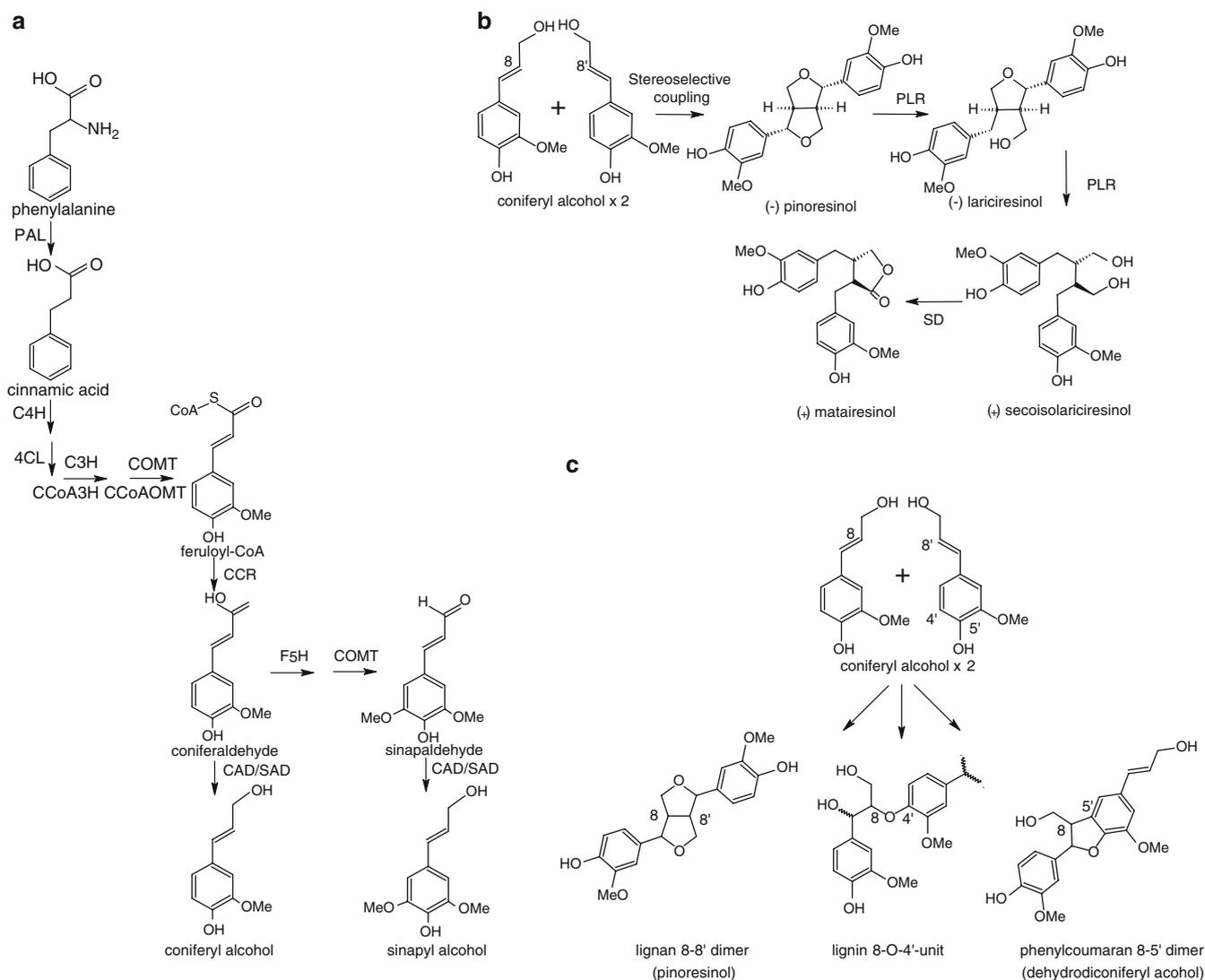


Fig. 1 a–c Monolignol-derived products known to be present in flax and investigated in this study. **a** Monolignol biosynthetic pathway occurring in most angiosperms (from Boerjan et al. 2003). *PAL*: phenylalanine ammonia-lyase; *C4H*: cinnamate 4-hydroxylase; *4CL*: 4-coumarate: CoA ligase; *C3H*: *p*-coumarate 3-hydroxylase; *CCoAOMT*: caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase; *COMT*: caffeic acid *O*-methyltransferase; *CCR*: cinnamoyl-CoA reductase; *F5H*: ferulate 5-hydroxylase; *CAD*: cinnamyl alcohol dehydroge-

nase; *SAD*: sinapyl alcohol dehydrogenase. **b** Biosynthetic pathway leading to secoisolariciresinol, the major lignan present in flax (from Ford et al. 2001). *PLR*: pinoresinol lariciresinol reductase; *SD*: secoisolariciresinol dehydrogenase. **c** Coniferyl alcohol-derived products: pinoresinol (8-8'-linked lignan) and dehydrodiconiferyl alcohol (8-5'-linked phenylcoumaran lignan) result from simple dimerization, 8-O-4'-linked units result from cross coupling of a coniferyl alcohol with a G unit during the lignification process

then to the formation of hydroxycinnamyl alcohols (monolignols) via the action of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD, EC 1.1.1.195).

Lignins are complex racemic aromatic cell wall polymers that result from the random radical coupling of the three main hydroxycinnamyl alcohol monomers (monolignols), *p*-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohols (Boerjan et al. 2003). The corresponding units that constitute the lignin polymer are respectively *p*-hydroxyphenyl (H, non-methoxylated), guaiacyl (G, mono-methoxylated) and syringyl (S, di-methoxylated) units. Lignin is located in the cell walls of conductive xylem tissues, decreasing permeability of tracheids and vessels, as well as in supporting tissues, increasing the stiffness and strength of the stem. Lignin deposition leading to the reinforcement of cell walls can also be induced in response to microbial attack, thereby acting as a physical barrier against pathogen invasion (Mitchell et al. 1994; Dixon and Paiva 1995).

Alternatively, monolignols can be dimerised to form lignans in a number of plant families. They are optically-active dimers that result from the stereo-selective dirigent protein-mediated coupling of the 8 and 8' C-atoms of the side chains of two coniferyl alcohol moieties (Davin et al. 1997). The biosynthesis of lignans in flax (*Linum usitatissimum* L.) has been recently elucidated (Ford et al. 2001). It appears that the dirigent protein coupling of E-coniferyl alcohol leads to (–)-pinoresinol (Fig. 1b, c), which is converted into (–)-lariciresinol and (+)-secoisolariciresinol via the action of pinoresinol lariciresinol reductase (PLR) and finally into (+)-matairesinol (Fig. 1b). (+)-Secoisolariciresinol which accumulates in its diglucoside form (secoisolariciresinol diglucoside, SDG) is the major lignan present in flaxseed. (+)-Matairesinol is also present but at a lower level. Interestingly, secoisolariciresinol and matairesinol are metabolised by the intestinal microflora into their biologically active forms enterodiol and enterolactone respectively. These so-called 'mammalian lignans' exhibit antioxidant properties and act as phytoestrogens. SDG is thus indirectly a natural cancer chemopreventive lignan, effective against the onset of breast cancer, prostate cancer and colon cancer and exhibits a wide range of health promoting activities for humans (reviewed by Wescott and Muir 2003). Flax cell cultures have also been shown to accumulate significant amounts of a 8-5'-linked phenylcoumaran lignan (Fig. 1c) as its glucosylated form, the dehydrodiconiferyl alcohol-4-β-D-glucoside (DCG; Attoumbre et al. 2005).

In planta, lignans have been reported to have potent defence properties, such as antifeedant, antibacterial and antifungal activities (MacRae and Towers 1984). Their constitutive deposition reinforces durability, longevity and resistance of the heartwood of many tree species against wood-rotting fungi. Indeed, the heartwood of many species, such as loblolly pine (*Pinus taeda*), contains significant levels of 8-5'-linked phenylcoumaran lignans such as dehydrodiconiferyl alcohol derived from

dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DCG) and related metabolites. These compounds and their higher molecular weight non-lignin derivatives are infused in the heartwood as protective post-lignification deposits (Gang et al. 1999). Vander Mijnsbrugge et al. (2000) identified in poplar a phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER) involved in 8-5'-linked lignan biosynthesis. This enzyme which catalyses the reduction of dehydrodiconiferyl alcohol into isodihydro-dehydrodiconiferyl alcohol has been found to be the most abundant protein of the poplar xylem. Lignans could also act as phytoalexins, in both woody and non-woody species, being formed *de novo* in response to fungal attack, for example, the 8-8'-linked lignan, (–)-matairesinol, is produced in *Picea abies* in response to attack from *Fomes annosus* (reviewed by Gang et al. 1999).

The enzymatic steps involved in the biosynthesis of monolignols and monolignol-derived products are now well-established and many of the corresponding genes have been cloned. However, little information is available about the metabolic regulation controlling carbon flux at the coniferyl alcohol branchpoint for the biosynthesis of lignins versus lignans. Since both lignins and lignans are potentially involved in the defence response of plants one can ask the following question: how do plants allocate coniferyl alcohol to these two different metabolites? In order to gain an insight into monolignol partitioning during the defence response in flax cells, we have analysed the effects of fungal elicitation on monolignol and lignan biosynthetic genes expression (transcript accumulation), enzymatic activities and accumulation of three distinct classes of monolignol-derived compounds (Fig. 1b, c): SECO (8-8'-linked lignan), DCG (8-5'-linked phenylcoumaran lignan) and labile ether-linked lignin fraction (8-O-4'-linked). The fungal elicitors used were mycelium extracts of three species that were able to attack flax. Two of them were broad spectrum fungi: *Botrytis cinerea* and *Phoma exigua*, and the other was a specific flax pathogen: *F. oxysporum* F. ssp. *lini*.

Materials and methods

Plant material

The 2-1B cell suspension culture of *L. usitatissimum* L. cv Barbara was established from hypocotyl-derived calli in MS-derived medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 3% (w/v) sucrose, 8.88 μM benzylaminopurine and 2.68 μM α-naphthalene acetic acid. All suspension cultures were incubated on a gyratory shaker at 120 rpm in darkness at 25°C and subcultured every 14 days. Usually, 100 ml MS-derived medium in a 250 ml Erlenmeyer flask were inoculated with 5 g of cells. The growth of cell suspensions during a cycle was measured by the packed cell volume (PCV) method. Fresh weight (FW) was measured after filtration and dry weight (DW) after lyophilisation.

Elicitation of flax cell cultures

Fungal elicitors were prepared as described by Campbell and Ellis (1992) with slight modifications. One-week-old mycelia were rinsed and resuspended with sterile distilled water to a final concentration of 50 mg ml⁻¹ of fungal mycelium, blended in an Ultra Turrax at full speed for 5 min and then autoclaved for 10 min at 120°C. Total sugar content of the elicitor preparations was 2.70 ± 0.3 mg ml⁻¹ and no protein were found in the elicitor preparations. Following transfer to fresh medium, flax cell cultures were inoculated at day 10 by fungal elicitors at a rate of 3 % (v/v). At the same time, control cell suspensions were inoculated with sterile double distilled water and used as reference during this study. Incubation continued on a gyratory shaker at 120 rpm in darkness at 25 °C. Cells were collected for analyses at 1, 8, 24, 48 and 96 h after elicitation.

Cell viability

Viability and membrane integrity were determined by fluorescein diacetate (FDA) staining. Cell samples were incubated in a final concentration of 0.005 % (w/v) FDA for 2 min and examined under blue light epifluorescence. Cell viability was determined by the ratio of living (i.e. fluorescent) cells to total cells. A minimum of 1,000 cells were examined for each sample.

PAL assay

Soluble proteins were extracted from 1.5 g of fresh frozen tissue by homogenization in 3 ml of 0.1 M sodium borate buffer (SBB) pH 8.8 containing 10 mM β-mercaptoethanol and kept on ice for 30 min. After centrifugation (10 min, 16,000 g) at 4°C the supernatant was collected and used in the assay. Protein concentrations were measured by Bradford's method (1976). PAL specific activity was assayed spectrophotometrically by monitoring the production of *trans*-cinnamate at 290 nm as described by Dunn et al. (1998). The reaction mixtures contained 50 µg proteins and 50 mM L-phenylalanine in 5 ml of SBB (pH 8.8) and were incubated at 40°C.

CCR, CAD and SAD assays

Soluble proteins were extracted by grinding 1.5 g of fresh frozen tissue in a pre-chilled mortar containing a cold extraction buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 5% w:v ethylene glycol, 2% w:v polyvinyl pyrrolidone and 0.1 M β-mercaptoethanol). The crude extract was centrifuged (10 min, 16,000 g) at 4°C and the supernatant was used in the assays. Protein concentrations were measured by Bradford's method (1976). CCR specific activity was determined spectrophotometrically as

described by Goffner et al. (1994) using feruloyl-CoA as substrate. Feruloyl-CoA was synthesised according to Beuerle and Pichersky (2002). CAD and SAD specific activities were determined spectrophotometrically as described by Hawkins and Boudet (1994).

Partial cDNA isolation

Degenerated primers were designed from global and local alignments of orthologous genes encoding some key enzymes of the monolignol pathway (*PAL*, *CCR* and *CAD*) and also *PCBER*. Total RNA was purified from 150 mg of frozen tissues using RNeasy Plant Kit (Qiagen). Degenerated primers designed to bind highly conserved domains of plants *PAL*, *CCR*, *CAD* and *PCBER* were used to amplify partial cDNAs. PCR products were resolved and purified from a preparative agarose gel, subcloned in pGEM-T-Easy vector (Promega), sequenced (MWG-Biotech) and analysed for sequence homologies by local alignments (BLASTn: <http://www.ncbi.nih.gov> and ClustalW: <http://www.infobiogen.fr>). After verifications of the sequences, specific primers were designed in order to perform gene expression studies in response to elicitation.

Semi-quantitative reverse transcriptase-PCR

Total RNA was extracted from 150 mg of ground frozen tissues using the RNeasy Plant Kit (Qiagen) and the RNase free DNase set (Qiagen) in order to eliminate DNA contamination. First-strand cDNA were synthesised at 37°C for 60 min, with 4 units of Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). PCR were performed with specific primers designed from the partial cDNA sequences (Table 1). A 939 bp fragment of the *PLR* cDNA was amplified using PLR-F1 forward primer (5'-ATGGGCGGTGCAGAGTTCT-3') and PLR-R1 reverse primer (5'-TCAAAGGTAGATCATCAGA-3') designed from a flax *PLR* cDNA sequence (accession number AX191955). To normalise the amount of mRNA in each PCR reaction, a PCR product (632 bp) corresponding to the exon 2 of the *ACTIN* gene was amplified with ACT-F2 forward primer (5'-TCTGGAGATGGTGTGAGCCACAC-3') and ACT-R2 reverse primer (5'-GGAAGGTACTGAGGGAGGCCAAG-3') designed from the tobacco sequence. cDNA fragments were amplified during 20, 25 and 30 cycles.

Labile ether-linked lignin fraction

Flax cells were extracted three times with 80 % (v/v) ethanol. Extractive-free cells were recovered by filtration and freeze-dried. The monomer composition of the labile ether-lignin structure was determined by thioacidolysis which specifically disrupted the ether linkages (8-O-4' intermonomeric linkages). Briefly, 10 mg of

sample were submitted to a mixture of BF_3 /ethanethiol/dioxane for 4 h at 100°C (Lapierre et al. 1986). The thioethylated derivatives of monolignols were purified by dichloromethane extraction and analysed as trimethyl silyl derivatives using gas chromatography. The separation of the monomers was carried out on a fused silica capillary DB1 column (30-m, $0.25\ \mu\text{m}$) using helium as a carrier gas. The temperature gradient was $160\text{--}280^\circ\text{C}$ at $2^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$. Quantitative evaluation of the mono (guaiacyl), or dimethoxyl (syringyl) moieties was carried out using tetracosane as internal standard and a flame ionization detector. Identification was carried out by GC-separation and mass spectrometric detection.

Ester- and ether-linked phenolics

Ester- and ether-linked phenolic acids were analysed following alkali treatment using 4M NaOH at 170°C (Iiyama et al. 1990). Following a 2 h treatment, the medium was adjusted to pH 1 and hydroxycinnamic acids were recovered by diethyl ether extraction prior to HPLC using 3,4,5 trimethoxy-*trans*-cinnamic acid as internal standard. Ether fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure (800 mbar). The dried extract was dissolved in 1.5 ml of methanol:water (1/1) and filtered ($0.45\ \mu\text{m}$) prior to injection on a Spherisorb (Merck, S5 ODS2 C-18 $250\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) column. Elution gradient proceeded as previously described (Lamblin et al. 2001): A (acetonitrile, orthophosphoric acid 1‰ in Milli-Q water, 10:90) 100–92% for 6 min; then 92–0% A with solvent B (methanol; orthophosphoric acid 1‰ in Milli-Q water, 80:20) and C (acetonitrile; orthophosphoric acid 1‰ in Milli-Q water, 80:20) 0–50% for 29 min. UV detection was performed using water photodiode array detector. Phenolic monomers were quantified at 302 nm using commercial standards.

FT-IR spectroscopy

FT-IR spectra were recorded between $4,000$ and $400\ \text{cm}^{-1}$ at $4\ \text{cm}^{-1}$ resolution on a Nicolet

spectrophotometer using KBr discs containing 1% of the dry samples (lyophilised cells) and corrected for the KBr background. The window between 800 and $2000\ \text{cm}^{-1}$ which shows information of polysaccharides and lignin was selected to compare cell wall modifications between control and elicited samples. All spectra were baseline-corrected, then normalised at $1,650\ \text{cm}^{-1}$ prior to spectra comparison. Average spectra were obtained from the cell wall analysis of the three culture replicates.

Lignan content evaluation

The lignan content was evaluated by the assay of anhydrosecoisolariciresinol (ANHSEC) and the phenylcoumaran lignan DCG. Each sample was ground after lyophilisation and then extracted with methanol:water 70% (v/v) for 3 h at $60\ \text{C}$ under agitation. The extract was filtered and then separated into two fractions:

A fraction was diluted and directly injected into the HPLC system for the DCG quantification. The second fraction was subjected to acid hydrolysis (HCl, 2M) during 2 h at 100°C in order to release ANHSEC from SDG and secoisolariciresinol, as described by Charlet et al. (2002). A liquid–liquid extraction was performed on the hydrolysate by using hexane:ethyl acetate 1:1 (v/v). The organic phase was reduced to dryness under vacuum, and resuspended in MeOH for HPLC analysis. The HPLC quantifications were carried out on a KROMA-SIL C18 column ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, Macherey Nagel). The mobile phase was a mixture of water and MeCN 15:85 (v/v) for DCG, or 33:67 (v/v) for ANHSEC, supplemented with 0.1% phosphoric acid and 0.1% triethylamine. A flow rate of $1\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$ was used.

Statistical analysis

Data management and statistical analyses were performed with SPSS statistical software package (SPSS version 11.0.1 PC, Chicago, IL, USA). Means were expressed with their standard error (except data concerning the release phenolic derivatives and DCG in the

Table 1 Accession numbers, sizes and highest BLASTn results for the partial cDNA sequences used to design specific primers for semi-quantitative RT-PCR analysis

genes	Accession number GenBank	Size (bp)	BLASTn identities Species-access number	Specific primer sequences (5' → 3')
<i>LuPAL</i>	AY837828	872	83% <i>Populus tremuloides</i> -AF480619	<i>PAL-F</i> CATCAGATTTGAGATCTTGGAAAGC <i>PAL-R</i> GCCATGGCAATTCAGCTCCCTTGAA
<i>LuCCR</i>	AY837830	734	85% <i>Linum album</i> -AJ440712	<i>CCR-F</i> AGGCTACACTGTGACAGGAACCGT <i>CCR-R</i> CACTTGGTAGGGATAGGATACTCCGG
<i>LuCAD</i>	AY837831	853	96% <i>Populus tremuloides</i> -AF217957	<i>CAD-F</i> CTCAGAAACACGGGACAGAGAAGATCT <i>CAD-R</i> CATCTCCTCTGTTTCCTTCATGCTCCC
<i>LuPCBER</i>	AY837829	458	81% <i>Tsuga heterophylla</i> -AF242499	<i>PCBER-F</i> TATGTCTCCGCAAACCTGCTTTGC <i>PCBER-R</i> TTCAACAGTGGTGTATTTAACCTC

culture medium) and compared by ANOVA (GLM procedure). All statistical tests were considered significant at $P \leq 0.05$. *indicates a significant difference with the control.

Results

Characterisation of the elicitor-induced physiological response

Elicitors were added on day 10 of cultivation (end of the exponential growth phase), 2 days before the PCV reached a plateau. Elicitor addition was performed at this time because the stress induced by subculturing was distant and this period is characterised by a relatively high stability of PAL and CAD activities and high cell viability (data not shown).

At 24 h post-elicitation, growth stopped in treated suspensions and a drop (10–25 %) of cell viability was observed (Fig. 2a, b). At 96 h post-elicitation, cell viability of the control suspension remained stable (90%) but declined to 70% in cell suspensions treated with *B. cinerea* or *P. exigua* extracts and to 50% with *F. oxysporum* extract.

Elicited suspensions presented a strong browning that could result from the synthesis of phenolic compounds. This was confirmed by an increase of UV autofluorescence (Fig. 2c), as well as by a stronger staining of the elicited cells in presence of phloroglucinol-HCl (Weisner reagent), which indicated the presence of lignin and/or wall-bound or secreted phenolic derivatives (Fig. 2d).

Monolignol and lignan biosynthetic gene expression in elicited cell cultures

Analyses of different databases revealed no entries for *L. usitatissimum* monolignol biosynthetic gene sequences. In order to monitor the effect of elicitation on *PAL*, *CCR*, *CAD* and *PCBER* gene expression, we designed degenerated primers from global alignments of orthologous sequences for PCR cloning. The partial cDNAs sequences obtained were analysed for homologies studies by local alignments (BLASTn and ClustalW) and submitted to GenBank. The results are compiled in Table 1 showing accession numbers, sizes, BLASTn results of the partial cDNAs and specific primers designed for semi-quantitative RT-PCR analysis. The *LuPAL*,

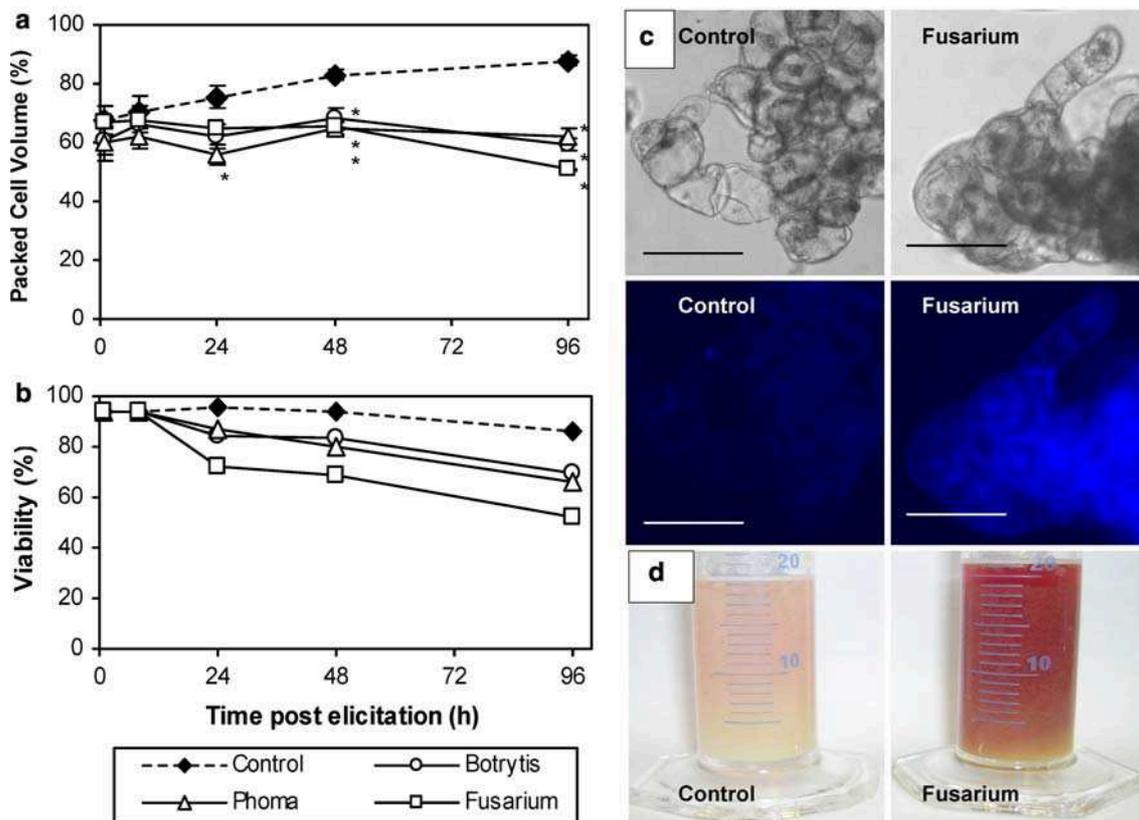


Fig. 2 a-d Elicitor-induced physiological response of flax cell suspensions. Cell cultures were treated with either 3% (v:v) of mycelium extract of *B. cinerea*, *P. exigua*, *F. oxysporum* or an equal volume of water (control). **a** Growth kinetics estimated by Packed Cell Volume measurements. Bars represent standard error (SE) of 3 independent experiments. **b** Kinetics of cell viability estimated by

counting at least 1,000 cells over several microscope fields. **c** Control and *F. oxysporum*-treated cells examined under light or epi-fluorescence microscopy (using a 365-nm excitation filter and a 445 to 450 nm longwave pass filter) 96 h after elicitation (scale bar, 50 μ m). **d** Phloroglucinol staining of control and *F. oxysporum*-treated cells harvested 96 h after elicitation

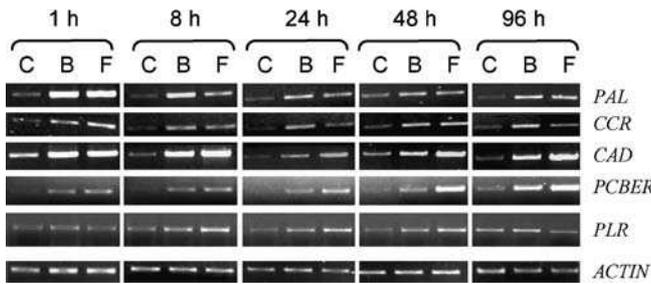


Fig. 3 RT-PCR analysis of monolignol and lignan biosynthetic gene expression in control and elicited cell suspension cultures. Total RNA isolated 1, 8, 24, 48, and 96 h post elicitation were subjected to RT-PCR semi quantitative analysis using *ACTIN* gene as internal control. Ten microliters of 25-cycle PCR products were loaded on 1% (w:v) agarose gel. C, control cell suspension, B and F, cell suspensions treated with mycelium extract of *B. cinerea*, or *F. oxysporum*

LuCCR and *LuCAD* partial cDNA sequences were compared with members of the corresponding multigene families in *Arabidopsis thaliana* (S1). Sequences of flax genes obtained through PCR with degenerated primers were highly homologous to *A. thaliana* sequences for PAL, CCR and CAD (respectively 93, 85 and 84% of amino-acid identity for the closer sequence). For PAL, the highest identity level was found for *A. thaliana* PAL involved in development but also in defence. Whereas for CCR and CAD, the flax sequences appeared more closely related to developmental genes (Class I for CAD) than to genes that have been shown to be involved in defence (Class II for CAD).

The accumulation of monolignol and lignan biosynthetic gene transcripts in response to elicitation with fungal extracts of *B. cinerea* (one of the two broad spectrum fungi) or *F. oxysporum* (flax specific pathogen) was monitored by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 3). A rapid induction (1 h) of *PAL*, *CCR*, *CAD* and *PCBER* gene expression was observed in both elicited cell cultures, that persisted up to 96 h post-elicitation. This phenomenon was more marked for *CAD*. The *PLR* gene expression was only weakly activated in elicited cells from 8 to 48 h post-elicitation. *F. oxysporum*-treated cells showed higher levels of expression of *CAD* and *PCBER* genes in comparison with *B. cinerea*-treated cells.

Effects of elicitation on enzymatic activities

Phenylalanine aminolyse, CCR and CAD specific activities were monitored in control and elicited cell suspensions during a 96 h period after elicitation (Fig. 4). A rapid and strong (up to fourfold) increase of PAL activity (Fig. 4a) was observed in all treated cell cultures at 8 h post-elicitation, reaching a maximum at 24 h. Among the different fungal extracts, the highest PAL activity was measured in *F. oxysporum*-treated cells (up to a fivefold increase at 96 h).

CCR activity of control cells slowly increased from 1 h ($0.057 \text{ nkat mg}^{-1}\text{protein}$) to 96 h ($0.083 \text{ nkat mg}^{-1}\text{protein}$) up to values significantly higher than that of elicited cells; this contrary to *F. oxysporum*-treated cells which showed increased value only transiently at 24 h (Fig. 4b).

In contrast, CAD activity (as monitored by the formation of coniferyl alcohol, common precursor for guaiacyl lignin and lignan biosynthesis) rapidly decreased in elicited cell cultures at 1 h post-elicitation and remained low at 8 h post-elicitation, reaching values two to eightfold lower than that of the control, the effect being even more pronounced for *F. oxysporum*-treated cells (Fig. 4c). A kinetic study of CAD activity of control and *F. oxysporum*-treated cells between 0 and 1 h after elicitation revealed that inhibition of CAD activity started 30 min after addition of the elicitor extract (Fig. 4e). Enzyme activity then increased in elicited cells from 8 to 96 h to reach values comparable (*B. cinerea*- and *P. exigua*-treated) or significantly higher (*F. oxysporum*-treated) than that of the control. Indeed, CAD activity of *F. oxysporum*-treated cells showed a ninefold increase between 8 and 96 h post elicitation.

A substrate-specific activation of CAD enzyme activity (significant at 8 h) was observed with *F. oxysporum*-treated cells when enzyme activity was monitored by sinapyl alcohol formation thus meaning that it functions also as a SAD (sinapyl alcohol dehydrogenase; Fig. 4d).

Interestingly, the CCR and CAD activities displayed opposite patterns of variation with time in *F. oxysporum*-treated cells. CAD activity, whose substrate is the CCR product, increased continuously up to 96 h where it reached value over the standard. This is contrary to CCR which was significantly lower than standard at the end of the culture.

Cell wall-bound phenolic monomers and labile ether-linked lignin fraction of elicited cell cultures

In order to gain information about the fate of monolignol-derived compounds in control and elicited cell cultures we analysed 1) the main phenolic monomers associated with the cell wall or secreted in the culture medium, 2) cell wall 8-O-4'-linked lignin structures and 3) intracellular and secreted 8-8'- and 8-5'-linked lignans.

The main ester- and ether-bound phenolic compounds released by alkali treatment of the cell walls of control cell suspensions were respectively *p*-coumaric acid and ferulic acid (Fig. 5a). Cell suspensions elicited with *B. cinerea*, *P. exigua* and *F. oxysporum* extracts showed an approximately twofold increase in these phenolic derivatives, except for the vanillin levels which increased by eightfold in *F. oxysporum*-treated cells. Cell cultures treated with *F. oxysporum* extracts, and to a lesser extent with *B. cinerea* extracts, also accumulated syringaldehyde and vanillic acid that were absent in control or *P. exigua*-treated cells. The main phenolic

compounds secreted into the culture medium of control and elicited cell suspensions (Fig. 5b) were the same as those associated with the cell wall. The total quantities of secreted phenolics were similar in control (1.2 mg ml^{-1}), *B. cinerea*-elicited (1.1 mg ml^{-1}) and *P. exigua*-elicited cells (1.4 mg ml^{-1}). In contrast the total quantity of phenolics was strongly decreased in the culture medium in *F. oxysporum*-elicited cells (0.35 mg ml^{-1}). However, using this method (strongly basic condition and elevated temperature) one can not exclude that a part of the compounds detected and quantified can originate from lignin monomers (H, G and S) released as their aldehyde forms (4-hydroxy-

benzaldehyde, vanillin and syringaldehyde respectively) in proportion that vary with lignin composition (Akin et al. 1995). Indeed a strong correlation between guaiacyl units and vanillin contents in control and elicited cell cultures was observed, confirming the hypothesis of a possible release of lignin monomers after alkali treatment of the cell walls. In the same way *F. oxysporum*-treated cells displayed non negligible amounts of syringaldehyde and syringyl units in comparison with control cells.

The chemical composition of the labile ether-linked lignin fraction of control and elicited cell suspensions is reported in Fig. 6a and S2. Guaiacyl units constituted

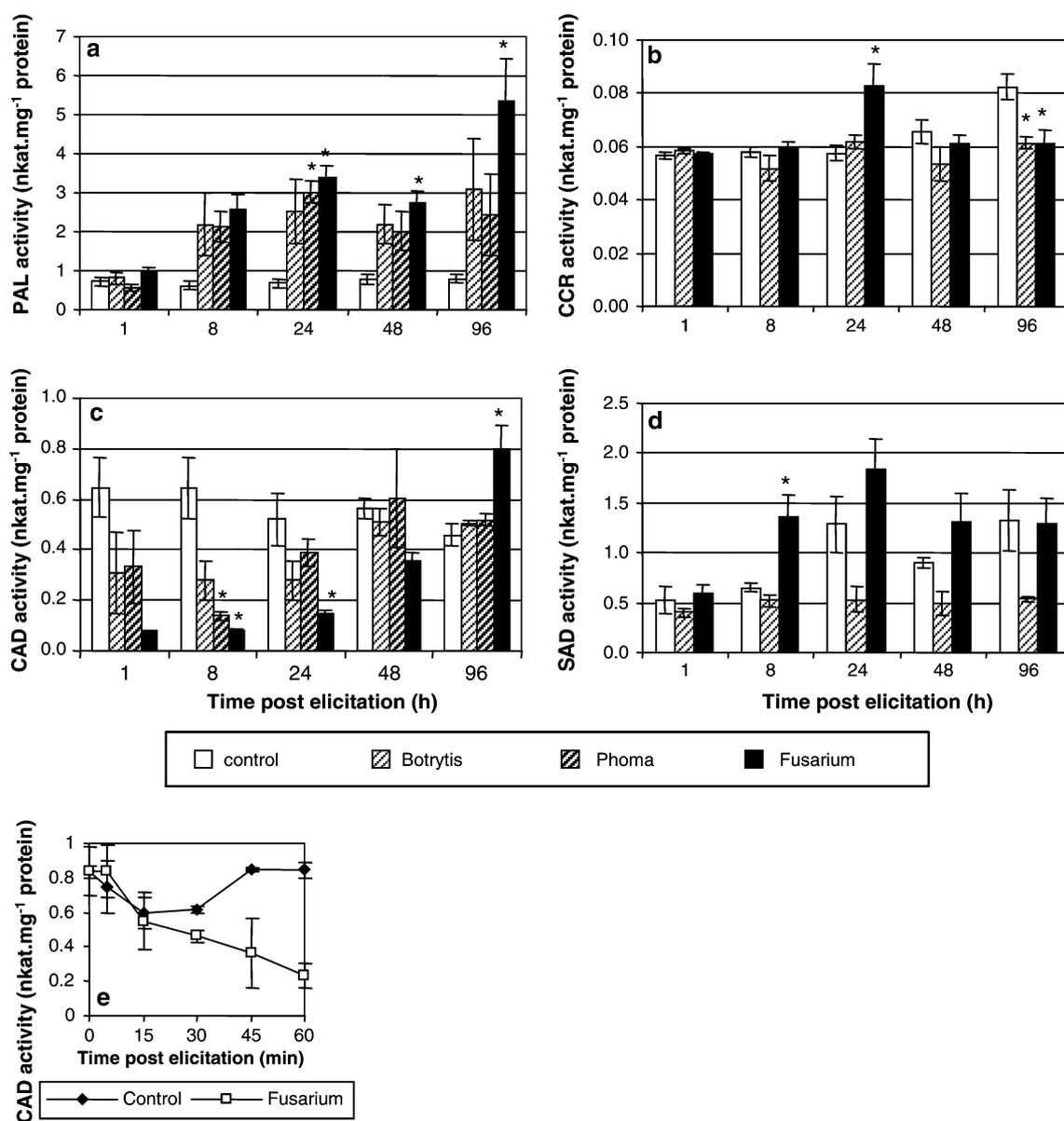


Fig. 4 a–e Time course of specific PAL (a), CCR (b), CAD (c) and SAD (d) activities of the soluble protein fraction of control and elicited cell suspension cultures. Cell cultures were treated with either 3% (v:v) of mycelium extract of *B. cinerea*, *P. exigua*, *F.*

oxysporum or an equal volume of water (control). Bars represent SE of 3 independent experiments. **e.** Kinetic study of CAD activity of control and *F. oxysporum*-treated cells between 0 and 1 h post elicitation

the predominant labile ether-linked lignin fraction of control and elicited cell cultures. However, the guaiacyl content was increased after elicitation with *B. cinerea* (3.9-fold), *P. exigua* (3.6-fold) and *F. oxysporum* (18.5-fold) extracts. The syringyl units were also significantly increased in *F. oxysporum*-treated cells (36-fold) which were characterised by a twofold increase of the S/G ratio in comparison with the control (0.049 vs 0.025, respectively, S2).

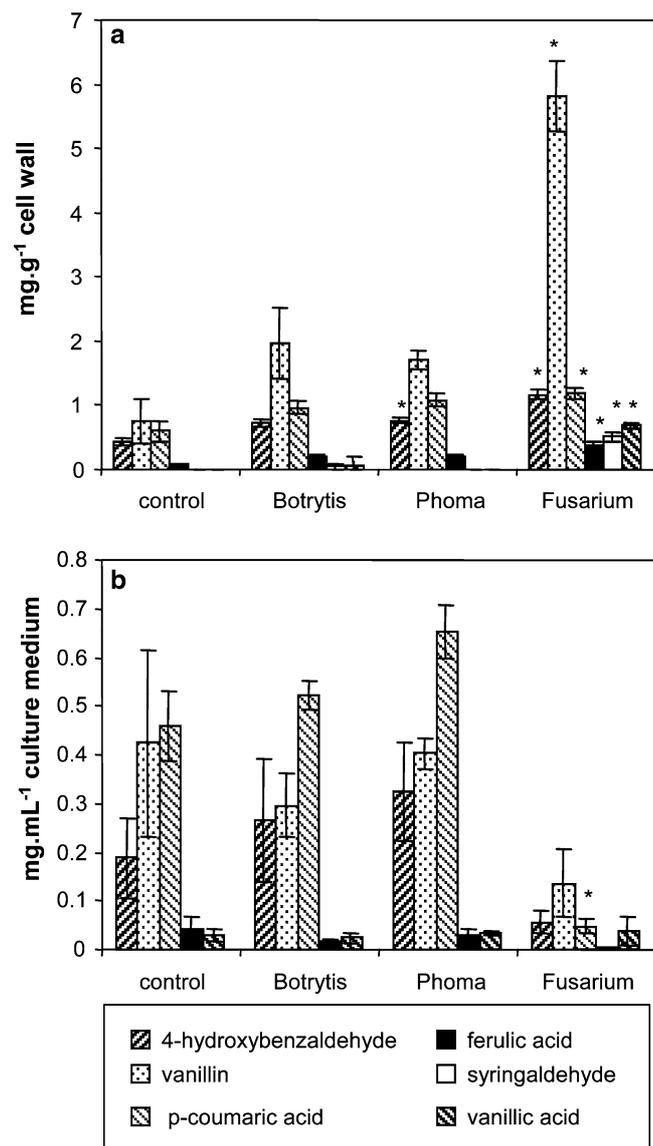


Fig. 5 a, b Phenolic compounds of control and elicited cell suspension cultures. Cell cultures were harvested 96 h after treatment with fungal extracts of *B. cinerea*, *P. exigua* or *F. oxysporum*. **a** Ester- and ether-bound phenolic monomers released from the cell walls after alkali treatment (Bars represent SE of three independent experiments). **b** Phenolic compounds secreted in the culture medium (mean and spread of the values scored over two independent experiments)

Effects of elicitation on lignan and phenylcoumaran lignan accumulation

Pinoresinol and lariciresinol, that are the two direct precursors of SECO were not detected or only present in trace amounts (data not shown). Flax cell cultures accumulated SECO (aglycone and SDG, presumably the final accumulated forms of lignans in flax cell suspensions) and DCG. No matairesinol could be detected either in control or elicited cells.

As shown in Fig. 6b, 96 h after elicitation the intracellular level of ANHSEC (corresponding to the total pool of aglycone SECO and SDG) remained unchanged in cells treated with *B. cinerea* and *P. exigua* extracts (0.37 and 0.41 mg g⁻¹ DW, respectively) in comparison with the control cell suspension (0.36 mg g⁻¹ DW). However, the ANHSEC lignan level strongly decreased (eightfold) in *F. oxysporum*-treated cells (0.046 mg g⁻¹ DW). No secreted lignan could be detected in the culture medium of control and elicited cells. The intracellular DCG phenylcoumaran lignan content (Fig. 6c) showed a slight increase in cell cultures elicited with *B. cinerea* (19.9 mg g⁻¹ DW) and *P. exigua* (24.3 mg g⁻¹ DW) extracts but was significantly decreased after elicitation with *F. oxysporum* extract (1.75 mg g⁻¹ DW) as compared to the control (15.1 mg g⁻¹ DW). In addition, the secretion of DCG was strongly decreased (six to tenfold) in elicited cell cultures in comparison with the control.

FTIR spectroscopic characterisation of control and elicited cells

In order to extend the characterisation of elicitor-induced cell wall modifications, we analysed the cell suspension cultures by FTIR spectroscopy. Overall, the fingerprint profile of FTIR spectra from the walls of *P. exigua*- and *B. cinerea*-elicited flax cells showed little variation from that of control samples (Fig. 7a). The predominant band at 1,650 cm⁻¹ can be assigned to the carbonyl groups of amide II (proteins) and/or conjugated aldehyde or ketone. However, the accompanying amide N-H stretch at 1,540 cm⁻¹ suggests that the broad absorbance at 1,650 cm⁻¹ is mostly due to proteins (Stewart et al. 1997). The bands in the 1,200–1,000 cm⁻¹ wavelength regions are characteristic of polysaccharides and show the same pattern in control and *P. exigua*- or *B. cinerea*-elicited samples. However, based on the lower absorbance displayed in this region, the relative proportion of polysaccharides appears to decrease as compared to protein in elicited samples. Additionally, the intensity of the signal associated with carboxylic esters (1,750 cm⁻¹) is decreased, suggesting a lower contribution of the methylesterified pectin in elicited samples.

The spectra of *F. oxysporum*-elicited samples showed the same variations as those observed with the other elicited cultures, although some of them were more pronounced. For example, the relative increase of

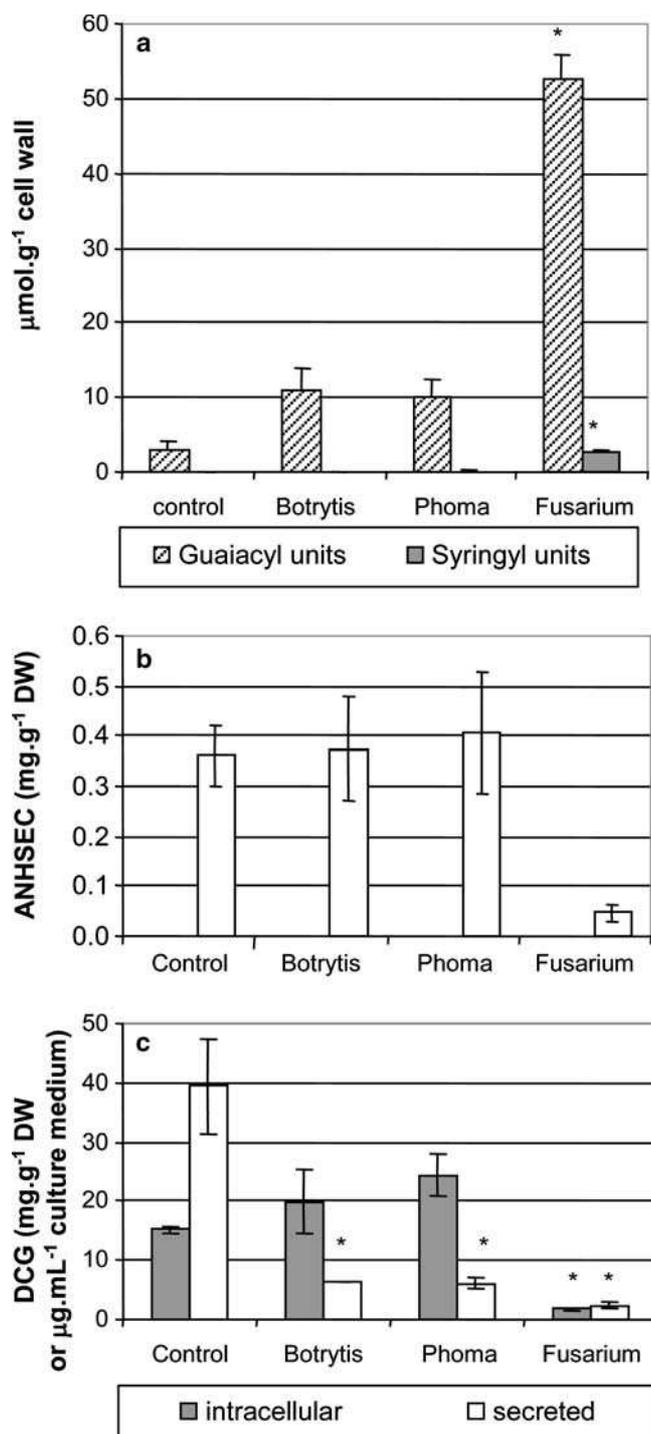


Fig. 6 a-c Monolignol-derived products accumulated in control and elicited cell suspension cultures 96 h after treatment with fungal extracts of *B. cinerea*, *P. exigua* or *F. oxysporum*. **a** Chemical composition of the labile ether-linked lignin fraction obtained by thioacidolysis (mean and SE of 3 independent experiments). **b** Lignan (anhydro-secoisolaricresinol, ANHSEC), and **c** phenylcoumaran lignan (DCG) contents (intracellular: mean and SE of three independent experiments, secreted: mean and spread of the values scored over two independent experiments)

proteins was clearly suggested by the peak at $1,540\text{ cm}^{-1}$. However, the greatest variation observed in

F. oxysporum-elicited samples concerns signals associated with aromatic skeleton vibrations ($1,600\text{ cm}^{-1}$ and $1,508\text{ cm}^{-1}$) which were more intensive in *F. oxysporum*-elicited samples as compared to control samples. Notably, the absorbance at $1,508\text{ cm}^{-1}$ can be detected as a true peak instead of an indistinct shoulder in other elicited or control samples. These observations suggest that greater amounts of lignin are integrated with the cell walls of *F. oxysporum*-elicited samples. Other signals also displayed enhanced absorbance in *F. oxysporum*-elicited cultures. The increased shoulder at $1,470\text{ cm}^{-1}$ corresponding to C–H deformations of alkyl (–CH₃, –CH₂–) groups could be associated with lignin side chains or polyester such as suberin (Zeier and Schreiber 1999). However, the reduced intensity of the ester band at $1,750\text{ cm}^{-1}$ in elicited samples does not support the idea of an increased polyester content. Several other bands indicative of guaiacyl-rich lignin ($1,422\text{ cm}^{-1}$, aromatic skeletal vibration ; $1,270\text{ cm}^{-1}$ and $1,215\text{ cm}^{-1}$, C–O of guaiacyl ring; Faix 1991) could also be identified in difference spectra between *F. oxysporum*-elicited and control cell cultures (Fig. 7b).

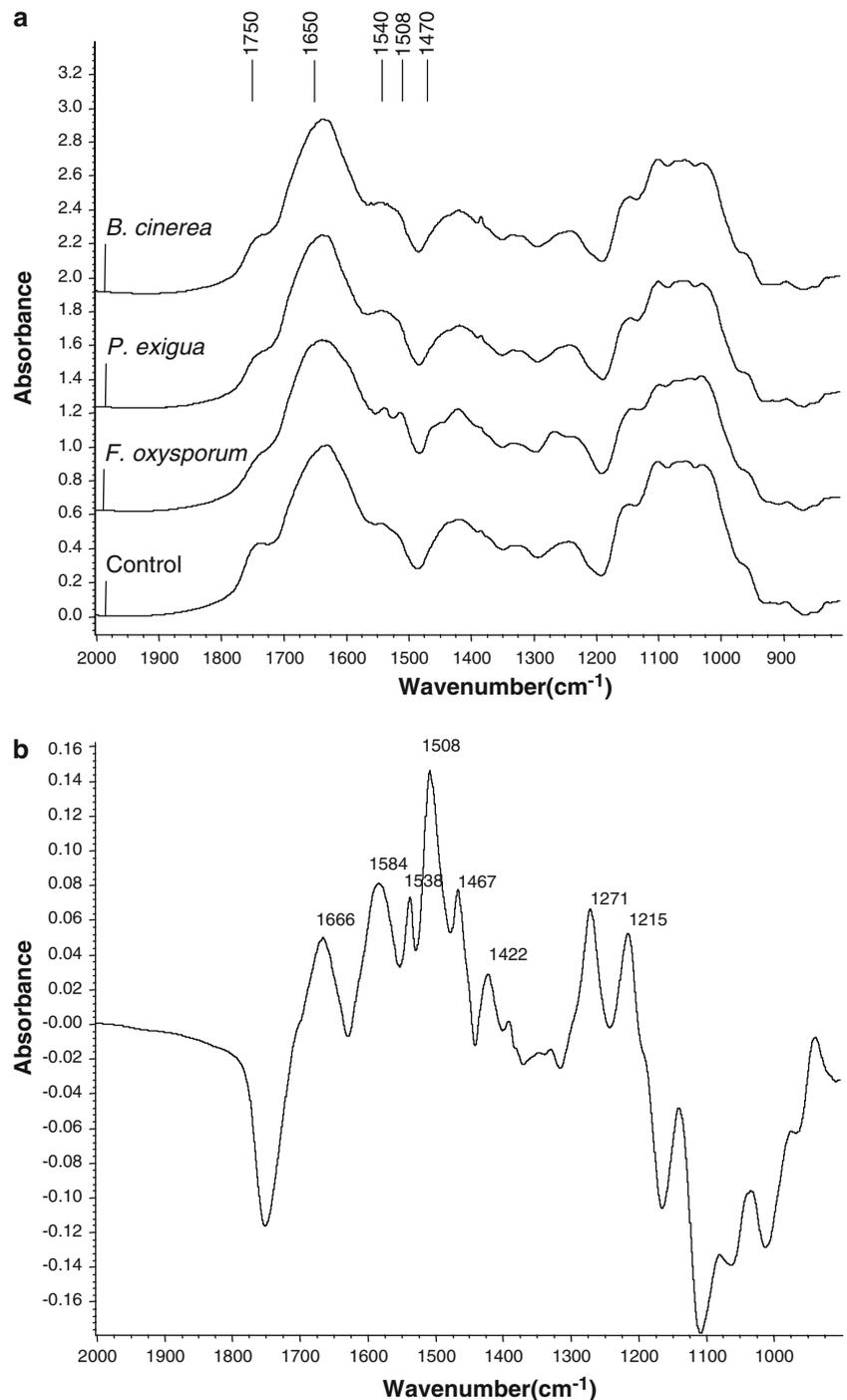
Discussion

Elicitor-induced transcriptional and enzymatic changes in the monolignol pathway

An induction of the general phenylpropanoid pathway was observed in flax cell suspension cultures treated with various fungal extracts used as elicitors. The rapid induction of *PAL* gene expression in elicited cell cultures was closely correlated with the increase in *PAL* specific activity. The *PAL* enzyme which catalyses the entry of L-phenylalanine into the phenylpropanoid pathway has reputedly a crucial role in plant defence mechanisms and is presumably responsible for the increased carbon flux into this pathway necessary for the synthesis of defence/stress-related compounds (Dixon and Paiva 1995). Activation of genes during the early steps of the phenylpropanoid pathway in response to biotic or abiotic stresses has already been reported in other plant systems. Indeed, a rapid and strong induction of *PAL* transcripts was also observed in *Medicago truncatula* cell suspension cultures elicited with yeast extract (Suzuki et al. 2004).

The transcriptional regulation of *PAL* gene expression is quite complex since *PAL* is typically encoded by a small multigene family. For the *LuPAL* partial cDNA isolated, the highest identity level was found for *A. thaliana PAL1* and *PAL2* (S1), two stress-responsive *PAL* family members containing promoter regulatory elements conferring responsiveness to elicitation or pathogen infection (Raes et al. 2003). Transcriptional regulation of the *PAL* gene can be mediated by *MYB* transcription factors involved in the regulation of the phenylpropanoid pathway during development (Borevitz et al. 2000) or following infection or elicitation (Sugimoto et al. 2000).

Fig. 7 a, b FTIR spectra of control and elicited cells harvested 96 h after treatment (a) and difference spectrum between *F. oxysporum*-treated sample and control (b)



In the monolignol-specific pathway, *LuCCR* and *LuCAD* sequences appeared more closely related to *A. thaliana* genes involved in a developmental lignin biosynthesis than with defence lignin biosynthesis genes (S1). Nevertheless, elicitation of flax cell cultures by *B. cinerea* and *F. oxysporum* extracts lead to an activation of the flax *CCR* and *CAD* gene expression. Down regulation of the *CCR* gene leading to reduced lignin accumulation in tobacco (Piquemal et al. 1998) or *A. thaliana* (Goujon et al. 2003) indicates that the *CCR*

enzyme catalyses a rate limiting step controlling the overall carbon flux into the monolignol pathway. In *A. thaliana* 2 *CCR* genes (*AtCCR1*, *AtCCR2*) have been isolated. These two genes are differentially expressed and *AtCCR1* is associated with developmental lignification whereas *AtCCR2* is associated with defence since it is transiently but strongly induced in response to infection by *Xanthomonas sylvestris* (Lauvergeat et al. 2001). In the absence of knowledge concerning the number of *CCR* genes in flax, it is difficult to know whether

differential activation of developmental/defence lignin pathway occurs. The moderate induction of *CCR* gene expression in elicited-flax cells was not associated with an increased *CCR* activity (*in vitro* assay) except in *F. oxysporum*-treated cells at 24 h post elicitation.

Arabidopsis thaliana *CAD* genes have been classified into three groups (Raes et al. 2003). Class I genes, showing the highest identity with our *LuCAD* (S1), are associated with developmental lignin and use coniferyl alcohol as preferential substrate. Class II (induced by elicitor treatment, and highly to poplar sinapyl alcohol dehydrogenase gene) and class III *CAD* genes use also other substrate such as sinapyl alcohol (Kiedrowski et al. 1992; Somssich et al. 1996; Brill et al. 1999; Raes et al. 2003).

The most surprising result is that the strong induction of the *CAD* gene expression observed in elicited flax cell cultures was not associated with an increase in *CAD* activity (as measured by its capacity to convert coniferyl alcohol into coniferaldehyde) during the first hours after elicitation. This observed transient decrease in *CAD* activity appears contradictory with the increased lignin content in *F. oxysporum*-treated cells. One hypothesis is a direct incorporation of aldehydes into lignin as observed in plants where *CAD* gene expression is reduced by antisense transgenesis (Baucher et al. 1996), these plants exhibiting red cell walls around their vessels.

A similar decline of *CAD* activity was observed in tobacco cell suspensions elicited with cell wall degrading enzymes (Negrel and Javelle 1995). However an increase in *CAD* activity was observed in elicited-flax cell cultures (with *F. oxysporum*) when using sinapyl alcohol as substrate.

The increase in *CAD* gene expression observed in elicited-flax cell cultures might be associated with a *CAD* enzyme showing higher affinities for substrates other than coniferyl alcohol. Similarly, Mitchell et al. (1994, 1999) reported on the induction of a sinapyl alcohol-specific *CAD* activity (*SAD* activity) in wheat leaves inoculated with spores of *B. cinerea* associated with the deposition of a syringyl-rich defence lignin.

The induction of *CAD* gene expression associated with a transient decrease in *CAD* activity could be due to differential transcriptional regulation within a multi-gene family, or posttranslational regulation events that are known to occur in the phenylpropanoid pathway. Indeed, Allwood et al. (1999) demonstrated the implication of a protein kinase in the posttranslational regulatory mechanism of the *PAL* enzyme.

Effect of elicitation on monolignol-derived product accumulation

The increase in *CCR* and *CAD* gene expression following elicitation with *B. cinerea* or *F. oxysporum* suggests an increased carbon flux into the monolignol pathway. Monolignols can be used by the plant to form three classes of compounds: lignins, lignans and

phenylcoumaran lignans. However, little is known about the regulation of coniferyl alcohol partitioning into the different compounds during development and defence responses.

Labile ether-linked lignin fraction

Since it is generally difficult to quantify lignin in weakly-lignified cells we decided to investigate any potential modifications in lignin structure by thioacidolysis that allows specific investigation of monomers involved in noncondensed (labile ether-linked) bonds. Our results showed an increased incorporation of 8-O-4'-linked lignin structure in the cell walls of elicited cells. This phenomenon was particularly marked after elicitation with *F. oxysporum* extracts. The labile ether lignin fraction of both control and elicited flax cells was mainly constituted of G units, as already observed in flax callus cultures (Lamblin et al. 2001). However, *F. oxysporum*-treated cells displayed a dramatic 36-fold increase in S unit content as compared to the control cells. Contrary to *B. cinerea*- and *P. exigua*-treated cells, which contained very low levels of S units, the S content of *F. oxysporum*-treated cells was not neglectable (S unit content was 36 times that of standard cells and S/G ratio was twice that of standard cells, reaching 0.049). In this latter case, cells reacted to elicitation by increasing content and also modifying composition of lignin.

This increase in S units might be associated with an elicitor-inducible *CAD* enzyme having high substrate affinity for sinapaldehyde, or with increased 5-ferulate hydroxylase (F5H)/caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) activities. Such an increase in the labile ether-linked syringyl reflects that monolignol pathway is a relevant actor in the response to elicitation, ending by change in lignin content and/or quality. Moreover, FTIR spectra analysis suggested an increase of the overall lignin content of *F. oxysporum*-treated cells which reflects an increased monolignol allocation to lignin biosynthesis.

Induced lignification is one of the several plant responses to wounding (Hawkins and Boudet 2003), microbial attack or elicitation (Campbell and Ellis 1992; Lange et al. 1995). Defence lignin is known to create a physical barrier thereby limiting pathogen invasion in the plant tissues, this polymer being highly resistant to enzymatic degradation by micro-organisms. In some species, its composition seems to differ from that of constitutive lignin. For example, the elicitation of *P. abies* cell suspensions by the spruce needle pathogen *Rhizosphaera kalkhoffii* results in the release into the culture medium of a lignin-like polymer rich in non-methoxylated H units as compared to developmental lignin (Lange et al. 1995). Similarly, wounded *Eucalyptus gunnii* seedlings form a lignified barrier zone rich in G units as opposed to the more usual mixed G-S *Eucalyptus* developmental lignin (Hawkins and Boudet 2003). The strong increase in labile ether syringyl units in

F. oxysporum-treated flax cells suggests that elicitation may act distinctively on the lignification pathway according to plant species but also to the kind of pathogen.

The increase in cell wall-bound phenolics correlated with the deposition of lignin in *F. oxysporum*-treated flax cell suspensions, as already observed in *Musa acuminata* roots elicited with *F. oxysporum* extracts (De Ascensao and Dubery 2003). Similarly, pine cell cultures elicited with a fungal extract accumulated a significantly higher amount of lignin and cell wall-bound ferulic acid (Campbell and Ellis 1992).

Lignan (SECO) and phenylcoumaran lignan (DCG)

Elicitation with *B. cinerea* or *P. exigua* mycelium extracts had no effect on the total SECO pool and DCG intracellular levels but reduced the amount of secreted DCG. Such results are not surprising since RT-PCR experiments did not clearly reveal the inducibility of the *PLR* gene expression in elicited cells. In contrast, *F. oxysporum*-treated cells showed a dramatic decrease in DCG (both intracellular and secreted) and intracellular SECO lignan levels. The decrease of DCG in *F. oxysporum*-treated cells could be related to the *PCBER* increase of expression, as this enzyme catalyses reduction of the aglycone form of DCG (Gang et al. 1999).

Except for the cytotoxic lignan podophyllotoxin, there is little data in the literature on elicitation of the lignan biosynthesis. The accumulation of 5-methoxy-podophyllotoxin ceased after elicitation of a *Linum flavum* cell suspension culture with nigeran, a polyglucan from *Aspergillus japonicus*, (Van Uden et al. 1990). On the other hand, a twofold increased synthesis of podophyllotoxin and peltatins was observed in callus cultures of *Linum austriacum* treated with mannan, a yeast glycopeptide (Vardapetyan et al. 2003). An elevated podophyllotoxin production has also been reported after elicitation of callus cultures of *Juniperus chinensis* by chito-oligosaccharides which mimic fungal cell wall constituents (15-fold increase) or laminaran enzyme hydrolysates (3.5-fold increase) (Muranaka et al. 1998). Attempts to increase lignan content by using methyl jasmonate in *Forsythia x intermedia* cell cultures resulted in three- and sevenfold increase in pinoresinol and matairesinol contents respectively (Schmidt and Petersen 2002). But only one out of ten *Linum album* cell suspensions increased its podophyllotoxin content (by about tenfold) in response to this signal transducer (Fuss 2003).

A number of hypotheses can be advanced to explain the strong decrease in lignan and phenylcoumaran lignan content observed in *F. oxysporum*-treated flax cells:

(1) A large part of the coniferyl alcohol normally used for DCG and SECO production might have been allocated to increased lignin synthesis to reinforce the cell wall.

- (2) *De novo* synthesised 8-8'-linked lignan (pinoresinol, precursor of secoisolariciresinol) or 8-5'-linked phenylcoumaran lignan (dehydrodiconiferyl alcohol) might have been incorporated in the lignin polymer to contribute to cell wall reinforcement in elicited cell cultures. Indeed, Morreel et al. (2004) have recently identified these two compounds in the methanol-soluble fraction of poplar xylem, a heavily-lignified tissue. Additionally, Tokunaga et al. (2005) showed that four dilignols, including pinoresinol and dehydrodiconiferyl alcohol, were utilised as lignin precursors during *in vitro* differentiation of *Zinnia* tracheary elements. A *F. oxysporum*-elicitor induced peroxidase activity leading to crosslinking of low molecular weight molecules like lignans should also be considered.
- (3) Secoisolariciresinol and dehydrodiconiferyl alcohol might have been infused as structural components of the cell wall. Indeed, lignans and phenylcoumaran 8-5'-linked lignans have been found as protective post-lignification infusions in the heartwood of some tree species such as red cedar or loblolly pine (Lewis et al. 1998; Gang et al. 1999).
- (4) The strong induction of the *PCBER* gene expression suggests that DCG might have been metabolised (after deglycosylation) into isodihydro-dehydrodiconiferyl alcohol by this enzyme which catalyses the non-enantio-specific NADPH-dependent reduction of the benzylic ether functionality (Gang et al. 1999). *PCBER* has been identified as the most abundant protein in lignifying cells of poplar secondary xylem that also contain low amounts of free dehydrodiconiferyl alcohol (Vander Mijnsbrugge et al. 2000).

Conclusion

Although it has been suggested that some lignans might function as phytoalexins in plant disease, little is known about the role of these compounds *in planta*. Considering the antimicrobial activities of specific lignans described in the literature, their primary role in plant defence would rather be as part of the constitutive arsenal of compounds used to ensure plant survival over extended periods (Lewis et al. 1998). In this study we did not observe any increased lignan accumulation in elicited flax cell cultures. Supposing that flax lignans and phenylcoumaran lignans play a role in the plant defence against fungi, they would most likely belong to the preformed phytoanticipins rather than to the category of inducible phytoalexins. They could also act as structural components infused in the cell wall as observed in woody species, contributing to reinforce the physical barrier against pathogen invasion.

All three fungal elicitors tested triggered an activation of the monolignol pathway in flax cells. Nevertheless, flax cell cultures showed a specific response to elicitation with *F. oxysporum* extracts. Indeed, the Barbara cultivar

is known to be highly susceptible to *F. oxysporum* infection. At the monolignol level, the strong increase in lignin content was associated with a decrease in SECO lignan, and DCG phenylcoumaran lignan accumulation. Flax defence against *F. oxysporum* invasion involves an early oxidative burst (H_2O_2 synthesis) as demonstrated by Olivain et al. (2003), but preventing the spreading of this pathogen throughout the entire vascular system could also require the building of physical barriers using lignin as structural component. The strong increase in labile ether-linked lignin structures in the cell wall could be a specific reaction of flax to *F. oxysporum*, one of its most aggressive and invasive pathogen which is known to progress through the roots inside the entire plant, contrary to *B. cinerea* and *P. exigua*. These two fungi are occasional flax pathogens responsible for basal stem blight (*P. exigua*) and grey mould occurring on the surface of mature capsules (*B. cinerea*).

Acknowledgments C. Hano and M. Addi contributed equally to this work. We thank J.-P. Trouvé (coopérative linière Terre de Lin, Fontaine le Dun, France) for gifts of flax seeds cv Barbara, *P. exigua* and *F. oxysporum* mycelia, and B. Dehorter (Université des Sciences et Technologies de Lille, France) for giving us *B. cinerea* mycelium. We thank E. Duverger (Université d'Orléans, France) for epi-fluorescence microscopy. We also wish to thank L. Gutierrez (Université de Picardie Jules Verne, France) for technical advice on RT-PCR experiments. This work was financially supported, in part, by a grant from the "Région Centre" (France) and by the "Conseil Général d'Eure et Loir" (France).

References

- Allwood EG, Davies DR, Gerrish C, Ellis BE, Bolwell GP (1999) Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett* 457:47–52
- Akin DE, Rigsby LL, Gamble GR, Morisson WH III, Kimball BA, Pinter PJ Jr, Wall GW, Garcia RL, LaMorte RL (1995) Biodegradation of plant cell walls, wall carbohydrates, and wall aromatics in wheat grown in ambient or enriched CO₂ concentrations. *J Sci Food Agric* 67:399–406
- Attoubre J, Hano C, Mesnard F, Lamblin F, Bensaddek L, Raynaud- Le Grandic S, Laine E, Baltora-Rosset S, Fliniaux MA (2005) Identification by NMR and accumulation of a neolignan, the dehydrodiconiferyl alcohol-4- β -D-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures. *Comptes Rendus Chimie*
- Baucher M, Chabbert B, Pilate G, Van Doorselaere J, Tollier MT, Petit-Conil M, Cornu D, Monties B, Van Montagu M, Inze D, Jouanin L, Boerjan W (1996) Red xylem and higher lignin extraction by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol* 112:1479–1490
- Beuerle T, Pichersky E (2002) Enzymatic synthesis and purification of aromatic Coenzyme A esters. *Anal Biochem* 302:305–312
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54:519–546
- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12:2383–2393
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brill EM, Abrahams S, Hayes CM, Jenkins CLD, Watson JM (1999) Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol* 41:279–291
- Campbell MM, Ellis BE (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. *Phytochemistry* 31:737–742
- Charlet S, Bensaddek L, Raynaud S, Gillet F, Mesnard F, Fliniaux MA (2002) An HPLC procedure for the quantification of anhydrosecoisolariciresinol. Application to the evaluation of flax lignan content. *Plant Physiol Biochem* 40:225–229
- Davin LB, Wang HB, Crowell AL, Bedgar LD, Martin DM, Sarkanen S, Lewis NG (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* 275:362–366
- De Ascensao AR, Dubery IA (2003) Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Phytochemistry* 63:679–686
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defense—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3:371–390
- Dunn DC, Duncan LW, Romeo JT (1998) Changes in arginine, PAL activity, and nematode behavior in salinity-stressed citrus. *Phytochemistry* 49:413–417
- Faix O (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* 45:21–27
- Ford JD, Huang KS, Wang HB, Davin LB, Lewis NG (2001) Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglucoside-hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. *J Nat Prod* 64:1388–1397
- Fuss E (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochem Rev* 2:307–320
- Gang DR, Kasahara H, Xia ZQ, Vander Mijnsbrugge K, Bauw G, Boerjan W, Van Montagu M, Davin LB, Lewis NG (1999) Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *J Biol Chem* 274:7516–7527
- Goffiner D, Campbell MM, Campargue C, Clastre M, Borderies G, Boudet A, Boudet AM (1994) Purification and characterization of cinnamoyl-coenzyme A:NADP oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiol* 106:625–632
- Goujon T, Ferret V, Mila I, Pollet B, Ruel K, Burlat V, Joseleau J-P, Barrière Y, Lapiere C, Jouanin L (2003) Down regulation of the *AtCCR1* gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* 217:218–228
- Hawkins SW, Boudet AM (1994) Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* Hook. *Plant Physiol* 104:75–84
- Hawkins SW, Boudet AM (2003) Defense lignin and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*. *Forest Pathol* 33:91–104
- Iiyama L, Lam TBT, Stone BA (1990) Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat straw internodes. *Phytochemistry* 29:733–737
- Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock K, Somssich IE, Dangel JL (1992) Rapid activation of a novel plant defence gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus. *EMBO J* 11:4677–4684
- Lamblin F, Saladin G, Dehorter B, Cronier D, Grenier E, Lacoux J, Bruyant P, Laine E, Chabbert B, Girault F, Monties B, Morvan C, David H, David A (2001) Overexpression of a heterologous *sam* gene encoding S-adenosylmethionine synthetase in flax (*Linum usitatissimum*) cells: Consequences on methylation of lignin precursors and pectins. *Physiol Plant* 112:223–232

- Lange BM, Lapierre C, Sandermann H Jr (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin (structural similarity to early developmental lignins). *Plant Physiol* 108:1277–1287
- Lapierre C, Monties B, Rolando C (1986) Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions. *Holzforchung* 40:113–118
- Lauvergeat V, Lacombe C, Lasserre E, Roby D, Grima-Pettenati J (2001) Two cinnamoyl-CoA reductase (*CCR*) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* 57:1187–1195
- Lewis NG, Davin LB, Sarkanen S (1998) Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations. In: Lewis NG, Sarkanen S (eds) *Lignin and Lignan Biosynthesis*. ACS Symposium Series, Washington pp 1–27
- MacRae DW, Towers GHN (1984) Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23:1207–1220
- Mitchell HJ, Hall JL, Barber MS (1994) Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol* 104:551–556
- Mitchell HJ, Hall SA, Stratford R, Hall JL, Barber MS (1999) Differential induction of cinnamyl alcohol dehydrogenase during defensive lignification in wheat (*Triticum aestivum* L.): characterisation of the major inducible form. *Planta* 208:31–37
- Morreel K, Ralph J, Kim H, Lu F, Goeminne G, Ralph S, Messens E, Boerjan W (2004) Profiling of oligolignols reveals monolignol coupling conditions in lignifying poplar xylem. *Plant Physiol* 136:3537–3549
- Murakana T, Miyata M, Ito K, Tachibana S (1998) Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry* 49:491–496
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Negrel J, Javelle F (1995) Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase- or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol Plant* 95:569–574
- Olivain C, Trouvelot S, Binet M-N, Cordier C, Pugin A, Alabouvette C (2003) Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol* 69:5453–5462
- Piquemal J, Lapierre C, Myton K, O'Connell A, Schuch W, Grima-Pettenati J, Boudet AM (1998) Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J* 13:71–83
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:1051–1071
- Schmidt J, Petersen M (2002) Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia x intermedia* cell suspension culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 68:91–98
- Somssich IE, Wernert P, Kiedrowski S, Hahlbrock K (1996) *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP(+) oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14199–14203
- Stewart D, Yahiaoui N, McDougall GJ, Myton K, Marque C, Boudet AM, Haigh J (1997) Fourier-transform infrared and raman spectroscopic evidence for the incorporation of cinnamaldehydes into the lignin of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with reduced expression of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Planta* 201:311–318
- Sugimoto K, Takeda S, Hirochika H (2000) MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes. *Plant Cell* 12:2511–2527
- Suzuki H, Reddy MSS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Summer LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA (2004) Methyljasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic reprogramming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago sativa*. *Planta* 220:696–707
- Tokunaga N, Sakakibara N, Umezawa T, Ito Y, Fukuda H, Sato Y (2005) Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells. *Plant Cell Physiol* 46:224–232
- Vander Mijnsbrugge K, Beeckman H, De Rycke R, Van Montagu M, Engler G, Boerjan W (2000) Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. *Planta* 211:502–509
- Van Uden W, Pras N, Vossebeld EM, Mol JNM, Malingre TM (1990) Production of 5-methoxypodophyllotoxin in cell suspension cultures of *Linum flavum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20:81–87
- Vardapetyan HR, Kirakosyan AB, Oganessian AA, Penesyan AR, Alfermann WA (2003) Effect of various elicitors on lignan biosynthesis in callus cultures of *Linum austriacum*. *Russ J Plant Physiol* 50:297–300
- Wescott ND, Muir AD (2003) Flax seed lignan in disease prevention and health promoting. *Phytochem Rev* 2:401–417
- Zeier J, Schreiber L (1999) Fourier transform infrared-spectroscopic characterisation of isolated endodermal cell walls from plant roots: chemical nature in relation to anatomical development. *Planta* 209:537–542

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Research article

Molecular characterization of cell death induced by a compatible interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *linii* and flax (*Linum usitatissimum*) cells

Christophe Hano^{a,*}, Mohamed Addi^a, Ophélie Fliniaux^b, Lamine Bensaddek^b,
Eric Duverger^c, François Mesnard^b, Frédéric Lamblin^a, Eric Lainé^a

^a Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres, 21 rue de Loigny la Bataille, 28000 Chartres, France

^b Laboratoire de Phytotechnologie, UPRES EA 3900, Université de Picardie Jules Verne, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens Cedex 01, France

^c Glycobiologie, Vectorologie et Trafic Intracellulaire, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, 1 rue Charles-Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France

Received 17 September 2007

Available online 4 March 2008

Abstract

The cellular and molecular events associated with cell death during compatible interaction between *Fusarium oxysporum* sp. *linii* and a susceptible flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension are reported here. In order to determine the physiological and molecular sequence of cell death of inoculated cells, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial potential, lipoxygenase, DNase, protease and caspase-3-like activities, lipid peroxidation and secondary metabolite production were monitored. We also used microscopy, *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) and DNA fragmentation assay. Cell death was associated with specific morphological and biochemical changes that are generally noticed in hypersensitive (incompatible) reaction. An oxidative burst as well as a loss of mitochondrial potential of inoculated cells, an activation of lipoxygenase and lipid peroxidation were noted. Enzyme-mediated nuclear DNA degradation was detectable but oligonucleosomal fragmentation was not observed. Caspase-3-like activity was dramatically increased in inoculated cells. Phenylpropanoid metabolism was also affected as demonstrated by activation of *PAL* and *PCBER* gene expressions and reduced soluble lignan and neolignan contents. These results obtained in flax suggest that compatible interaction triggers a cell death sequence sharing a number of common features with the hypersensitive response observed in incompatible interaction and in animal apoptosis.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Caspase; Flax (*Linum usitatissimum*); *Fusarium oxysporum* sp. *linii*; Programmed cell death; Nuclease; Reactive oxygen species; Secondary metabolites

1. Introduction

Plant defense mechanisms have been extensively analyzed in various plant–pathogen interactions. Indeed, understanding

molecular events during plant–pathogen interactions is of great interest since these events are closely associated with plant disease resistance and can guide agricultural strategies. *Fusarium oxysporum* is ubiquitous in soil worldwide as both pathogenic and nonpathogenic strains. *F. oxysporum* f. sp. *linii*, causative agent of wilt disease in flax (*Linum usitatissimum* L.), is one of the most important diseases in this crop. It is characterized by its ability to enter the plant through the roots and to spread throughout the entire vascular system, inducing yellowing and wilting of the leaves, and eventually causing the death of the plant [37]. Host cell death that occurs during many interactions between plants and their pathogens

Abbreviations: DCG, dehydrodiconiferyl alcohol glucoside; HR, hypersensitive response; LOX, lipoxygenase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; PCBER, phenylcoumaran benzylic ether reductase; PCD, programmed cell death; PLR, pinorensinol–lariciresinol reductase; ROS, reactive oxygen species; SECO, secoisolariciresinol; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick end labelling.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 37 30 97 53; fax: +33 2 37 91 08 63.

E-mail address: christophe.hano@univ-orleans.fr (C. Hano).

can be associated with disease resistance (incompatible interaction) or with susceptibility (compatible interaction) [16].

The most studied plant–pathogen interaction model, the hypersensitive response (HR), an incompatible interaction, is associated with a phenomenon termed resistance. Resistance response in plant involves three steps: (a) recognition of the pathogen, (b) signal transduction, and (c) execution of the defense programs such as HR cell death, oxidative burst, transcriptional activation of defense genes, and subsequent induction of systemic acquired resistance (SAR). Recognition events often follow the gene-for-gene model discovered by Flor [11] in flax. The resistance response is triggered when the host has a dominant *R* gene corresponding to a dominant *avr* gene in the pathogen leading to a localized cell death and the rapid activation of defense responses [19,41]. This hypersensitive cell death is regarded as a defensive suicide of the plant cells against an avirulent pathogen that prevents pathogen spreading. In plants, cell death during HR has been shown to be genetically controlled (programmed cell death, PCD) and to share some features with animal cell apoptosis [14]. It includes the generation of reactive oxygen species (ROS) leading to the so-called oxidative burst that plays a central role for the generation of transduction signals for cell death [15,30]. It is followed by lipid peroxidation, as a result of free radical peroxidation or lipoxygenase enzyme activity, which reflects membrane degradation or dysfunction [36]. Activation of nucleases that degrade the chromosomal DNA into oligonucleosomal DNA cleavage has also been reported in some plant tissues undergoing PCD [28,31]. Recently, there has been growing evidence of caspase-like activity in plants [24,26,32], for example, during HR in fungus-infected cowpea plant [7,10].

Another component of the plant's defense system is the production of secondary metabolites such as constitutive anti-feedants and phytoanticipins, or inducible phytoalexins. Lignin deposition is generally induced in response to microbial attack and acts as a physical barrier against pathogen invasion [8,34]. Lignans and neolignans, that share monolignols as common precursors with lignin, can be formed *de novo* in response to fungal attack and act as phytoalexins in both woody and non-woody species [13]. Activation of genes of the early steps of the phenylpropanoid pathway by biotic or abiotic stresses occurs in different plant systems. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) has a crucial role in plant defense mechanisms as the starting point for the synthesis of defense/stress-related compounds such as lignin, lignans and neolignans from phenylalanine [8]. Pinoresinol–lariciresinol reductase (PLR) and phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER), involved in lignans and neolignans' metabolism, are both correlated with functions associated with plant defense [13]. In flax cell culture, elicitation with *F. oxysporum* extracts triggered a strong incorporation of monolignols in the non-condensed labile ether-linked lignin fraction concomitantly with a decrease in lignans and neolignans' accumulation [17].

Plant cell cultures are a useful model system to investigate biosynthesis of plant secondary metabolites; for example *Linum* cell cultures produce a wide range of putative defense-related lignans of pharmaceutical interest [2,12].

The use of direct pathogen infections of plant cell cultures enables the identification of signaling components and the determination of the relationship between cell death and other defense-related events [16], because this system, contrary to a whole plant, allows uniformity, accessibility and reduced complexity. Recent studies suggest that cell death during interactions between susceptible plant and pathogen (compatible interaction) exhibits some features characteristic of apoptosis [16]. For example, the compatible interaction between *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* or *Magnaporthe grisea* and oat host cells induced chromatin condensation and DNA cleavage [46]. The authors hypothesized that both compatible and incompatible interactions may have overlapping pathways [16]. However, little is known about the morphological and molecular events associated with cell death that occurs in susceptible plant cells. Indeed most of the published work focused on incompatible interaction or/and a small set of the above mentioned cell death markers. Therefore in the present work, we investigate the kinetics of the biochemical changes and molecular mechanisms of cell death occurring in a cell suspension of a susceptible flax cultivar inoculated with spores of a virulent strain of *F. oxysporum* f. sp. *linii*. We put effort in monitoring a wide range of molecular and biochemical markers.

2. Results

2.1. Morphological and physiological changes

To evaluate the effects of *F. oxysporum* on both plant cell morphology and viability, we examined flax suspension-cultured cells inoculated with conidiospores at the end of their exponential growth phase. Conidiospores began to germinate 24 h after inoculation and hyphae surrounding cell clusters were visible at 48 h (Fig. 1A). Since 24 h after inoculation, a browning of treated-cell suspension was observed and accompanied by shrinkage and finally membrane disruption, but apoptotic bodies were not observed (Fig. 1A). Changes in cell morphology were associated with a growth arrest 24 h after inoculation (Fig. 1B) and an increased cell death (Fig. 1C). Cultures exhibited *per se* a certain ratio of dead cells, before inoculation, however, this level remained constant in control cell culture while it increased since 24 h post-inoculation in treated suspensions (Fig. 1C). A significant alkalization of the extracellular medium was noted in inoculated cells when compared to control (Fig. 1D). Conductivity measurements reflect the ion content in culture medium which results from the equilibrium between uptake and leakage. Contrary to control cells, ion leakage in inoculated cells at least compensates ion uptake (Fig. 1E). Conductivity measurements suggest that inoculated cells no longer metabolized their culture medium.

2.2. Oxidative burst and membrane dysfunction

An oxidative burst, corresponding to a sudden rise in intracellular superoxide anions' level, occurred after inoculation. Indeed, when compared to control cells, intracellular

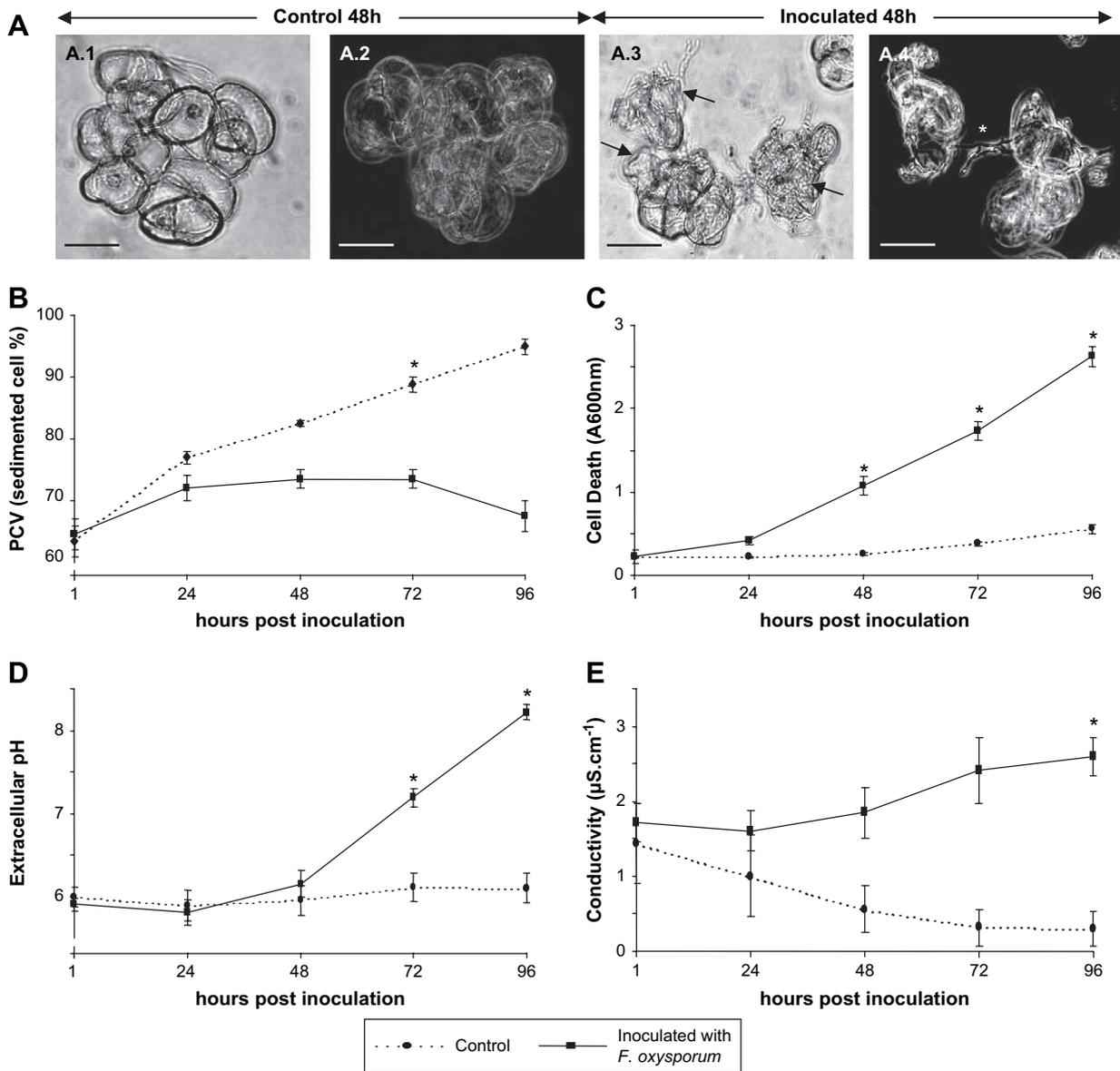


Fig. 1. Morphological and physiological changes. (A) Morphology of control and inoculated cells. (1) Control cells at 48 h examined under bright field microscopy. (2) Control cells at 48 h under phase contrast microscopy. (3) Inoculated cells at 48 h examined under bright field microscopy. Note that the cell shrinkage is indicated by arrows. (4) Inoculated cells at 48 h under phase contrast microscopy. Hyphae indicated by star are visible 48 h after inoculation. Scale bars: 50 μm . (B) Growth kinetics estimated by packed cell volume measurements. (C) Kinetics of cell death estimated by Evans blue method and expressed in percentage of dead cells. (D) Kinetics of culture medium pH. (E) Kinetics of culture medium conductivity expressed in $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Data represent the average \pm standard deviation from three independent determinations. (*) denote significant differences between cell lines ($P \leq 0.05$).

superoxide anions' concentrations increased after *F. oxysporum* exposure up to threefold 48 h after inoculation (Fig. 2A). This oxidative burst was preceded by a first moderate production of superoxide anions 8 h after inoculation (Fig. 2A). No extracellular production of superoxide anions was detected in both control and inoculated cells during the considered period (data not shown).

An increase in lipoxygenase (LOX) activity was observed, reaching a maximum value 48 h after inoculation (Fig. 2B). These activations of ROS production and LOX activity were logically followed by an increase in lipid hydroperoxide production (Fig. 2C) and a loss of membrane integrity as

confirmed by FDA staining (Fig. 2D). Another well known consequence of ROS production was the disruption of the mitochondria membrane as revealed by a dramatic drop of the mitochondria potential $\Delta\Psi_m$: the fluorescence of inoculated cells was approximately fivefold lower than that of control cells (Fig. 2E).

2.3. Activation of DNase and DNA degradation

Samples from control or *F. oxysporum*-inoculated cell suspensions were analyzed from 1 to 96 h for DNA integrity. During this period TUNEL positive nuclei of flax control cells remained

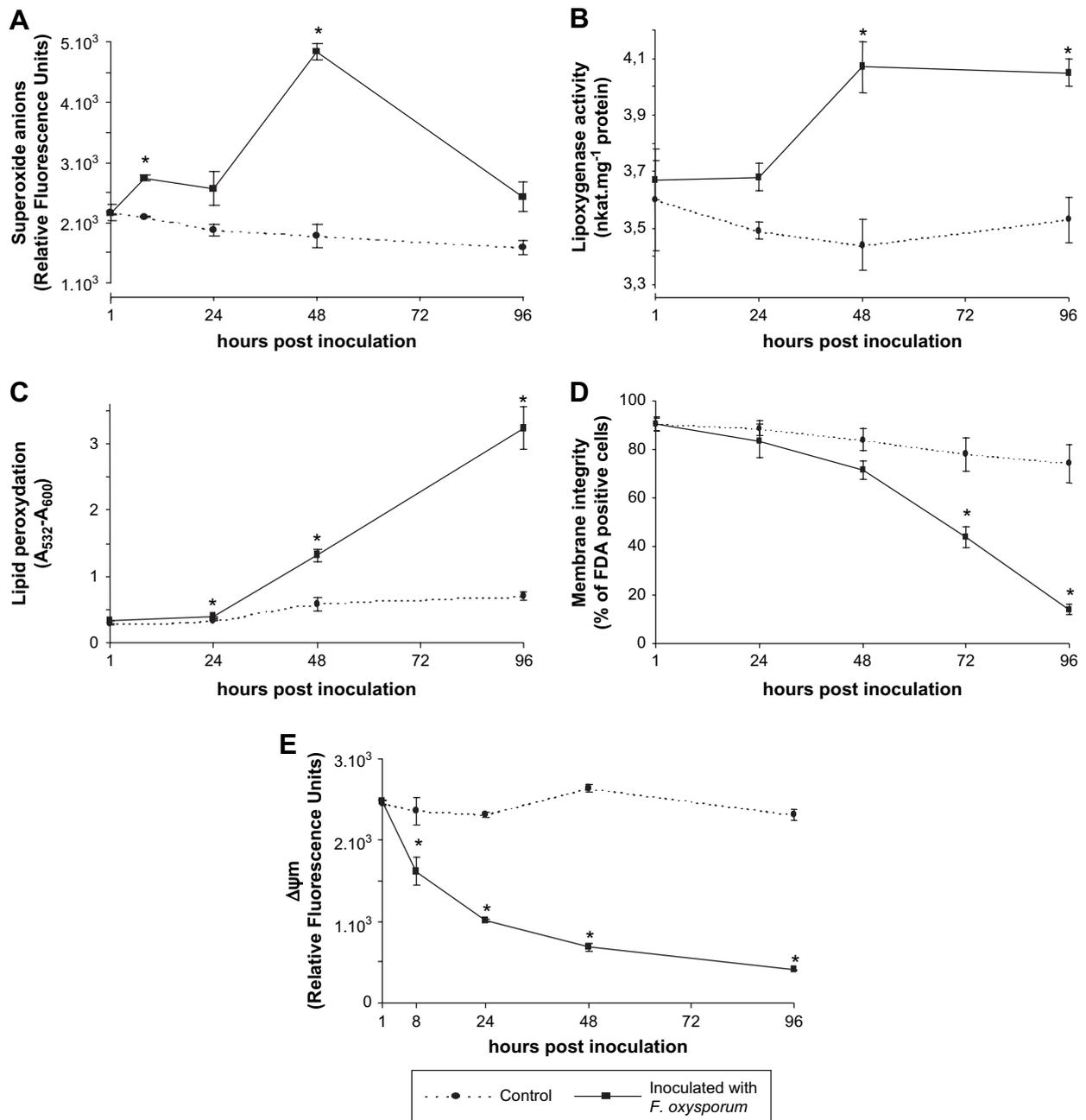


Fig. 2. Oxidative burst and membrane integrity. (A) Kinetics of intracellular superoxide production. (B) Kinetics of lipoxygenase (LOX) specific activity. (C) Kinetics of lipid peroxidation. (D) Kinetics of plasmalemma integrity estimated by FDA staining. (E) Kinetics of mitochondrial membrane integrity estimated by mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) variation. Data represent the average \pm standard deviation from three independent determinations. (*) denote significant differences between cell lines ($P \leq 0.05$).

under 10% (Fig. 3A). In contrast, in cells inoculated with *F. oxysporum*, a number of nuclei appeared TUNEL positive 48 h after inoculation (Fig. 3A, B). Indeed, after a 24 h lag phase which displayed no increase the percentage of TUNEL positive nuclei climbed up to 98% 96 h post-inoculation (Fig. 3A).

This increase in TUNEL positive nuclei was correlated with an increase in DNase activity in inoculated cells reaching a maximum value 96 h after inoculation (Fig. 3C).

DNA analysis on agarose gel also confirmed DNA fragmentation and appeared extensive in inoculated cells after

96 h (Fig. 3D), but oligonucleosomal fragmentation was not observed.

2.4. Activation of protease and caspase-3-like protease

We first measured the overall protease activity with azocasein as substrate. Inoculated cells displayed higher protease activity than control cells, especially at the end of the culture (Fig. 4A).

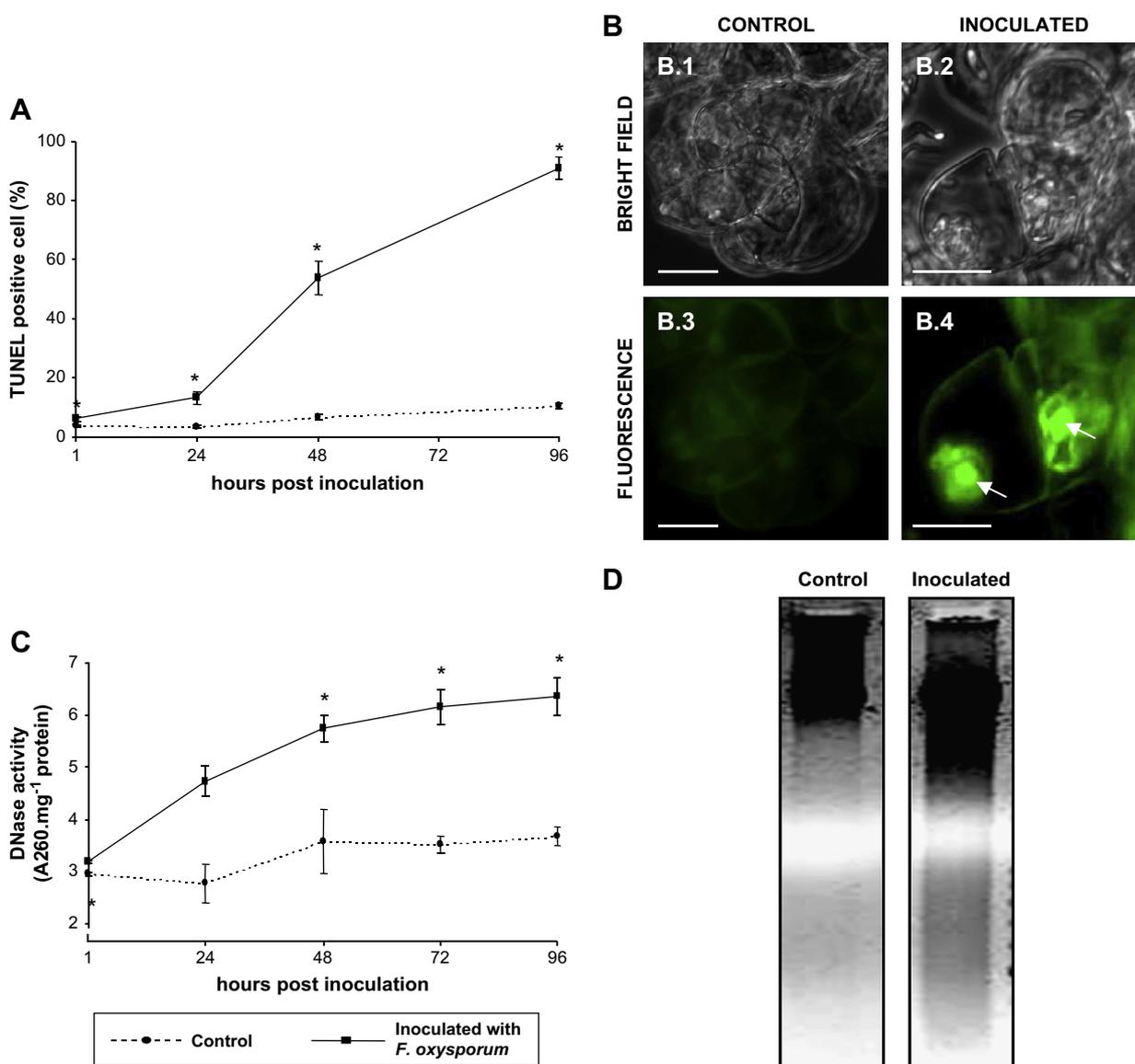


Fig. 3. DNA integrity in control and *F. oxysporum* conidiospore-inoculated cells. (A) *In situ* TUNEL assay. (B) Localization of nuclei with fragmented DNA under bright field or fluorescence microscopy (using a 488-nm excitation filter and a 515–565 nm wavelength pass filter) 96 h after inoculation. Control (1) and inoculated (2) cells examined under bright field microscopy. Control (3) and inoculated (4) cells examined under fluorescence microscopy. Note DNA fragmentation (green fluorescence) indicated by arrows. Scale bars: 50 μ m. (C) Kinetics of DNase specific activity. (D) Agarose gel electrophoresis analysis of control and inoculated DNA at 96 h post-inoculation. Data represent the average \pm standard deviation from three independent determinations. (*) denote significant differences between cell lines ($P \leq 0.05$). (For interpretation of color in this figure, the reader is referred to the web version of the article.)

In order to test whether the protease activity was executed by regular protease or rather by specific caspase-3-like proteins, we used specific caspase-3 substrate. The control culture displayed nearly undetectable caspase-3-like activity during the first hours of the considered period. On the contrary, in inoculated cells, caspase-3-like activity was evidenced as soon as 24 h and increased continuously all along the culture period up to 12-fold as compared to control cells' 96 h post-inoculation (Fig. 4B).

2.5. Secondary metabolism perturbation

Semi-quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR demonstrated that *PAL* and *PCBER* gene expressions were strongly

induced 24 h after inoculation (Fig. 5A). The induction of *PAL* gene expression in elicited cell cultures was closely correlated to the increase in *PAL* specific activity. Time course measurements of *PAL* activity, revealed an increase from 24 to 72 h, reaching up to threefold increase 48 h after inoculation, then it decreases to the control value 96 h after inoculation (Fig. 5B).

The *PLR* gene expression was only weakly activated in elicited cells 24 h post-inoculation (Fig. 5A).

A significant increase in cell browning (Fig. 5C), phloroglucinol staining (Fig. 5D) and cell wall autofluorescence (Fig. 5E) was observed as a consequence of lignin and wall bound phenolic compounds' deposition. This result

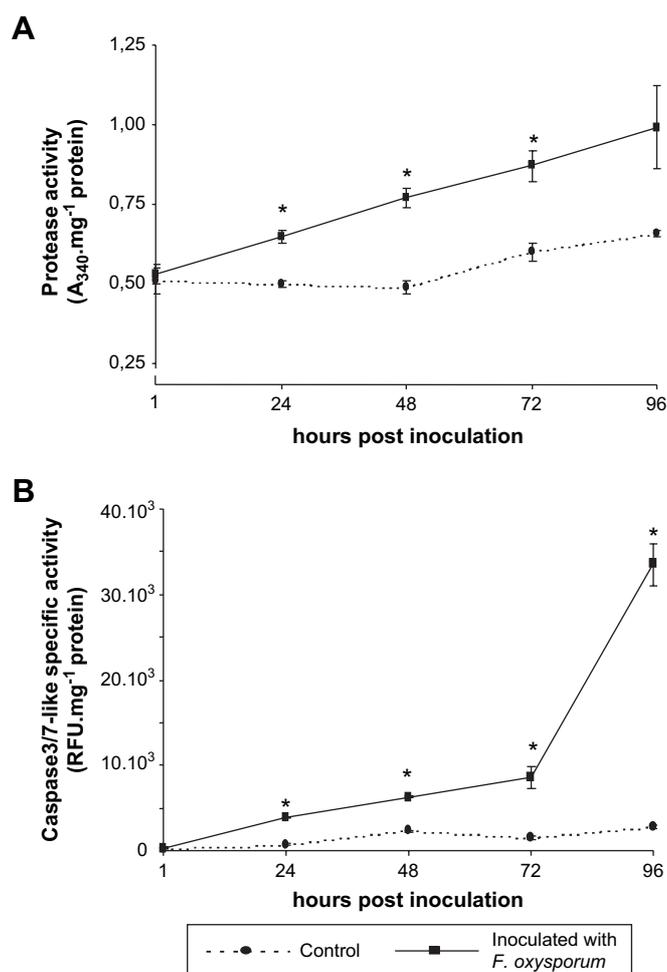


Fig. 4. Protease and caspase-3-like activities. (A) Kinetics of protease specific activity. (B) Kinetics of caspase-3-like specific activity. Data represent the average \pm standard deviation from three independent determinations. (*) denote significant differences between cell lines ($P \leq 0.05$).

was confirmed by an increase in total wall bound phenolic monomers' levels in inoculated cells (Table 1). On the contrary the quantities of free phenolics dramatically decreased and soluble lignan (SECO) and neolignan (DCG) almost disappeared 96 h after inoculation with *F. oxysporum* (Table 1).

3. Discussion

Morphological and molecular events associated with plant cell death induction in the hypersensitive response (HR) are better known than those that occur in susceptible plant cells [16]. In this work, a cell suspension of a flax susceptible cultivar was inoculated with spores of a virulent strain of *F. oxysporum* f. sp. *linii*.

For most of the parameters measured, difference between the inoculated cells and the control cells became clear 24 h after inoculation. This 24 h period could either correspond to the time needed for cells to respond or to the time needed by the fungus to reach a critical concentration necessary to elicitate the response of the cells.

3.1. Physiological response

Plant cell death is generally associated with characteristic physiological changes. The first steps are a growth arrest and a transient H^+ /ATPase driven-change in proton gradients across the plasma membrane that can lead to extracellular alkalization, conveniently detected in the medium of suspension-cultured cells [4,19]. These physiological features were observed following inoculation of our flax cell suspension with *F. oxysporum* conidiospores and were accompanied by changes in cell morphology such as cell shrinkage and finally membrane disruption.

3.2. Oxidative burst

Upon pathogen attack, one of the earliest events in the HR is an oxidative burst leading to the generation of superoxide anion radicals $\bullet O_2^-$ and hydrogen peroxide (H_2O_2 [27,30]). It was postulated by Levine et al. [30] that biphasic or prolonged ROS generation is necessary for hypersensitive cell death to occur. Nevertheless ROS play a role in cell death during the challenge of barley leaves with both compatible and incompatible fungal pathogen as demonstrated by Able et al. [1]. These authors even reported an higher ROS production during disease development than during HR induction in barley leaves challenged with *Rhynchosporium secalis* and *Pyrenophora teres*. In the present study, superoxide anions were generated during the compatible interaction with *F. oxysporum*, suggesting that ROS play a critical role in induction of cell death. We observed a biphasic accumulation of ROS, a first one following inoculation and a second, massive and persistent, peaking during pathogen development. This biphasic production of ROS was also observed by Olivain et al. [37] in flax suspension inoculated with spores of *F. oxysporum*.

During apoptosis, lipid peroxidation processes leading to the loss of membrane integrity have been described as a consequence of oxidative burst in animals [29] and plant cells [23]. Although it may occur non-enzymatically by the action of ROS, lipid peroxidation could also be catalyzed by enzymes such as lipoxygenase [36]. Marmey et al. [33] have shown that during HR cell death of cotton induced by the incompatible interaction with *Xanthomonas campestris*, an increase in lipoxygenase activity was responsive for lipid peroxidation. In *Erwinia amylovora* and pear interaction, lipid peroxidation occurred only during the HR and was not recorded in the compatible interaction [45]. In our hands, a drastic accumulation of peroxidized lipid occurred and a loss of membrane integrity was monitored using FDA staining. This lipid peroxidation followed an increased LOX activity and a concomitant ROS production. Therefore both phenomena seem to contribute to this lipid peroxidation. From our results, we can state that lipid peroxidation should not be considered as a specific characteristic event of HR.

We also noted the disruption of mitochondrial membrane, assessed by $\Delta\Psi_m$ measurements, a well known consequence of ROS production and an important feature in the early phase of apoptotic response in animals [40] as well as in plants [46].

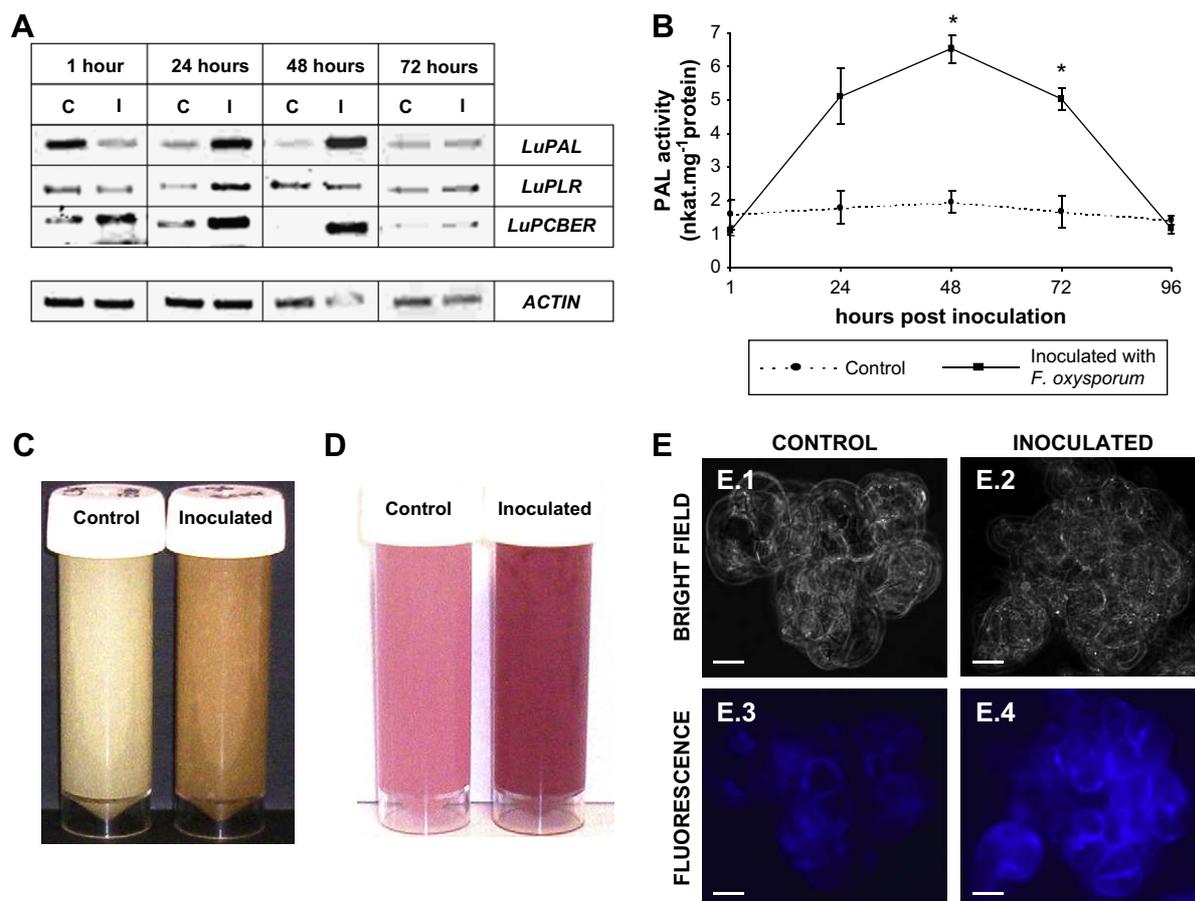


Fig. 5. Phenylpropanoid metabolism. (A) RT-PCR analysis of lignin and lignans biosynthetic gene expression in control and inoculated cells. Total RNA isolated 1, 24, 48, and 72 h post-inoculation were subjected to RT-PCR semi-quantitative analysis using an *ACTIN* gene as internal control. Ten microliters of 25-cycle PCR products were loaded on 1% (w/v) agarose gel. C, control cell suspension and I, inoculated cell suspensions. (B) Kinetics of PAL specific activity. Data represent the average \pm standard deviation from three independent determinations. (*) denote significant differences between cell lines ($P \leq 0.05$). (C) Browning 96 h after inoculation. (D) Phloroglucinol staining 96 h after inoculation. (E) Cell wall autofluorescence. Cells were examined under bright field or fluorescence microscopy (using a 365-nm excitation filter and a 445–450 nm wavelength pass filter) 96 h after inoculation. Control (1) and inoculated (2) cells examined under bright field microscopy. Control (3) and inoculated (4) cells examined under fluorescence microscopy. Scale bars: 50 μ m.

3.3. DNA degradation

DNA cleavage into an apoptotic-like nuclear DNA ladder of internucleosomal fragments of approximately 180 bp, a well known feature of animal apoptosis [20] was also observed in many plant species [16]. Recent studies demonstrated that DNA fragmentation also occurred during development of disease symptoms [23,46]. In our study, DNA degradation was evidenced by TUNEL analysis. DNA

Table 1
Secondary metabolites accumulation in control and inoculated cell suspensions harvested 96 h after treatment

	Control	Inoculated
Free phenolics (μ g g ⁻¹ DW)	132.00 \pm 28.37	49.50 \pm 15.33
Wall bound phenolics (μ g g ⁻¹ DW)	1153.67 \pm 20.85	1630.00 \pm 115.89
Lignan SECO (μ g g ⁻¹ DW)	0.52 \pm 0.04*	0.05 \pm 0.01*
Neolignan DCG (μ g g ⁻¹ DW)	11.30 \pm 1.14*	0.30 \pm 0.15*

Data represent the average \pm standard deviation from three independent determinations. (*) denote significant differences between cell lines ($P \leq 0.05$).

degradation occurred as a logical consequence of the observed increase in DNase activity in inoculated cells and was clearly visible on gel electrophoresis at the end of the culture but DNA laddering was not observed. However, internucleosomal DNA cleavage is not a sufficient criterion to identify apoptosis [6], and DNA degradation without internucleosomal fragmentation, following induction of nuclease activity, also occurred during the HR in tobacco challenged with tobacco mosaic virus [35]. Our results highlight the necessity to use several approaches, such as *in situ* TUNEL, DNase activity and DNA electrophoresis, to identify the pattern of DNA fragmentation. Although considered as a good *in situ* marker of apoptosis in plant cells [22], TUNEL does not reveal the pattern of DNA fragmentation.

3.4. Caspase-like protease activation

During PCD, nucleases and proteases are involved in both animals [20] and plants [26,32,44]. Caspases were shown to control DNA degradation in animal cells [20], and caspase

inhibitors prevented victorin-induced DNA laddering in plants [43]. Caspase-1-like and caspase-3-like activities were evidenced during HR in tobacco [7]. More recently, the vacuolar-processing enzyme (VPE), exhibiting a caspase-1-like activity, was shown to play a crucial role during HR in *Nicotiana benthamiana* challenged with tobacco mosaic virus [18]. In animal cells, caspase-3 is considered as the most important enzyme in the proteolytic disassembly of cells during the apoptotic process [20]. In plant cells, recent evidence from biochemical approaches suggests that caspase-3-like proteases may be also involved in the control of the cell death process in plants [24–26,32]. In the present study, we evidenced the involvement of caspase-3-like activity during compatible interaction. In our results, caspase-3-like activation preceded DNA cleavage, thus suggesting a possible involvement of this caspase-3-like enzyme in the subsequent DNA degradation.

3.5. Phenylpropanoid derivatives synthesis

Activation of genes of the early steps of the phenylpropanoid pathway in response to biotic or abiotic stresses has been reported in other plant systems. A rapid and strong induction of *PAL* transcripts was already observed in *Medicago truncatula* [43] and *L. usitatissimum* [17] elicited cell suspension cultures. A rapid induction of *PAL* gene closely correlated to an increase in *PAL* specific activity was observed in our inoculated cells. The *PAL* enzyme has reputedly a key role in plant defense mechanisms. It is responsible for the increased carbon flux into this pathway necessary for the synthesis of defense/stress-related compounds [8], such as defense lignin, creating a physical barrier limiting pathogen invasion, and other antimicrobial phytoalexins. Autofluorescence and phloroglucinol staining observed herein evidenced an increase in lignin deposition and/or wall bound phenolics' incorporation in inoculated cell walls. Concomitantly, we measured a drastic decrease in DCG accumulation in inoculated flax cells. This result was coherent with RT-PCR experiments that showed an induction of expression of the *PCBER* encoding gene, an enzyme involved in DCG metabolization [3,17]. As already observed using flax cell cultures elicited with fungal extracts [17] a low final content of *SECO* was found despite a slight activation of *PLR* gene expression suggesting a possible incorporation of these already preformed dimers into the lignin polymer.

3.6. Concluding remarks

We have established that cell death occurring during compatible interaction between a susceptible flax cell culture and a virulent *F. oxysporum* strain exhibited features generally encountered in HR and animal apoptosis, such as oxidative burst, mitochondrial potential loss, caspase and DNase activations. Nevertheless, the typical so-called DNA laddering (oligonucleosomal DNA fragmentation) did not occur. As hypothesized by Greenberg and Yao [16], "it is possible that, although some PCD steps are common between resistant and susceptible responses, some aspects of PCD are different".

This suggests that in the compatible interaction, active processes participate in the cell death, even if the cascade of events does not reproduce the complete apoptosis process.

4. Material and methods

4.1. Plant material

The 2-1B cell suspension culture of *L. usitatissimum* cultivar Barbara (highly sensitive to *Fusarium* wilt) was established from hypocotyl-derived calli and subcultured as described by Hano et al. [17] in Murashige and Skoog medium supplemented with 3% (w/v) sucrose, 8.88 μM BAP and 2.68 μM NAA. All suspension cultures were incubated on a gyratory shaker at 120 rpm in darkness at 25 °C and subcultured every 14 days. Usually, 100 mL MS-derived medium in a 250 mL Erlenmeyer flask were inoculated with 5 g of cells. The growth of cell suspensions during a cycle was measured by the packed cell volume (PCV) method.

4.2. Preparation of conidia inoculum and inoculation of flax cells

F. oxysporum sp. *linii* strain F60 was cultivated in a conidiospore production liquid medium as described by Zhou et al. [47]. Conidiospores were filtered (on 50 μm sieve), pelleted by centrifugation and diluted to the desired concentration with double distilled water.

Following transfer to fresh medium, flax cell cultures were inoculated at day 10 (exponential growth phase, PCV 66%) with 10 μL containing 5×10^5 conidiospores. Control cell suspensions were inoculated with the same volume of sterile double distilled water and used as reference during this study. Incubation continued on a gyratory shaker at 120 rpm in darkness at 25 °C. The extracellular pH and the conductivity (expressed in $\mu\text{S cm}^{-1}$) of the cell suspension medium were monitored at different time intervals.

4.3. Measurement of cell death

Cell death was estimated using Evans blue (Sigma). Briefly, cells were incubated in Evans blue solution (0.025% (w/v) in water) for 30 min. After washing in 10 mM NaH_2PO_4 , 120 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4 solution (phosphate-buffered saline, PBS 1 \times), the trapped Evans blue was released from cells by homogenizing them in 800 μL of a 50% (v/v) MeOH and 1% (w/v) SDS solution. The homogenate was incubated for 15 min in a water bath at 50 °C and centrifuged at 13,000 g for 15 min. The absorbance of the supernatant was determined at 600 nm.

4.4. ROS formation and mitochondria $\Delta\Psi_m$ measurements

Intracellular and extracellular ROS species (superoxide anions) production and mitochondria $\Delta\Psi_m$ were measured by monitoring the fluorescence of their specific probes.

For ROS formation, cells were stained in culture with 3 μM dihydroethidium bromide (Sigma) for 40 min at 37 °C. Dihydroethidium bromide is oxidized to fluorescent ethidium bromide in the presence of superoxide anions [38].

The evaluation of mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was carried out by treating cells with 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆₍₃₎, Sigma). DiOC₆₍₃₎ stains mitochondria depending on their $\Delta\Psi_m$ [39]. Cells were incubated in culture medium with 25 nM DiOC₆₍₃₎ for 40 min at 37 °C. At least three independent experiments were performed and results were expressed as relative fluorescent units.

4.5. Lipoxygenase activity and lipid peroxidation

Lipoxygenase (LOX) activity was determined by the method of Jalloul et al. [21]. Cells were homogenized using a mortar and pestle with 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM β -mercaptoethanol. The homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant (25 μL) was incubated for 20 min at 25 °C with 125 μL of 250 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and 100 mM of ethanolic solution of linoleic acid (0.5 μL). The reaction was stopped by addition of 12 N HClO₄ (7 μL), and hydroperoxy fatty acids were extracted in 200 μL of hexane. After vigorous shaking, the absorbance at 234 nm of the upper organic phase was measured against blank containing hexane. LOX activity was expressed using a molar extinction coefficient for conjugated dienes of 25,000 M⁻¹ cm⁻¹.

Measurement of lipid peroxide was carried out with the thio-barbituric acid (TBA; Sigma) method described by Kiba et al. [23]. Briefly, cells were ground using a mortar and pestle in distilled water and centrifuged at 10,000 g for 10 min. Supernatant fractions (75 μL) were mixed with 25 μL of 3% (w/v) SDS, 50 μL of 3% TBA (w/v) in 50 mM NaOH and 50 μL of 23% (v/v) of HCl throughout mixing between each addition. The mixture was heated at 80 °C for 20 min. After cooling on ice, the absorbance at 532 nm (A_{532}) was measured and non-specific absorbance at 600 nm (A_{600}) was subtracted.

Membrane integrity was also determined by fluorescein diacetate (FDA; Sigma) staining. Cell samples were incubated in a final concentration of 0.005% (w/v) FDA for 2 min and examined under blue light epifluorescence. Cell viability was determined by the ratio of living (i.e. fluorescent) cells to total cells. A minimum of 1000 cells were examined for each sample.

4.6. DNA fragmentation analysis

Nuclear DNA cleavage was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) using the *in situ* cell death detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Inoculated and control cells were fixed 45 min in 4% paraformaldehyde in PBS and washed twice in PBS. Cells were treated for 15 min with proteinase K (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Sigma) before 3'-OH end labelling. Three independent experiments were performed with more than 1000 nuclei counted per condition.

DNase activity was determined according to Kiba et al. [23]. Cells were homogenized using a mortar and pestle with 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM β -mercaptoethanol. The homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant (25 μL) was incubated for 120 min at 37 °C with 1 mg mL⁻¹ calf thymus DNA (Sigma) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). The reaction was terminated by addition of perchloric acid (final concentration of 4%), and the increase in acid-soluble DNA was determined by measuring the absorbance of the supernatant at 260 nm.

For DNA gel electrophoresis analysis, DNA was extracted by the cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) method [9], digested with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DNase-free RNase (Promega) for 1 h at 37 °C, separated by electrophoresis on a 1.8% (w/v) agarose gel in 1 \times Tris acetate EDTA (TAE), and then visualized in the presence of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide.

4.7. Protease and caspase-3-like activities

For protease assay, cells were homogenized using a mortar and pestle with 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM β -mercaptoethanol. The homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min. The soluble protein fraction was incubated with 2.5 mg mL⁻¹ azocasein (Sigma) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) at 37 °C. Activity was stopped by addition of trichloroacetic acid (final concentration of 4%) and incubation on ice for 30 min. Precipitated proteins were removed by centrifugation at 10,000 g for 10 min then the acid-soluble proteins were determined by measuring the absorbance of the supernatant at 340 nm.

For caspase-3-like assay, cells were frozen in liquid nitrogen and then used to obtain cytosolic protein extracts. Samples were ground in 500 μL ice-cold extraction buffer containing 100 mM HEPES (pH 7.2), 10% (w/v) sucrose, 0.1% (w/v) CHAPS, 5 mM DTT and 1% (v/v) NP40 using a glass-chilled mortar and pestle. Subsequently, the homogenate was incubated on ice for 15 min and centrifuged twice for 10 min at 13,000 g at 4 °C to pellet cell debris. The supernatant was cleared by filtration through a 0.22 μm filter. *In vitro* caspase-3-like activity was measured using the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3 Assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Substrate cleavage was detected in a BioRad fluorimeter (excitation wavelength: 380 nm; emission wavelength 460 nm). The kinetics of substrate hydrolysis was tested to be linear throughout the 2 h reaction.

4.8. Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA were extracted from 150 mg of ground frozen tissues using the RNeasy Plant Kit (Qiagen) and the RNase free DNase set (Qiagen) in order to eliminate DNA contamination. First-strand cDNA was synthesised at 37 °C for 60 min, with 4 units of Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). PCR was performed with specific primers for

PAL, PLR and PCBER genes [17]. To normalise the amount of mRNA in each PCR reaction, a PCR product (632 bp) corresponding to the exon 2 of the β -ACTIN gene was amplified. cDNA fragments were amplified during 20, 25 or 30 cycles.

4.9. PAL assay

Soluble proteins were extracted from 1.5 g of fresh frozen tissue by homogenisation using a mortar and pestle in 3 mL of 0.1 M sodium borate buffer (SBB) pH 8.8, containing 10 mM β -mercaptoethanol and kept on ice for 30 min. After centrifugation (10 min, 16,000 g, 4 °C), the supernatant was collected and used in the assay. PAL specific activity was assayed spectrophotometrically by monitoring the production of *trans*-cinnamate at 290 nm as described by Hano et al. [17]. The reaction mixtures contained 50 μ g proteins and 50 mM L-phenylalanine in 5 mL of SBB (pH 8.8) and were incubated at 40 °C.

4.10. Secondary metabolite content evaluation

The lignan and neolignan contents were evaluated by HPLC as described by Hano et al. [17].

For total phenolics' evaluation, soluble phenolics were extracted with 80% methanol. Cell wall bound phenolic acids were then released from the remaining pellet by alkaline hydrolysis (2 N NaOH, 60 °C for 4 h). After centrifugation at 8000 g for 10 min, the supernatant was transferred into a new tube, and was used for total phenolic estimation using the Folin–Ciocalteu method as described by Singleton et al. [42].

For lignin detection, cell culture material was treated with 2.5% (w/v) phloroglucinol in 6 M HCl for 30 min. Lignin-containing cells appeared red.

4.11. Protein assay

All protein concentrations were measured by Bradford's method [5], using BSA as standard.

4.12. Treatment of data

All data presented in this study were the means of at least three independent replicates. Comparative statistical analyses of groups were performed with Excel using Student's *t*-test or one way analysis of variance according to the data. All statistical tests were considered significant at $P < 0.05$.

Acknowledgments

We thank J.-P. Trouvé (coopérative linière Terre de Lin, Fontaine le Dun, France) for gifts of flax seeds cv. Barbara and *F. oxysporum*. This work was granted by the "Conseil Général d'Eure et Loir" (France).

References

- [1] A.J. Able, Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens, *Protoplasma* 221 (2003) 137–143.
- [2] R.R.J. Arroo, A.W. Alfermann, M. Medarde, M. Peterson, N. Pras, J.G. Woolley, Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans, *Phytochem. Rev.* 1 (2002) 27–35.
- [3] J. Attoumbre, C. Hano, F. Mesnard, F. Lamblin, L. Bensaddek, S. Raynaud-Le Grandic, E. Laine, S. Baltora-Rosset, M.A. Fliniaux, Identification by NMR and accumulation of a neolignan, the dehydrodi-coniferyl alcohol-4- β -D-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures, *C.R. Chimie* 9 (2006) 420–425.
- [4] B. Bouizgarne, H. El-Maarouf-Bouteau, C. Frankart, D. Rebutier, K. Madioua, A.M. Pennarun, M. Monestiez, J. Trouverie, Z. Amiar, J. Briand, M. Brault, J.P. Rona, Y. Ouhdouch, I. El Hadrami, F. Bouteau, Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects, *New Phytol.* 169 (2006) 209–218.
- [5] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [6] R.J. Collins, B.V. Harmon, G.C. Gobe, J.F.R. Kerr, Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis, *Int. J. Radiat. Biol.* 61 (1992) 451–453.
- [7] O. del Pozo, E. Lam, Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens, *Curr. Biol.* 8 (1998) 1129–1132.
- [8] R.A. Dixon, N.L. Paiva, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* 7 (1995) 1085–1097.
- [9] J.J. Doyle, J.L. Doyle, Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus* 12 (1990) 13–15.
- [10] I. D'Silva, G.G. Piorier, M.C. Heath, Activation of cysteine protease in cowpea plants during the hypersensitive response – a form of programmed cell death, *Exp. Cell Res.* 245 (1998) 389–399.
- [11] H.H. Flor, Current status of the gene-for-gene concept, *Annu. Rev. Phytopathol.* 9 (1971) 275–296.
- [12] E. Fuss, Lignans in plant cell and organ cultures: an overview, *Phytochem. Rev.* 2 (2003) 307–320.
- [13] D.R. Gang, H. Kasahara, Z.Q. Xia, K. Vander Mijnsbrugge, G. Bauw, W. Boerjan, M. Van Montagu, L.B. Davin, N.G. Lewis, Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinosresinol–lariciresinol and isoflavone reductases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7516–7527.
- [14] D.G. Gilchrist, Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide, *Annu. Rev. Phytopathol.* 36 (1998) 393–414.
- [15] E.M. Govrin, A. Levine, The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*, *Curr. Biol.* 10 (2000) 751–757.
- [16] J.T. Greenberg, N. Yao, The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions, *Cell. Microbiol.* 6 (2004) 201–211.
- [17] C. Hano, M. Addi, L. Bensaddek, D. Crônier, S. Baltora-Rosset, J. Doussot, S. Maury, F. Mesnard, B. Chabbert, S.W. Hawkins, E. Lainé, F. Lamblin, Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures, *Planta* 223 (2006) 975–989.
- [18] N. Hatsugai, M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, S. Tsuda, M. Kondo, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura, A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death, *Science* 305 (2004) 855–858.
- [19] M. Heath, Hypersensitive response-related death, *Plant Mol. Biol.* 44 (2000) 321–334.
- [20] M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407 (2000) 770–776.
- [21] A. Jalloul, J.L. Montillet, K. Assigbetsé, J.P. Agnel, E. Delannoy, C. Triantaphylidès, J.F. Daniel, P. Marmey, J.P. Geiger, M. Nicole, Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction, *Plant J.* 32 (2002) 1–12.
- [22] A.M. Jones, S. Coimbra, A. Fath, M. Sottomayor, H. Thomas, Programmed cell death assays for plants, *Methods Cell Biol.* 66 (2001) 437–451.

- [23] A. Kiba, O. Takata, K. Ohnishi, Y. Hikichi, Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant, *Planta* 224 (2006) 981–994.
- [24] H. Korhout, G. Berecki, W. Bruin, B. van Duijn, M. Wang, The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinase in plant cells, *FEBS Lett.* 475 (2000) 139–144.
- [25] E. Lam, N. Kato, M. Lawton, Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response, *Nature* 411 (2001) 848–853.
- [26] E. Lam, O. Del Pozo, Caspase-like proteases involvement in the control of plant cell death, *Plant Mol. Biol.* 44 (2000) 417–428.
- [27] C. Lamb, R.A. Dixon, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 (1997) 251–275.
- [28] R.H. Lee, S.C.G. Chen, Programmed cell death during rice leaf senescence is non-apoptotic, *New Phytol.* 155 (2002) 25–32.
- [29] G. Lenaz, Role of mitochondria in oxidative stress and ageing, *Biochim. Biophys. Acta* 1366 (1998) 53–67.
- [30] A. Levine, R. Tenhaken, R. Dixon, C. Lamb, H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response, *Cell* 79 (1994) 583–593.
- [31] L. Lombardi, N. Ceccarelli, P. Picciarelli, R. Lorenzi, DNA degradation during programmed cell death in *Phaseolus coccineus* suspensor, *Plant Physiol. Biochem.* 45 (2007) 221–227.
- [32] L. Lombardi, N. Ceccarelli, P. Picciarelli, R. Lorenzi, Caspase-like proteases involvement in programmed cell death of *Phaseolus coccineus* suspensor, *Plant Sci.* 172 (2007) 573–578.
- [33] P. Marmey, A. Jalloul, M. Alhamdia, K. Assigbete, J.L. Cacas, A.E. Voloudakis, A. Champion, A. Clerivet, J.L. Montillet, M. Nicole, The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Plant Physiol. Biochem.* 45 (2007) 596–606.
- [34] H.J. Mitchell, J.L. Hall, M.S. Barber, Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, *Plant Physiol.* 104 (1994) 551–556.
- [35] R. Mittler, E. Lam, Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death, *Plant Cell* 7 (1995) 1951–1962.
- [36] J.L. Montillet, S. Chamnongpol, C. Rusterucci, J. Dat, B. van de Cotte, J.P. Agnel, C. Battesti, D. Inze, F. Van Breusegem, C. Triantaphylides, Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves, *Plant Physiol.* 138 (2005) 1516–1526.
- [37] C. Olivain, S. Trouvelot, M.N. Binet, C. Cordier, A. Pugin, C. Alabouvette, Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 5453–5462.
- [38] M. Pajusto, T.H. Toivonen, J. Tarkkanen, E. Jokitalo, P.S. Mattila, Reactive oxygen species induce signals that lead to apoptotic DNA degradation in primary CD4+ T cells, *Apoptosis* 10 (2005) 1433–1443.
- [39] P.X. Petit, J.E. O'Connor, D. Grunwald, S. Brown, Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 389–397.
- [40] P.X. Petit, N. Zamzami, J.L. Vayssiere, B. Mignotte, G. Kroemer, M. Castedo, Implication of mitochondria in apoptosis, *Mol. Cell. Biochem.* 174 (1997) 185–188.
- [41] K. Shirasu, P. Schulze-Lefert, Regulators of cell death in disease resistance, *Plant Mol. Biol.* 44 (2000) 371–385.
- [42] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants, part A*, Lester Packer, Academic Press, San Diego, 1999, pp. 152–178.
- [43] H. Suzuki, M.S.S. Reddy, M. Naoumkina, N. Aziz, G.D. May, D.V. Huhman, L.W. Summer, J.W. Blount, P. Mendes, R. Dixon, Methyljasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic reprogramming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago sativa*, *Planta* 220 (2005) 696–707.
- [44] Y. Tada, S. Hata, Y. Takata, H. Nakayashiki, Y. Tosa, S. Mayama, Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors, *Mol. Plant–Microbe Interact.* 14 (2001) 477–486.
- [45] J.S. Venisse, G. Gullner, M.N. Brisset, Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*, *Plant Physiol.* 125 (2001) 2164–2172.
- [46] N. Yao, Y. Tada, M. Sakamoto, H. Nakayashiki, P. Park, Y. Tosa, S. Mayama, Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats, *Plant J.* 30 (2002) 567–579.
- [47] W. Zhou, F. Eudes, A. Laroche, Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*, *Proteomics* 6 (2006) 4599–4609.

Abstract

Flax (*Linum usitatissimum*) has been a source of high quality fibers (bast fibers) for several thousand years. The fibers are currently used in the textile industry but also increasingly in the fabrication of composites. The interesting mechanical properties of these bast fibers depend upon the structure and chemical composition of their cell walls. In order to improve our knowledge about the mechanisms underlying cell wall formation in flax fibers we produced ESTs from outer tissues, rich in fibers. Functional classification of ESTs allowed the identification of sequences coding a potential beta-xylosidase (*LuBXL1*). *LuBXL1* down-regulated (IR-PTGS) plants did not show any visible phenotype. However, microscopic analysis suggested that down-regulation could have affected xylem cell wall structure. Enzymatic Fingerprinting indicated a relative increase in the relative quantity of the XXXG oligoxyloglucans in stem inner tissues of down-regulated lines, together with a relative decrease in the quantity of certain oligoxylans. These observations suggest that the down-regulation of *LuBXL1* in flax is associated with modifications in cell wall hemicelluloses.

Keywords: Flax, *Linum usitatissimum*, bast fibers, cell wall, EST, β -xylosidase, IR-PTGS, enzymatic fingerprinting.

Résumé

Le lin (*Linum usitatissimum*) fait partie des premières plantes cultivées dans le monde. Depuis toujours il est une source de fibres (périphloèmiennes) de très grande qualité pour l'industrie textile et connaît actuellement un nouvel intérêt dans l'industrie des matériaux composites. Les fibres périphloèmiennes de lin possèdent des propriétés mécaniques remarquables grâce à la structure et la composition chimique de leurs parois cellulaires. Afin d'approfondir nos connaissances concernant la mise en place de la paroi cellulaire des fibres de lin, nous avons généré des ESTs à partir de tissus externes riches en fibres. La classification fonctionnelle des ESTs a permis l'identification de séquences codant une beta xylosidase potentielle (*LuBXL1*). La caractérisation fonctionnelle de plantes sous-exprimant (stratégie IR-PTGS) *LuBXL1* n'as pas pu permettre la mise en évidence d'un phénotype macroscopique. En revanche, des analyses microscopiques ont suggéré des modifications éventuelles de la paroi des cellules xylèmiennes. La technique d'empreinte enzymatique a démontré une augmentation relative de l'oligoxyloglucanes XXXG dans les tissus internes de lignées sous-exprimant *LuBXL1*, associée une diminution dans la quantité relative de certains oligoxylanes. Ces observations suggèrent que chez le lin la sous-expression de *LuBXL1* est associée à des modifications des hémicelluloses pariétales.

Mots clés: Lin, *Linum usitatissimum*, fibres périphloèmiennes, paroi cellulaire, β -xylosidase, IR-PTGS, empreinte enzymatique.