

50376
2004
65

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE



THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

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

Spécialité : Stratégie d'Exploitation des Fonctions Biologiques

Arnaud DAY

LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DU LIN (*Linum usitatissimum* L.) :

APPROCHES CYTOCHIMIQUE, CHIMIQUE ET MOLECULAIRE

N° d'ordre : 3445

Présentée publiquement le 24 mars 2004, devant le jury composé de :

M^r ROLANDO C.
M^{me} RUEL K.
M^r PILATE G.
M^r BERT F.
M^{me} CHABBERT B.
M^r HAWKINS S.

Professeur, Université de Lille I
Directrice de Recherche, CERMAV-CNRS, Grenoble
Directeur de Recherche, INRA Orléans
Directeur de l'Institut Technique du Lin, Paris
Chargée de Recherche, INRA Reims
Professeur, Université de Lille I

Président / Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse

Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales, UPRES EA 3568 – USC INRA, UFR de Biologie, USTL,
59655 VILLENEUVE D'ASCQ Cedex

Equipe Parois et Matériaux Fibreux, INRA, Centre de Recherches Agronomiques, 2, Esplanade Roland
Garros, 51686 REIMS cedex 2

Avant tout propos, je tiens à remercier chaleureusement Madame la Dr. B. Chabbert, Madame la Pr. H. David et Monsieur le Pr. S. Hawkins pour m'avoir accepté dans leur Laboratoire, pour avoir encadré ce travail, pour leurs conseils judicieux, leurs encouragements et leurs soutiens réguliers durant ces années de thèse. Merci pour votre confiance, pour les collaborations que vous avez rendues possibles et qui m'ont beaucoup apporté ainsi que pour votre patience et votre aide à l'élaboration de ce mémoire.

Madame la Dr. K. Ruel, veuillez trouver ici ma sincère reconnaissance pour les conseils, la patience et la sympathie avec lesquels vous m'avez initié aux techniques d'(immuno-)cytochimies; ainsi que pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Monsieur le Pr. J.P. Joseleau, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe pendant ces quelques mois passés au CERMAV-CNRS.

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Dr. G. Pilate pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Monsieur le Pr. C. Rolando pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, ainsi qu'à Monsieur F. Bert, Directeur de l'I.T.L., pour avoir accepté de juger ce travail.

Durant ce travail de thèse, nombreuses sont les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont apporté leur aide et/ou témoigné leur sympathie, je leur adresse mes plus vifs remerciements. Un merci plus appuyé à B. Plancq, à C. Cazier, au Dr. P. Saumitou-Laprade, à C. Gode, à M. Béchet et à S. Belingheri, qui ont toujours su m'aider, me "dépanner", me conseiller. J'ai une pensée toute particulière au Dr. G. Chambat, à M.F. Marais et à A. Lefebvre qui ont su m'accueillir avec une grande gentillesse lors de mes passages au CERMAV-CNRS. Enfin, un merci spécial à tous les membres de l'UMR FARE qui ont toujours fait preuve d'une grande sympathie lors de mes séjours dans l'Equipe Parois et Matériaux Fibreux.

Je souhaite également remercier très sincèrement :

Le Dr. Bertrand Dehorter pour m'avoir initié à la recherche, pour ses conseils avisés, sa disponibilité, son aide et son amitié.

Le Dr. Godfrey Neutelings, pour ses recommandations pertinentes, son aide et sa sympathie.

Le Dr. Lionel Belingheri, pour ses conseils et ses discussions fructueuses.

Nico, Romain, Cécé, Elie, Mel, David et Johnny pour votre gentillesse, votre amitié et votre aide à tout niveau durant toutes ces années.

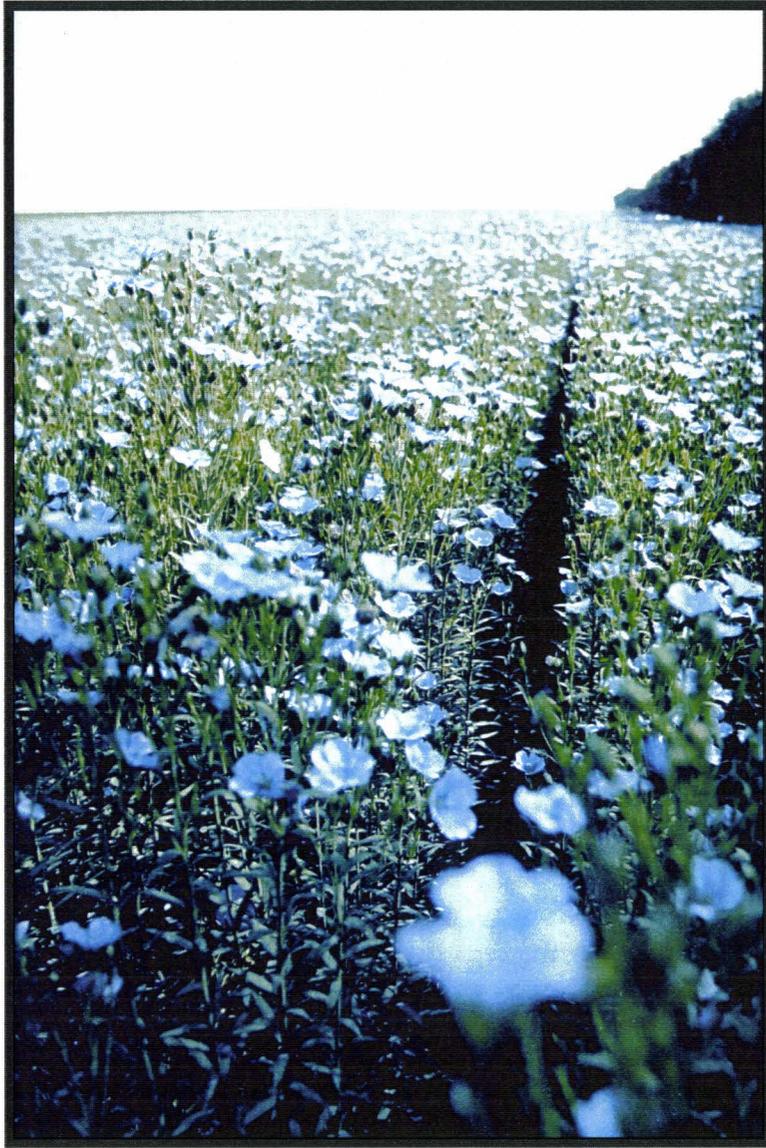
Caroline, Mélanie, Wanhui, Mohamed, Katsuchi et bien sur aux "Rémois du 5 rue de Belfort".

Ce travail n'aurait abouti sans la confiance, le soutien et les encouragements de mes Parents, mes Grands-Parents, de Julien et Vanessa, à vous tous, du fond du cœur : un immense merci. Enfin, ma pensée la plus affectueuse va à Aurélie : merci de ta patience et de ton soutien.

"Dans les journaux scientifiques, on ne signale que les expériences scientifiques réussies. Mais on devrait aussi signaler celles qui ne marchent pas. Faute d'information, celles-ci sont reproduites indéfiniment par d'autres savants ignorant leur échec... "

Bernard Werber, extrait de "l'Encyclopedie du savoir relatif et absolu" (2000).

PREAMBULE



Culture du lin dans les Flandres (Nord - Pas de Calais)

C'est un spectacle vert et bleu d'autant plus attendu qu'il ne dure pas plus d'une quinzaine de jours. Chaque année, à la faveur du mois de juin, les campagnes de Normandie, du Nord-Pas de Calais, de la Picardie et de façon plus anecdotique de Champagne et d'Iles de France, se couvrent de milliers de petites fleurs se balançant nonchalamment, comme pour oublier leur durée de vie éphémère (figure page précédente). Cette vision bucolique signale la présence de cultures de lin (*Linum usitatissimum* L.).

Cette culture, remontant à 7500 ans avant J.C., permet l'obtention de fibres cellulosiques dont les propriétés textiles sont appréciées depuis la haute antiquité égyptienne. La finesse et la nervosité de ces fibres, leurs reflets lumineux et leur exceptionnelle capacité d'absorption assurent un confort unique aux tissus en lin. Pline l'Ancien a consacré un volume de son Histoire Naturelle à cette plante qui, selon ces termes, a "porté le Monde en tout sens..." en pensant bien sûr aux voiles de marinier en lin. En effet, les fibres en lin constituent sans aucun doute une des premières fibres naturelles que l'homme ait utilisées pour des applications techniques. Juste une fibre textile ? Non! Les fibres de lin possèdent également d'incroyables propriétés mécaniques : forte ténacité, faible élasticité, importante résistance à l'usure et ceci malgré leur grande finesse (Baley, 2002; Girault et al., 1997; Roland et al., 1995). A cet égard elles sont considérées comme les plus solides des fibres végétales et leur solidité est comparable à certains verres et aciers (Sotton, 1989). C'est un composite dont le renfort, la cellulose, est en forte proportion et à un fort degré de cristallinité expliquant sa bonne tenue aux tractions et sa faible capacité de récupération après flexion et pliure (prédisposition des vêtements en lin à se froisser). De telles propriétés confèrent aux fibres de lin la possibilité d'investir de nouveaux marchés non textiles tels que celui des matériaux composites (Baley, 2002; Van de Velde et Baetens, 2001). Les tendances actuelles valorisent également ses vertus écologiques : les fibres sont biodégradables et sa culture reste moins polluante que celle du coton. Ainsi, au cours de la dernière décennie, les surfaces cultivées de lin à fibres en France ne cessent d'augmenter pour atteindre en 2002 : 68500 ha, la variété hermes représentant la plus grande surface (40 % des cultures de lin à fibre). La France, réputée pour produire les meilleures fibres en terme de qualité se place en première place mondiale en matière de production (~64000 tonnes de lin teillé) et à la troisième place mondiale en terme de surfaces. En 2002, le lin a suscité près de 150 millions d'euros d'excédents à l'exportation (Pilat, 2002; Institut Technique du Lin).

A la définition, "fibre végétale" le Webster's New International Dictionary donne "an elongate tapering cell that has at maturity a small lumen and no protoplasm content, that is found in many plant organs and is specially well developed in the xylem and phloem of the vascular

system, and that imparts elasticity, flexibility, and tensile strength to the plant or organ". Parmi les nombreuses et diverses fibres répondant à cette définition, les fibres de lin se singularisent par leur origine, leur composition et leur organisation structurale (Anderson, 1927; McDougall et al., 1993). Ces dernières ne sont pas facilement accessibles car intimement liées au parenchyme et au cortex de la tige et sont très fortement associées entre elles au sein de faisceaux. De ce fait, leur isolement et leur séparation nécessitent une succession d'étapes biologiques, mécaniques et chimiques dont l'efficacité est conditionnée par leur cohésion. Des composés phénoliques seraient notamment impliqués dans ce phénomène, la détection de lignines ayant très souvent été corrélée aux difficultés d'extraction et de filage des fibres. Toutefois, de nombreuses controverses persistent autour de ce dernier point (Morrison et al., 2003); de même que la biosynthèse des lignines reste, d'une manière générale, très imprécise (Boerjan et al., 2003).

Dans ce contexte, les travaux rapportés dans ce mémoire visent à apporter une contribution dans le cadre de la problématique générale : "la lignification des fibres de lin." Cette étude, réalisée dans le cadre d'un financement inter-région Nord-Pas-de Calais / Champagne-Ardenne a été effectuée parallèlement au Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales (UPRES 3568, UFR de Biologie, USTL, Lille; sous la direction du Pr. Hélène David puis du Pr. Simon Hawkins) et à l'INRA UMR-FARE (Equipe PMF, INRA, Centre de Recherches Agronomiques, Reims; sous la direction du Dr. Brigitte Chabbert). L'approche pluridisciplinaire de ce sujet de thèse a conduit à effectuer des analyses au Centre d'Etudes et de Recherches des Macromolécules Végétales (CNRS; UPR 5301, Grenoble; sous la direction du Dr. Katia Ruel).

SOMMAIRE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A -- LE LIN : LA PLANTE, SES FIBRES, SA CULTURE, SON INDUSTRIE.....	1
I - SYSTEMATIQUE ET DESCRIPTION BOTANIQUE	1
1.1 - Place de l'espèce " <i>Linum usitatissimum</i> " dans la classification des végétaux	1
1.2 - Morphologie de la plante	1
a - <u>La tige</u>	<u>1</u>
b - <u>La fleur et sa fécondation</u>	<u>2</u>
1.3 - Anatomie de la tige	2
a - <u>Localisation des fibres</u>	<u>2</u>
b - <u>Caractéristiques des fibres</u>	<u>3</u>
c - <u>La fibrogénèse</u>	<u>4</u>
II - LA DYNAMIQUE DE CROISSANCE DU LIN A FIBRES	4
a - <u>Les paramètres édaphiques</u>	<u>4</u>
b - <u>Le développement de la plante</u>	<u>5</u>
c - <u>La récolte</u>	<u>5</u>
III - LA TRANSFORMATION AGRO-INDUSTRIELLE DU LIN A FIBRES.....	6
3.1 - Le rouissage	6
a - <u>Le rouissage a l'eau</u>	<u>6</u>
b - <u>Le rouissage a terre</u>	<u>6</u>
c - <u>Le rouissage enzymatique</u>	<u>7</u>
d - <u>Le rouissage chimique</u>	<u>7</u>
3.2 - Le teillage	8
3.3 - Utilisation des fibres dans l'industrie textile : la filature	8
3.4 - Utilisation des fibres dans les composites	9
IV - LES PROPRIETES DES FIBRES DE LIN.....	10
B -- ORGANISATION, COMPOSITION ET ARCHITECTURE DES PAROIS VEGETALES 11	11
I - ORGANISATION DES PAROIS VEGETALES.....	11
1.1 - La lamelle moyenne	11
1.2 - La paroi primaire	12
1.3 - La paroi secondaire	12
II - COMPOSITION MOLECULAIRE DES PAROIS	13
2.1 - Les composés polysaccharidiques	13
a - <u>La cellulose</u>	<u>13</u>
α - <i>Composition et biosynthèse</i>	
β - <i>Structure</i>	
γ - <i>La cellulose des parois secondaires des fibres de lin</i>	
b - <u>Les hémicelluloses</u>	<u>16</u>
α - <i>Les xyloglucanes</i>	
β - <i>Les xylanes</i>	
γ - <i>Les glucomannanes</i>	
δ - <i>Les mannanes et les galactomannanes</i>	
ε - <i>Les β-glucanes non cellulosiques</i>	
ζ - <i>Les hémicelluloses des fibres du lin</i>	
c - <u>Les pectines</u>	<u>17</u>
α - <i>Les composés pectiques minoritaires</i>	
β - <i>Les homogalacturonanes</i>	
γ - <i>Les rhamnogalacturonanes de type I</i>	
δ - <i>Les rhamnogalacturonanes de type II</i>	
ε - <i>Les pectines des fibres du lin</i>	
2.2 - Les composés protéiques	20
a - <u>Les protéines riches en hydroxyproline</u>	<u>21</u>
α - <i>Les extensines</i>	
β - <i>Les arabinogalactanes protéiques</i>	

<i>b - Les protéines riches en glycine</i>	22
<i>c - Les protéines riches en proline</i>	22
<i>d - Les protéines enzymatiques</i>	22
2.3 - Les composés phénoliques	23
<i>a - La lignine</i>	23
<i>α - Nature et fonctions</i>	
<i>β - Structure</i>	
<i>γ - Hétérogénéité des lignines</i>	
<i>δ - Modélisation de la structure des lignines d'angiospermes</i>	
<i>b - Les acides phénoliques</i>	29
III - ARCHITECTURE PARIETALE	30
3.1 - Dynamique de la paroi cellulaire	30
3.2 - Le domaine hémicelluloses - cellulose	31
3.3 - Le domaine pectique	32
3.4 - Le domaine protéique	32
3.5 - Le domaine phénolique	33
C -- EVOLUTION DES STRUCTURES PARIETALES DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES AU COURS DU TRAITEMENT DU LIN	35
I - STRUCTURE DES FAISCEAUX FIBREUX	35
II - STRUCTURE DES FIBRES ELEMENTAIRES	36
III - ROLE DES POLYMERES NON-CELLULOSIQUES	36
D -- LA BIOSYNTHESE DES COMPOSES PHENOLIQUES	38
I - LA VOIE GENERALE DES PHENYLPROPANOÏDES	39
1.1 - La première étape de désamination : la phénylalanine ammonia-lyase	39
1.2 - Les étapes d'hydroxylation	40
<i>a - La cinnamate 4-hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11)</i>	41
<i>b - La coumarate 3-hydroxylase (C3H)</i>	41
<i>c - La férulate 5-hydroxylase (F5H) / coniféraldéhyde 5-hydroxylase (Cald5H)</i>	42
1.3 - Les réactions de méthylation	43
<i>a - L'acide caféique/5-hydroxyférulique 3-, 5- O-méthyltransférase (COMT, E.C. 2.1.1.6) ou aldéhyde OMT</i>	43
<i>b - La caféoyl coenzyme A 3-, 5-O-méthyltransférase (CCoAOMT, E.C. 2.1.1.104)</i>	45
<i>c - Rôle putatif des deux OMT dans la voie de biosynthèse</i>	46
1.4 - La réaction d'estérification des acides cinnamiques : la 4-coumarate coenzyme A ligase (4-CL)	46
II - LA VOIE SPECIFIQUE DES MONOLIGNOLS	47
2.1 - La cinnamoyl coenzyme A réductase (CCR, E.C. 1.2.1.44)	48
2.2 - L'alcool cinnamylique deshydrogénase (CAD, E.C. 1.1.1.195)	49
2.3 - L'alcool sinapylique deshydrogénase (SAD)	50
III - TRANSPORT ET STOCKAGE DES MONOLIGNOLS	50
IV - LA POLYMERISATION DES MONOLIGNOLS	51
4.1 - Les peroxydases (E.C. 1.11.1.7)	51
4.2 - Les laccases (E.C. 1.10.3.2)	52
4.3 - Complémentarité des peroxydases et des laccases	52
V - LA LIGNIFICATION DES PAROIS	53

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE RECHERCHE

MATERIELS ET METHODES

A -- LE LIN COMME MATERIEL BIOLOGIQUE.....	56
I - DEFINITION DES STADES DE PRELEVEMENT	56
II - DEFINITION DES FRAGMENTS DE TIGE	57
III - SEPARATION DES TISSUS EXTERNES ET INTERNES DES TIGES.....	57
B -- ETUDE (ULTRA)STRUCTURALE DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DU LIN AU COURS DE LEUR MATURATION	58
I - MATERIEL VEGETAL.....	58
II - PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MET	58
2.1 - Fixation	58
<i>a - Fixation aldéhydique</i>	<u>58</u>
<i>b - Fixation par le permanganate de potassium</i>	<u>59</u>
2.2 - Déshydratation	59
2.3 - Imprégnation	59
2.4 - Inclusion et polymérisation	60
III - ULTRAMICROTOMIE	60
IV - MARQUAGE DES ULTRACOUPEES POUR LA MET.....	60
4.1 - Marquages cytochimiques	60
<i>a - Technique du P.A.T.Ag</i>	<u>61</u>
<i>b - Technique du permanganate de potassium</i>	<u>61</u>
4.2 - Marquages immunocytochimiques	62
<i>a - Principe</i>	<u>62</u>
<i>b - Marquages immunocytochimiques avec les antisera polyclonaux anti-lignines</i>	<u>62</u>
<i>c - Les anticorps utilisés</i>	<u>64</u>
<i>α - Mode d'obtention des antigènes</i>	
<i>β - Obtention des antisera</i>	
4.3 - Post-marquage par simple contraste à l'acétate d'uranyle	64
V - OBSERVATION EN MET ET PHOTOGRAPHIE	65
VI - COLORATION DES CONSTITUANTS PARIETAUX EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....	65
VII - DETECTION HISTOCHIMIQUE DES LIGNINES EN MICROSCOPIE OPTIQUE	66
C -- CARACTERISATION DES LIGNINES ET DE LEURS PRECURSEURS DANS LA TIGE DE LIN AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	67
I - MATERIEL VEGETAL.....	68
II - OBTENTION DES RESIDUS PARIETAUX ET ANALYSES PRELIMINAIRES	68
2.1 - Extraction éthanolique	68
2.2 - Détermination des teneurs en protéines dans les résidus pariétaux	68
IV - CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES PARIETAUX	69
4.1 - Hydrolyse alcaline	69
4.2 - Extraction organique et concentration	69
4.3 - Analyse par HPLC	70
V - DETERMINATION DES TENEURS EN LIGNINE.....	71
5.1 - Methode de Klason	71
5.2 - Méthode au bromure d'acétyle	72

VI - CARACTERISATION STRUCTURALE DES LIGNINES	73
6.1 - L'oxydation au nitrobenzène alcalin	73
<i>a - Principe</i>	<u>73</u>
<i>b - Mode opératoire</i>	<u>73</u>
6.2 - Thioacidolyse	74
<i>a - Principe</i>	<u>74</u>
<i>b - Mode opératoire</i>	<u>75</u>
<i>α - Dégradation des lignines par thioacidolyse</i>	
<i>β - Silylation des monomères trithioéthérés libérés</i>	
<i>γ - Analyse par chromatographie en phase gazeuse</i>	
D -- CARACTERISATIONS D'UNE CCoAOMT IMPLIQUEE DANS LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES.....	77
I - MATERIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE	77
1.1 - Matériel végétal	77
<i>a - Lins de plein champ</i>	<u>77</u>
<i>b - Lins transgéniques</i>	<u>77</u>
<i>α - Transformation et multiplication des vitroplants</i>	
<i>β - Transfert en serre</i>	
<i>γ - Echantillonnage</i>	
1.2 - Matériel bactérien	79
<i>a - Souches bactériennes</i>	<u>79</u>
<i>b - Matériel génétique extrachromosomique</i>	<u>80</u>
<i>α - Vecteur de clonage pMOSBLUE®</i>	
<i>β - Phagemide pBLUESCRIPT®</i>	
<i>γ - Vecteur d'expression pet16b®</i>	
<i>c - Culture et conservation des souches bactériennes</i>	<u>80</u>
<i>α - Cultures en milieu gélosé</i>	
<i>β - Cultures en milieu liquide</i>	
<i>γ - Stockage</i>	
II - TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	81
2.1 - Extraction et purification des acides nucléiques	81
<i>a - ADN génomique</i>	<u>82</u>
<i>b - ADN plasmidique</i>	<u>82</u>
<i>c - ARN totaux</i>	<u>83</u>
<i>α - Extraction des acides nucléiques</i>	
<i>β - Précipitation sélective des ARN</i>	
<i>d - isolement des ARN messenger</i>	<u>84</u>
2.2 - Dosage des acides nucléiques	84
2.3 - Digestion de ADN génomique et plasmidique	84
<i>a - Digestion enzymatique</i>	<u>84</u>
<i>b - Purification</i>	<u>85</u>
2.4 - Construction de molécules ADN "hybrides"	85
2.5 - Amplification de ADN par PCR	85
<i>a - Principe</i>	<u>85</u>
<i>b - PCR classique</i>	<u>85</u>
<i>c - Nested PCR</i>	<u>86</u>
<i>d - Marche par PCR sur ADN génomique</i>	<u>87</u>
<i>e - Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées</i>	<u>87</u>
2.6 - Synthèse d'ADNc	88
2.7 - Migration électrophorétique des acides nucléiques	88
<i>a - Electrophorèse ADN</i>	<u>89</u>
<i>b - Electrophorèse des ARN</i>	<u>89</u>
2.8 - Purification de fragments ADN à partir d'un gel d'agarose	90
2.9 - Clonage de fragments ADN amplifiés par PCR	90
<i>a - Ligation dans le vecteur pMOSBLUE® et transformation des bactéries MOSBLUE®</i>	<u>90</u>
<i>b - Criblage des bactéries par PCR</i>	<u>90</u>
2.10 - Construction et exploitation d'une banque d'ADNc	91

<i>a - Synthèse d'ADNc</i>	<u>91</u>
<i>b - Clonage des ADNc</i>	<u>91</u>
<i>c - Titration de la banque</i>	<u>91</u>
<i>d - Obtention de plages de lyse</i>	<u>91</u>
<i>e - Amplification de la banque</i>	<u>92</u>
<i>f - Criblage de la banque par PCR</i>	<u>92</u>
<i>g - Procédé d'excision automatique</i>	<u>92</u>
2.11 - Séquençage de fragments ADN et analyse des séquences	93
2.12 - Hybridation des acides nucléiques avec une sonde radiomarquée	93
<i>a - Synthèse de sondes ADN radiomarquées</i>	<u>93</u>
<i>b - Hybridation de type Southern</i>	<u>94</u>
<i>c - Hybridation de type northern</i>	<u>95</u>
2.13 - Production et purification d'une CCoAOMT recombinante	95
<i>a - Clonage dans les bactéries hôtes BL21-Gold (DE3)[®]</i>	<u>96</u>
<i>b - Culture et induction des bactéries BL21 transformées</i>	<u>97</u>
<i>c - Purification de la protéine de fusion 10xH-CCoAOMT</i>	<u>97</u>
<i>d - Elimination du tag 10xH</i>	<u>98</u>
III - TECHNIQUES DE BIOCHIMIE DES PROTEINES	99
3.1 - Extraction des protéines totales	99
3.2 - Dosage des protéines	99
3.3 - Analyse des protéines en conditions dénaturantes	99
<i>a - Electrophorèse mono-dimensionnelle SDS-PAGE</i>	<u>99</u>
<i>α - Préparation des échantillons</i>	
<i>β - Migration électrophorétique</i>	
<i>b - Electrophorèse bi-dimensionnelle NEpHGE-PAGE</i>	<u>101</u>
<i>α - Préparation des échantillons</i>	
<i>β - Première dimension NEpHGE</i>	
<i>γ - Deuxième dimension SDS-PAGE</i>	
3.4 - Fixation et détection des protéines totales	102
<i>a - Coloration au bleu de coomassie</i>	<u>102</u>
<i>b - Coloration au nitrate d'argent</i>	<u>103</u>
3.5 - Détection immunologique sur empreinte (western-blot)	103
<i>a - Electrotransfert</i>	<u>103</u>
<i>b - Immunodétection</i>	<u>104</u>
3.6 - Séquençage des peptides et analyse des séquences	104
3.7 - Analyse de protéines natives	105
<i>a - Mesures des activités enzymatiques CCoAOMT (E.C. 6.2.1.12)</i>	<u>105</u>
<i>b - Localisation d'une CCoAOMT par empreintes tissulaires</i>	<u>106</u>
<i>α - Empreintes tissulaires et localisation des lignines</i>	
<i>β - Immunodétections</i>	
<i>γ - Révélation des protéines totales</i>	

RESULTATS ET DISCUSSIONS

A -- ETUDE (ULTRA)STRUCTURALE DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DU LIN AU COURS DE LEUR MATURATION	108
I - LES DIFFERENTS TISSUS ET LA DISPOSITION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DANS LA TIGE DE LIN	108
II - DISTRIBUTION DES POLYSACCHARIDES PARIETAUX DANS LES PRINCIPAUX TISSUS DU CYLINDRE CENTRAL	110
2.1 - Les tissus xylémiens	110
2.2 - Le phloème	112
2.3 - Les fibres périphloémiennes	112
<i>a - La zone mitoyenne composite</i>	<i>113</i>
<i>b - La paroi secondaire</i>	<i>114</i>
<i>α - L'architecture cellulosique de la paroi secondaire</i>	
<i>β - Distribution des hémicelluloses et des pectines</i>	
III - DISTRIBUTION DE LA LIGNINE DANS LES DIFFERENTS TISSUS DE LA TIGE DE LIN	116
3.1 - Détection histochimique des lignines dans la tige de lin	116
<i>a - Les colorations différentielles de la tige de lin</i>	<i>117</i>
<i>b - Discussion</i>	<i>117</i>
3.2 - Détection des lignines dans la tige de lin en microscopie électronique à transmission	118
<i>a - Détection de la lignification des tiges de lin par la méthode du permanganate de potassium</i>	<i>119</i>
<i>α - Mise en évidence des lignines constitutives du bois</i>	
<i>β - Mise en évidence des lignines inscrutant les fibres périphloémiennes</i>	
<i>γ - La spécificité du marquage des lignines au permanganate de potassium</i>	
<i>b - Approche de la lignification des fibres du lin par immunocytochimie</i>	<i>121</i>
<i>α - Caractéristiques des sondes immunologiques utilisées</i>	
<i>β - Immunomarquage des lignines constitutives des tiges de lin</i>	
<i>c - L'appréciation de la lignification des fibres périphloémiennes en fonction des techniques employées</i>	<i>123</i>
<i>d - La lignification des fibres périphloémiennes du lin : une exception ?</i>	<i>124</i>
IV - ETUDE DES VARIATIONS QUALITATIVES DES LIGNINES AU NIVEAU SUB-CELLULAIRE	126
4.1 - Distribution des lignines dans les fibres xylémiennes	126
4.2 - Distribution des lignines dans les fibres périphloémiennes	127
V - EVOLUTION DE LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES PENDANT LEUR MATURATION	129
5.1 - Immunomarquages des lignines au début et en fin du processus de maturation	130
5.2 - Evolution de la lignification des fibres périphloémiennes	130
B -- CARACTERISATION DES LIGNINES ET DE LEURS PRECURSEURS DANS LA TIGE DE LIN AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	132
I - DEFINITION DU MATERIEL VEGETAL UTILISE EN RELATION AVEC LA LIGNIFICATION DES TIGES DE LIN	132
II - DOSAGE DES LIGNINES PRESENTES DANS LA TIGE DE LIN AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES ...	133
1.1 - Estimation de la teneur en lignine par la méthode du bromure acétylé	133
<i>a - Les teneurs en lignines dans les tissus externes et internes</i>	<i>133</i>
<i>b - Estimations des artefacts potentiels</i>	<i>134</i>
<i>α - Le coefficient d'extinction molaire: ε</i>	
<i>β - L'acide perchlorique</i>	
<i>γ - Les protéines pariétales</i>	
<i>δ - Les acides phénoliques pariétaux</i>	
<i>ε - Conclusion</i>	
1.2 - Détermination des teneurs en lignine par la méthode Klason	139
1.3 - Discussion	140
<i>a - Comparaison des deux méthodes employées pour le dosage des lignines</i>	<i>140</i>
<i>b - Etude comparative des teneurs en lignines dans les tiges de lin</i>	<i>141</i>
<i>α - Les teneurs en lignines dans les tissus internes</i>	
<i>β - La lignification des tissus externes riches en fibres périphloémiennes</i>	

II - CARACTERISATION DES LIGNINES DES TIGES DE LIN PENDANT LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	144
2.1 - Généralités	144
2.2 - Caractérisation des lignines du lin par thioacidolyse	145
<i>a - Composition monomérique des lignines dans les tissus internes et externes</i>	<u>145</u>
<i>α - Les tissus internes</i>	
<i>β - Les tissus externes</i>	
<i>γ - Conclusion</i>	
<i>b - Discussion de la méthode</i>	<u>147</u>
2.3 - Caractérisation des lignines du lin par oxydation alcaline par le nitrobenzène	148
<i>a - Les monomères constitutifs des lignines des tissus externes et internes</i>	<u>149</u>
<i>α - Les tissus internes</i>	
<i>β - Les tissus externes</i>	
<i>γ - Conclusion</i>	
<i>b - Discussion de la méthode</i>	<u>152</u>
<i>α - L'efficacité et la fiabilité de l'oxydation alcaline par le nitrobenzène</i>	
<i>β - Le mécanisme réactionnel</i>	
<i>γ - Les protéines et acides phénoliques pariétaux</i>	
2.4 - Discussion	154
<i>a - Evaluation comparée des différentes techniques employées</i>	<u>154</u>
<i>b - Comparaison de la composition qualitative des lignines de la tige de lin</i>	<u>155</u>
<i>α - La lignine constitutive du bois</i>	
<i>β - La lignine incrustant les fibres périphloémiennes</i>	
<i>γ - Conclusion</i>	
C -- CARACTERISATIONS D'UNE CCoAOMT IMPLIQUEE DANS LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES.....	165
I - MESURE DES ACTIVITES CCoAOMT DANS LES TIGES DE LIN	165
1.1 - Evolution des activités CCoAOMT au cours du développement des lins	166
1.2 - Activités CCoAOMT dans les tissus externes et internes au cours de la maturation des fibres périphloémiennes	166
II - ANALYSES ELECTROPHORETIQUES DE LA CCoAOMT DES TIGES DE LIN AU STADE FLORAISON	167
III - ANALYSE D'UNE MICROSEQUENCE PEPTIDIQUE DE CCoAOMT DE LIN	169
IV - STRATEGIE EMPLOYEE POUR LA CARACTERISATION MOLECULAIRE D'UNE CCoAOMT DE TIGES DE LIN	170
4.1 - Amplification de fragments génomiques par PCR	170
<i>a - Nested-PCR sur ADN génomique</i>	<u>170</u>
<i>b - Marche sur le chromosome par PCR</i>	<u>171</u>
4.2 - Criblage d'une banque d'ADNc	171
<i>a - Contrôle de la présence de clones CCoAOMT</i>	<u>171</u>
<i>b - Criblage à l'aide d'une sonde nucléotidique</i>	<u>172</u>
<i>c - Criblage par PCR</i>	<u>172</u>
4.3 - Obtention d'un ADNc plein longueur CCoAOMT	173
V - CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES ET ENZYMATIQUES D'UNE CCoAOMT ISOLEE DES TISSUS EXTERNES DE TIGE DE LIN	173
5.1 - Etude séquentielle de l'ADNc plein longueur	173
<i>a - Analyse de la séquence nucléotidique</i>	<u>173</u>
<i>b - Analyse de la séquence protéique déduite de l'ADNc plein longueur</i>	<u>174</u>
<i>α - Recherche des modifications post-traductionnelles putatives</i>	
<i>β - Prédiction des structures secondaire et tertiaire</i>	
<i>γ - Comparaison de sa séquence protéique et identification des sites actifs</i>	
5.2 - Analyse de sa spécificité de substrat	176
<i>a - Production et purification de la protéine recombinante CCoAOMT</i>	<u>176</u>
<i>α - Principe et provenance des extraits protéiques</i>	
<i>β - Contrôles électrophorétiques et immunologiques</i>	
<i>c - Caractéristiques enzymatiques de la CCoAOMT recombinante</i>	<u>178</u>
<i>α - Substrats testés et méthodologie employée</i>	
<i>β - Détermination des constantes enzymatiques pour chaque substrat</i>	

VI - EXPRESSION DU/DES GENES CCoAOMT DANS LE LIN AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT	179
6.1 - Localisation tissulaire de la CCoAOMT dans les tiges de lin au stade floraison	179
<i>a - La technique d'empreinte tissulaire</i>	<u>179</u>
<i>b - Appréciation de la localisation tissulaire de la CCoAOMT en relation avec la lignification des tiges</i>	<u>179</u>
6.2 - Analyse de l'expression du/des gènes CCoAOMT dans les différents organes du lin au cours de leur développement	180
<i>a - Qualité des ARN extraits en fonction du stade de développement</i>	<u>180</u>
<i>b - Intensité du signal d'hybridation</i>	<u>181</u>
<i>c - Relation entre l'expression de gène(s) CCoAOMT et le développement des lins</i>	<u>182</u>
VII - CARACTERISATION DE GENE(S) CCoAOMT	183
7.1 - Structure génomique	183
7.2 - Détermination du nombre de gène(s) CCoAOMT chez le lin	184
<i>a - Principe</i>	<u>184</u>
<i>b - Résultats de l'hybridation de type Southern</i>	<u>184</u>
7.3 - Analyse d'une séquence promotrice d'un gène CCoAOMT de lin	185
<i>a - Méthodologie employée</i>	<u>185</u>
<i>b - Analyse bioinformatique de la séquence promotrice isolée</i>	<u>185</u>
<i>α - Détermination du site d'initiation de la transcription</i>	
<i>β - Détermination des facteurs cis régulateurs putatifs</i>	
VIII - ETUDE DE LINS TRANSGENIQUES "CCoAOMT ANTISENS"	187
<i>a - Stratégie employée pour l'obtention de lins transgénique</i>	<u>187</u>
<i>b - Analyse des lins transgéniques</i>	<u>188</u>
<i>α - Confirmation de l'état transgéniques</i>	
<i>β - Etude morphologique</i>	
<i>γ - Mesure des activités CCoAOMT</i>	
IX - DISCUSSION.....	189
9.1 - Colocalisation de la CCoAOMT et des lignines des tiges de lin	189
<i>a - Distribution tissulaire de la CCoAOMT en relation avec la lignification des tiges</i>	<u>189</u>
<i>b - Etude de la CCoAOMT comme marqueur de la lignification</i>	<u>190</u>
9.2 - Les activités CCoAOMT en relation avec la lignification des tiges	190
9.3 - La régulation de la CCoAOMT de lin est transcriptionnelle	191
<i>a - Relation entre activités enzymatiques et expression de la CCoAOMT</i>	<u>191</u>
<i>b - Le cas particulier des lins aux stades capsules brunes</i>	<u>192</u>
9.4 - Caractéristiques d'une CCoAOMT isolée des tissus externes des tiges de lin au stade floraison	192
<i>a - Caractéristiques structurales</i>	<u>192</u>
<i>α - Comparaison de sa séquence protéique</i>	
<i>β - Comparaison de ses propriétés physico-chimiques</i>	
<i>b - Caractéristiques enzymatiques</i>	<u>194</u>
<i>α - Spécificité de substrat</i>	
<i>β - Rôle putatif dans la biosynthèse des monolignols</i>	
<i>γ - Les difficultés à généraliser le modèle établi chez le lin</i>	
9.5 - Etude génomique de la CCoAOMT chez le lin	196
<i>a - Organisation génomique</i>	<u>196</u>
<i>b - Approche de la régulation de gènes CCoAOMT chez le lin</i>	<u>196</u>
<i>α - La faible conservation des séquences promotrices des gènes CCoAOMT</i>	
<i>β - Elément de régulation des gènes CCoAOMT</i>	
9.6 - Effet de la transgénèse CCoAOMT antisens chez le lin	198
<i>a - Altération de la croissance des plantes</i>	<u>198</u>
<i>b - Réduction des activités CCoAOMT</i>	<u>198</u>

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION	199
I - MISE EN EVIDENCE DES LIGNINES INCRUSTANT LES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	200
II - LES CARACTERISTIQUES DE CETTE LIGNIFICATION	200
2.1 - D'un point de vue quantitatif	200
2.2 - D'un point de vue qualitatif	201
2.3 - D'un point de vue évolutif	202
III - LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES <i>VIA</i> LA CARACTERISATION D'UNE CCoAOMT	203
PERSPECTIVES	204
I - LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	204
II - LA MORPHOGENESE DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	205
III - LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES	207
IV - L'INFLUENCE DES PARAMETRES CULTURAUX	208

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DIFFUSION DES TRAVAUX : LISTE DES COMMUNICATIONS

RESUME / ABSTRACT

ABREVIATIONS

et CONVENTIONS

Général

2-D : électrophorèse bi-dimensionnelle

4CL : 4-hydroxyCinnamate coenzyme A Ligase

ADNc : ADN Complémentaire

ADN-T : ADN de Transfert

AGI : ArabinoGalactane de type I

AGII : ArabinoGalactane de type II

AGP : ArabinoGalactane Protéine

AldOMT : Aldéhyde OMT

ARNm : ARN Messager

C3H : Coumarate 3-Hydroxylase

C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase

CAD : Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase : alcool cinnamylique déshydrogénase

Cald5H : Coniféraldéhyde 5-Hydroxylase

CCoAOMT : Caféoyl Coenzyme A *O*-MéthylTransférase

CCR : Cinnamoyl Coenzyme A Réductase

COMT : acide Caféique/acide 5-hydroxyfêrulique *O*-MéthylTransférase

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DHP : DeHydroPolymer = polymère de lignine synthétique

DM : Degré de Méthylestérification

F5H : Fêrulate 5-Hydroxylase

G : Gaïacyle

GRP : Glycin Rich Protein : protéine riche en glycine

GST : Glutathion S-Transférase

H : *p*-Hydroxyphényl (en général) ou 4-Hydroxybenzaldéhyde (réaction du nitrobenzène)

HCl : acide chlorhydrique

HCT : Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoylTransférase

HG : HomoGalacturonane

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography : chromatographie en phase liquide à haute pression

HRGP : Hydroxyprolin Rich GlycoProtein : Glycoprotéine riche en hydroxyproline

IEF : IsoElectroFocalisation

JTC ou jtc : Jonction TriCellulaire

Lac : Laccase

LM ou lm : Lamelle Moyenne

MET : Microscopie Electronique à Transmission

NEpHGE : Non-Equilibrium pH Gradient Electrophoresis : électrophorèse en gradient de pH non équilibré

OMT : *O*-MéthylTransférase

p/v : rapport Poids / Volume

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis : électrophorèse en gel de polyacrylamide

PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase

PATAg : Periodic Acid-Thio carbohydrazid Ag (silver) proteinate

PCR : Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne

Per : Peroxydase

Ph-OH : groupement phénol

pI : Point Isoélectrique

PI : Paroi primaire

PII : Paroi secondaire

PME Pectine MéthylEstérase

PRP : Prolin Rich Protein : protéine riche en proline

RG-I : RhamnoGalacturonane de type I

RG-II : RhamnoGalacturonane de type II

S : Syringyle

SAD : Sinapyl Alcohol Dehydrogenase : alcool sinapylique déshydrogénase

SAM : S-Adénosyl Méthionine

SMC : Site Multiple de Clonage

UV : Ultra-Violet

V : Vanilline

v/v : rapport Volume / Volume

XyG : XyloGlucane

zl : Zulauf

ZMC ou zmc : Zone Mitoyenne Composite

zt : Zutropf

Acides nucléiques

ADN

A : desoxy-Adénosine (adénine + desoxy-ribose + phosphate)

G : desoxy-Guanosine (guanine+ desoxy-ribose + phosphate)

C : desoxy-Cytidine (cytosine+ desoxy-ribose + phosphate)

T : desoxy-Thymidine (thymine+ desoxy-ribose + phosphate)

ARN

A : Adénosine (adénine + ribose + phosphate)

G : Guanosine (guanine+ ribose + phosphate)

C : Cytidine (cytosine+ ribose + phosphate)

U : Uridine (uracile+ ribose + phosphate)

Le Code Génétique

1 ^{ère} position extrémité 5'	2 ^{ème} position								3 ^{ème} position extrémité 3'
	T		C		A		G		
T	TTT	F	TCT	S	TAT	Y	TGT	C	T
	TTC	F	TCC	S	TAC	Y	TGC	C	C
	TTA	L	TCA	S	TAA	Stop*	TGA	Stop	A
	TTG	L	TCG	S	TAG	Stop*	TGG	W	G
C	CTT	L	CCT	P	CAT	H	CGT	R	T
	CTC	L	CCC	P	CAC	H	CGC	R	C
	CTA	L	CCA	P	CAA	Q	CGA	R	A
	CTG	L	CCG	P	CAG	Q	CGG	R	G
A	ATT	I	ACT	T	AAT	N	AGT	S	T
	ATC	I	ACC	T	AAC	N	AGC	S	C
	ATA	I	ACA	T	AAA	K	AGA	R	A
	ATG	M	ACG	T	AAG	K	AGG	R	G
G	GTT	V	GCT	A	GAT	D	GGT	G	T
	GTC	V	GCC	A	GAC	D	GGC	G	C
	GTA	V	GCA	A	GAA	E	GGA	G	A
	GTG	V	GCG	A	GAG	E	GGG	G	G

Le codon Stop TAA est appelé codon ocre et le codon stop TAG est nommé codon ambre

Acides aminés

A	Ala	Alanine	M	Met	Methionine
C	Cys	Cystéine	N	Asn	Asparagine
D	Asp	Acide aspartique	P	Pro	Proline
E	Glu	Acide glutamique	Q	Gln	Glutamine
F	Phe	Phénylalanine	R	Arg	Arginine
G	Gly	Glycine	S	Ser	Serine
H	His	Histidine	T	Thr	Thréonine
I	Iso	Isoleucine	V	Val	Valine
K	Lys	Lysine	W	Trp	Tryptophane
L	Leu	Leucine	Y	Tyr	Tyrosine

Oses

Ara	Arabinose	Glc	Glucose
Fuc	Fucose	GlcA	Acide Glucuronique
Gal	Galactose	Rha	Rhamnose
GalA	Acide Galacturonique	Xyl	Xylose

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

A – LE LIN : LA PLANTE, SES FIBRES, SA CULTURE, SON INDUSTRIE

I - SYSTEMATIQUE ET DESCRIPTION BOTANIQUE

1.1 - PLACE DE L'ESPECE "*Linum usitatissimum*" DANS LA CLASSIFICATION DES VEGETAUX

Angiosperme dicotylédone de la famille des linacées, le lin appartient au genre *linum* (figure 1) qui comprend cinq sections subdivisées en groupes et totalisant plus de trois cents espèces. Parmi celles ci, dans la section *eulinum* et le groupe *protolinum* se trouve le lin cultivé *Linum usitatissimum* (Plonka et Anselme, 1956). Ce dernier se caractérise, comme son ancêtre *Linum angustifolium*, par la présence de 15 paires de petits chromosomes dans les noyaux cellulaires.

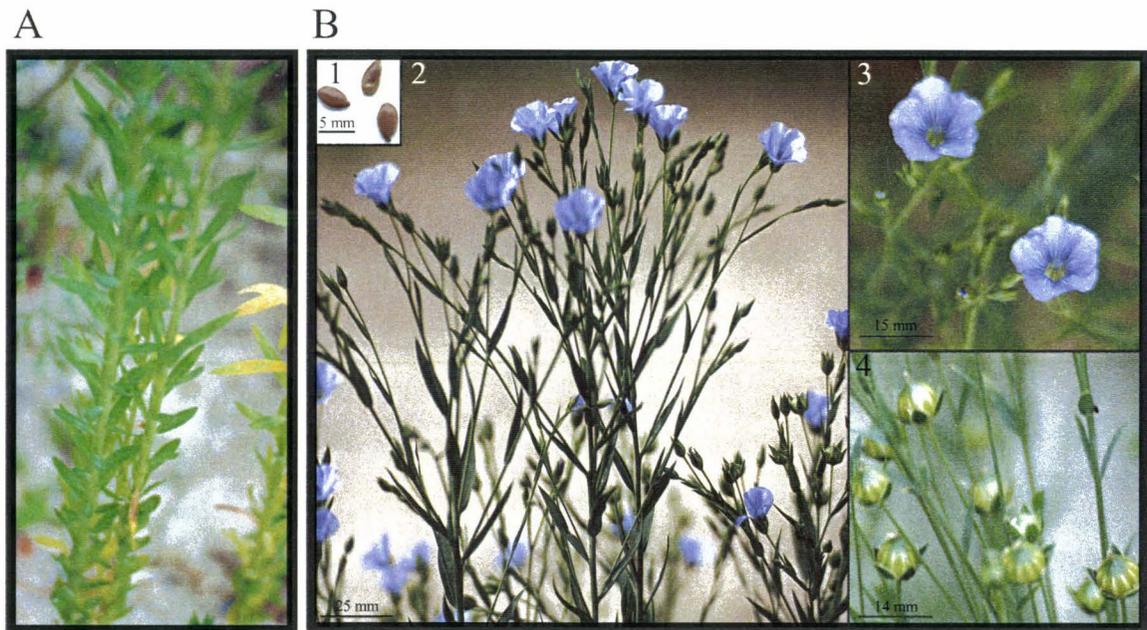
En fonction des caractères sélectionnés, l'espèce *usitatissimum* peut être subdivisée en deux catégories (Plonka et Anselme, 1956; Lisson et Mendham, 2000; Rennebaum et al., 2002) :

- Les variétés oléagineuses. Elles sont cultivées pour leur graine riche en huile (35 à 45 % du poids sec). Cette dernière est principalement utilisée dans la fabrication de peintures, d'encre d'imprimerie, de vernis et de linoléums à cause de ses propriétés siccatives dues à ses fortes teneurs en acides gras insaturés notamment en acide linoléique (C18 : 2) et en acide linoléique (C18 : 3) (Jain et al., 1999). En outre, ces graines renfermant de fortes teneurs en lignanes aux effets bénéfiques (Charlet et al., 2002) sont de plus en plus employées dans l'alimentation humaine et animale (Oomah, 2001; Sicilia et al., 2003).
- Les variétés à fibres. A ce jour, 19 variétés sélectionnées pour leur richesse en fibres sont inscrites au catalogue officiel français. Par leurs propriétés ces dernières présentent un fort intérêt industriel notamment dans les secteurs textile (75 % de leur débouché) et chimie des biopolymères (16 % de leur débouché).

1.2 - MORPHOLOGIE DE LA PLANTE

a - La tige

Linum usitatissimum L., plante annuelle, se présente en fin de croissance sous l'aspect d'une tige dressée droite et cylindrique de 0,8 à 1,2 m de hauteur et d'un diamètre moyen au collet de 1 à 3 mm selon la densité de semis (jusqu'à 2000 graines par m², en culture traditionnelle) (Casa et al., 1999). D'abord verte, la tige jaunie à partir de la floraison puis devient brune-verte foncée à maturité des fibres. Cette tige se termine par une inflorescence en cyme; à partir de l'axe primaire



C	Règne	végétaux
	Sous règne	spermaphytes
	Embranchement	rhizophytes
	Sous-embranchement	angiospermes
	Classe	dicotylédones
	Sous classe	ovulées
	Ordre	malpighiales
	Sous ordre	rosidées I
	Famille	linacées
	Genre	linum
	Section	eulinum
	Groupe	protolinum
	Espèce	usitatissimum

Figure 1 : Le lin : morphologie et classification. A : Disposition spiralée des feuilles sur les tiges de lin. B : Organes reproducteurs du lin : Graines (1), Hampe florale (2), Fleur (3), Capsules vertes (4). C : Classification du lin cultivé ; la nouvelle classification revue par Chase et al. (1998) a été prise en compte.

se développe des axes secondaires, rarement plus de cinq, qui peuvent se ramifier à leur tour. Chaque ramification, dont l'intensité est un caractère variétal, donne naissance à une fleur qui forme à son tour la capsule et les graines. La partie inflorescente représente à peu près 1/5 de la hauteur totale de la plante.

Les feuilles simples, allongées et sessiles sont insérées le long de la tige selon une disposition spiralée formée par la superposition de trois hélices foliaires (Meicenheimer, 1992). L'angle moyen de deux feuilles consécutives est d'environ 145° et, sur la même génératrice, la distance entre deux feuilles varie entre 10 et 15 cm.

b - La fleur et sa fécondation

La fleur est construite sur le type 5 (figure 1). Sa durée n'est que de quelques heures; elle s'épanouit tôt le matin et se fane à la mi-journée. La couleur des pétales va du célèbre bleu dans les types purs, jusqu'au blanc rosé, en passant par le rose violacée dans les races hybrides.

Le lin cultivé est une plante autogame : quand la fleur s'ouvre, l'auto-pollinisation a déjà eu lieu (Gürbüz, 1999). L'ovaire se transforme en une capsule à cinq loges contenant normalement chacune deux graines. La proportion de fécondation croisée reste généralement faible (1 à 2 % pour les lins textiles); les rares hybrides naturels étant le fait d'insectes.

1.3 - ANATOMIE DE LA TIGE

a - Localisation des fibres

Les fibres de lin se situent dans la tige où elles ont une fonction de soutien (McDougall et al., 1993; Roland et al., 1995). L'examen au microscope d'une coupe transversale d'une tige (figure 2) permet de distinguer classiquement plusieurs zones concentriques (Bossuyt, 1941; Crozier, 1950). La tige présente une couronne de faisceaux de fibres localisée entre les tissus périphériques de l'écorce (l'épiderme et le parenchyme cortical) et les tissus du cylindre central formés, de l'extérieur vers l'intérieur, par le phloème secondaire (*i.e.* le liber), le cambium vasculaire et le xylème secondaire (*i.e.* le bois). Le nombre de faisceaux fibreux est variable selon les cultivars.

En coupe longitudinale, ces faisceaux fibreux apparaissent parallèles à l'axe de la tige et constitués de plusieurs centaines de cellules fibreuses appelées fibres élémentaires (Anderson, 1927; Esau, 1943; Sotton et Monroq, 1977). Ces dernières sont accolées les unes aux autres, fortement soudées par un ciment interstitiel (I.T.L., 1988). Dans le sens longitudinal, les fibres démarrent à

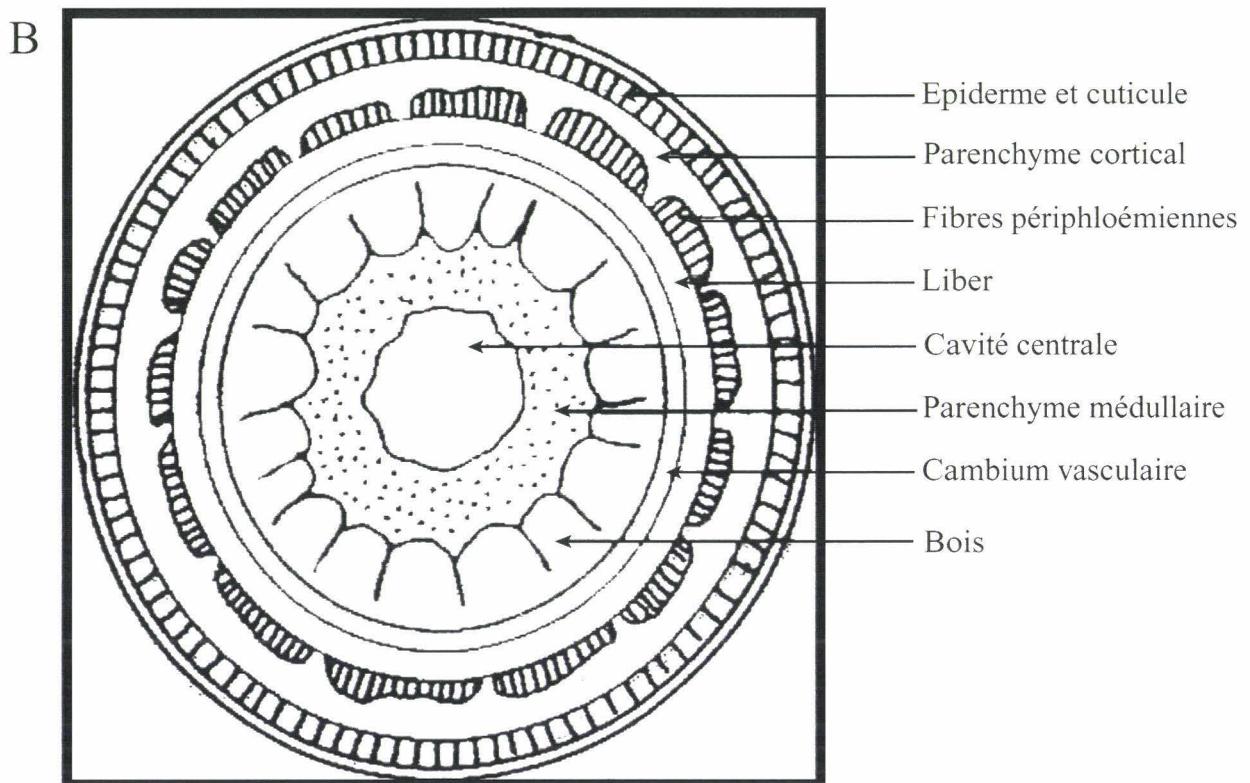
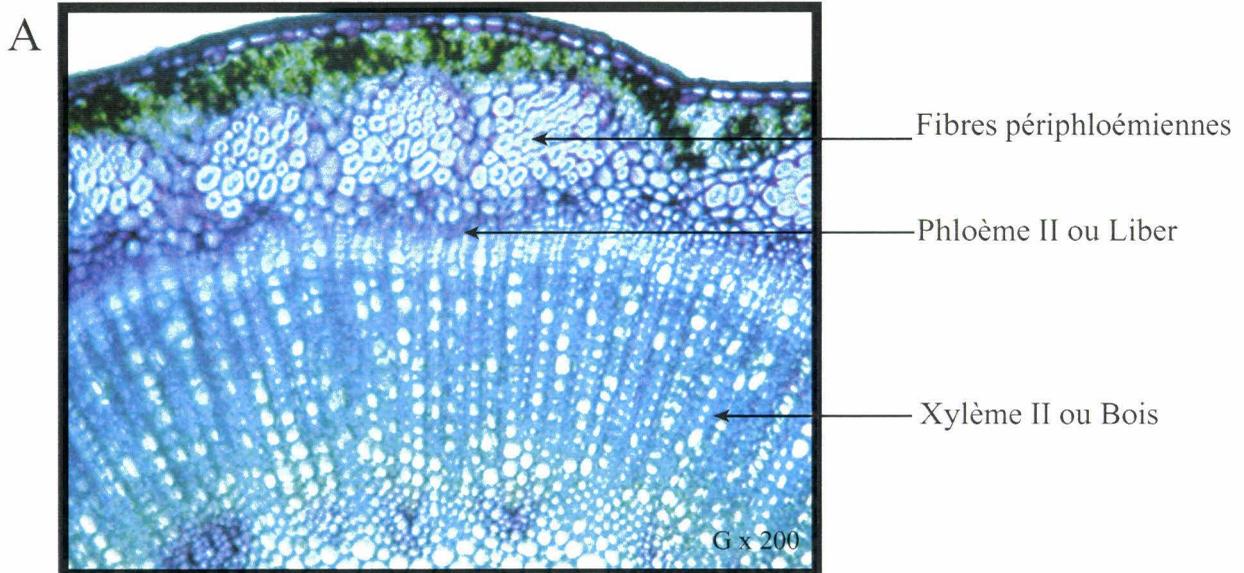


Figure 2 : Organisation tissulaire d'une tige de lin montrant la localisation des fibres cellulosiques d'intérêt industriel.

A : Coupe transversale d'une tige de lin au stade floraison colorée au bleu de méthylène et observée en microscopie optique. B : Schématisation des tissus d'une coupe transversale de tige de lin.

l'aisselle d'une feuille et se terminent en pénétrant dans la feuille suivante située sur la même génératrice. L'endroit où les fibres sortent de la couronne fibreuse pour pénétrer dans la feuille est appelée "brèche foliaire". La disposition en spirale des feuilles induit à un décalage longitudinal des fibres élémentaires dont la longueur varie de 10 à 150 mm de telle sorte que la longueur des faisceaux fibreux est sensiblement égale à la hauteur de la tige (Heude, 1961; Lourd, 1964). Il existe ainsi une corrélation entre la longueur des fibres élémentaires et la distance inter-foliaire : pour une même hauteur de tige, la longueur des fibres sera fonction du nombre de feuilles mais aussi de leur disposition.

b - Caractéristiques des fibres

La fibre élémentaire de lin est une cellule multinucléée (Anderson, 1927) ne présentant pas de cloisonnement interne. Aucune division cellulaire n'a lieu dans les faisceaux fibreux malgré les diverses phases mitotiques du noyau des cellules fibreuses (Esau, 1943).

Au sein d'une même tige, la distribution en nombre des fibres élémentaires présente une grande hétérogénéité (Morvan et al., 1989a). Leur dispersion est irrégulière et suit une loi logarithmo-normale (Lourd, 1964). L'étude de la longueur des fibres élémentaires au sein d'une tige de lin d'une hauteur de 90 cm et d'un diamètre moyen de 2 mm révèle également de fortes disparités (figure 3) :

- La partie basale contient de nombreuses fibres élémentaires courtes présentant en coupe transversale des sections variées et un important lumen.
- La partie médiane des tiges contient les fibres élémentaires les plus longues (jusqu'à 150 mm) lesquelles possèdent un très petit lumen. Cependant, la présence de fibres courtes au sein des faisceaux abaisse la longueur moyenne des fibres élémentaires dans cette partie.
- La partie apicale des tiges est constituée d'un mélange de fibres longues (jusqu'à 60 mm) et de fibres courtes, ces dernières étant en proportion plus élevée que dans la partie médiane.

Le diamètre des fibres élémentaires varie dans les parties médiane et apicale entre 8 et 25 μm , la moyenne se situant aux environs de 18 μm . Aucune corrélation ne semble exister entre le diamètre et la longueur de ces cellules, bien que ces deux dimensions puissent varier considérablement (Esau, 1943; Lourd, 1964; McDougall et al., 1993).

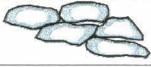
	Parties de la tige	Schématisation des fibres élémentaires	Longueur moyenne en mm	Pourcentage en nombre	Pourcentage en masse
90 cm					
72 cm	Apicale		10	23,9	13,3
57 cm	Médiane		14	53,5	58,5
10 cm	Basale		8	22,6	28,2
0 cm					
		Tige entière :	12,6	100	100

Figure 3: Hétérogénéité des fibres élémentaires dans la tige de lin (d'après I.T.L.).

c - La fibrogénèse

Les fibres élémentaires se différencient dans la tige à partir de cellules initiales situées en périphérie du protophloème, sous un manchon cortical de parenchyme chlorophyllien (Esau, 1942;1943). Très rapidement, ces cellules forment des massifs, *i.e.* les faisceaux fibreux, de quelques dizaines d'unités disposés en un arrangement circulaire à proximité extérieure immédiate du phloème. Au sein de ces faisceaux, le développement des cellules n'est pas synchrone : il concerne d'abord les cellules les plus externes puis progresse en direction centripète (Jacquemart et Fourcroy, 1961). Le suivi de la croissance apicale intrusive de ces cellules initiales révèle une progression bidirectionnelle (Esau, 1943; Schoch-Bodmer et Huber, 1951). Cette phase de grandissement des cellules initiales s'intensifie jusqu'à la floraison puis devient plus faible. La croissance en harmonie de la tige et des fibres élémentaires expliquerait la longueur inhabituelle de ces dernières (Esau, 1943).

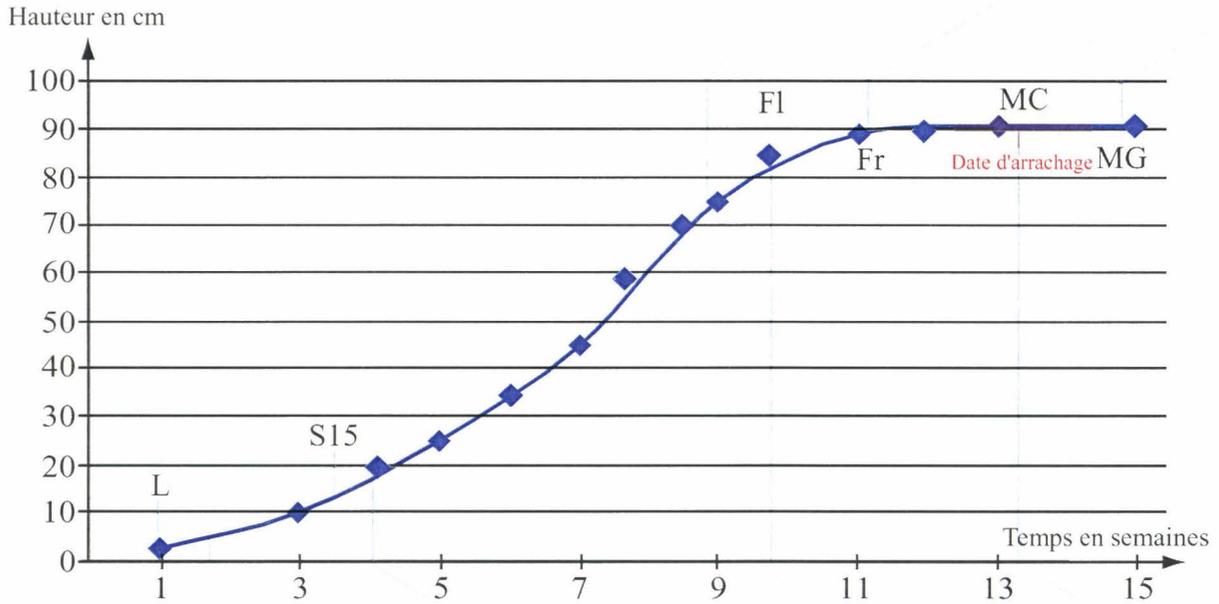
Parallèlement à cette croissance longitudinale, le diamètre de ces cellules augmente (Anderson, 1927). Pour les cellules fibreuses les plus périphériques, cet épaissement pariétal commence sensiblement lors du début du fonctionnement cambial et l'oblitération des tubes criblés du protophloème. Au stade floraison, le potentiel de richesse en fibres est atteint; au-delà, les fibres subissent majoritairement des réarrangements structuraux. Parmi ces derniers, leur épaissement pariétal s'amplifiant à partir de ce stade reste le plus remarquable. Ce phénomène conduit à l'oblitération du lumen des cellules entraînant une régression des ribosomes, une dissociation et une lipophanérose des membranes puis la disparition du plasmalemme (Roland et al., 1995). Pour une fibre élémentaire donnée, cette étape "de remplissage", selon les termes des liniculteurs, dure trois à cinq semaines en fonction des conditions climatiques et influe de ce fait sur la qualité des fibres. A leur maturité, ces dernières représentent en moyenne 25 % de la masse sèche des tiges dépourvues de leurs graines.

II - LA DYNAMIQUE DE CROISSANCE DU LIN A FIBRES

a - Les paramètres édaphiques

Les lins textiles nécessitent un climat tempéré et humide. De ce fait leur culture, en Europe est principalement limitée à la Belgique et à la France, contrairement aux lins oléagineux pouvant subir des climats plus méridionaux (Hassan et Leitch, 2000).

Les sols produisant d'abondantes fibres de bonnes qualités se révèlent silico-argileux, légèrement acides, de consistance moyenne, pourvus en humus, profonds et perméables (Sultana, 1992a).



MOIS	PRATIQUES CULTURALES
Fin mars - 1ère quinzaine d'avril	Semis
Avril - mai	Entretien de la culture
Juin	Arrachage
Juillet	Rouissage au champ
Août	Rentrée
Août - Septembre	

Floraison

Figure 4 : Calendrier du lin.

A: Longueur des tiges de lin en fonction du nombre de jours de croissance. Les stades phénologiques majeurs sont indiqués sur la courbe : L : levée; S15 : stade 15 cm; Fl : floraison; Fr : fructification, MC : maturation des capsules (capsules jaunes-brunes); MG : maturation des graines. B : Technique cultural selon les mois (d'après I.T.L., 1988).

Les cultures de lin ne doivent pas se succéder sur le même terrain avec des intervalles trop rapprochés (au minimum 6 -7 ans (I.T.L., 1988)) afin d'éviter la fatigue du sol et la prolifération de maladies cryptogamiques. Le lin doit donc entrer dans un assolement. Comme précédent, une culture céréalière est généralement recommandée (Sultana, 1992a).

b - Le développement de la plante

La croissance du lin est rapide, de la levée à la maturité, il s'écoule entre 90 et 110 jours au cours desquels la tige atteint sa hauteur maximale (figure 4, A). Les stades phénologiques ne sont pas aussi nets que ceux d'autres espèces, céréalières ou légumineuses. Les étapes les plus notoires du développement des lins sont au nombre de cinq (Morvan et al., 1989b) :

- De la levée au stade 15 cm : cette phase déterminant le potentiel de la richesse en fibre s'achève par l'induction de l'apex des tiges à la phase reproductive (Jacquemart et Fourcroy, 1961).
- Du stade 15 cm à la floraison : stade de pleine croissance végétative, le lin passe d'une hauteur de 15 cm à 80 - 90 cm. C'est une période de grande sensibilité à la verse.
- Du stade floraison à la fructification (capsules formées vertes).
- Du stade capsules vertes aux stades capsules jaunes-brunes. Ce dernier stade correspond à la maturité des fibres périphloémiennes.
- Du stade capsules jaunes-brunes au stade capsules brunes, *i.e.* maturité des graines.

La datation de ces différentes étapes du développement des lins reliées aux pratiques culturales est indiquée figure 4, B.

c - La récolte

La destination et l'emploi des fibres conditionnent la date de récolte des lins : si une grande finesse des fibres est recherchée, une récolte précoce sera privilégiée, à l'inverse des dates tardives permettront l'obtention de fibres plus résistantes.

Aujourd'hui, l'estimation de la maturité des fibres est plus technique que botanique (I.T.L., 1988). Le marché demandant des fibres fines et solides et les graines étant également récoltées pour la production de semence, la date de récolte reste un compromis entre maturité des fibres et maturité des graines. Ainsi, pour satisfaire ces objectifs, les lins sont considérés à maturité environ 4 semaines après la floraison. Cette étape se caractérise par un jaunissement complet de la tige, une chute des feuilles sur les 2/3 inférieures des tiges et un léger brunissement des capsules. Les lins sont alors arrachés à l'aide de matériels agricoles spécifiques (figure 5).

III - LA TRANSFORMATION AGRO-INDUSTRIELLE DU LIN A FIBRES

Les techniques afférentes à la transformation du lin sont singulières. En effet, les fibres étant constitutives de la tige, leur utilisation nécessite préalablement leur désolidarisation des tissus environnants. Ce travail se subdivise principalement en deux opérations : le rouissage puis le teillage.

Les fibres de lin teillées peuvent ensuite être vendues aux industries textiles où elles seront filées et/ou aux industries chimiques où elles pourront servir à la fabrication de bio-polymères.

3.1 - LE ROUISSAGE

Ce procédé représente l'une des plus anciennes biotechnologies comme l'atteste des documents archéologiques trouvés dans des cités sub-lacustres (Roland et al., 1995). Cette première étape de traitement des tiges de lin consiste en une décomposition enzymatique "contrôlée" des ciments intercellulaires aidant ainsi à la désolidarisation des faisceaux fibreux et à la séparation ultérieure du bois des fibres (Sharma et al., 1992; Henriksson et al., 1997).

Traditionnellement, le rouissage peut s'effectuer de deux façons : à l'eau ou "au champ". Toutefois, les aléas dus à ces deux techniques ont conduit au développement d'une nouvelle méthode, le rouissage enzymatique et à l'optimisation d'une ancienne méthode : le rouissage chimique (Van Sumere, 1992; Sharma et al., 1999a).

a - Le rouissage à l'eau

C'est la méthode "noble" par excellence. Toutefois cette pratique est de plus en plus abandonnée pour des raisons économiques et écologiques. Ce rouissage, autrefois pratiqué en rivière, s'effectue maintenant en cuve dans de l'eau à 37°C. Les bactéries anaérobies se développant au cours de la fermentation relarguent diverses enzymes produisant une dégradation progressive des ciments intercellulaires (Sharma et al., 1992). Ce mode de rouissage, très contrôlable, produit cependant des fibres à l'odeur nauséabonde et de couleur sombre (Van Sumere, 1992). Quand le rouissage est terminé, la paille est sortie de la cuve puis séchée.

b - Le rouissage à terre

Ce mode de rouissage, le plus employé actuellement (75 % de la production mondiale (Sultana, 1992a)) malgré son efficacité inférieure par rapport au rouissage à l'eau (Sharma et al., 1999a), s'effectue immédiatement après la récolte (figure 6). Les lins arrachés sont couchés en andain sur le terrain même de la culture. L'alternance des pluies, des rosées, des vents et du soleil va

permettre la prolifération sur les tiges de lin de bactéries et de champignons telluriques (Sharma, 1986b; Henriksson et al., 1997; Akin et Rigsby, 1998). Les enzymes secrétées par ces microorganismes provoquent une désagrégation du ciment interfibre conduisant à la perte de la cohésion tissulaire (Sharma et al., 1992). Afin d'homogénéiser ce traitement biologique, les andains de paille sont régulièrement retournés. Les tiges passent ainsi de l'or pâle aux roux puis au gris. Quand le degré de rouissage se révèle satisfaisant, ce qui, dans les meilleures conditions, survient au bout de trois semaines, la paille séchée est pressée en bottes puis récoltée. Ces dernières sont alors stockées quelque mois avant que les tiges soient teillées afin de pallier les irrégularités du séchage au champ.

Ce rouissage apparaît donc comme une étape empirique grandement dépendante des conditions climatiques. Ces conditions aléatoires s'ajoutent inévitablement à l'hétérogénéité qualitative des fibres. De telles limites deviennent de plus en plus inacceptables pour les industriels demandant une qualité constante de la matière première brute. Les tentatives d'amélioration du rouissage au champ (pulvérisation de spores fongiques, de bactéries, d'agents chimiques) se sont avérées efficaces mais la qualité du rouissage reste indissociable des conditions climatiques (Sharma et al., 1999b; Easson et Cooper, 2002; Goodman et al., 2002).

c - Le rouissage enzymatique

Les tiges de lin arrachés sont incubées en présence d'enzymes dégradant les composés pariétaux notamment au niveau des zones inter-fibres. Globalement deux méthodes sont employées : i. la pulvérisation d'un cocktail enzymatique sur les tiges de lin (Akin et al., 2000) et ii. l'immersion des tiges dans une solution enzymatique (Van Sumere, 1992). Dans ces deux cas, le mélange actif utilisé (Flaxyme®, Ultrazym®, Viscozyme®...) contient diverses enzymes (cellulases et/ou pectinases et/ou xylanases) (Easson et al., 1998; Henriksson et Eriksson, 1998; Mooney et al., 2001; Akin et al., 2002). D'un point de vue général, cette méthode apparaît fiable, très efficace et peut être étroitement contrôlée. Néanmoins, son coût élevé constitue une limite majeure à son utilisation (Akin et al., 2003) qui peut en outre altérer la couleur des fibres (Epps et al., 2001).

d - Le rouissage chimique

Ce mode de rouissage emploi des agents chimiques (acides, bases, chélateurs) afin de désolidariser les éléments fibreux de la tige. Les lins arrachés sont plongés dans diverses solutions pendant quelques heures, parfois à des températures élevées sous atmosphère contrôlée (Van Sumere, 1992; Rognes et al., 2000). Certes rapide, le rapport qualité de rouissage/coût de

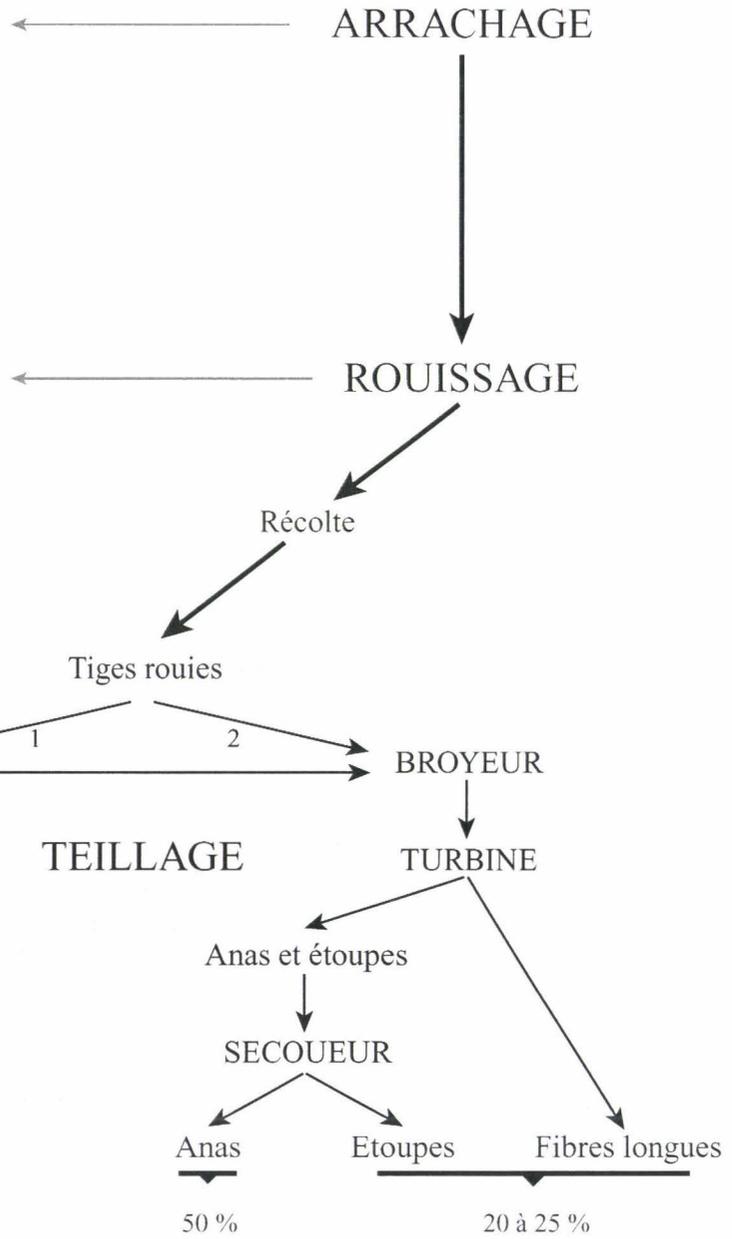


Figure 5: Traitements des lins à fibres après leur arrachage et diagramme général du teillage du lin (d'après I.T.L.). Les proportions en produits et sous-produits d'un lin à fibres sont indiquées en pourcentage de masse. 1 et 2 font référence à des lins égrenés ou non avant récolte respectivement.

cette méthode parfois très polluante reste globalement faible. Seule, la technique d'hydrolyse-flash semble se développer, ce procédé ayant de bons rendements quantitatifs et qualitatifs et n'étant pas spécifique au lin (Sotton et Ferrari, 1989).

3.2 - LE TEILLAGE

Cette étape mécanique consiste en l'extraction des fibres désolidarisées des tissus environnants par l'action du rouissage (Sultana, 1992b). Globalement, lors du teillage (figure 5), les tiges de lin rouies sont battues permettant ainsi l'élimination de l'épiderme (sous forme de poussières), du bois (sous forme de petits fragments appelés anas) et de fibres courtes (étoupes). Les fibres longues obtenues sont triées manuellement avant d'être pressées puis commercialisées. Selon les années, les conditions de culture, les variétés et le degré de rouissage, le rapport fibres longues/étoupes peut varier de 1 à 3.

3.3 - UTILISATION DES FIBRES DANS L'INDUSTRIE TEXTILE : LA FILATURE

Cette étape est propre aux fibres de lin utilisées dans l'industrie textile. La grande hétérogénéité des fibres ne permet pas l'emploi de méthodes conventionnelles du type "coton" (Sotton et Sata, 1986; Anthony, 2002). La filature regroupe l'ensemble des opérations indispensables à la transformation des fibres de lin teillées en fil aussi régulier que possible. La filature se divise communément en plusieurs étapes décalées dans le temps (figure 6) (I.T.L., 1988; Ross, 1992) :

- Le peignage. Cette première étape a pour rôle de dénouer et paralléliser les fibres tout en continuant le nettoyage réalisé lors du teillage. Le rapport lin peigné/lin teillé est généralement compris entre 60 et 70 %. Il ressort de cette étape des fibres courtes (étoupes) et des fibres longues.
- La préparation du lin peigné. Cette phase a pour but de préparer, à partir des fibres longues, une mèche aussi homogène que possible et de qualité constante pour produire le fil. Cette opération mécanique parfait la parallélisation et améliore la finesse des éléments fibreux constitués généralement à ce stade d'un seul faisceau.
- La filature proprement dite. Deux modes de filatures sont employés selon la qualité du fil désiré. La filature "au sec", très semblable à la filature de la laine, produit des fils grossiers car l'élément fibreux, constitué de fibres techniques ou d'étoupes, est lui-même très grossier. La filature "au mouillée", spécifique aux fibres longues de lin, s'effectue après immersion des

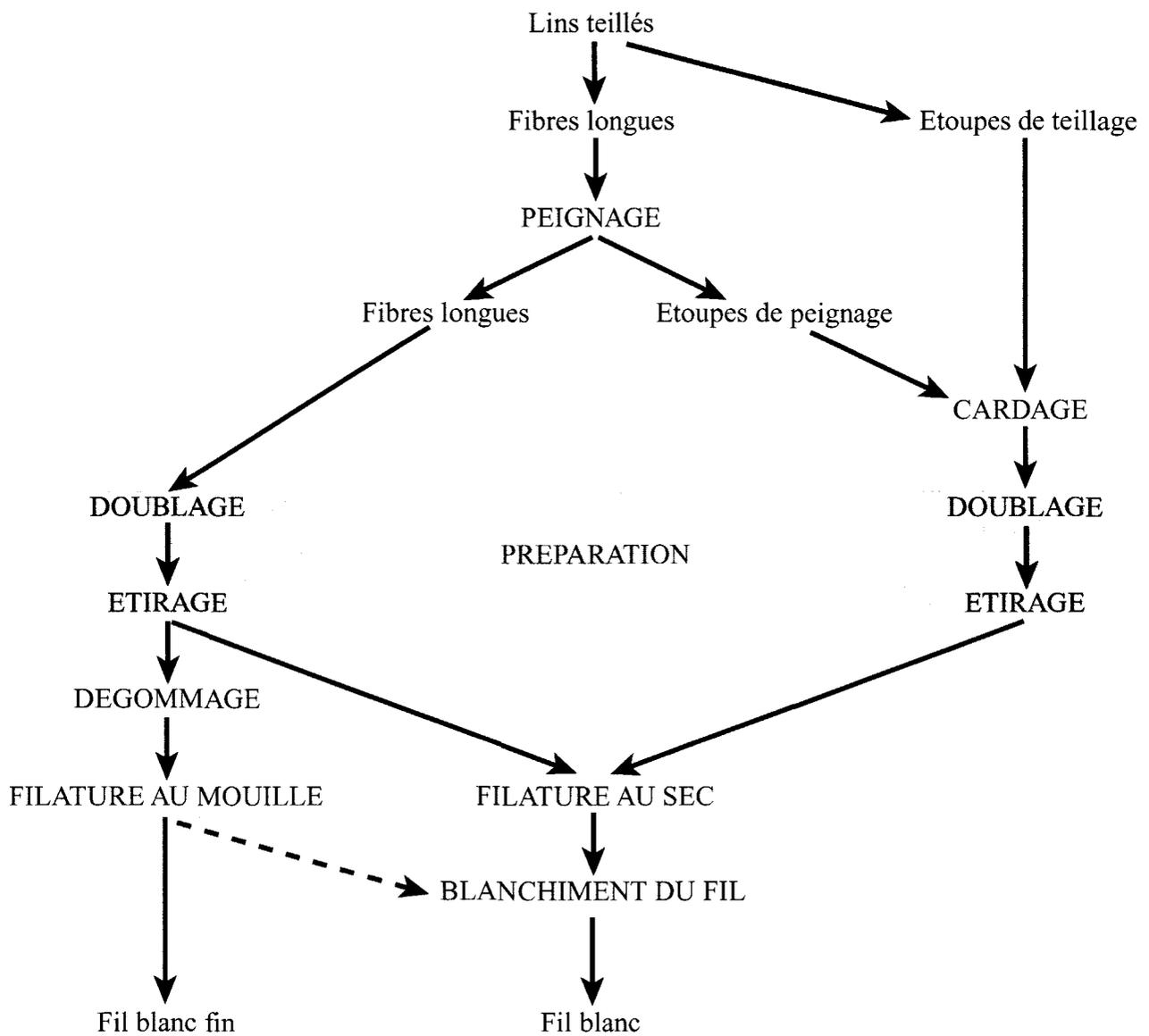


Figure 6 : Schéma synoptique simplifié du filage des fibres de lin (d'après I.T.L.).

Les étoupes issues du teillage et/ou du peignage sont également utilisées en filature au sec. Leur qualité inférieure par rapport aux fibres longues implique une voie séparée présentant une étape supplémentaire (cardage) consistant globalement à nettoyer ces fibres courtes.

mèches dans l'eau chaude et donne des fils plus fins et plus réguliers. Cette filature nécessite préalablement une étape de dégomme. Cette opération améliore la dissociation des fibres élémentaires affinant les éléments fibreux. Le dégomme s'effectue par traitement des fibres au carbonate de soude puis, en cas de blanchiment, à l'eau oxygénée. La cohésion entre les éléments fibreux est assurée par une torsion permettant ainsi d'obtenir de longs fils (Archibald, 1992; Van Langenhove et Briuggeman, 1992).

3.4 - UTILISATION DES FIBRES DANS LES COMPOSITES

La recherche constante d'un rapport minimum résistance mécanique/taille et/ou poids pour les matériaux ont conduit les industriels à s'orienter vers les fibres végétales. La résistance mécanique reste le premier critère de choix des fibres utilisées, leur fonction principale étant d'absorber les contraintes mécaniques subit par le polymère (Rouilly et Rigal, 2002; Zini et al., 2003).

L'incorporation de fibres de lin dans des résines polyéthylène, polypropylènes, isocyanates, époxy s'est avérée judicieux tant d'un point de vue coût, technique qu'écologique (fibres de lin dans les habillages intérieurs des voitures pour exemple) (Hornsby et al., 1997; Eichhorn et al., 2001; Van de Velde et Baetens, 2001; Lamy et Pomel, 2002; Papadopoulos et Hague, 2003). Leur emploi implique une succession d'étapes très variables selon la résine employée pour enrober les fibres et l'utilisation finale du composite. Globalement, les fibres teillées sont coupées en fragments de quelques cm de long avant de subir différents traitements physiques (thermiques, électriques...) et/ou chimiques (acides, couplages avec diverses molécules, imprégnation). Ces traitements permettent à la fois d'homogénéiser leurs propriétés, de favoriser les interactions fibres-matrice (les propriétés des composites dépendent essentiellement de l'adhésion entre les fibres et la matrice enrobante), de préparer les fibres aux températures élevées employées lors de la fabrication du composite et de limiter leur dégradation au sein de ce dernier (Bledzki et al., 1996; Bismarck et al., 2002; Van de Weyenberg et al., 2003; Zini et al., 2003). En effet, la biodégradation des fibres mais aussi leur hydrophilie et leur hétérogénéité qualitative constituent des freins majeurs au développement de ces bio-composites (Bismarck et al., 2002; Papadopoulos et Hague, 2003).

IV - LES PROPRIETES DES FIBRES DE LIN

Les fibres de lin sont réputées pour leur haut pouvoir d'absorption de l'eau. Après peignage, ces fibres peuvent retenir une masse d'eau égale à leur masse sèche (Morvan et al., 1990). Cette propriété néfaste dans les bio-polymères est très appréciée dans l'industrie textile (sensation de fraîcheur des vêtements en lin).

L'architecture pariétale des fibres de lin leur confère des propriétés exceptionnelles très recherchées dont la principale réside dans leur résistance à l'étirement. A cet égard, les fibres de lin sont les plus solides des fibres végétales et dans l'échelle de résistance des matériaux, leur force de tension à la rupture (jusqu'à 2000 Mpa) est comparable à certains aciers et certains verres (Bossuyt, 1941; Eichhorn et al., 2001; Bos et al., 2002; Rouilly et Rigal, 2002). L'association longueur de fibre-grande résistance mécanique est très rare, cette relation étant généralement inversement proportionnelle.

En revanche, la réponse des fibres de lin au flambage, *i.e.* forces latérales dues aux cisaillements, est faible. Ces contraintes provoquent très généralement des zones de faiblesse (structures "genoux") qui induisent une diminution de la charge à la rupture. De même la résistance des fibres aux forces de compression, déterminée par une succession de contraintes d'étirement et de relâchements conduit à la formation de nombreuses structures "genoux". Le rapport résistances aux tensions/compressions est ~80 % pour ces fibres (Bos et al., 2002; Van de Velde et Kiekens, 2002).

La composition et l'architecture de la matrice pariétale des fibres déterminant leurs propriétés (Hearle, 1963; Morvan et al., 1990; Bos et al., 2002; Astley et Donald, 2003), l'étude de ces deux paramètres intrinsèques permettra une compréhension plus approfondie de leur réactivité et de leur comportement physico-chimique.

B – ORGANISATION, COMPOSITION ET ARCHITECTURE DES PAROIS VEGETALES

Depuis sa découverte en 1765 par Robert Hooke, la paroi végétale a longtemps été considérée comme une structure statique (Carpita et Gibeaut, 1993). Depuis une trentaine d'années et l'élaboration des premiers modèles architecturaux de la paroi végétale (Keegstra et al., 1973; Talmadge et al., 1973), cette dernière se définit maintenant comme une structure extracellulaire organisée, vitale, dynamique et remodelable sous le contrôle de la cellule qu'elle entoure. En effet, la cellule régule les dépôts de substances néo-synthétisées de nature essentiellement polysaccharidiques (cellulose, hémicelluloses, pectines), protéiques et phénoliques (lignine, acides phénoliques) et généralement de type polymérique. La cellule dirige également l'organisation supra-moléculaire des composés pariétaux dont l'architecture résultante joue un rôle prépondérant dans sa physiologie. Par sa situation, sa composition et son architecture, la paroi assure *in planta* de nombreuses fonctions vitales, mécaniques, physiologiques, morphologiques et ceci tant aux niveaux cellulaire, que tissulaire, qu'à l'organe et à la plante entière (Goodwin et Mercer, 1990).

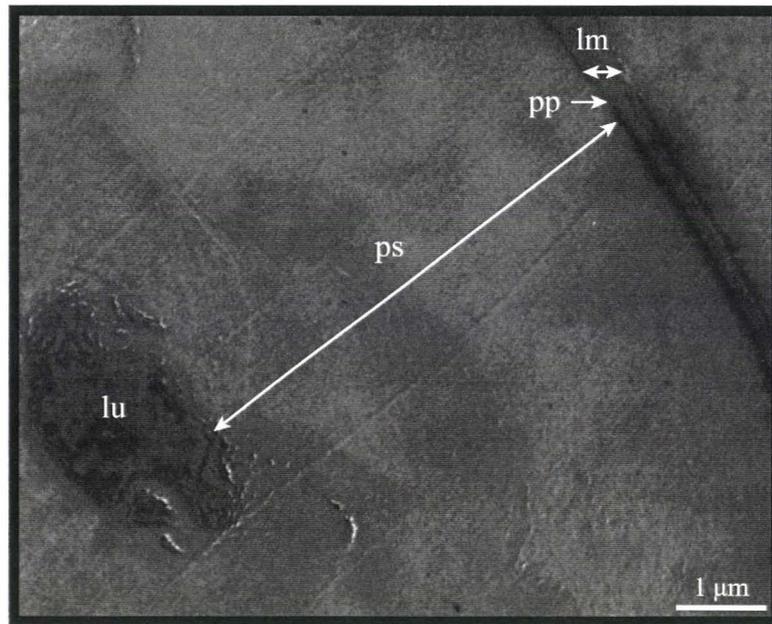
I - ORGANISATION DES PAROIS VEGETALES

Malgré la grande diversité taxonomique, tissulaire et cellulaire, une caractéristique générale est commune à toutes les parois, ce sont des structures hétérogènes constituées de différentes couches : une lamelle moyenne, une paroi primaire et généralement une paroi secondaire (Goodwin et Mercer, 1990). Les parois se distinguent de la lamelle moyenne par leur architecture fibrillaire (cellulose) enrobée dans une matrice amorphe non cellulosique. Les fibres élémentaires du lin constituent un exemple de cette organisation tripartite, leur paroi pouvant représenter 95 % de la section transversale des cellules matures (figure 7, A).

1.1 - LA LAMELLE MOYENNE

La lamelle moyenne est la formation la plus périphérique (figure 7, A) et est commune aux cellules contiguës. Cette assise pariétale, véritable enveloppe hydrophile polyanionique, possède des propriétés physico-chimiques lui permettant d'assurer la cohésion intercellulaire (Saka et Goring, 1983). Ainsi, la modification de sa composition, sous l'influence de facteurs internes et/ou externes (dégradation par des microorganismes) va conditionner l'adhésion intercellulaire (Westermarck et al., 1986).

A



B

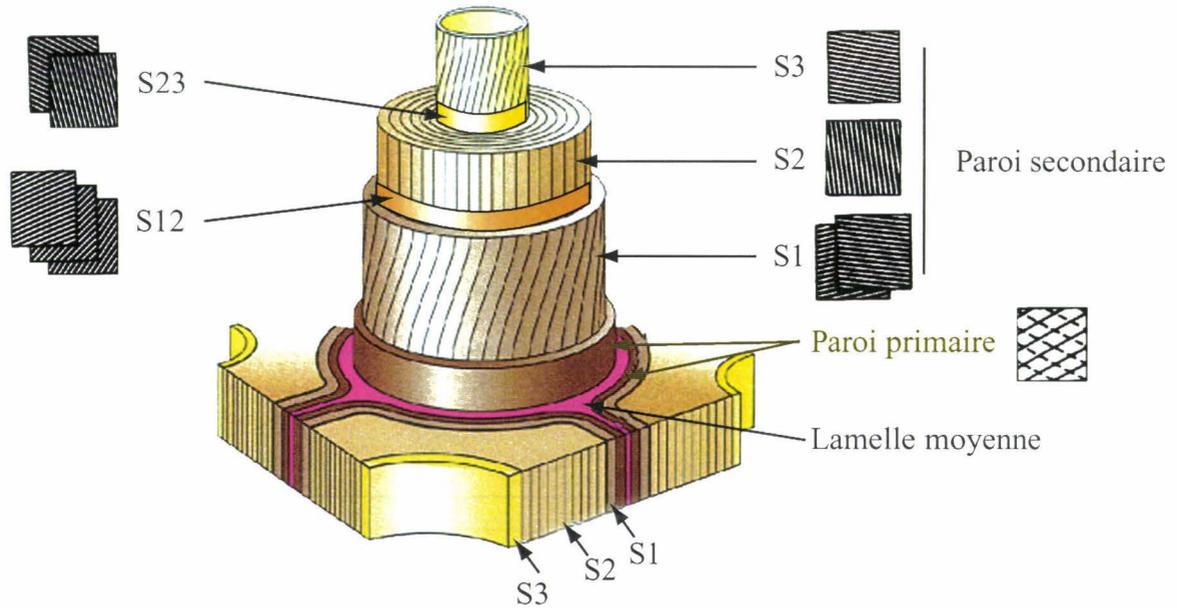


Figure 7 : Structure tripartite des parois végétales.

A : Organisation pariétale des cellules fibreuses périphloémiennes : coupe transversale d'une fibre de lin mature contrastée au PATAg et observée au microscope électronique à transmission. lm : lamelle moyenne; pp: paroi primaire, ps : paroi secondaire; lu : lumen.

B : Diagramme schématique de l'organisation de la paroi d'une cellule xylémienne montrant l'orientation des microfibrilles de cellulose dans les différentes couches pariétales (lamelle moyenne, paroi primaire et paroi secondaire) et sous couches de la paroi secondaire (S1, S2 et S3). S12 et S23 sont des sous couches intermédiaires peu épaisse entre S1 - S2 et S2 - S3 respectivement (d'après Wardrop et Bland, 1959; Fujita et Harada, 1990).

1.2 - LA PAROI PRIMAIRE

Cette assise pariétale plus interne (figure 7, A) possède une épaisseur voisine de 100 nm. Cette paroi, très hydrophile (l'eau pouvant représenter 90 % de son poids), caractérise les stades précoces du développement (Carpita et Gibeaut, 1993; Cosgrove, 1999). Elle constitue la seule structure fibrillaire des cellules jeunes et en croissance, ses principales propriétés sont donc l'élasticité et la plasticité (Barnoud, 1980).

1.3 - LA PAROI SECONDAIRE

Certaines cellules se différencient par un épaississement pariétal, *i.e.* la paroi secondaire. La formation de cette structure débute une fois la taille définitive des cellules atteinte. Ces parois, situées entre le plasmalemme et la paroi primaire sont peu hydrophiles, peu hydratées (~20 % d'eau), inextensibles et compactes. Son épaisseur peut être 100 fois plus importante que la paroi primaire. Dans les fibres de lin cette structure secondaire pouvant représenter 90 % de la section transversale des cellules (figure 7, A) est associée à leurs propriétés physico-chimiques remarquables. Plus généralement, les parois secondaires sont associées à une fonction de soutien (fibres périphloémiennes et xylémiennes) et/ou de conduction (vaisseaux xylémiens) (Mellerowicz et al., 2001).

La structures de parois secondaires est fortement dépendante de la différenciation cellulaire. L'organisation de ces parois apparaît toujours très précises et spécifique résultant d'une régulation très fine où interviennent des facteurs externes et internes. D'un point de vue structural, ces parois secondaires semblent présenter un degré d'organisation supérieur comparé aux parois primaires.

Il a été mis en évidence dans les parois secondaires des fibres xylémiennes, une structure pluri-stratifiée où trois régions sont généralement différenciables, numérotées selon l'ordre de leur formation : S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne) (Figure G, B) (Wardrop et Bland, 1959; Fengel et Wegener, 1984). De fines sous-couches intermédiaires (S12 et S23) existent entre ces strates. Ces différentes couches diffèrent par leur composition chimique et par l'orientation de leurs éléments structuraux, notamment de leur architecture fibrillaire. La part relative de ces différentes sous-couches pouvant être dépendante de facteurs environnementaux et hormonaux est susceptible de varier (Mellerowicz et al., 2001; Wodzicki, 2001).

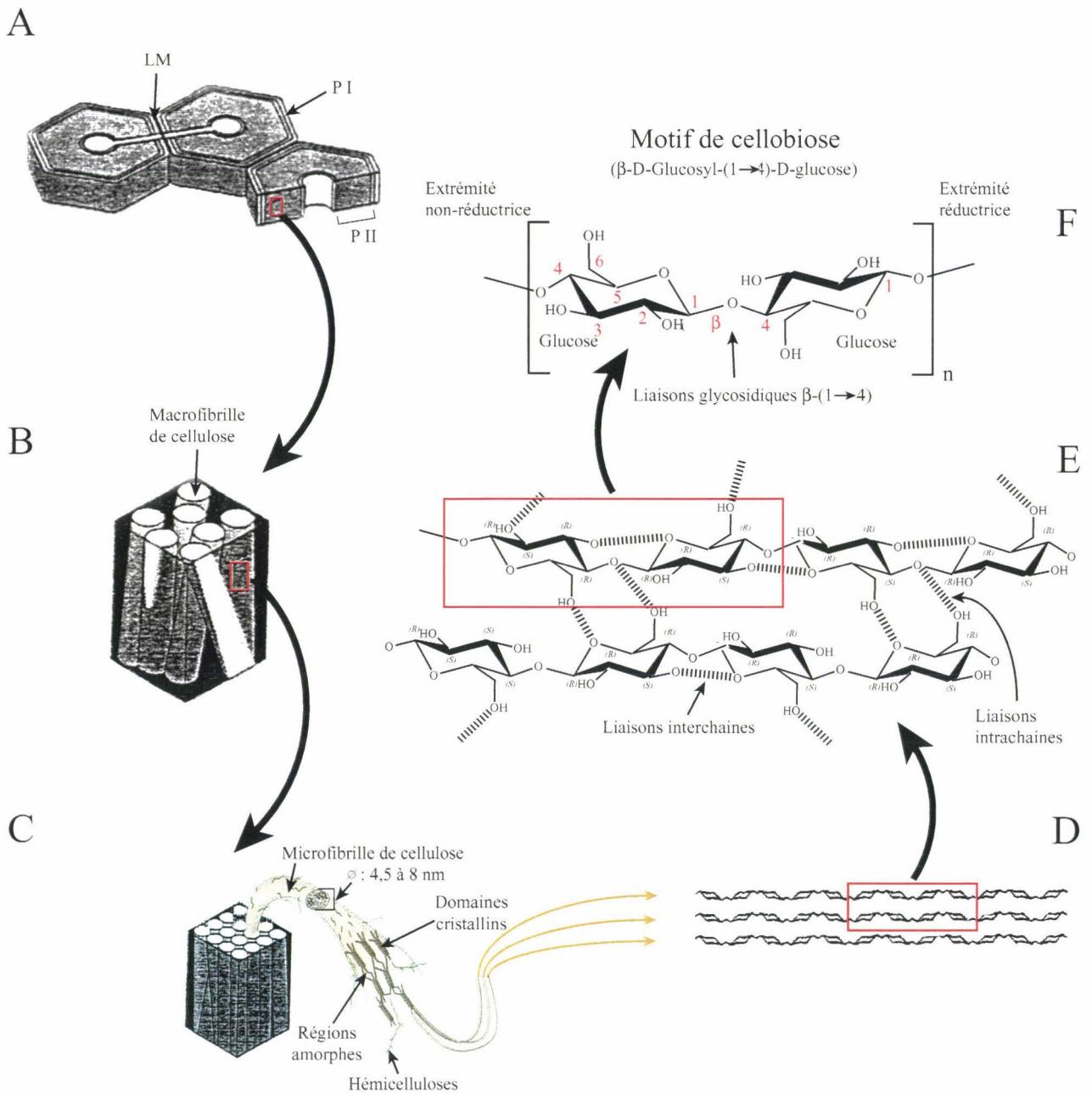


Figure 8 : Organisations supramoléculaire et moléculaire de la cellulose dans les parois cellulaires (d'après McDougall et al., 1993).

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, le cellobiose.

II - COMPOSITION MOLECULAIRE DES PAROIS

La composition moléculaire des parois diffère fortement selon la structure pariétale élaborée conditionnant leurs propriétés physico-chimiques et mécaniques respectives (Roland, 1980). La paroi peut être assimilée à un composite tant par sa structure tripartite que par son architecture globale (Reis et al., 1994; Salmen et Olsson, 1998; Wilson et al., 2000).

2.1 - LES COMPOSES POLYSACCHARIDIQUES

Les polysaccharides, longues chaînes linéaires ou ramifiées de sucres, représentent les composants principaux des parois. Dans ces dernières, trois types de polysaccharides majoritaires ont été identifiés : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Goodwin et Mercer, 1990; Gibeaut et Carpita, 1994; Carpita, 1996). Nettement plus minoritaire, la callose constituant le quatrième principal composant polysaccharidique pariétal est synthétisée généralement lorsque la cellule est endommagée (Delmer, 1987).

a - La cellulose

Molécule organique la plus abondante de la planète (Barnoud, 1980), la cellulose représente chez les dicotylédones 20 à 30 % de la masse sèche de leurs parois primaires et selon les tissus 40 à 90 % de la masse sèche de leurs parois secondaires (Preston, 1986).

α - Composition et biosynthèse

La cellulose est une supramolécule de formule chimique générique $(C_6H_{12}O_6)_n$. Ce polymère est formé de longues chaînes tendues, homogènes et linéaires de résidus D-glucose, sous forme cyclique glucopyranose, interconnectés par une liaison glycosidique β -(1→4) (figure 8) (Barnoud, 1980; Fry, 1988). Cet homopolymère appartient ainsi à la série des β -D-glucanes; son unité de base répétitive est le cellobiose, diholoside constitué de deux résidus glucose en conformation chaise orientés à 180° l'un par rapport à l'autre et dont la longueur est estimée à 1,03 nm (Delmer et Amor, 1995). Les deux extrémités de la chaîne ne sont pas chimiquement équivalentes polarisant ainsi la molécule de cellulose. A l'une des extrémités, le carbone anomère (C_1) du résidu D-glucopyranose est engagé dans la liaison glycosidique. Par contre à l'autre extrémité, le carbone anomère est libre. Ce dernier portant une fonction héli-acétalique confère des propriétés réductrices à cette extrémité (figure 8, F) (Barnoud, 1980).

La biosynthèse de la cellulose est réalisée par un complexe multienzymatique, appelé rosette, situé au niveau de la membrane plasmique et constitué de six cellulose-synthases. Ces enzymes

catalysent la fixation des molécules d'UDP-glucose à l'extrémité réductrice de la chaîne (Delmer et Amor, 1995; Williamson et al., 2001).

La longueur des chaînes de cellulose, c'est à dire leur degré de polymérisation (DP) est très difficilement appréciable, les méthodes d'extraction et/ou de solubilisation de ce polymère provoquant des coupures intrachânes (Barnoud, 1980). Le DP estimé dans les parois secondaires (DP minimum $\sim 15\,000$) apparaît plus élevé en comparaison des parois primaires (DP maximum $\sim 4\,500$) (Delmer et Amor, 1995).

β - Structure

La conformation tridimensionnelle de la chaîne de cellulose présente une structure très étirée qui correspond à une hélice d'ordre 2, se répétant tous les 1,03 nm, *i.e.* longueur du cellobiose (Goodwin et Mercer, 1990). Le mode de liaison covalent C₁-C₄ entre les résidus glucose laisse libre les hydroxyles substitués sur les autres carbones permettant l'établissement de diverses liaisons hydrogènes qui stabilisent l'architecture tridimensionnelle de la molécule. Les liaisons hydrogènes intrachânes établies entre l'O₅ et l'O₃ de deux résidus glucoses successifs stabilisent le polymère dans son orientation linéaire et lui confèrent une certaine rigidité (figure 8, E). Les liaisons interchânes maintenant les molécules de celluloses parallèles entre elles permettent leur agrégation en microfibrilles dont le diamètre varie entre 4,5 et 8 nm chez les plantes supérieures et pouvant contenir jusqu'à 200 chaînes (~ 36 dans les parois primaires) (figures 8, D et E) (Goodwin et Mercer, 1990; Kuga et Brown, 1991). Dans les parois secondaires un degré d'organisation supérieur est retrouvé : i. ces microfibrilles peuvent s'autoassembler en macrofibrilles (figures 8, H, C) (Delmer et Amor, 1995) et ii. l'orientation des microfibrilles par rapport à l'axe de la cellule est variable selon S1, S2 et S3 (Wardrop et Bland, 1959). S1 et S3 sont constituées de fibrilles très inclinées par rapport à l'axe cellulaire. S2, la plus épaisse, est formée d'un nombre variable d'assises dans lesquelles l'orientation des microfibrilles est plus redressée par rapport à l'axe cellulaire (figures 8, G, B) (Chafe, 1974; Fujita et Harada, 1991).

Les liaisons hydrogène favorisent l'organisation des chaînes en domaines cristallins ordonnés de grandes tailles, les cristallites. La cellulose peut ainsi être considérée comme un système biphasique consistant en cellulose cristalline et en cellulose amorphe. La densité des cristallites, estimée par cristallographie, permet d'évaluer le degré de cristallinité de la cellulose. Ce dernier paramètre est généralement inférieur à 50 % dans les parois primaires assurant ainsi une certaine souplesse et une déformation possible lors de la croissance cellulaire; et pourrait atteindre près de 70 % dans les parois secondaires (Roland et Mosiniak, 1996).

Quatre principales formes allomorphes de la cellulose ont été identifiées : les celluloses I, II, III et IV (Hulleman et al., 1994). La forme I constitue la forme naturelle de la cellulose. Sa structure tridimensionnelle n'est pas encore totalement élucidée car elle présente une grande complexité qui résulte de la coexistence de deux formes cristallines distinctes, appelées cellulose I α et cellulose I β (Atalla, 1984). La forme I β est prédominante chez les végétaux supérieurs (Hulleman et al., 1994; Focher et al., 2001). La cellulose II est obtenue généralement par régénération à partir de solution ou par mercerisation, *i.e.* traitement alcalin des fibres cellulosiques. Les celluloses III et IV sont issues de traitement chimique des celluloses I ou II.

γ - La cellulose des parois secondaires des fibres de lin

Les parois de fibres de lin ont été l'un des premiers matériaux où la réalité des microfibrilles de cellulose a été signalée (Anderson, 1927). La cellulose représente entre 65 % et 85 % de la masse des fibres et constitue 65 à 80 % de leur paroi secondaire (Morvan et al., 1989a; Focher, 1992; Baley, 2002).

Dans ces dernières, 50 à 100 chaînes de cellulose sont associées en fibrilles élémentaires, *i.e.* micelles, elles-mêmes regroupées, par 10 à 20, en microfibrilles. Ces dernières peuvent également s'associer entre elles en macrofibrilles. La surface transversale des microfibrilles est estimée à 5 nm² (Astley et Donald, 2001) et la distance entre deux micelles est estimée à 1 nm et à 10 nm entre deux microfibrilles (Baley, 2002). Une telle organisation induit une porosité estimée à 10 %. La résistance mécanique des fibres est optimisée par la disposition des microfibrilles de cellulose dans la paroi. Leur organisation, parallèles entre elles, selon une orientation variable en fonction des strates dans la paroi secondaire forme une structure dont la résistance optimale aux tractions est longitudinale. Lors des contraintes d'étirement, l'angle d'inclinaison des microfibrilles avec l'axe longitudinal de la cellule diminue, augmentant ainsi sa résistance (Anderson, 1927; Bos et al., 2002).

Par RMN-C¹³, le pourcentage de cristallinité de la cellulose des parois secondaires de ces fibres a été estimé à 74 %, soit une densité cristalline de 1,53 g/cm³ \pm 1 % (Focher et al., 2001; Baley, 2002). Comparées à diverses espèces (kénaf, chanvre) et à différents tissus (bois, fibres de coton) de telles valeurs sont nettement supérieures (Hulleman et al., 1994; Lennholm et al., 1994; Focher et al., 2001). Cette cellulose cristalline est constituée chez le lin de 60 % de cellulose I β et de 25 % de cellulose I α , valeurs comparables au chanvre et respectivement supérieure et égale au coton. Les propriétés des fibres de lin peuvent être également reliées au rapport cellulose cristalline/cellulose amorphe et à l'angle des hélicoïdes que forme la cellulose (Hearle, 1963), la cellulose amorphe de la fibre de lin étant orientée parallèlement à la cellulose cristalline (Astley et Donald, 2003).

b - Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent environ 30 % de la masse sèche des parois primaires et 10 à 20 % de la masse sèche des parois secondaires des dicotylédones (Goodwin et Mercer, 1990; Carpita et Gibeaut, 1993). Leur biosynthèse s'effectue dans l'appareil de Golgi avant d'être excrétées, par des vésicules sécrétrices, dans la matrice extracellulaire (Carpita et al., 1996).

L'examen de la composition osidique des hémicelluloses de différentes origines végétales ont montré la prédominance générale de certaines formes : les xyloglucanes, les xylanes, les glucomannanes, les mannanes, les galactomannanes et les β -(1→3), β -(1→4) glucanes. Les proportions relatives de ces différents groupes varient selon la plante, le tissu, l'assise pariétale.

α - Les xyloglucanes

Ces composés sont des polymères neutres constitués d'une chaîne principale de résidus glucose liés en β -(1→4) sur laquelle sont branchées, au niveau du C₆, des chaînes latérales (~60 à 80 % des résidus glucose sont ainsi substitués) (figure 9, A). Ces dernières sont composées de xyloses liés en α -(1→6) ou d'un trisaccharide xylose α -(1→2)-galactose β -(1→2) fucose, cet ose étant toujours en position terminale (Carpita et Gibeaut, 1993).

Les xyloglucanes (XyG) représentent les principales hémicelluloses des parois primaires des dicotylédones (20 à 25 % de la masse sèche) où elles jouent un important rôle structural en relation avec leur longueur (~50 à 500 nm) (Carpita, 1996; Cosgrove, 1997a).

β - Les xylanes

D'une manière générale, ces composés (figure 9, B) sont constitués d'une chaîne linéaire principale de résidus xylose reliés par une liaison β -(1→4). Selon les espèces et/ou les tissus, 10 à 90 % de ces oses sont substitués au niveau C₂ et/ou C₃ par de courtes chaînes latérales (Joseleau, 1980; McNeil et al., 1984). Ces dernières sont constituées de résidus arabinose (arabinoxylanes) et/ou d'acide glucuronique généralement 4-*O*-méthylés (glucuronoxylanes, glucuroarabinoxylanes) et plus rarement de résidus galactose. Ces oses sont reliés à la chaîne principale *via* leur C₁. Des résidus xylose peuvent également être *O*-acétylés au niveau de leur C₂ ou C₃.

Les glucuronoxylanes sont abondamment retrouvées dans les parois secondaires des dicotylédones et à des teneurs plus faibles, des glucuroarabinoxylanes ont été détectées dans leur paroi primaire (Goodwin et Mercer, 1990; Brett et 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).

γ - Les glucomannanes

Minoritaires chez les angiospermes, ces hémicelluloses sont abondantes dans les parois secondaires du bois des gymnospermes. Elles sont formées d'une chaîne principale de résidus glucose et mannose reliées en β -(1→4) dans des proportions moyennes respectives de 1 : 3 chez les conifères et de 1 : 2 chez les dicotylédones (figure 9, C). Occasionnellement, le C₆ de ces résidus peut être substitué par un résidu galactose (Joseleau, 1980).

δ - Les mannanes et les galactomannanes

Peu présents chez les angiospermes, les mannanes sont constitués de 90 % de mannose, reliés linéairement par des liaisons β -(1→4). La substitution de certains de ces résidus au niveau de leur C₆ par des résidus galactose via une liaison α -(1→6) forme les galactomannanes (figure 9, D).

ε - Les β-glucanes non cellulosiques

Ces composés sont des polymères non ramifiés de glucose reliés par des liaisons β -(1→3) et/ou β -(1→4). Les β -glucanes se fixent aléatoirement le long des chaînes de celluloses.

ζ - Les hémicelluloses des fibres du lin

Par analyses chimiques et immunocytochimiques, des glucomannanes acétylés et/ou galactosylés, des xylanes et des xyloglucanes ont été mises en évidence dans les parois des fibres périphloémiennes. Les teneurs en hémicelluloses baissent au cours du développement des fibres parallèlement à l'augmentation des teneurs en cellulose (McDougall, 1993; Goubet, 1995; Van Hazendonk et al., 1996; Mooney et al., 2001).

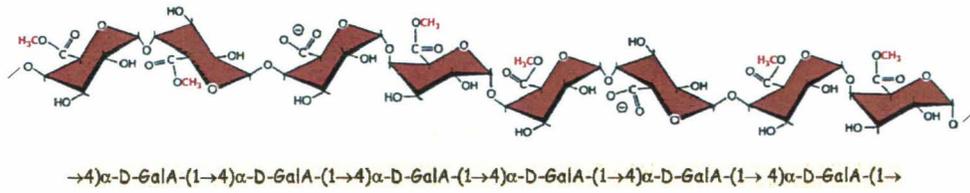
c - Les pectines

Les substances pectiques sont caractéristiques des lamelles moyennes, des jonctions tricellulaires et des parois primaires où elles peuvent représenter jusqu'à 35 % de leur masse sèche. (Jarvis, 1984; O'Neill et al., 1990; Carpita et Gibeaut, 1993). La participation des pectines à la paroi secondaire est moins connue. Les pectines sont des polysaccharides acides ou neutres extractibles par l'eau, les agents chélateurs et les acides dilués.

Les pectines, synthétisées dans l'appareil de Golgi, gagnent le plasmalemme par le biais de vésicules avant d'être intégrées dans la paroi où elles possèdent de nombreuses fonctions. Elles interviennent dans l'hydratation, la porosité, la plasticité, la modulation du pH et la charge électrostatique. En outre, elles participent à l'adhésion cellulaire et sont également impliquées dans la signalisation cellulaire et les mécanismes de défense (Aldington et Fry, 1993; Carpita et Gibeaut, 1993; Carpita et McCann, 2002).

Les homogalacturonanes (HG)

A : Structure de base : chaîne linéaire d'acide galacturonique



B : Structure en "boîte à oeuf" entre deux chaînes d'HG *via* des ions calcium

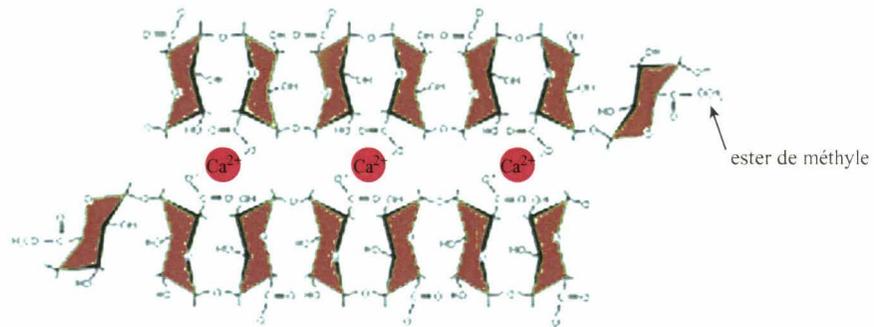


Figure 10 : Structure schématique des homogalacturonanes (d'après Carpita et McCann, 2000).

A : Structure moléculaire de base, B : Structure en "boîte à oeuf" suite à l'établissement de liaisons ioniques entre des ions Ca²⁺ et des fonctions acides carboxyliques non méthylestérifiées des acides galacturoniques.

Les fonctions ci-énumérées peuvent être corrélées à la complexité et à la variabilité de leur composition chimique. Trois principaux polysaccharides pectiques ont été caractérisés dans les parois : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et des rhamnogalacturonanes de type II (RG-II). Les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes sont des composés pectiques plus minoritaires mais essentiels à l'architecture pariétale.

α - Les composés pectiques minoritaires

Ces pectines sont des polymères neutres, de taille et de configuration très variées (figure 11). Les principaux composants de cette famille sont (Goodwin et Mercer, 1990; Carpita, 1996) :

- Les arabinanes, constituées d'une succession linéaire de résidus L-arabinose (Ara) liés en α -(1→5) parfois substitués au niveau de leur O₂, O₃ et O₅ par des résidus Ara.
- Les galactanes, des polymères linéaires de résidus D-galactose (Gal) reliés en β -(1→4).
- Les arabinogalactanes. En fonction de leur structure deux classes sont distinguables, les arabinogalactanes de type I (AGI) et celles de type II (AGII). Les AGI sont constituées d'une chaîne principale de résidus Gal unis par une liaison β -(1→4) sur lesquels, au niveau de leur O₃, sont branchés des résidus Ara et/ou Gal. Les AGII se composent d'une chaîne principale de résidus Gal reliés principalement en β -(1→3) et substitués au niveau de leur O₆ par des chaînes latérales longues de β -(1→6)-Gal et/ou courtes de β -(1→4)-Gal et/ou de α -(1→3, 5)-Ara.

β - Les homogalacturonanes

Les homogalacturonanes (HG), aussi appelés acides polygalacturoniques, sont définis comme des homopolymères linéaires d'acide galacturonique (GalA) interconnectés par une liaison α -(1→4) (figure 10, A) (O'Neill et al., 1990; Ridley et al., 2001). Les HG peuvent contenir 100 à 200 résidus GalA (Thibault et al., 1993). La longue chaîne de GalA peut toutefois être interrompue par un résidu rhamnose selon un motif : D-GalA-(1→2)- α -L-Rha-(1→4)- α -D-GalA (Jarvis, 1984) induisant une déviation de $\sim 90^\circ$ de l'axe de la chaîne ("coude pectique").

Le fort caractère anionique des HG dû à la fonction carboxyle du C₆ des résidus GalA confère à ces composés la capacité de capter des ions transitoires dans la paroi. Au cours de leur synthèse, des modifications structurales peuvent intervenir sur certains résidus GalA (Cosgrove, 1997b) :

- Une méthylestérification du C₆. Les HG sont synthétisées et sécrétées dans la paroi sous forme hautement méthylée, puis le degré de méthylestérification (DM) est régulé *in muro* par des pectines méthylestérases (PME) qui vont générer des résidus carboxyles libres (Roger et al., 2001; Lacoux et al., 2003). Ces fonctions carboxyliques peuvent être neutralisées par des ions

Les rhamnogalacturanes de type I (RG-I)

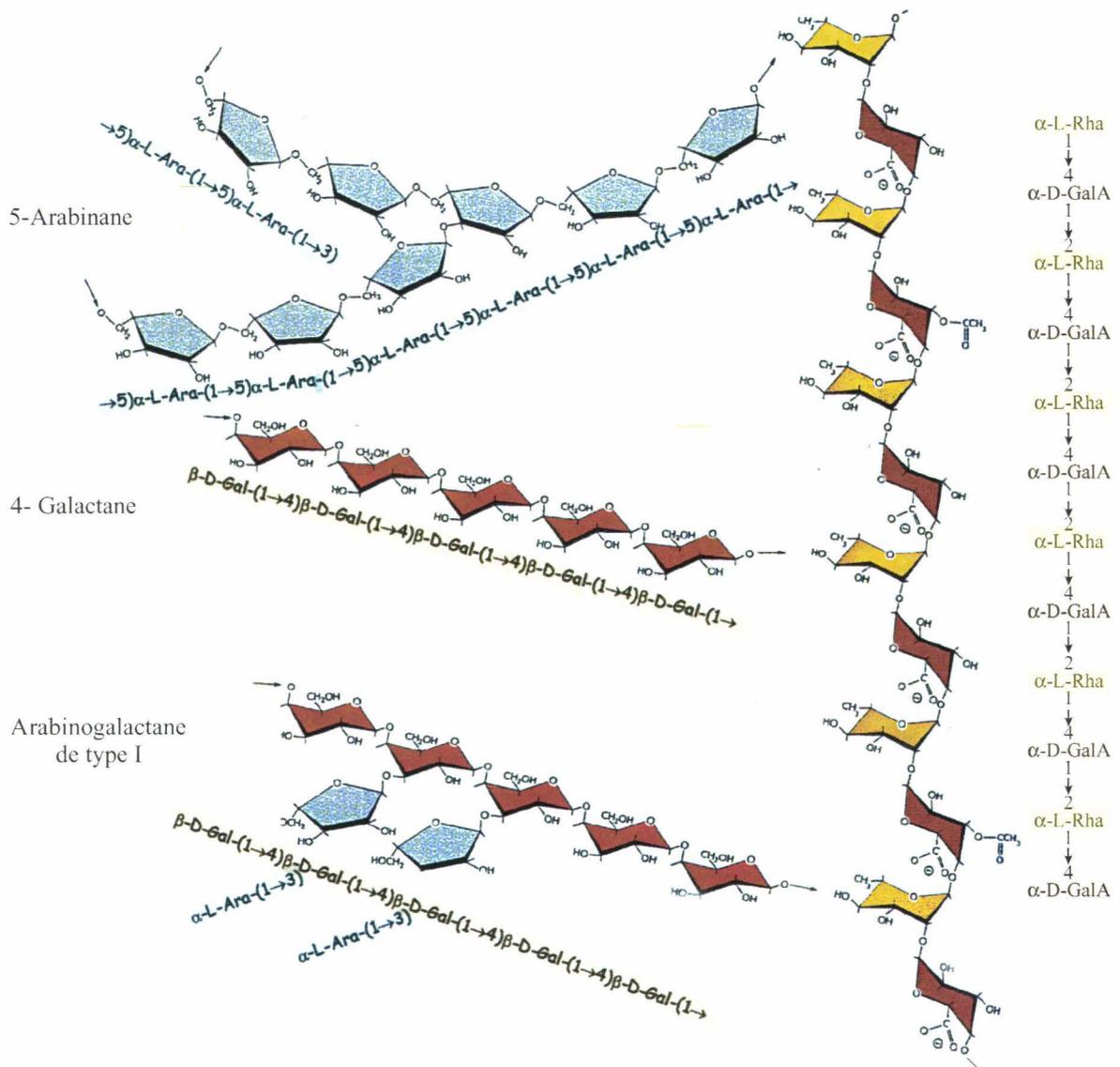


Figure 11 : Structure schématique des rhamnogalacturanes de type I (d'après Carpita et McCann, 2000).

La chaîne principale constituée d'un enchaînement linéaire de résidus rhamnose et d'acides galacturoniques est substituée de nombreuses chaînes latérales composées de pectines minoritaires : 5-Arabinane, 4-Galactane, Arabinogalactane de type I.

monovalents ou divalents. La présence d'ions Ca^{2+} occasionne l'établissement de liaisons ioniques entre les d'HG non méthylées, *i.e.* structures en "boîte à oeuf" (figure 10, B), rigidifiant la paroi par la formation de gels solides et insolubles (Lacoux, 2002). Le DM, pouvant varier au cours de la croissance cellulaire, conditionne les propriétés de la paroi (élasticité, plasticité, porosité) régule les activités enzymatiques et intervient dans la cohésion intercellulaire (Thibault, 1980; Powell et al., 1982; Jarvis, 1984; Moustacas et al., 1991).

- Une acétylation sur les alcools secondaires portés par le C_2 et/ou le C_3 . Le degré d'acétylation, reste très généralement plus faible que le DM (Voragen et al., 1986; Ishii, 1997b; Pauly et Scheller, 2000).
- La substitution d'un résidu xylose sur le C_3 par une liaison β -(1→3). Les HG ou les régions des HG présentant ce type de modification sont appelés (motifs) xylogalacturonanes (Schols et al., 1995; Le Goff et al., 2000).

γ - Les rhamnogalacturonanes de type I

Avec les HG, les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) représentent les composés pectiques les plus abondants des parois. Les RG-I sont des hétéropolymères dont la chaîne principale est constituée d'une centaine de motifs répétitifs de disaccharide (1→2)- α -L-Rha-(1→4)- α -D-GalA sur lesquels sont branchées de nombreuses chaînes latérales : 20 à 80 % des résidus Gal sont substitués au niveau de leur C_4 (figure 11) (McNeil et al., 1980; O'Neill et al., 1990; Carpita et Gibeau, 1993). Les résidus GalA peuvent être méthylestérifiés et plus ou moins acétylés. D'une manière générale, le degré de polymérisation des RG-I peut atteindre 2000 et leur taille semblerait varier entre 500 et 2000 kDa (Cosgrove, 1997a).

La grande diversité des chaînes latérales induit une importante hétérogénéité structurale. Les plus courantes sont constituées de galactanes, d'arabinanes et d'arabinogalactanes (figure 11) (O'Neill et al., 1990; Lerouge et al., 1993; Mohnen, 1999; Ridley et al., 2001).

δ - Les rhamnogalacturonanes de type II

Ces composés très ramifiés se caractérisent par leur faible masse moléculaire (environ 5 kDa) et leur faible degré de polymérisation (proche de 60) (Brett et Waldron, 1996). Leur structure précise est encore mal connue. Leur chaîne principale serait constituée d'un motif répétitif de 8 résidus GalA liés en α -(1→4) séparés par un trisaccharide riche en résidus rhamnose (McNeil et al., 1984; Goodwin et Mercer, 1990; O'Neill et al., 1996; Vidal et al., 2000). Sur cet axe, 4 chaînes latérales ont été identifiées, greffées au niveau du C_4 des GalA et composées de résidus

typiques des pectines mais aussi de monosaccharides rares (York et al., 1985; Stevenson et al., 1988; Puvanesarajah et al., 1991; Hervé du Penhoat et al., 1999).

Chez les angiospermes, les RG-II existent sous forme monomérique et dimérique. Dans ce dernier cas, deux RG-II s'associent de façon covalente *via* des liaisons diester établies avec un ion bore (O'Neill et al., 1996; Cosgrove, 1997b; Ridley et al., 2001).

ε - Les pectines des fibres du lin

L'identification de composés pectiques dans ces fibres a révélé des galactanes pouvant être liées à des RG-I partiellement acétylées, des arabinanes, des RG-II et des HG (Gorshkova et al., 1996; Girault et al., 1997; His et al., 2001). Ces pectines ont été détectées dans la globalité de la paroi fibres (Goubet, 1995; AndemeOnzighi et al., 2000); leur paroi secondaire contenant les plus faibles teneurs (Akin et al., 1996a). Au cours de la maturation des fibres, il a été constaté une baisse des teneurs en pectines associée à une évolution de leur composition notamment au niveau de la lamelle moyenne ; cette dernière semblant s'enrichir en HG. Ce résultat peut être rapproché des variations des concentrations en ions Ca^{2+} lesquelles deviennent importantes dans les fibres matures (Lewin, 1958; Sharma et al., 1999a).

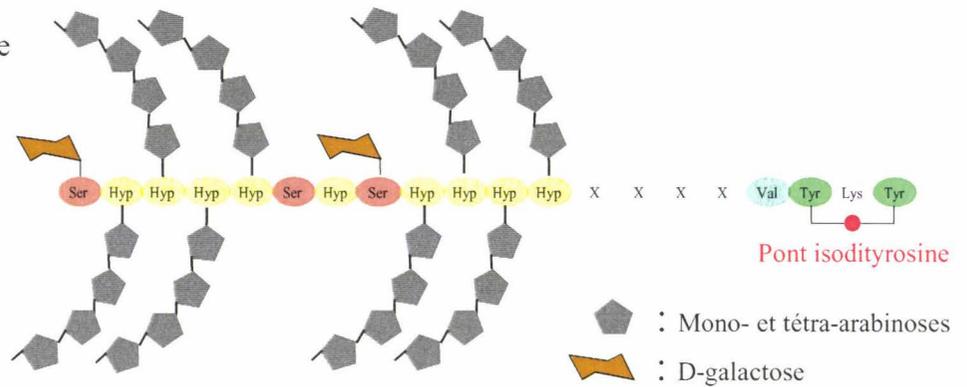
2.2 - LES COMPOSES PROTEIQUES

La matrice pariétale des plantes supérieures renferme également des protéines en quantités très variables (entre 1 et 10 % de sa masse sèche). Certaines jouent un rôle structural, d'autres enzymatique (Showalter, 1993; Cassab, 1998; Showalter, 2001). Dans les fibres périploémiennes du lin, les protéines structurales représentent ~1 % de leur masse sèche (Girault et al., 2000; Andème-Onzighi, 2003). Leur synthèse suit le processus classique des protéines sécrétées, depuis le réticulum endoplasmique jusqu'au compartiment extracellulaire *via* l'appareil de Golgi. Certaines de ces protéines peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles, notamment des glycosylations.

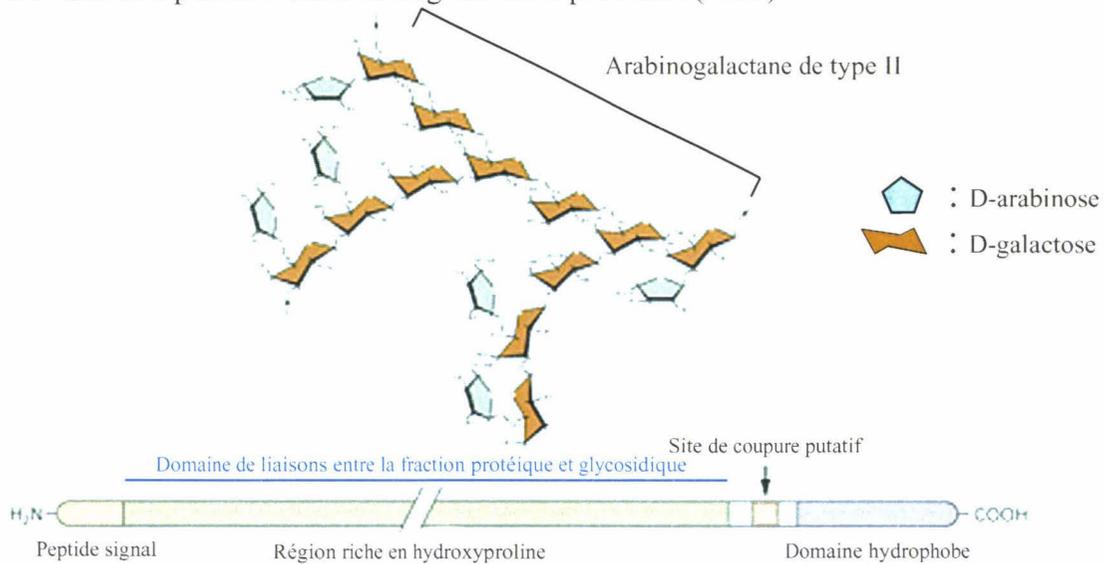
Les protéines structurales sont généralement divisées en plusieurs familles selon les acides aminés prépondérants entrant dans leur composition. Trois grandes familles sont distinguables, énumérées par ordre décroissant d'importance (Showalter, 1993) : les protéines riches en hydroxyproline (HRGP), les protéines riches en glycine (GRP) et les protéines riches en proline (PRP) (figure 12). Cette classification "arbitraire" ne peut être exhaustive en regard des récents travaux relatant des protéines "chimériques" n'appartenant à aucun de ces groupes ou conduisant à supposer de nouvelles classes (protéines riches en leucine ou en tyrosine) (Showalter, 2001).

A : Les protéines riches en hydroxyproline (HRGP) - hautement glycosylées

1 : Extensine de tomate



2 : Structure putative des arabinogalactanes protéines (AGP)



B : Les protéines riches en glycines (GRP) - pas glycosylées

GRP de pétunia



C : Les protéines riches en proline (PRP) - peu glycosylées

PRP de soja

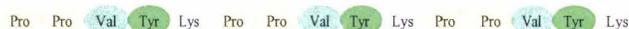


Figure 12 : Structure schématique des principales familles de protéines structurales pariétales (d'après Carpita et McCann, 2000).

a - Les protéines riches en hydroxyproline

Les HRGP représentent la classe majeure des protéines structurales des parois des dicotylédones (Cosgrove, 1997a; Cassab, 1998). Elles constituent une grande famille de glycoprotéines, subdivisée en deux classes principales : les extensines et les arabinogalactanes protéines (AGP). Leur teneur respective est fortement dépendante des tissus et du stade de développement (Cosgrove, 1997a).

Parmi leurs diverses fonctions, dont certaines restent encore imprécises, les HRGP joueraient un rôle important dans la rigidité pariétale et dans les mécanismes de stress et de défense (Esquerré-Tugayé et al., 1979; Lamport, 1986; Cooper et al., 1987; Tiré et al., 1994). Elles sembleraient également impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (Cassab et Varner, 1988).

α - Les extensines

Cette classe des HRGP regroupe les principales protéines des parois des angiospermes. D'une manière générale, les extensines sont basiques et riches en hydroxyproline (33 à 42 % de la masse moléculaire de la fraction protéique). Ces protéines se caractérisent par la répétition d'une séquence hélicoïdale serine-(hydroxyproline)₄ et la présence de motifs tyrosine-lysine-tyrosine (Cooper et al., 1987; Cassab et Varner, 1988; Carpita et Gibeaut, 1993).

Les résidus hydroxyproline et moins fréquemment la sérine du pentapeptide sont *O*-glycosylés. Ils portent, dans ce cas, respectivement une chaîne linéaire constituée d'un à quatre résidus arabinose reliés en (1→2) ou (1→3) et/ou un résidu galactose (figure 12, A1). La fraction glycosidique, pouvant représenter 65 % de la masse moléculaire des extensines (Cassab et Varner, 1988), apparaît spécifique des plantes et des tissus.

Le deuxième motif des extensines permet l'établissement de liaisons intramoléculaires entre les deux résidus tyrosines *via* un pont diphényléther, *i.e.* une liaison isodityrosine (Epstein et Lamport, 1984; Cooper et al., 1987). La possibilité de telles liaisons intermoléculaires est probable et favoriserait l'interaction entre plusieurs molécules d'extensines les rendant ainsi insolubles.

β - Les arabinogalactanes protéines

Les arabinogalactanes protéines (AGP) constituent un groupe hétérogène de protéines riches en hydroxyproline, fortement glycosylées (figure 12, A2). Le squelette protéique, mineur (1 à 10 % de la masse moléculaire) est riche en hydroxyproline (20 à 30 % de la masse moléculaire protéique) (Fincher et al., 1983; Basic et al., 1987; Mau et al., 1995). La fraction osidique est très généralement constituée d'un polysaccharide pectique d'arabinogalactane de type II (Nothnagel, 1997).

b - Les protéines riches en glycine

Les protéines riches en glycine (GRP) ont été identifiées chez de nombreuses dicotylédones où elles interviendraient dans la résistance mécanique des parois (Condit et Maegher, 1986; Gomez et al., 1988; De Oliveira et al., 1990; Obokata et al., 1991; Keller, 1993). Ces protéines constituent un groupe très hétérogène et sont caractérisées par leur structure primaire composée à ~60 - 70 % de glycine (figure 12, B) (Showalter, 1993). La prédiction de leur structure secondaire suggère leur enchâssement dans la membrane plasmique *via* leur extrémité C-terminale.

La glycosylation de ces protéines est actuellement peu connue. La présence de ponts isodityrosines a été suggérée entre des extensines et des GRP de même que des formes dimériques de GRP ont été identifiées chez le pétunia (Condit et Meagher, 1987; Showalter, 1993).

c - Les protéines riches en proline

Ces protéines regroupent des protéines riches en hydroxyproline ou présentant un motif répétitif proline-proline dans leur structure primaire (figure 12, C) (Chen et Varner, 1985; Hong et al., 1987; Showalter, 1993). Les PRP caractérisées à ce jour ne sont pas ou peu glycosylées.

La présence de résidus tyrosine dans les PRP favorise la formation de liaisons isodityrosines entre ces protéines et avec d'autres protéines structurales. Les PRP possèderaient des fonctions semblables aux HRPG (Hong et al., 1989; Ye et al., 1991; Bradley et al., 1992).

d - Les protéines enzymatiques

La paroi renferme également une grande diversité d'enzymes impliquées majoritairement dans le métabolisme cellulaire et majoritairement dans des modifications de composants pariétaux (Varner et Lin, 1989; Cosgrove, 1997a) dont :

- La dégradation directe ou indirecte des composants pariétaux (glycanases, polygalacturonases, glucuronidases, chitinases...).
- La modification/polymérisation de substrats pariétaux (peroxydases, PME, protéines dirigeantes...) (Ranocha et al., 1999; Davin et Lewis, 2000)
- La réorganisation de la paroi (xyloglucanases, transglycosidases...) (Fry, 1995).
- La plasticité/rhéologie pariétale (expansines...) (McQueen-Mason, 1995; Cosgrove, 1999).

2.3 - LES COMPOSES PHENOLIQUES

Par définition, les composés phénoliques regroupent l'ensemble des molécules comportant au moins un cycle benzénique sur lequel est fixée une fonction alcool, *i.e.* un phénol. Chez les végétaux, cette appellation générique convient à un grand nombre de composés très diversifiés (Harborne, 1989). Cependant, dans la matrice pariétale, cette définition se restreint à un sous-ensemble comprenant tous les composés constitués d'un phénol (C₆) substitué en position *para* par une chaîne propène (C₃), *i.e.* les composés phénylpropénoïques (Ibrahim et Barron, 1989). Ces derniers étant des molécules en C₆-C₃ dérivées de l'acide cinnamique, ils sont de ce fait inclus, dans la nomenclature chimique, dans les composés hydroxycinnamiques (regroupent les composés aromatiques en C₆-C₁, C₆-C₂ et C₆-C₃).

Ces composés phénoliques peuvent exister sous forme polymérique, la lignine, ou mono-, dimérique, les acides *p*-hydroxycinnamiques, couramment appelés acides phénoliques (Yamamoto et al., 1989; Wallace et Fry, 1994). Selon la structure pariétale, les cellules, les tissus et les espèces, d'importantes variations qualitatives et quantitatives ont été décelées (Monties et Fukushima, 2001).

a - La lignine

α - Nature et fonctions

La lignine est une macromolécule formée par polymérisation oxydative de divers monomères de la série phénylpropane. Elle est étroitement associée aux polysaccharides pariétaux par diverses liaisons dont la nature n'est qu'en partie connue (Monties, 1980). Sa biosynthèse (voie des phénylpropanoïdes), résultant de l'action coordonnée de nombreuses chaînes métaboliques, apparaît comme l'un des procédés les plus coûteux en énergie chez les plantes. Le polymère final, très hétérogène, présente les ratios C/H et C/O les plus élevés comparé à tous les autres polymères pariétaux lui conférant ainsi une haute valeur calorifique. Les spécificités intrinsèques de ce polymère (amorphe, isotrope et optiquement inactif (Ralph et al., 1999; Bergander et Salmen, 2002; Thielemans et al., 2002)) en font un composé unique dans la nature (Lewis et al., 1999). Enfin, la lignine représente environ 20 % de la biomasse terrestre constituant le deuxième biopolymère le plus abondant à la surface du globe (Higuchi, 1990).

A l'échelle de l'évolution des organismes photosynthétiques, la lignification est un phénomène récent survenu il y a environ 450 millions d'années. L'apparition de la lignine dans le règne végétal a été déterminante dans la colonisation du milieu terrestre par les plantes (Sarkanen et Ludwig, 1971b). Ses propriétés mécaniques et plastiques ont permis l'acquisition du port dressé et le développement de systèmes de conduction efficaces chez les végétaux supérieurs (Lewis et

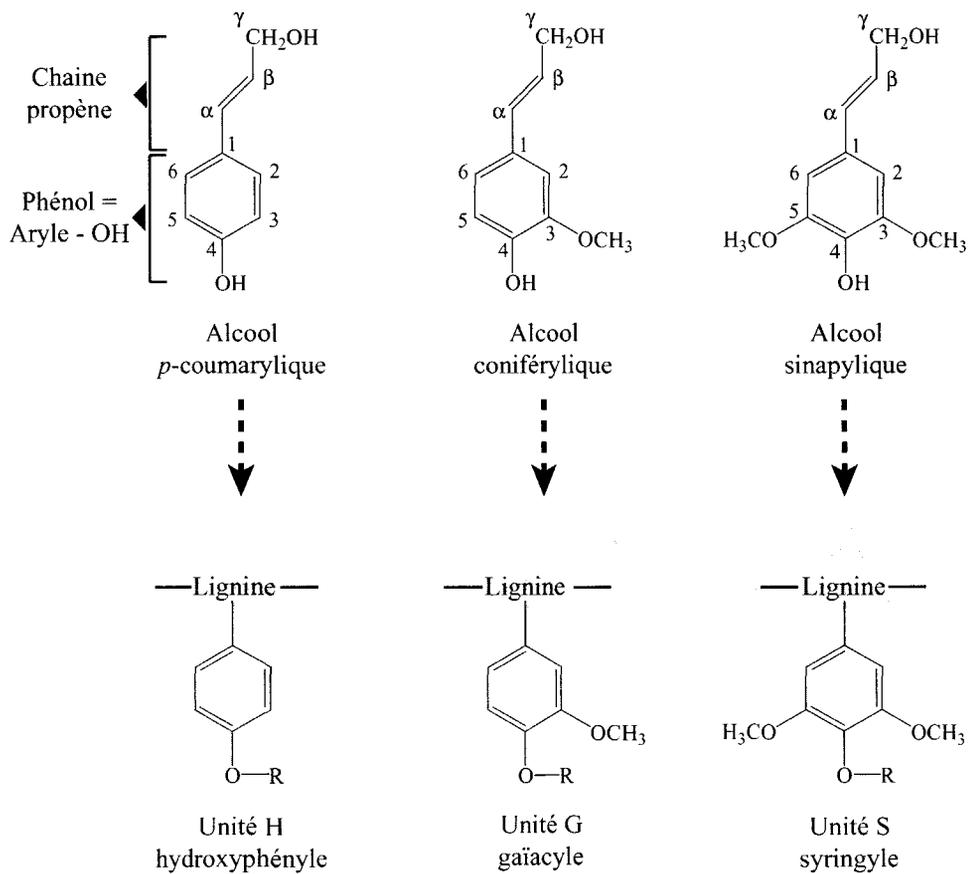


Figure 13 : Structure des trois alcools phénylpropénoïques et des sous-unités qui en dérivent dans la lignine.

La numérotation des carbones est indiquée selon la nomenclature usuelle revue par Sarkanen et Ludwig (1971a). R : H ou un autre monolignol (d'après Whetten et al., 1998).

Yamamoto, 1990). Dans ce sens, les lignines sont présentes dans toutes les plantes vasculaires (ptéridophytes, angiospermes et gymnospermes) dans les parois des cellules de soutien et de conduction : xylème, sclérenchyme (Higuchi, 1981). Si la lignine est constitutive de certaines cellules spécialisées, elle peut également être synthétisée par de nombreuses cellules en réponse à un stress biotique et/ou abiotique. En effet, le dépôt de lignine conférant à la paroi une résistance accrue crée une barrière physique et biochimique protectrice (Lewis et Yamamoto, 1990; Walter, 1992; Hawkins et Boudet, 1996). Il a aussi été suggéré que la lignine permette d'inactiver certains composés cytotoxiques suite à leur copolymérisation au sein de ce polymère (Trenck et Sandermann, 1981).

Afin de rendre compte de son hétérogénéité, certains auteurs (initialement Sarkanen et Ludwig en 1971) ont choisi de mettre le terme "lignine" au pluriel. Dans l'étude des lignines, il est indispensable de considérer les différences existantes entre les lignines extraites par des solvants (lignines natives) et les lignines *in situ* (protolignines) (Lai et Sarkanen, 1971; Monties, 1980).

β- Structure

Composition monomérique

Les lignines dérivent de la polymérisation déshydrogénative, *i.e.* oxydative, de trois alcools phénylpropénoïques (ou monolignols) différant uniquement par leur degré de méthylation : l'alcool trans-*para*-coumarylique, l'alcool trans-coniférylique et l'alcool trans-sinapylique. Ces trois monolignols (figure 13) donnent respectivement dans le polymère les sous-unités *para*-hydroxyphényles, *i.e.* H (non-méthoxylées), gaïacyles, *i.e.* G (monométhoxylées) et syringyles, *i.e.* S (diméthoxylées) (Sarkanen et Ludwig, 1971a; Monties, 1980).

Polymérisation des monolignols

Ces sous-unités sont inter-connectées dans le polymère lignine par une série de liaisons covalentes de nature éther et/ou carbone-carbone. Proposée par Erdtmann (1933) et confirmée par Freudenberg à partir de polymères de lignine synthétique (DHP) (Freudenberg et al., 1958), la théorie de polymérisation déshydrogénative explique ces diverses liaisons.

Au cours de la première étape de ce processus, les alcools phénylpropénoïques sont activés par un mécanisme oxydatif de nature enzymatique (peroxydases, laccases, phénol oxydases (Lewis et al., 1999)) en radicaux libres intermédiaires, *i.e.* radicaux phénoxy. La localisation des électrons dans ces derniers possédant plusieurs formes mésomères conduit à une réactivité accrue des C₁, C₅, C β , et le O₄ (figure 14) (Glasser, 1980; Durbeej et Eriksson, 2003b). Les radicaux phénoxy s'associent ensuite entre eux, spontanément et aléatoirement, pour former des

méthylène-quinones. Ces dernières, très électrophiles, réagissent avec des composés nucléophiles (H_2O , alcool primaire et/ou groupe quinone intramolécule et/ou intermolécule) les convertissant en dilignols et/ou les greffant au polymère lignine et/ou à des composés pariétaux (pectines, hémicelluloses) (Freudenberg et Neish, 1968; Higuchi, 1985; Argyropoulos et Menachem, 1997; Cathala et al., 2001).

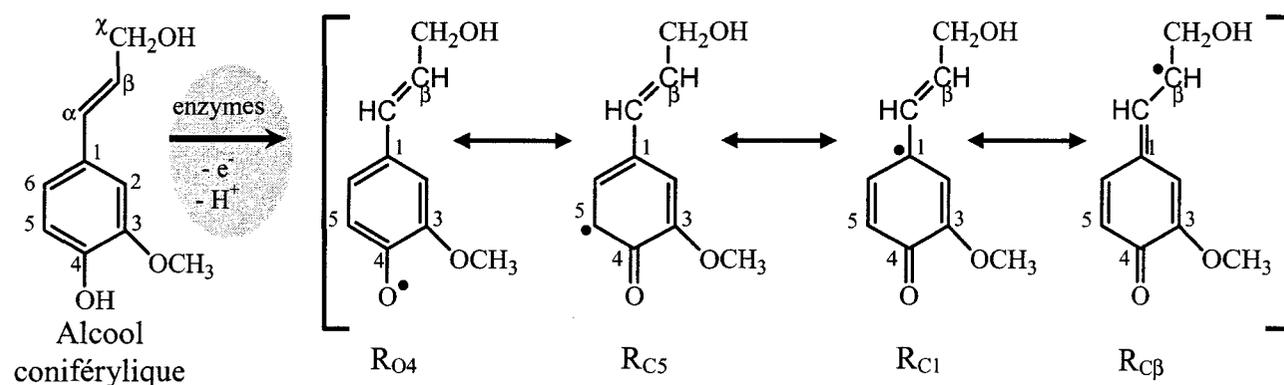


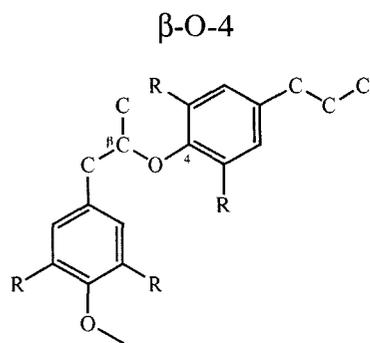
Figure 14 : Principales formes mésomères des radicaux phénoxy produit après oxydation enzymatique de l'alcool coniférylique (d'après Cathala et al., 2001)

De récents travaux suggèrent de modérer la polymérisation aléatoire des monolignols. La polymérisation d'alcool coniférylique sur une surface graphique ou dorée conduit à une structure très ordonnée formant une sorte de maillage (Radotic et al., 1994). En outre, la matrice polysaccharidique pariétale semblerait exercer une grande influence sur la polymérisation des monolignols en ayant une fonction organisatrice. Il a en effet été démontré que les hémicelluloses pouvaient participer à l'orientation des précurseurs avant leur polymérisation (Eriksson et Lindgren, 1977; Grabber et al., 1995; Houtman et Atalla, 1995; Argyropoulos et Menachem, 1997; Ruel et al., 2002). Par ailleurs, une glycoprotéine appelée protéine dirigeante, isolée des tiges de diverses angiospermes (*Forsythia*, peuplier, *Arabidopsis*, lin, tabac) et gymnospermes, capturerait les radicaux phénoxy et induirait, en présence de peroxydases et/ou de laccases, un couplage stéréosélectif entre eux (Kim et al., 2002a). Cette protéine, préférentiellement localisée dans les zones cambiales et les tissus lignifiés, posséderait une grande spécificité pour l'alcool coniférylique (Davin et al., 1997; Gang et al., 1999; Davin et Lewis, 2000).

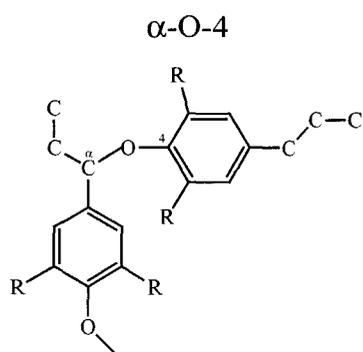
Liaisons intermonomériques

En regard des 4 principales formes mésomères des radicaux phénoxy, 16 combinaisons de liaison sont possibles conduisant à 9 structures différentes (tableau 1 et figure 15). Leur probabilité de se former est dépendante de leur environnement stérique et électronique (Monties, 1989b).

A: Les liaisons "non-condensées"

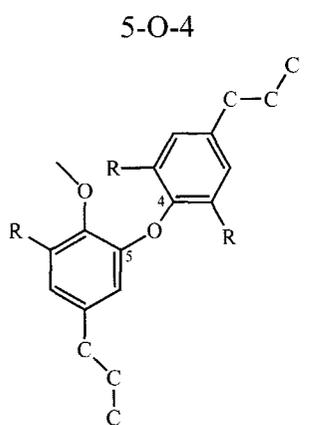


Structure alkyle β -aryle-éther

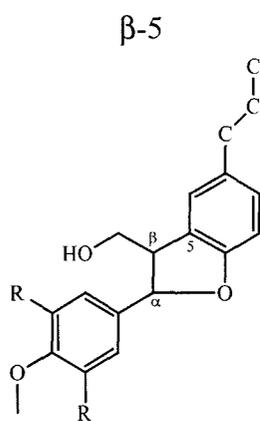


Structure alkyle α -aryle-éther

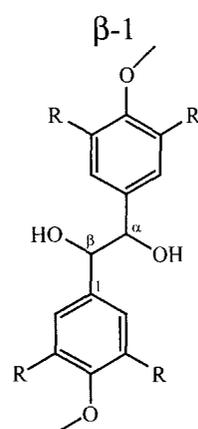
B: Les liaisons "condensées"



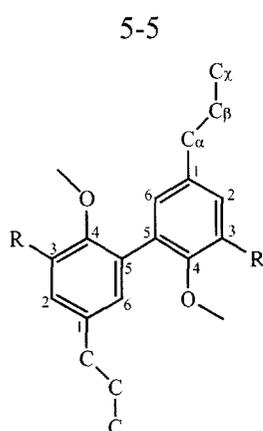
Structure diphenyl éther



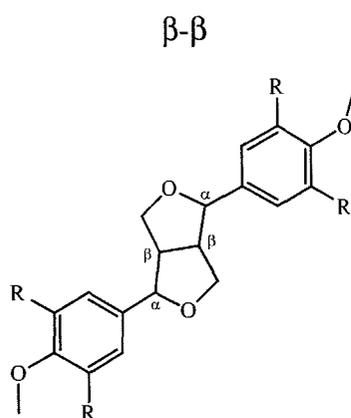
Structure diarylpropane



Structure biphenyle



Structure phénylcoumarane



Structure résinol

Figure 15 : Principales liaisons intermonomères identifiées au sein de la lignine et classées suivant la terminologie biochimique en liaisons "non-condensées" et en liaisons "condensées" (d'après Lapierre, 1993).

La numérotation des carbones se réfère à la nomenclature usuelle revue par Sarkanen et Ludwig (1971a). R = H ou OCH₃.

	R _{O4}	R _{C5}	R _{C1}	R _{Cβ}
R _{O4}	4-O-4*	5-O-4	4-O-1	4-O-β
R _{C5}	5-O-4	5-5	5-1	5-β
R _{C1}	1-O-4	1-5	1-1	1-β
R _{Cβ}	β-O-4	β-5	β-1	β-β

Tableau 1 : Principales liaisons intermonomériques potentiellement formées suite au couplage des 4 principaux radicaux phénoxy de l'alcool coniférylique (d'après Glasser, 1980). Les liaisons β-O-4 et 4-O-β, 5-1 et 1-5... sont équivalentes. La liaison-4-O-O-4* est une forme trop instable pour exister.

Les calculs de mécanique quantique révèlent une densité électronique supérieure au niveau du O₄ favorisant de ce fait sa réactivité (Glasser, 1980; Durbeej et Eriksson, 2003b; Durbeej et Eriksson, 2003c). Les structures β-O-4, sont effectivement les principales liaisons intermonomériques identifiées chez les angiospermes comme chez les gymnospermes, les autres liaisons étant présentes à des fréquences nettement plus faibles (tableau 2) (Monties, 1989b; Sakakibara, 1991). Une structure α-O-4 est retrouvée à des faibles fréquences dans la lignine. Elle résulte de l'addition sur un monolignol déjà engagé dans une liaison, d'une structure méthylène-quinone (Monties, 1989a). D'autres liaisons intermonomériques ont été identifiées mais leur présence à l'état de trace dans la lignine explique leur omission en général (Lapierre et al., 1988; Sakakibara, 1991; Ralph et al., 1997; Durbeej et Eriksson, 2003a).

Type de liaisons	Noms	Fréquence en %		Classification biochimique	
		Angiospermes dicotylédones	Gymnospermes		
éthers	β-O-4	alkyle-β-aryle-éther	60	48	non-condensées
	α-O-4	alkyle-α-aryle-éther	6 - 8	6 - 8	
	4-O-5	diphényl éther	6	9 - 12	
C-C	β-5	phénylcoumarane	7	7	condensées
	β-1	diarylpropane	3	2	
	β-β	résinol	4,5	9,5 - 11	
	5-5	biphényl	6,5	3,5 - 4	

Tableau 2 : Fréquence des principales liaisons intermonomériques dans le bois des angiospermes dicotylédones et des gymnospermes (d'après Baucher et al., 1998).

Les différentes liaisons intermonomériques sont regroupées en deux catégories : les structures carbone-carbone (β-5, β-1, β-β, 5-5) et les structures éther (β-O-4, α-O-4, 4-O-5). Annexée à cette première classification chimique, une deuxième classification a été établie en fonction de la réactivité des liaisons, *i.e.* facilité de rupture, lors des principales méthodes dégradatives employées pour caractériser les lignines (thioacidolyse et oxydation par le nitrobenzène). Les liaisons "facilement" rompues sont qualifiées de "non condensées", elles regroupent les structures β-O-4 et α-O-4, et les liaisons résistantes sont appelées "condensées", elles incluent toutes les autres liaisons (tableau 2 et figure 15).

La fréquence des liaisons intermonomériques est très dépendante de la composition de la lignine : des proportions élevées en sous-unités H et/ou G favorisent la formation de structures condensées, *i.e.* C-C et/ou 4-O-5 (Monties, 1989b; Chen, 1991). En effet, le C₅ du cycle aromatique n'étant pas substitué, ce dernier peut être activé puis impliqué dans des liaisons de type β-5, 5-5 ou plus rarement 4-O-5, cette dernière structure étant moins stable (Durbeej et Eriksson, 2003a). Dans la lignine des gymnospermes, caractérisée par sa richesse en unités G, ~25 % des liaisons intermonomères engagent le C₅ induisant une baisse des fréquences en structures non-condensées par rapport aux dicotylédones dont les proportions en unités S dans le polymère sont plus importantes (Lewis et Yamamoto, 1990; Whetten et Sederoff, 1995; Campbell et Sederoff, 1996).

γ- Hétérogénéité des lignines

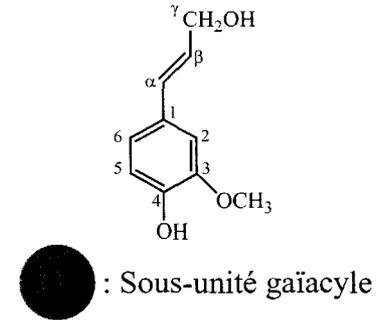
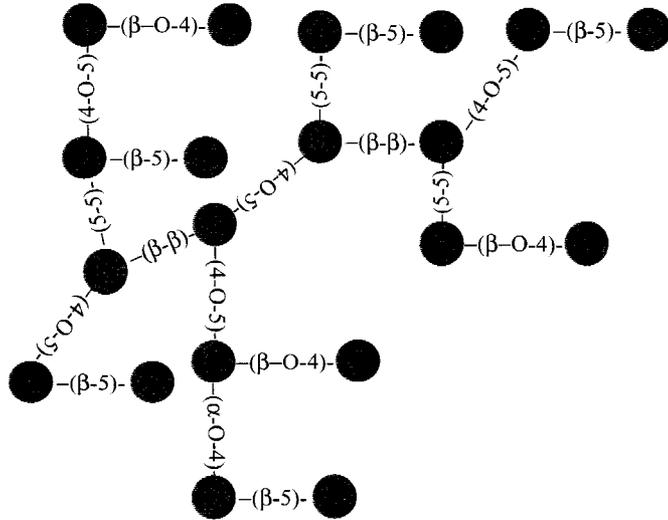
Dans la lignine, le terme hétérogénéité regroupe un ensemble de variables et notamment : les teneurs, la composition en monolignols et les proportions des liaisons intermonomériques (Monties, 1984;1991). Cette hétérogénéité s'applique à tous les niveaux : selon les espèces, les tissus, les cellules mais aussi en fonction des assises pariétales, des stades de développement, des conditions environnementales (pour revues (Chen, 1991; Boudet et al., 1995; Baucher et al., 1998; Lewis et al., 1999; Monties et Fukushima, 2001)).

Parmi ces variables, la composition monomérique différentielle des lignines peut être reliée à la systématique des végétaux (Faix, 1991). En effet, dans le règne végétal, trois types de lignines peuvent être distinguées selon leur composition en alcools *p*-coumarylique (H), coniférylique (G) et sinapylique (S) :

- La première, composée principalement d'alcool coniférylique est appelée lignine G, les alcools sinapylique et *p*-coumarylique étant présents en très faibles teneurs. Elle est caractéristique des gymnospermes et des ptéridophytes.
- La seconde, propre aux angiospermes, est constituée majoritairement des alcools coniférylique et sinapylique et de ce fait nommée lignine G-S. Les quantités d'alcool *p*-coumarylique y sont nettement minoritaires.
- Une troisième, typique des espèces herbacées, composée des alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique est appelée lignines H-G-S.

Très généralement, sur la base des monomères libérées par les méthodes dégradatives d'analyse des lignines, un rapport quantitatif entre les unités S et les unités G libérées est calculé. Ce ratio S/G est alors employé pour caractériser la lignine.

A : Polymérisation "à la verse" (*zulauf-verfahren*)



B : Polymérisation "à la goutte" (*zutropf-verfahren*)

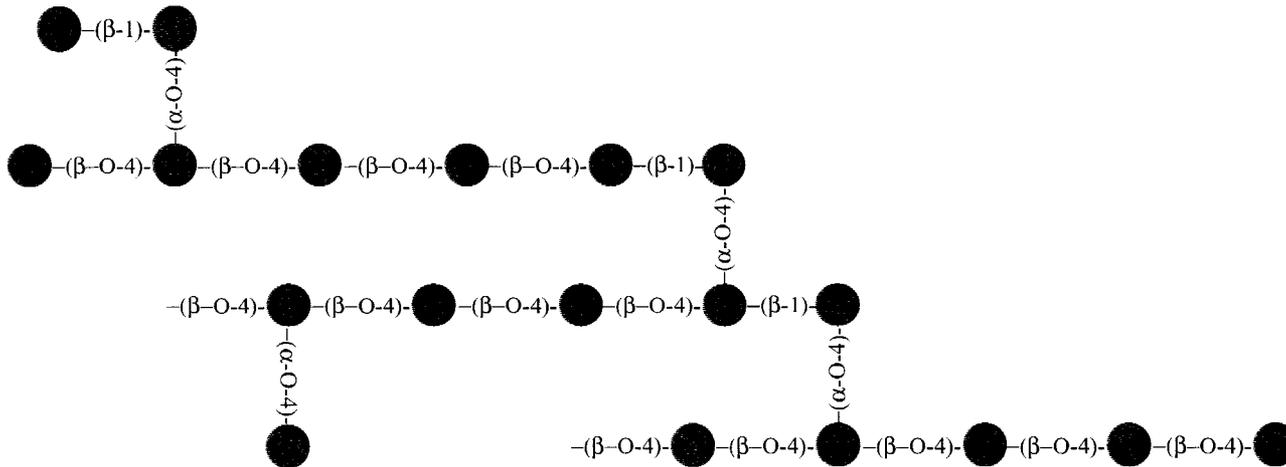


Figure 16 : Représentation schématique de deux polymères synthétiques de 20 unités gaïacyle (DHP-G) (d'après Burlat, 1997).

A : La polymérisation par la méthode *zulauf* favoriserait une prédominance de liaisons carbone-carbone condensées donnant au polymère une conformation massive.
 B : La polymérisation par la méthode *zutropf* engendrerait à l'inverse une prédominance de liaisons β-O-4 non-condensées conférant au polymère une conformation plus linéaire.

*δ- Modélisation de la structure des lignines d'angiospermes**Polymérisation des lignines in vitro*

Une lignine artificielle peut être formée par polymérisation déshydrogénative des monolignols. La lignine ainsi obtenue est appelée polymère synthétique de lignine (DHP). Initialement, Freudenberg a synthétisé des DHP par addition, à une solution d'alcool coniférylique, de laccases et de l'O₂ (Freudenberg et al., 1958) ou de peroxydases et de H₂O₂ (Freudenberg et al., 1964). L'analyse de ces DHP a révélé leur forte ressemblance avec de la lignine extraite démontrant ainsi leur intérêt. Depuis ces travaux pionniers, les DHP ont donc été largement étudiés. Il a été montré que leur structure moléculaire est affectée par les conditions réactionnelles (Freudenberg et Neish, 1968; Lai et Sarkanen, 1971; Faix, 1986). En effet, selon le mode d'addition des précurseurs (un seul ou plusieurs types en mélange) et de l'enzyme (la peroxydase de raifort est couramment employée) deux modes de polymérisation sont distinguables :

- La polymérisation massive, *i.e.* à la verse (*zulauf*-verfahren, *i.e.* zl). Ce mode implique l'addition rapide de H₂O₂ à une solution de précurseurs et de peroxydase.
- La polymérisation en goutte (*zutropf*-verfahren, *i.e.* zt). Ces conditions de polymérisation se caractérisent par l'ajout lentement, *i.e.* goutte à goutte, et séparément de précurseurs et de peroxydase à une solution de H₂O₂ en agitation douce.

La caractérisation de ces DHP a révélé que la méthode *zutropf* engendrerait une prédominance de liaisons β-O-4 entre les monomères, alors que la méthode *zulauf* conduirait à la formation d'une forte proportion de liaisons condensées (β-5, β-β, 5-5 essentiellement) (Sarkanen, 1971). La prédominance de liaisons non-condensées ou condensées se traduit par des différences de conformation des DHP dans l'espace (Joseleau et Ruel, 1997). Le mode *zulauf* donnait initialement un dimère comprenant principalement une liaison 4-O-5 ou 5-5 puis un polymère branché. La seconde procédure, *zutropf*, conduit préférentiellement à un polymère linéaire (figure 16) (Adler, 1977; Higuchi, 1985; Monties, 1989b; Cathala et al., 1998).

La probabilité d'obtention d'un type de liaison donné dépend également du type de monolignols considérés. En effet, ces derniers différant entre eux par leur degré de méthylation, la probabilité de formation de liaisons intermonomères faisant intervenir le C₃ ou C₅ du noyau phénolique varie selon le type d'unité considéré. Les unités G ayant leur C₅ libre présentent une probabilité plus importante d'établir des liaisons condensées β-5 et 5-5 que les unités S (Terashima, 1989). Pour cette raison, des DHP-S seraient essentiellement de type non condensé même en utilisant le mode de polymérisation *zulauf*.

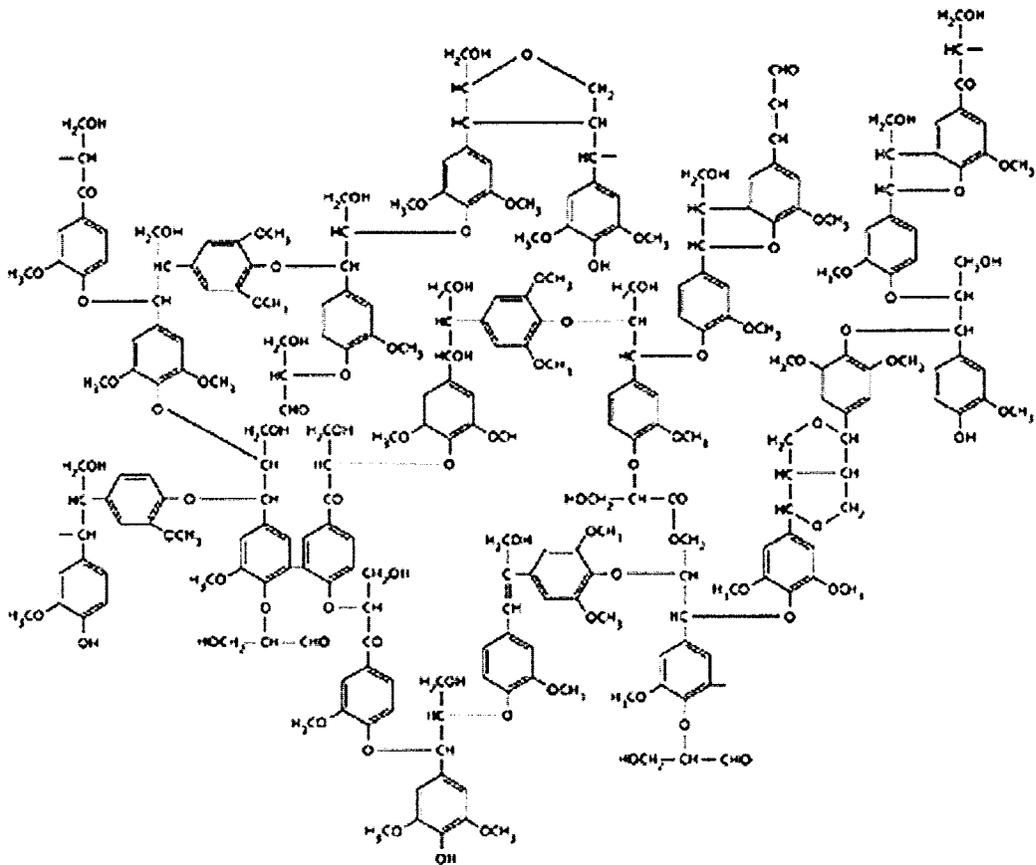


Figure 17 : Modèle statistique de la lignine de bois de hêtre (d'après Nimz, 1974).

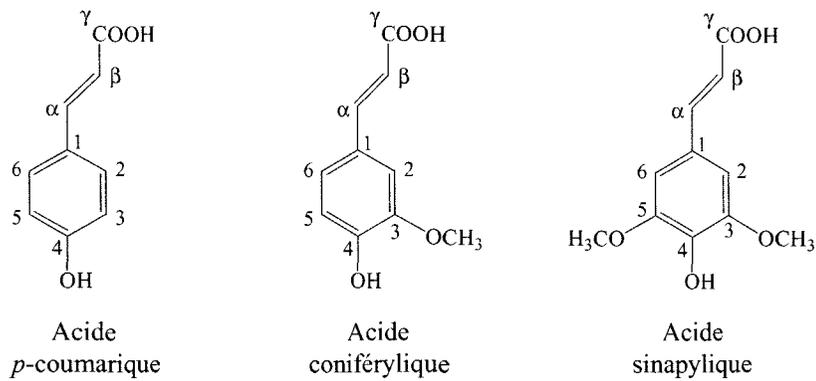


Figure 18 : Structure moléculaire des trois principaux acides phénoliques caractérisés dans les parois végétales.

Modèle moléculaire

La lignine étant une macromolécule tridimensionnelle, elle ne peut être décrite comme une combinaison de sous-unités reliées par quelques liaisons comme la cellulose. Plusieurs auteurs ont tenté d'établir, suite aux travaux de Freudenberg et Neish (1968), un modèle de la structure moléculaire de la lignine sur la base d'études *in situ* et d'analyses dégradatives de DHP ou de lignines extraites (Larsson et Miksche, 1971; Nimz, 1974; Adler, 1977; Sakakibara, 1983). Ces prédictions restent complexes en regard des différentes liaisons intermonomériques. La figure 17 montre un modèle de lignine de bois de bouleau établi après des études par spectroscopies UV et infrarouge, RMN H^3 et C^{13} et dont la formule chimique est $C_9H_{7,16}O_{2,44}(OCH_3)_{1,36}$ (Nimz, 1974). Cependant ces auteurs précisent que ce modèle n'est qu'une prédiction ne reflétant pas la lignine *in planta*. Cette dernière établissant de nombreuses liaisons avec divers polysaccharides pariétaux, son processus de polymérisation est dépendant de ces composés.

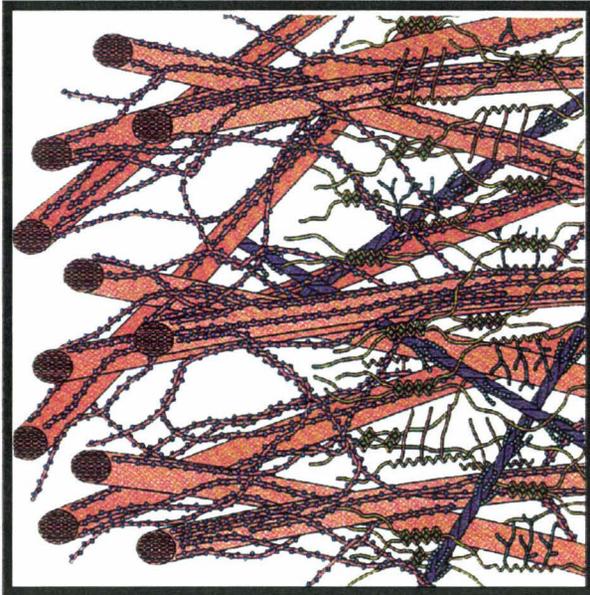
b - Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés aromatiques possédant au moins une fonction acide carboxylique et un groupement hydroxyle phénolique (Gross, 1981). Toutefois, la nomenclature usuelle utilise cette terminologie pour désigner un nombre limité de composés dérivant des acides hydroxycinnamique (C_6-C_3) et benzoïque (C_6-C_1) (Van Sumere, 1989). Nombre de ces acides et de leurs dérivés sont présents dans le règne végétal dans les cellules, à l'intérieur du protoplasme, *i.e.* les acides phénoliques extractibles, et/ou sont liés de manière covalente à des composés pariétaux, *i.e.* les acides phénoliques pariétaux (Yamamoto et al., 1989). Les acides phénoliques proviennent de la même voie de biosynthèse que les monolignols dans laquelle ils sont des composés intermédiaires (Freudenberg et Neish, 1968).

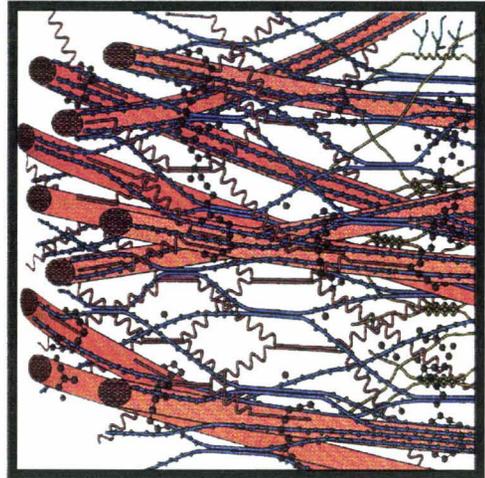
Les acides phénoliques pariétaux sont très majoritairement des acides hydroxycinnamiques. Parmi ceux ci, les acides trans-*p*-coumarique et trans-férulique sont les plus courants (figure 18), la détection d'acides trans-sinapique et trans-caféique étant spécifique à certaines espèces. La présence d'acides benzoïques est rapportée chez quelques espèces (Bate-Smith, 1962; Monties, 1984b; Gordon et al., 1985; Wallace et Fry, 1994).

La présence d'acides phénoliques pariétaux semble générale chez les végétaux (Harris et Hartley, 1976). Leur teneur reste globalement très faible (Wallace et Fry, 1994) excepté chez les monocotylédones (~0,5 à 1,5 % de la masse pariétale sèche) et quelques dicotylédones (Salicacées et les Chénopodiacées : 0,3 %) (Nakano et al., 1958; Hartley et Ford, 1989; Yang et Uchiyama, 2000).

A : Modèle de type I (dicotylédones)



B : Modèle de type II (monocotylédones)

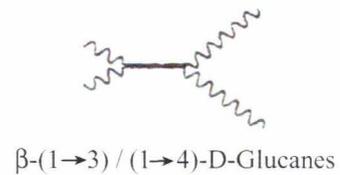
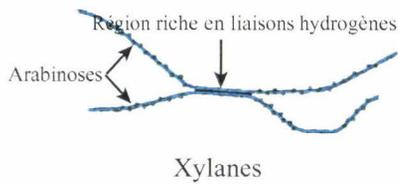


Légende :

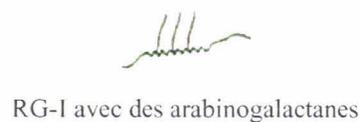
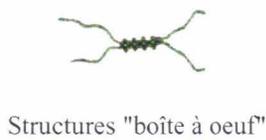


Microfibrilles de cellulose

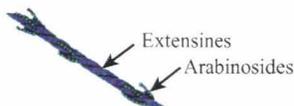
Hémicelluloses :



Pectines :



Protéines :



Polymères phénoliques :



Figure 19: Modèles structurels tridimensionnels putatifs de la paroi primaire des dicotylédones (type I) et des monocotylédones, graminées essentiellement (type II) (d'après Carpita et McCann, 2000). Ces modèles rendent compte des interactions potentielles entre les différents composés pariétaux.

III - ARCHITECTURE PARIETALE

3.1 - DYNAMIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE

Après leur sécrétion dans l'espace extracellulaire, les polymères pariétaux s'organisent et s'assemblent en une structure cohésive : la paroi. L'évolution chimique et architecturale de cette structure est associée aux événements morphogénétiques de la cellule qu'elle entoure. Trois stades sont facilement identifiables : la cytodierèse, l'élongation et la maturation cellulaires, chacun étant relié à une modification des propriétés physico-chimiques des parois (Gibeaut et Carpita, 1994). La première ébauche pariétale formée correspond à la plaque cellulaire où de nombreuses vésicules golgiennes viennent déverser leur contenu. Cette structure, formée d'un gel épais constitué principalement de pectines riches en HG associées entre elles *via* des ions Ca^{2+} , formera à terme la lamelle moyenne. Dans un deuxième temps, au cours de l'expansion et de la différenciation cellulaire, l'apposition, de pectines (~30 %), de microfibrilles de cellulose (~25 %) et d'hémicellulose (~30 %) conduit à la formation de la paroi primaire. L'établissement de liaisons diverses entre ces différents constituants permet la formation d'une structure fibrillaire souple et extensible (Barnoud, 1980). Enfin, lorsque la croissance cellulaire a cessé, certaines cellules élaborent, au niveau de la face interne de la paroi primaire, une paroi secondaire. Cette structure composée notamment de cellulose et d'hémicelluloses et parfois de lignines possède une résistance accrue (Gibeaut et Carpita, 1994; Terashima et al., 1998).

L'organisation des différents polymères au sein de ces structures pariétales a fait l'objet de divers modèles, la plupart relatifs aux parois primaires. D'après Carpita et Gibeau (1993), la paroi ne doit plus être appréciée comme un simple cadre rigide mais plutôt comme une mosaïque de domaines possédant des formes et des fonctions diverses. Dans ce sens, ces auteurs ont proposé deux modèles moléculaires de la paroi primaire : un modèle de type I pour les dicotylédones et certaines monocotylédones et un modèle de type II pour les graminées (figure 19). Plus récemment Bergander et Salmen (2002) ont élaboré deux modèles de parois secondaires pour tenter de relier leurs propriétés avec l'architecture pariétale de la cellulose et des hémicelluloses.

Globalement ces différents modèles reposent sur une organisation en maille à différents domaines ou réseaux structurellement indépendants et fonctionnellement interdépendants. Un premier réseau fibrillaire cellulose-hémicelluloses est enrobé par un second constitué de pectines dans lequel s'insinue un troisième domaine regroupant les protéines structurales (Carpita et Gibeaut, 1993; Cosgrove, 1999). La lignification survenant en fin de croissance cellulaire conduit à un quatrième réseau s'incrétant dans cette structure néoformée.

3.2 - LE DOMAINE HEMICELLULOSES - CELLULOSE

La cellulose constitue une trame fibrillaire dont les propriétés déterminent l'élasticité pariétale longitudinale des parois. L'orientation des microfibrilles de cellulose dans les parois conditionne la résistance mécanique de ces dernières (Bergander et Salmen, 2000;2002). Dans la paroi primaire, l'alignement parallèle des 5 à 10 strates de microfibrilles de cellulose est associé à une structure très élastique. Par contre, l'orientation différentielle des microfibrilles de cellulose dans S1, S2 et S3 (Wardrop et Bland, 1959) conduit à une structure pluristratifiée (paragraphe B - 1.3) très résistante.

Cette architecture fibrillaire repose essentiellement sur les interactions cellulose-hémicelluloses. En effet, les hémicelluloses ont la capacité de se lier par liaisons hydrogènes à la cellulose (Joseleau, 1980). En regard des travaux de Bergander et Salmen (2002), le domaine cellulose-hémicelluloses établi dans les parois primaires (Carpita et Gibeaut, 1993) apparaît semblable dans les parois secondaires. Cependant, dans ces dernières, la matrice amorphe enrobant les microfibrilles est essentiellement hémicellulosique tandis qu'elle est également riche en pectines dans les parois primaires. Le domaine cellulose-hémicelluloses apparaît ainsi essentiel à l'architecture des parois secondaire.

Le domaine hémicelluloses-cellulose s'appuie sur la structure des hémicelluloses majoritaires dans les parois, les xylanes (paroi secondaire) et les xyloglucanes (paroi primaire). Ces polysaccharides à longue chaîne sont à la fois présents à la surface des microfibrilles de cellulose et dans l'espace inter-microfibrilles. Les ramifications de leur axe principal limite leur association avec les autres polymères pariétaux. Ainsi, dans la matrice pariétale, une première région de l'axe principal (β - $(1\rightarrow4)$ glucane) est capable de se lier aux microfibrilles de cellulose tandis qu'une deuxième région peut s'associer avec i. une autre microfibrille de cellulose ou ii. avec une deuxième molécule de xylane ou de xyloglucane présente dans l'espace inter-microfibrilles. Ces associations cellulose-hémicellulose-cellulose ou cellulose-hémicellulose-hémicellulose-cellulose espacent et "fixent" les microfibrilles de cellulose dans la paroi lui conférant ainsi une certaine rigidité (Carpita et Gibeaut, 1993). De plus, dans les parois primaires, des répulsions électrostatiques entre groupements carboxyles des acides galacturoniques des xyloglucanes associées aux microfibrilles participent à maintenir ces dernières espacées (Reis et al., 1994). L'évolution de la structure des hémicelluloses au cours de la différenciation cellulaire, *i.e.* âge des tissus, modifie leurs interactions avec la cellulose, par exemple la synthèse de xylanes moins ramifiées favorise leur orientation longitudinale entre les microfibrilles. Ce modèle d'organisation est justifié par le rôle prépondérant dans l'élasticité pariétale transversale (force de compression) des hémicelluloses, notamment dans les parois secondaires (Bergander et Salmen, 2002).

3.3 - LE DOMAINE PECTIQUE

Très important dans les parois primaires, le deuxième réseau pectique enrobe le maillage cellulose-hémicelluloses dans une structure gélifiée. *In muro*, les pectines peuvent se lier aux différents polymères pariétaux (Thibault, 1980; Goodwin et Mercer, 1990; Willats et al., 2001).

Les HG et les RG-I sont les principaux constituants de ce réseau dans lequel sont présents en teneurs moindres des arabinanes et des galactanes (Carpita et Gibeau, 1993). Des RG-II liées de façon covalente à des RG-I et des HG ont été récemment mises en évidence (Willats et al., 2001). Les dimères de RG-II contribueraient vraisemblablement à l'intégrité structurale du réseau pectique (Carpita et al., 1996; Kobayashi et al., 1999). Des arabinanes, galactanes et arabinogalactanes seraient fixées par des liaisons covalentes de nature glycosidique aux RG. Les zones riches en HG acides participeraient à la formation de gels suite à des liaisons inter-chaînes pectiques *via* des ions Ca^{2+} (Powell et al., 1982; Jarvis, 1984; Lacoux, 2002).

Les association pectines-hémicelluloses et/ou cellulose se réalisent par différentes liaisons covalentes (ester) et non-covalentes (hydrogène, Van der Waals) (Taylor et al., 1990; Albersheim et al., 1994; Cosgrove, 1997a). Une proportion importante de XyG est associée de façon covalente au réseau pectique par l'intermédiaire des arabinanes et/ou des galactanes des RG-I. Chez les Chénopodiacées, des acides féruliques estérifiés aux résidus arabinosyls et galactosyls relient les chaînes pectiques. Enfin, des association covalentes ont été montrées entre des pectines (RG-I et RG-II) et des enzymes pariétales (extensines) (Qi et al., 1995; Foster et al., 1996).

3.4 - LE DOMAINE PROTEIQUE

Le troisième niveau d'organisation implique les protéines pariétales. Ces dernières établissent diverses interactions protéines-polysaccharides, protéines-protéines (*via* des liaisons isodityrosine) au sein de la paroi conduisant à la formation d'un réseau. L'affinité des composés phénoliques pour les résidus aromatiques et hydroxyprolines suggère l'implication des protéines structurales dans le processus de lignification et notamment des HRPG et des GRP (Condit et Maegher, 1986; Luck et al., 1994). Ces protéines pourraient servir de point d'initiation de la lignification et favoriseraient ensuite une réticulation ordonnée de la lignine dans la matrice pariétale.

Outre les protéines structurales, de nombreuses enzymes ont été identifiées dans les parois (Lamport, 1986; Ye et al., 1991; Showalter, 1993). Cependant leur localisation et leur association avec les polymères pariétaux restent imprécises et font l'objet de nombreux travaux.

3.5 - LE DOMAINE PHENOLIQUE

La présence des composés phénoliques modifie les propriétés mécaniques, chimiques et biologiques des parois (Ralph et al., 1998a; Lewis et al., 1999). Ces composés ne sont pas simplement déposés ou polymérisés dans la paroi mais contribuent à son architecture en établissant diverses liaisons covalentes avec les autres polymères (Monties, 1989b; Terashima et al., 1998; Helm, 2000). L'étude de ces liaisons a fait l'objet de nombreux travaux révélant une importante complexité et une grande diversité (figure 20) (Scalbert et al., 1985; He et Terashima, 1991; Iiyama et al., 1994; Helm, 2000) :

- Les monolignols établiraient avec les polysaccharides des liaisons ester à partir des groupements hydroxyles C γ ou C α de leur chaîne propène et/ou des liaisons éther engageant leur O $_4$ (Scalbert et al., 1985; He et Terashima, 1991; Iiyama et al., 1994). Les pectines et les hémicelluloses seraient les principaux polysaccharides impliqués dans de telles structures, les associations lignines-cellulose étant peu fréquentes (Terashima et al., 1998).
- Les lignines seraient également susceptibles de se lier à des protéines pariétales, la nature de ces liaisons n'est cependant pas encore élucidée (Monties, 1989a). De même certains auteurs ont proposé des liaisons de type éther entre des acides phénoliques et des protéines pariétales riches en acides aminés aromatiques (Lozovaya et al., 1999).
- Les acides phénoliques formeraient des structures ester avec les polysaccharides pariétaux (Yamamoto et al., 1989; Iiyama et al., 1990; Ralph et al., 1995). Ces liaisons semblent préférentiellement impliquer les pectines, *via* leurs résidus D-galactose ou L-arabinose chez les dicotylédones, et les hémicelluloses (arabinoxylanes, glucuroarabinoxylanes) *via* un résidu L-arabinose chez quelques dicotylédones et/ou xylose chez les monocotylédones (Fry, 1982; Ishii, 1997a; Smith et Harris, 2001).
- Les acides phénoliques peuvent également se lier aux lignines par des structures ester aux niveaux des C α et C γ des monolignols et/ou aryle-éther au niveau du C α , C β et C γ (Scalbert et al., 1985; Yamamoto et al., 1989; Ralph et al., 1998a; Sun et al., 1998). Ainsi, ils peuvent être engagés dans les liaisons ester par leur fonction carboxyle (α COOH) et des liaisons éther par leur fonction hydroxyle (Jacquet et al., 1995). L'acide férulique apparaît préférentiellement impliqué dans une structure ester avec des polysaccharides et une liaison éther avec les lignines (Scalbert et al., 1985) tandis que l'acide *p*-coumarique formerait des structures éther-acide *p*-coumarique-ester internes aux lignines (He et Terashima, 1989; Monties, 1991).

- Par ailleurs, les acides phénoliques estérifiés peuvent se dimériser par couplage oxydatif notamment chez les monocotylédones. La formation de ces dimères di-férulique (figure 21), di-coumarique ou mixtes (acide férulique-acide coumarique) reste encore obscure mais elle semblerait impliquer un mécanisme photochimique (stéréocyclodimères) et/ou enzymatique *via* la catalyse de peroxydases (déhydrodimères) (Ralph et al., 1994; Grabber et al., 1995; Yang et Uchiyama, 2000; Ward et al., 2001).

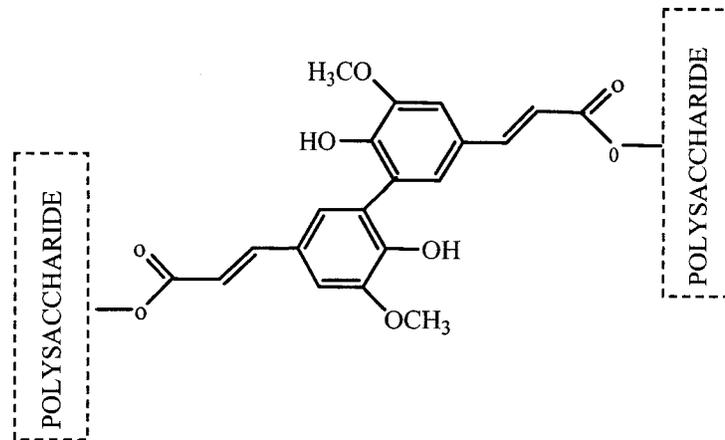


Figure 21 : Exemple de ponts covalents diférulique entre des polysaccharides pariétaux (d'après Ishii, 1997a).

Ces diverses et nombreuses structures ester et/ou éther augmentent la réticulation des polymères pariétaux en permettant la formation des ponts entre les polysaccharides pariétaux et/ou entre les lignines et les polysaccharides. Ces liaisons conduisent à accroître la rigidité pariétale et la cohésion intercellulaire. Elles sont également susceptibles d'intervenir dans les mécanismes d'arrêt de la croissance cellulaire en conférant à la cellule sa forme définitive (Hartley et Ford, 1989; Ishii, 1997a; Yang et Uchiyama, 2000). En outre, les complexes polysaccharides-lignines *via* l'acide férulique ancrant les lignines aux polysaccharides agiraient comme initiateur et/ou comme site de nucléation pour la lignification des parois (Scalbert et al., 1985; Ralph et al., 1995; Ward et al., 2001).

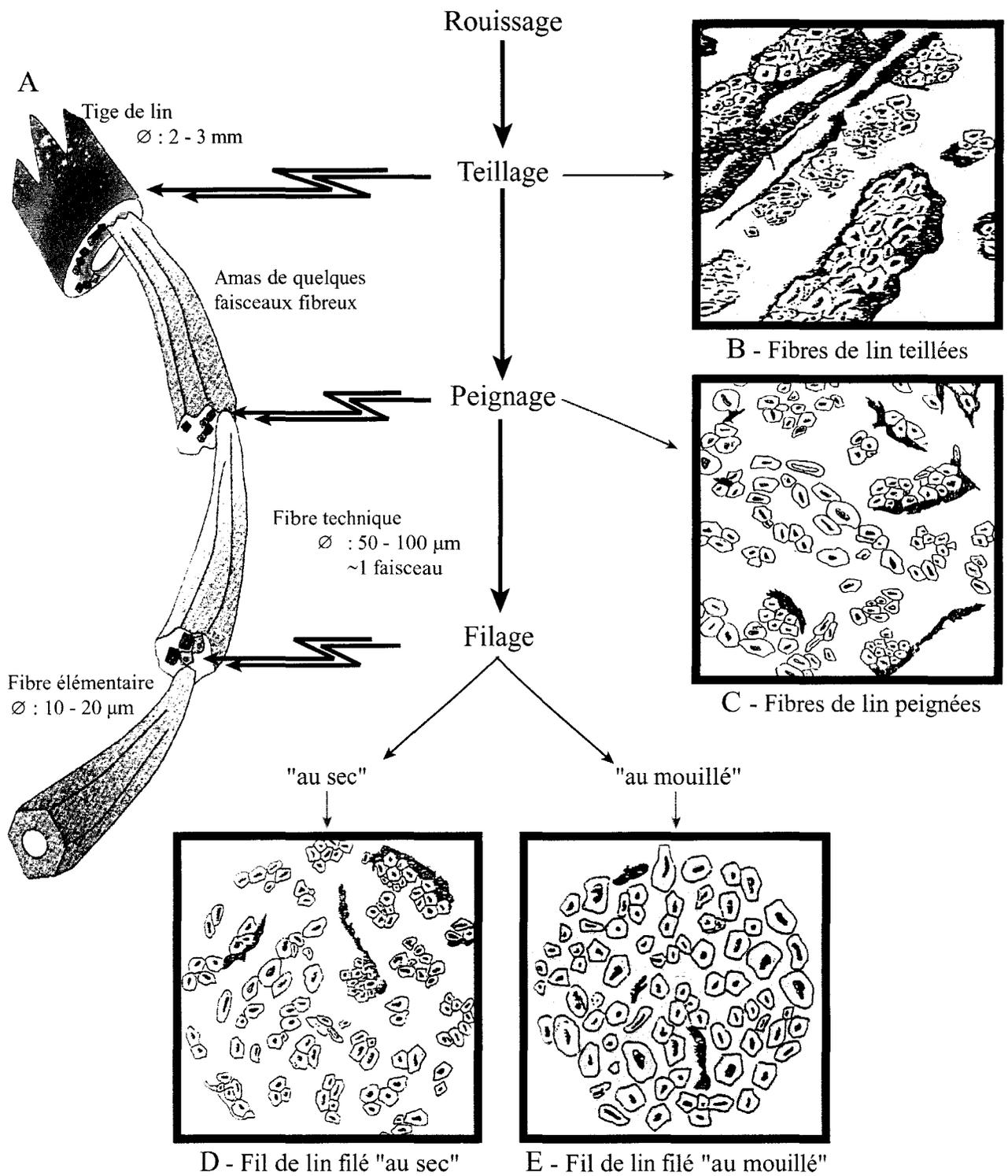


Figure 22 : Evolution de la structure des éléments fibreux au cours des principales étapes de la transformation textile du lin.

A : Finesse et composition des éléments fibreux (d'après Bos et al., 2002). B, C, D, E : Représentations schématiques d'une coupe transversale des éléments fibreux. Les impuretés sont illustrées en noir (d'après I.T.L.).

C – EVOLUTION DES STRUCTURES PARIETALES DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES AU COURS DU TRAITEMENT DU LIN

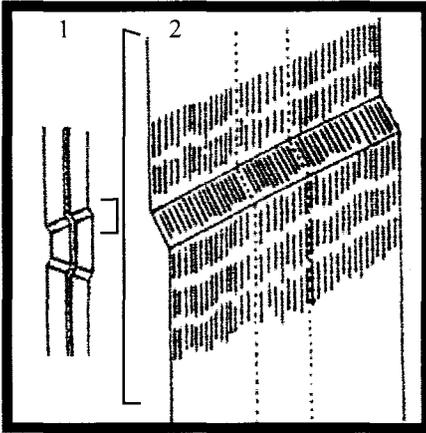
I - STRUCTURE DES FAISCEAUX FIBREUX

Au cours de la transformation textile des lins, la finesse des éléments fibreux augmentent suite à leur désolidarisation des tissus environnants (rouissage puis teillage) et à leur dissociation partielle (peignage puis filage). Leur section baisse de 10 000 μm^2 après rouissage à des valeurs comprises entre 150 et 500 μm^2 après filage (Girault et al., 1997). Cet affinage traduit une évolution de la composition des éléments fibreux regroupant grossièrement dans la tige de lin non rouie l'ensemble des faisceaux fibreux. La figure 22 montre l'évolution des éléments fibreux au cours des différentes étapes de la transformation des tiges de lin rouies.

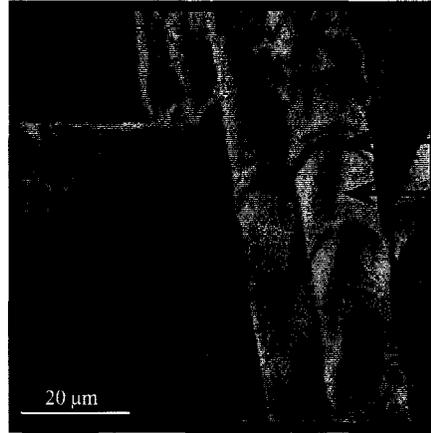
- Au cours du rouissage, les enzymes hydrolysantes agissent essentiellement au niveau des lamelles moyennes et des jonctions tricellulaires (Van Sumere, 1992). Au sein des faisceaux fibreux, une fraction des pectines, notamment les arabinanes, les galactanes et les blocs homogalacturonanes non estérifiées sont ainsi solubilisées (Morvan et al., 1990). Plus généralement, les quantités d'oses chutent au cours de cette première étape de transformation.
- Après le teillage, les éléments fibreux sont généralement constitués de plusieurs faisceaux accolés, parfois d'un faisceau et très rarement d'une fraction de faisceau (figure 22, B). Une quantité importante d'impuretés constituées essentiellement d'écorce (cuticule, épiderme, parenchyme cortical) sont présentes autour des éléments fibreux.
- Après le peignage, l'élément fibreux est majoritairement constitué d'un faisceau, parfois d'une fraction de faisceau et rarement d'une fibre élémentaire isolée (figure 22, C). Les fibres peignées contiennent en outre nettement moins d'impureté.
- Après filature, les éléments fibreux sont constitués d'une fraction de faisceaux, la proportion de fibres élémentaires est plus importante. Les étapes de dégomme puis de filage "au mouillé" permettent une dissociation plus importante des faisceaux fibreux, les fibres élémentaires étant plus individualisées en comparaison du filage "au sec" (figures 22, D et E).

La dissociation des faisceaux fibreux apparaît comme un paramètre essentiel à l'obtention de fil de lin d'une qualité supérieure. La cohésion interfibre conditionne ainsi l'isolement des fibres élémentaires et a un impact direct sur la qualité du produit fini (McDougall et al., 1993; Foulk et al., 2001; Rihouey et Mesnage, 2001; Evans et al., 2002).

A



B



"Genou"

Une fibre périphloémienne

Figure 23 : Schématisation (A) et photographie (B) d'un accident de structure "genou".

A : Interprétation avec trajet coudé de la cellulose de la paroi secondaire dans une défaillance locale "genou" : A2 : Agrandissement de la zone encadrée en A1 (d'après Roland et al., 1995). B : Photographie après observation au microscope électronique à balayage (d'après Focher et al., 1992).

II - STRUCTURE DES FIBRES ELEMENTAIRES

Les procédés mécaniques employés lors du teillage et du filage des lins peuvent engendrer et/ou accentuer des modifications ponctuelles de la structure pariétale des cellules fibreuses. L'observation des fibres élémentaires au microscope révèle quelques imperfections sur leur surface globalement lisse : plis, craquements, cassures. Cependant, en lumière polarisée ou en microscopie électronique à balayage, les fibres élémentaires présentent dans leur continuité longitudinale des accidents de structure plus caractéristiques et très apparents appelés "genoux" (figure 23) (Anderson, 1927; Bossuyt, 1941; Catling et Grayson, 1982; Focher et al., 1992). Ces accidents impliquent principalement la cellulose et seraient dus à des distorsions ponctuelles de l'orientation des microfibrilles (Nettelnstroth, 1968; Roland et al., 1995; Khalili et al., 2002). Dans les fibres natives, ces "genoux" sont répartis irrégulièrement le long des fibres, leur nombre variant de 100 à 500 pour une fibre de 50 mm, mais ils affectent parallèlement toutes les fibres élémentaires d'un même faisceau (Focher et al., 1992; Rognes et al., 2000; Khalili et al., 2002). Ces auteurs suggèrent que ces accidents sont intrinsèques aux fibres et qu'ils résultent d'une modification des pressions subits par les faisceaux fibreux au cours de leur croissance.

Ces accidents se développent et s'accroissent tout au long du cycle d'extraction et de travail des fibres (Sotton, 1989) avec une fréquence variant selon l'intensité de leur traitement, notamment les étapes de teillage et de peignage. Ainsi, plus la cohésion interfibre est importante plus ces opérations mécaniques seront drastiques favorisant de ce fait l'apparition de ces "genoux". Or ces derniers constituent une zone de faiblesse des fibres de lin, la rupture à l'étirement se produisant à leur niveau (Focher et al., 1992; Roland et al., 1995; Khalili et al., 2002). Par ailleurs, ces modifications ponctuelles joueraient un rôle non négligeable dans la prédisposition importante des tissus en lin à se froisser.

III - ROLE DES POLYMERES NON-CELLULOSIQUES

La matrice pariétale des fibres de lin est un composite dont certains éléments sont très résistants à la traction (cellulose) alors que d'autres sont plus malléables et étirables (pectines, hémicelluloses) (Bos et al., 2002). Il résulte de cette structure un état visco-élastique complexe dont les propriétés mécaniques résultent de l'ensemble de ses constituants (McDougall et al., 1993).

Les changements structuraux observés au cours du traitement des fibres sont rapportés comme résultant de la modification de la réactivité des constituants pariétaux et de leur accessibilité (Focher et al., 1992). L'étude des modifications physiques et chimiques au cours de la transformation textile

des fibres a révélé le rôle majeur de la lamelle moyenne dans leurs propriétés et leurs cohésions intercellulaires (Bossuyt, 1941; Heude, 1961; Mooney et al., 2001). Son analyse chimique a montré l'importance des composés non-cellulosiques dans le comportement des fibres (Lindeberg et Lange, 1948; Morvan et al., 1989b; Van Hazendonk et al., 1996). Par ailleurs, la solubilisation différentielle de la matrice polysaccharidique a montré que la cellulose ne contribue qu'à 16 % de la résistance totale des faisceaux fibreux (Morvan et al., 1990). L'ensemble de ces résultats suggèrent une relation étroite entre les polymères non-cellulosiques de la fibre élémentaire, notamment ceux de la lamelle moyenne, et l'efficacité de séparation et de divisibilité des éléments fibreux (Morvan et al., 1990; McDougall et al., 1993). Parmi ces polymères, des composés phénoliques auraient un impact majeur néfaste. Ces derniers seraient présents dans l'ensemble de la matrice pariétale des fibres (Sharma et al., 1999a), mais ils sont principalement détectés, par histochimie, au niveau de la lamelle moyenne et des jonctions tricellulaires des fibres (Anderson, 1927; Focher et al., 1992; Akin et al., 1996a; Gorshkova et al., 2000).

De nombreuses études ont montré que ces composés phénoliques augmentent la cohésion interfibre et de ce fait entravent la séparation des éléments fibreux du rouissage jusqu'à la filature (Anderson, 1927; Focher et al., 1992; Roland et al., 1995; Sharma et al., 1999a; Rihouey et Mesnage, 2001). Par conséquent, ils altèrent la résistance mécanique des fibres (augmentation du nombre de structure "genoux") et leur qualité textile intrinsèque (fils plus grossiers) (Crozier, 1950; Faughey et Sharma, 2000; Rognes et al., 2000).

La nature de ces composés phénoliques est toujours débattue. En regard de la littérature, ils sont généralement considérés comme étant des lignines (Tammes, 1907; Anderson, 1927; Sharma, 1986a; McDougall, 1991; Focher, 1992; Roland et al., 1995; Akin et al., 1996a; Gorshkova et al., 2000). Toutefois divers auteurs maintiennent un avis contradictoire et suggèrent la présence de composés phénoliques divers (pigments...) mais pas de lignines ou rejettent l'existence de composés phénoliques dans ces fibres (Love et al., 1994; Morrison et al., 2003). De telles oppositions peuvent être rapprochées des faibles teneurs en composés phénoliques généralement détectés dans ces tissus fibreux variant approximativement entre ~0,1 et 7 %. L'étude de ces composés phénoliques apparaît ainsi essentielle à la compréhension de la cohésion interfibre et à l'amélioration de la qualité du produit fini.

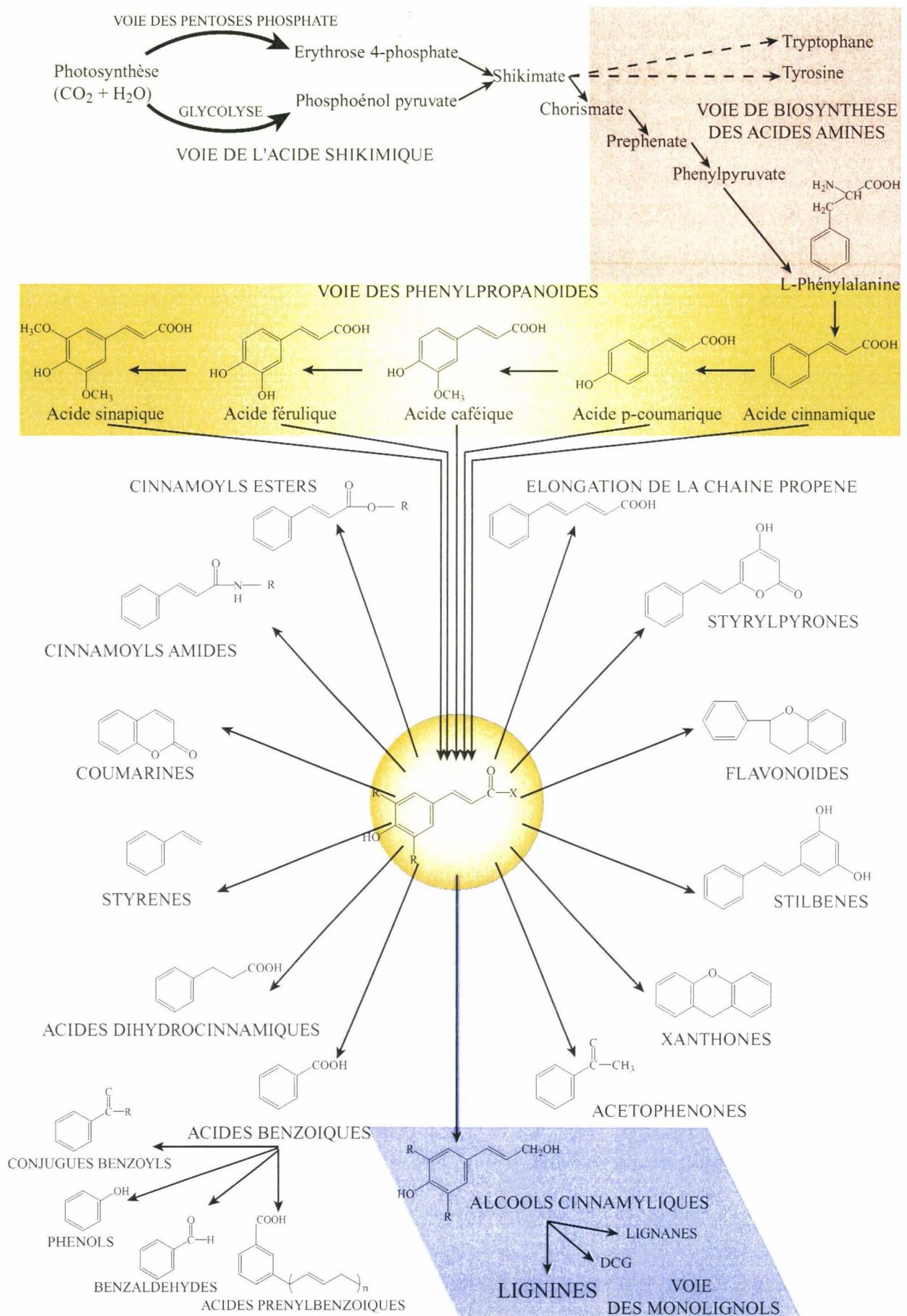


Figure 24 : Métabolisme général des composés phénoliques chez les végétaux.

L'interconnexion des voies de l'acide shikimique, de la biosynthèse des acides aminés aromatiques, des phénylpropanoïdes et des monolignols démontre le rôle central des acides hydroxycinnamiques dans la formation des divers composés phénoliques (d'après Van Sumere, 1989). DCG : glucoside d'alcool déhydrodiconiférylique; R = H ou OCH₃.

D – LA BIOSYNTHESE DES COMPOSES PHENOLIQUES

D'un point de vue général, les composés phénoliques sont issus de complexes voies de biosynthèse pouvant être divisées en deux parties : la première, commune à toutes ces molécules aromatiques, conduit à la formation des acides hydroxycinnamiques; la seconde, utilise ces derniers comme précurseur et est spécifique de chaque famille de composés phénoliques (figure 24). Les acides hydroxycinnamiques occupent ainsi une position centrale dans le métabolisme des composés phénoliques. Leur biosynthèse implique plusieurs segments métaboliques (figure 24) :

- La voie de l'acide shikimique qui conduit à la formation du chorismate à partir de phosphoénolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate issus respectivement de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates.
- La voie de biosynthèse des acides aminées aromatiques permettant notamment la formation de la phénylalanine et de la tyrosine à partir du chorismate (Herrmann, 1995).
- La voie des phénylpropanoïdes débutant par la conversion de la phénylalanine (ou de la tyrosine chez certaines monocotylédones) en acides *trans*-hydroxycinnamiques (C₃-C₆) lesquels peuvent être ensuite estérifiés avec le coenzyme A pour fournir les hydroxycinnamoyls coenzyme A correspondants.

Polymère phénolique supposé favoriser la cohésion intercellulaire des fibres périphloémiennes du lin, les lignines dérivent de ces précurseurs estérifiés et nécessitent en sus l'activation :

- De la voie des monolignols *stricto sensu* qui implique la réduction des hydroxycinnamoyls coenzyme A en leur alcool hydroxycinnamilique respectif. Cette voie est couramment incluse dans la voie des phénylpropanoïdes.
- Des mécanismes oxydatifs pariétaux. Cette dernière étape de la biosynthèse des lignines correspond à l'oxydation enzymatique des alcools phénylpropénoïques permettant ensuite leur polymérisation dans la paroi.

La plupart des enzymes et des gènes correspondants impliqués dans la voie générale de biosynthèse des lignines qui inclue les voies des phénylpropanoïdes, des monolignols puis leur polymérisation, sont maintenant identifiés et caractérisés (Whetten et Sederoff, 1995; Baucher et al., 1998; Anterola et Lewis, 2002; Boerjan et al., 2003). Les développements en parallèle de stratégies de génie génétique vis à vis de ces enzymes et de techniques d'analyse chimique des lignines ont conduit à la révision de diverses étapes de leur biosynthèse, certaines faisant encore l'objet de controverses. En outre, la variabilité des lignines laisse penser que leur biosynthèse ne

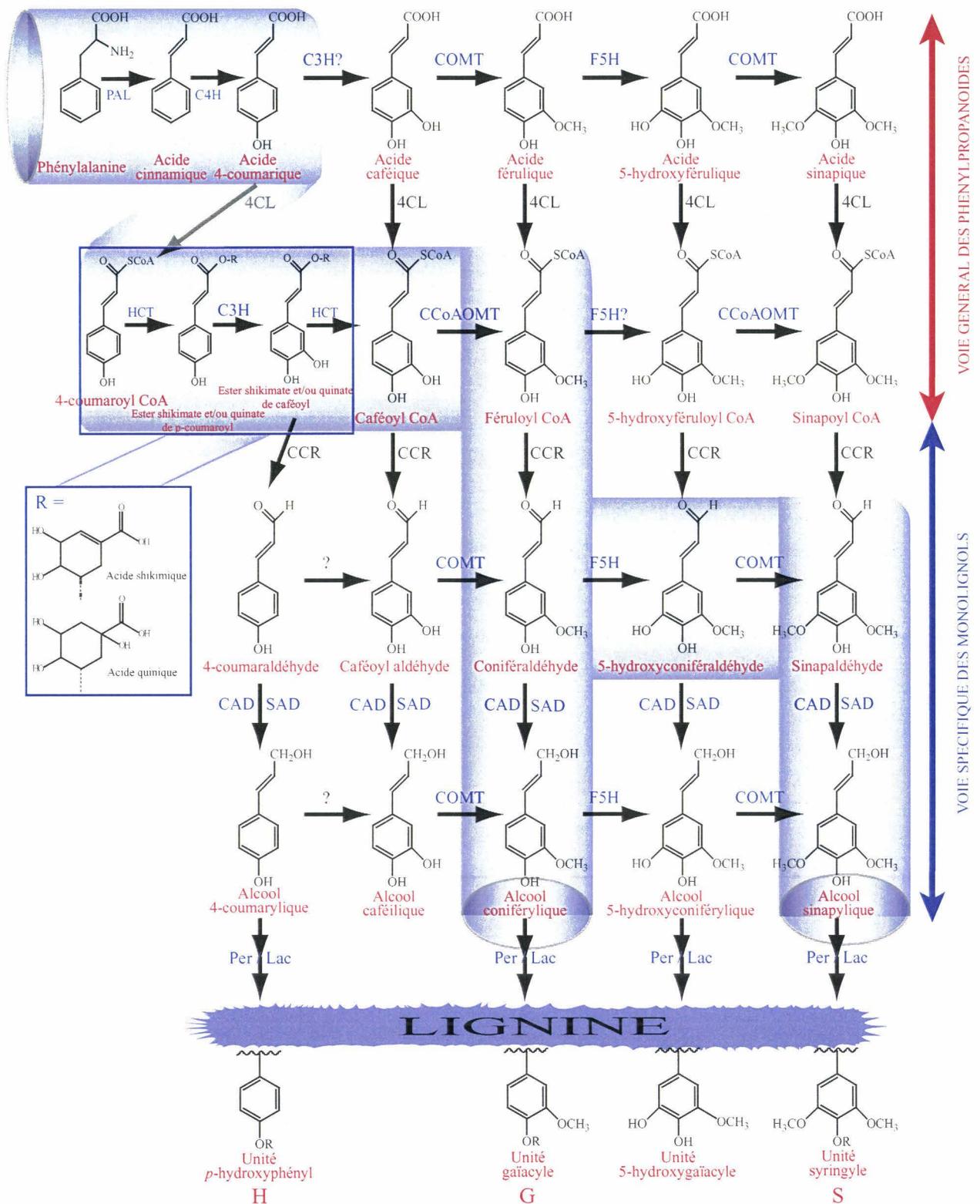


Figure 25: Voie de biosynthèse des monolignols regroupant la voie commune des phénylpropanoïdes et la voie spécifique des monolignols (d'après Baucher et al. 2003 et Dixon et al. 2001).

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.

s'effectue pas selon une voie stricte mais pourrait impliquer différents parcours métaboliques selon les espèces, les tissus et les conditions environnementales (Matsui et al., 1994; Yamauchi et al., 2003). De ce fait, les chapitres suivants donnent une description des enzymes impliquées dans la voie générale de biosynthèse des lignines mais ne peuvent prétendre fournir un modèle.

I - LA VOIE GENERALE DES PHENYLPROPANOÏDES

Cette voie comportant une succession de réactions de désamination, d'hydroxylation, de méthylation et d'estérification (figure 25) initie la synthèse des composés phénoliques chez les végétaux. En effet, elle permet :

- La formation des acides hydroxycinnamiques, notamment des acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique. Ces composés, très répandus dans les plantes, peuvent se lier à divers composés possédant des groupements hydroxyles (polysaccharides, lignine, cutine, lipides, terpènes, alcaloïdes... (Strack et Mock, 1993; Freire et al., 2002).
- La formation des hydroxycinnamoyls CoA précurseurs de plusieurs classes de composés incluant les monolignols mais aussi les lignanes, certaines phytoalexines, les coumarines, les stilbènes... (Hahlbrock et Scheel, 1989; Van Sumere, 1989; Holton et Cornish, 1995).

L'induction de cette voie semble sous le contrôle de nombreux facteurs tant biotiques (pathogènes) qu'abiotiques (lumière, stress) et peut être corrélée au large spectre d'action des composés phénoliques. (Bucciarelli et al., 1998; Dixon et al., 2002). Leurs rôles très variés (antifongiques, pigments...) sont établis mais leurs définitions exactes restent encore incomplètes (Ibrahim et al., 1998; Zacchino et al., 1999; Barber et al., 2000).

1.1 - LA PREMIERE ETAPE DE DESAMINATION : LA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE

Cette première étape de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, catalysée par la phénylalanine ammonia lyase (PAL, EC 4.3.1.5), constitue la transition entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (Rubery et Fosket, 1969). Cette enzyme permet la désamination non-oxydative de la L-phénylalanine pour donner l'acide cinnamique (figure 25). Chez quelques monocotylédones, cette étape est catalysée par la tyrosine ammonia-lyase (TAL) et s'effectue dans ce cas à partir de la tyrosine (Regnier et Macheix, 1994;1996; Whetten et al., 1998). La TAL n'exclue cependant pas la PAL, il a été isolé chez le maïs un ADNc codant à la

fois pour une TAL et une PAL (Rosler et al., 1997). Les molécules dérivés de l'acide cinnamique sont qualifiés de composés hydroxycinnamiques.

La PAL est un tétramère possédant une masse molaire comprise entre 240 et 330 kDa associé au réticulum endoplasmique (Lawton et al., 1983; Wagner et Hrazdina, 1984; Jorin et al., 1988; Whetten et Sederoff, 1992; Kumar et Ellis, 2001). Chez les angiospermes, cette enzyme est codée par une famille multigénique comportant généralement peu de membres (2 à 5) pouvant être subdivisée en 2 ou 3 classes, les séquences nucléotidiques des différents membres étant peu conservées. L'expression de ces différentes isoformes semble être tissus-spécifique et dépendante des conditions d'inductions (constitutives, stimuli biotiques ou abiotiques) (Ecker et Davis, 1987; Jorin et Dixon, 1990; Zhu et al., 1995).

La réduction de 85 % des activités PAL dans des tabacs par transgénèse a conduit à des plantes présentant une diminution de 50 % de leur teneur en lignine. L'analyse de sa composition monomérique a révélé une réduction des proportions en unités G induisant une augmentation du rapport S/G (Bate et al., 1994; Sewalt et al., 1997b; Korth et al., 2001). Ces plantes sont sévèrement affectées dans leur développement et sont plus sensibles aux pathogènes. Elles présentent en outre des teneurs anormalement élevées en acide chlorogénique et en rutine (Elkind et al., 1990; Bate et al., 1994; Maher et al., 1994; Blount et al., 2000). Ces effets pléiotropes d'une inhibition de la PAL ont été rapprochés des nombreuses fonctions des composés phénoliques dans les plantes (Anterola et Lewis, 2002).

1.2 - LES ETAPES D'HYDROXYLATION

Selon les composés hydroxycinnamiques, 1, 2 ou 3 réactions d'hydroxylation surviennent au niveau de leur cycle benzénique, respectivement en position *para*, *meta* 3 et *meta* 5 par rapport à la chaîne propène. Chacune de ces réactions est catalysée par une enzyme spécifique : respectivement la cinnamate 4-hydroxylase, la coumarate 3-hydroxylase et la férulate 5-hydroxylase (figure 25). Ces trois enzymes appartiendraient à la superfamille des cytochromes P450 (possèdent un hème) et seraient ancrées dans la membrane externe du réticulum endoplasmique par leur extrémité N-terminal hydrophobe (Smith et al., 1994; Chapple, 1998; Lewis et al., 1999).

a - La cinnamate 4-hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11)

Cette première étape d'hydroxylation, catalysée par la cinnamate 4-hydroxylase, transforme l'acide cinnamique en acide *para*-coumarique. Elle consiste au greffage régiospécifique d'un résidu hydroxyle au niveau du C₄ du cycle aromatique de l'acide cinnamique (figure 25).

Cette enzyme, une monooxygénase d'environ 57 kDa, a été purifiée à partir de nombreuses angiospermes. Elle est associée à une NADPH réductase et appartient à la sous-famille CYP73 (Teutsch et al., 1993; Schuler, 1996). Plusieurs travaux suggèrent que la C4H et la PAL soient réunies dans un complexe multienzymatique permettant ainsi un contrôle du flux carboné dans la voie des phénylpropanoïdes (Koopmann et al., 1999; WinkelShirley, 1999). La C4H semblerait codée selon les espèces par un seul gène (Bell Lelong et al., 1997) ou par une petite famille multigénique dont les membres présentent une forte homologie (Ro et al., 2001).

La modification de l'expression de la C4H par stratégie sens ou antisens a été réalisée dans le tabac (Sewalt et al., 1997b; Blee et al., 2001). Contrairement à sa sur-expression sans effet apparent excepté l'accumulation de métabolites secondaires, sa sous-expression entraîne une forte réduction des teneurs en lignines et de leur ratio S/G (Blount et al., 2002). Une telle opposition des variations S/G entre réduction des activités PAL et C4H suggère une régulation et une organisation très compliquées de ces deux enzymes dans le complexe multienzymatique lequel interviendrait dans le contrôle des unités G et S (Blount et al., 2000; Dixon et al., 2001).

b - La coumarate 3-hydroxylase (C3H)

La C3H catalyse l'hydroxylation du C₃ du cycle aromatique. Peu de données sont disponibles sur cette enzyme dont l'activité démontrée convertit l'acide *p*-coumarique en acide caféique et le *p*-coumaroyl CoA en caféoyl CoA (figure 25) (Kneusel et al., 1989; Kojima et Takeuchi, 1989; Tanaka et Kojima, 1991). La conversion de la phénylalanine en acide caféique dans des fractions microsomales suggère une association de la C3H et de la C4H (Alibert et al., 1972).

Récemment, un gène codant une C3H, a été caractérisé chez *Arabidopsis* ayant une activité *meta*-hydroxylase dont l'intensité serait très dépendante du substrat : forte vis à vis du *p*-coumaroyl quinate et du *p*-coumaroyl shikimate mais faible pour le coumaroyl CoA et l'acide *p*-coumarique (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002). La mutation non-fonctionnelle de ce gène entraîne une forte baisse des teneurs en lignine et une modification de sa composition, cette dernière étant exclusivement constituée de sous-unités H. Ces travaux suggèrent l'implication des esters shikimate et quinate des acides *p*-coumarique et caféique dans la biosynthèse des lignines. Le *p*-coumaroyl CoA serait converti en esters de shikimate et/ou de quinate par une hydroxycinnamoyl-

CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransférase (HCT) avant de subir la réaction d'hydroxylation catalysée par la C3H donnant ainsi des esters de caféoyl CoA. Ces derniers seraient ensuite hydrolysés par la HCT libérant ainsi du caféoyl CoA. (Baucher et al., 2003; Hoffmann et al., 2003).

c - La férulate 5-hydroxylase (F5H) / coniféraldéhyde 5-hydroxylase (Cald5H)

Cette enzyme catalyse la dernière étape d'hydroxylation, au niveau du C5 du cycle aromatique. Initialement caractérisée dans des fractions microsomales de peuplier, la F5H (E.C. 1.14.-) a longtemps été étiquetée comme permettant la conversion de l'acide férulique en acide 5-hydroxyférulique (Grand, 1984; Chapple et al., 1992). Plus récemment, divers travaux ont montré une efficacité enzymatique accrue de la F5H, rebaptisée C5Ald, pour le coniféraldéhyde et l'alcool coniférylique (figure 25) (Matsui et al., 1994; Chen et al., 1999; Osakabe et al., 1999; Matsui et al., 2000). Cette enzyme, une monooxygénase appartenant à la sous-famille CYP84, a été caractérisée chez de nombreuses dicotylédones à partir de ses ADNc (Li et al., 2000), sa purification biochimique ayant toujours échoué. La F5H semble exprimée dans tous les tissus lignifiés et plus intensément dans les tissus riches en sous-unités S (Meyer et al., 1998).

Chez *Arabidopsis*, un mutant déficient en F5H (*fah1*) produit une lignine pauvre en S dans laquelle la fréquence en structures inter-monomériques β -5 et 5-5 était supérieure par rapport au témoin (Chapple et al., 1992). La sur-expression de la *F5H*, sous le contrôle du promoteur de la *C4H*, chez ce mutant conduit à la formation d'une lignine entièrement composée de sous-unités S, très riches en liaisons β -O-4 (Meyer et al., 1998; Marita et al., 1999; Sibout et al., 2002). Chez le tabac et le peuplier, la sur-expression de cette enzyme induit une augmentation par $\sim 2,5$ du rapport S/G associée à une réduction (non-confirmée) des teneurs en lignines (Franke et al., 2000). Chez le peuplier, ces modifications peuvent s'accompagner d'une maturation accéléré du xylème secondaire (Li et al., 2003). Ces résultats démontrent le rôle prépondérant de la F5H dans la biosynthèse des lignines et notamment dans le contrôle des sous-unités S. Leur biosynthèse semblerait s'effectuer préférentiellement *via* le 5-hydroxyconiféraldéhyde et/ou l'alcool 5-hydroxyconiférylique après hydroxylation du coniféraldéhyde et de l'alcool coniférylique respectivement. En effet, la sur-expression de la *F5H* chez *Arabidopsis* conduit à l'incorporation d'alcool 5-hydroxyconiférylique dans la lignine (Ralph et al., 2001a).

1.3 - LES REACTIONS DE METHYLATION

La distinction majeure des lignines entre les espèces réside dans leur composition monomérique. La structure chimique des monolignols différant uniquement par leur degré de méthylation, les réactions de méthylation des hydroxyles situés en positions 3 et 5 du cycle aromatique sont des étapes déterminantes dans le contrôle de la composition des lignines.

De nombreux travaux ont tenté de définir et de caractériser cette différence (Neish, 1968; Shimada et al., 1973; Nakamura et al., 1974; Higuchi, 1985). Depuis l'élucidation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, la méthylation des monolignols était attribuée à une enzyme bispécifique : l'acide caféique/5-hydroxyférulique 3-, 5- *O*-méthyltransférase (COMT), active qu'au niveau des acides hydroxycinnamiques (Brown, 1961; Grisebach, 1981; Bugos et al., 1991). La purification à partir de suspensions cellulaires de carotte et de persil d'une deuxième *O*-méthyltransférase, la caféoyl coenzyme A 3- *O*-méthyltransférase (CCoAOMT) remet en question ce modèle (Kühnl et al., 1989; Pakusch et al., 1989). L'observation de l'induction de la CCoAOMT en parallèle avec la lignification de cellules xylémiennes a suggéré l'existence d'une voie alternative de méthylation des composés hydroxycinnamiques au niveau de leurs esters CoA (Ye et Varner, 1993; Ye et al., 1994). Plusieurs résultats ultérieurs ont confirmé cette hypothèse et il est maintenant clairement établi que la biosynthèse des lignines implique les activités de la COMT et de la CCoAOMT (figure 25) (Ye, 1997; Inoue et al., 1998; Martz et al., 1998; Zhong et al., 1998; Li et al., 1999), deux enzymes de la superfamille des *O*-méthyltransférases (Ibrahim et al., 1998).

a - L'acide caféique/5-hydroxyférulique 3-, 5- *O*-méthyltransférase (COMT, E.C. 2.1.1.6) ou Aldéhyde OMT

Cette enzyme catalyse en deux étapes distinctes le transfert d'un groupement méthyle de la *S*-adénosyl méthionine (SAM), son cofacteur, aux hydroxyles situés en positions 3 et 5 du cycle aromatique (Higuchi, 1981). Initialement la COMT a été rapportée comme active uniquement vis à vis de l'acide caféique et de l'acide 5-hydroxyférulique pour donner respectivement l'acide férulique et l'acide sinapique (Bugos et al., 1991; Van Doorselaere et al., 1991; Meng et Campbell, 1998). Cependant de récents travaux ont montré la préférence de la COMT pour le 5-hydroxyconiféraldéhyde dont la méthylation fournit le sinapaldéhyde et son activité vis à vis des alcools caféilique et 5-hydroxyconiférylique (figure 25) (Osakabe et al., 1999; Li et al., 2000; Parvathi et al., 2001).

La COMT est une enzyme monomérique d'environ 40 kDa localisée dans le cytosol (Hermann et al., 1987; Edwards et Dixon, 1991; Bugos et al., 1992; Kersey et al., 1999; Hawkins et al., 2003; Ruelland et al., 2003). Dans de nombreuses espèces plusieurs isoformes ont été caractérisées et classées en deux groupes selon leur expression et leur préférence de substrat (Collendavello et al., 1981; Jaeck et al., 1992; Pellegrini et al., 1993; Heath et al., 1998; Inoue et al., 2000). Les COMT du groupe I seraient impliquées dans la lignification constitutive des tissus tandis que les COMT du groupe II méthylant une gamme plus large de substrats (autres que celle des composés hydroxycinnamiques) seraient uniquement induites lors des réactions de défenses. Il semblerait qu'un même gène puissent coder plusieurs isoformes appartenant à ces deux groupes (Gowri et al., 1991; Baucher et al., 1998; Inoue et al., 2000).

La réduction des activités COMT par stratégie sens ou antisens a été effectuée dans de nombreuses espèces herbacées et pérennes sans jamais entraîner une altération du phénotype des plantes. Par contre, selon les travaux et les espèces, l'effet de cette transgénèse sur les teneurs en lignines est variable. Chez le maïs et la luzerne les teneurs en lignines sont réduites de ~30 % et ~20 % respectivement et une baisse de ~17 % est constatée dans le peuplier pour l'unique cas où les activités COMT résiduelles étaient proches de 0 (Jouanin et al., 2000; Guo et al., 2001; Piquemal et al., 2002; Marita et al., 2003). Dans toutes ces plantes transgéniques, la réduction des activités COMT conduit à une importante diminution des ratios S/G. Par exemple, dans le peuplier, ce facteur chute de plus de 75 %, cette baisse n'étant pas toujours associée à une réduction des teneurs en lignines (Van Doorselaere et al., 1995; Jouanin et al., 2000). Généralement, la sous-expression de la *COMT* n'affecte que la synthèse des sous-unités S exceptée dans la luzerne dans laquelle les proportions en unités G sont également réduites (Dwivedi et al., 1994; Guo et al., 2001). Cet enrichissement de la lignine en unités G est associé, dans de nombreuses espèces, à une augmentation des proportions en liaisons intermonomériques de type condensé, notamment en structures 5-5 et β -5. Cette modification qualitative des lignines est corrélée à leur plus grande difficulté d'extraction (Lapierre et al., 1999; Jouanin et al., 2000; Marita et al., 2001; Pinçon et al., 2001a). Par ailleurs, la lignine de ces plantes transgéniques est riche en alcool 5-hydroxyconiférylique et parfois en 5-hydroxyconiféraldéhyde. Ces deux sous-unités inhabituelles, associées à une coloration rouge-brun du bois de peuplier (Atanassova et al., 1995; Tsai et al., 1998; Jouanin et al., 2000), sont également détectées dans des mutants "naturels" de maïs nommés *bm3* (brown midrib 3) présentant des activités COMT réduites (Grand et al., 1985; Chabbert et al., 1994; Vignols et al., 1995).

b - La caféoyl coenzyme A 3-, 5-O-méthyltransférase (CCoAOMT, E.C. 2.1.1.104)

Après purification, la CCoAOMT a été caractérisée comme une enzyme homodimérique de 48 kDa capable de réaliser la 3-O-méthylation du caféoyl CoA pour donner le féruloyle CoA (Kneusel et al., 1989; Pakusch et al., 1989) en utilisant la SAM, cofacteur de cette enzyme, comme donneur de méthyle. *In vitro*, cette enzyme s'est révélée capable de catalyser la O-méthylation du caféoyl CoA et du 5-hydroxyféruloyle CoA mais semble inefficace vis à vis des acides caféique et 5-hydroxyférulique (figure 25) (Busam et al., 1997; Inoue et al., 1998; Martz et al., 1998; Li et al., 1999; Maury et al., 1999).

Depuis le premier clonage d'un ADNc codant une *CCoAOMT* (Schmitt et al., 1991), l'isolement et la caractérisation d'ADNc *CCoAOMT* ont été effectués chez de nombreuses angiospermes ligneuses ou herbacées (Anterola et Lewis, 2002; Baucher et al., 2003; Christensen et al., 2003). Plusieurs isoformes ont été mises en évidence différant selon leur spécificité de substrat, leur profil d'expression et leur localisation tissulaire. En fonction des espèces, la CCoAOMT semble être codée par un ou plusieurs gènes lesquels présentent très peu d'identité et d'homologie avec les gènes *COMT* (Lewis et al., 1999).

La sous-expression de la *CCoAOMT* réduit de 12 à 50 % les teneurs en lignines dans les plantes transformées par stratégie sens ou antisens : tabac (Zhong et al., 1998; Pinçon et al., 2001b), luzerne (Guo et al., 2001; Marita et al., 2003) et peuplier (Meyermans et al., 2000; Zhong et al., 2000). Cette transgénèse exerce également un effet sur la composition monomérique des lignines conduisant généralement à une augmentation du ratio S/G. Cette hausse résulte d'une forte réduction des proportions en unités G (luzerne (Guo et al., 2001; Parvathi et al., 2001) tabac (Pinçon et al., 2001b)) associée parfois à une baisse, plus minime, des teneurs en unités S (peuplier, luzerne (Marita et al., 2003), tabac (Zhong et al., 1998)). La sous-expression de la *CCoAOMT* induit également des modifications des liaisons intermonomériques des lignines et notamment une hausse des proportions en structures β -O-4 (Zhong et al., 2000; Pinçon et al., 2001b). Une telle évolution conduit à une lignine moins condensée dans ces plantes transgéniques associée, chez le peuplier, à une facilité accrue d'extraction (Chen et al., 2001a). Par ailleurs, les plantes aux activités CCoAOMT réduites accumulent généralement des composés inhabituels (acide *p*-hydroxybenzoïque, glucosides d'acide sinapique et/ou de son ester CoA) (Meyermans et al., 2000; Zhong et al., 2000; Guo et al., 2001). D'un point de vue phénotypique, aucune généralité ne peut être déduite de ces transgénèses, les résultats étant très variables selon les espèces et parfois pour une même plante selon les travaux.

La réduction simultanée des activités COMT et CCoAOMT chez le tabac (Zhong et al., 1998; Pinçon et al., 2001b; Zhao et al., 2002) et la luzerne (Guo et al., 2001) conduit à des effets combinés ou additifs. En comparaison des transformants simples, seuls les tabacs double-transgéniques présentent des réductions plus importantes des teneurs en lignines. La baisse conséquente des ratios S/G observée dans ces deux espèces provient d'une réduction des sous-unités S et G chez le tabac mais seulement des sous-unités S chez la luzerne.

c - Rôle putatif des deux OMT dans la voie de biosynthèse

En regard de l'ensemble des données relatives à la COMT, à la CCoAOMT et à la F5H, du suivi de précurseurs radiomarqués montrant l'importance des réactions de méthylation au niveau des alcools et des aldéhydes (Chen et al., 1999; Matsui et al., 2000); le modèle récemment établi pour la méthylation des précurseurs des lignines suggère (figure 25) (Baucher et al., 2003; Boerjan et al., 2003; Marita et al., 2003) :

- La 3-*O*-méthylation du caféoyl CoA par la CCoAOMT. Le féruloyl CoA ainsi formé serait un précurseur commun aux unités S et G. Le rôle clé de cette enzyme expliquerait la baisse des teneurs en lignines constatée dans les plantes transgéniques aux activités CCoAOMT réduites.
- La 5-*O*-méthylation du 5-hydroxyconiféraldéhyde par la COMT. Le sinapaldéhyde donnerait ensuite les sous-unités S.

Ce modèle doit néanmoins être relativisé en considération de récents travaux effectués chez la luzerne et rapportant une réduction de seulement 50 % des proportions en unités G dans des plantes aux activités CCoAOMT quasiment nulles (Dixon et al., 2001; Parvathi et al., 2001). Ces auteurs en concluent l'existence potentielle de deux voies séparées de synthèse des précurseurs mono-et diméthoxylés.

1.4 - LA REACTION D'ESTERIFICATION DES ACIDES CINNAMIQUES : LA 4-COUMARATE COENZYME A LIGASE

Cette étape catalysée par la 4-coumarate CoA ligase (4-CL, E.C. 6.2.1.12) correspond à l'activation des acides hydroxycinnamiques en leur ester de coenzyme A (figure 25) (Knobloch et Hahlbrock, 1975). Cette enzyme possède une large spécificité de substrats, les esters produits étant précurseurs de nombreux composés phénoliques (Dixon et Paiva, 1995; Douglas, 1996). Selon leur origine, les 4-CL ont une masse molaire comprise entre 55 et 67 kDa (Lewis et al., 1999).

Cette enzyme a été caractérisée chez de nombreuses espèces; les gènes codant la 4-CL ont été clonés : ils constituent généralement de petites familles multigéniques. Le degré de conservation entre les différents membres de ces familles varie selon les plantes. Ainsi chez certaines espèces (pomme de terre, persil), les différents gènes codent des enzymes identiques ou très semblables (Lozoya et al., 1988; Becker-André et al., 1991) par contre dans d'autres espèces (tabac, soja, peuplier, tremble, *Arabidopsis*) les isoformes sont divergentes (Knobloch et Hahlbrock, 1975; Uhlmann et Ebel, 1993; Hu et al., 1998; Ehlting et al., 1999; Cukovic et al., 2001; Kumar et Ellis, 2003). Ces dernières peuvent parfois présenter une localisation tissulaire différente et/ou un profil d'expression spécifique et/ou une préférence de substrats variable selon le degré de méthylation des acides hydroxycinnamiques (Allina et al., 1998; Heath et al., 2002; Lindermayr et al., 2002). L'activation de l'acide sinapique est ainsi spécifique de certaines isoformes rares (Wallis et Rhodes, 1977; Grand et al., 1983) et généralement aucune activité 4-CL n'est détectée avec ce substrat (Kutsushi et al., 1982; Higuchi, 1990).

Une réduction de 90 % des activités 4-CL induit une baisse des teneurs en lignines de 25 % chez le tabac (Kajita et al., 1996; Kajita et al., 1997) et de 45 à 50 % chez *Arabidopsis* et le peuplier (Lee et al., 1997; Hu et al., 1999; Li et al., 2003). Par contre les effets de cette transgénèse sur la composition des lignines divergent fortement selon ces espèces. Dans le tabac, cette transgénèse induit une augmentation de 200 % des proportions en unités H et une baisse de 67 % et 80 % des unités G et S respectivement. Parallèlement les teneurs en acides phénoliques pariétaux augmentent fortement. De plus, ces faibles activités 4-CL sont associées à l'apparition d'une coloration brune du xylème dont certains vaisseaux sont anormalement écrasés (Kajita et al., 1996). Par contre chez *Arabidopsis*, la réduction des activités 4-CL entraîne seulement une réduction des teneurs en unité G (Lee et al., 1997). Chez le peuplier, les plantes transgéniques présentent uniquement une augmentation des teneurs en acide phénoliques pariétaux (Hu et al., 1999; Li et al., 2003).

II - LA VOIE SPECIFIQUE DES MONOLIGNOLS

Par abus de langage, la voie spécifique des monolignols est souvent renommée voie spécifique des lignines. Cette simplification ne doit pas occulter le fait que les monolignols, précurseurs des lignines, peuvent être également précurseurs des lignanes et des dimères glycosylés d'alcool coniférylique (DCG) (Lewis et al., 1999; Petersen et Alfermann, 2001).

L'orientation spécifique des esters coenzyme A des acides hydroxycinnamiques vers la synthèse des monolignols est réalisée par deux réductases successives : la cinnamoyl CoA réductase puis l'alcool cinnamylique déshydrogénase ou l'alcool sinapylique déshydrogénase (figure 25).

2.1 - LA CINNAMOYL COENZYME A REDUCTASE (CCR, E.C. 1.2.1.44)

La CRR occupe une position clé entre le métabolisme des phénylpropanoïdes et la voie spécifique des monolignols. Elle catalyse la réduction, dépendante du cofacteur NADPH, des composés hydroxycinnamoyls CoA en leur hydroxycinnamaldéhyde respectif (Gross et al., 1973).

Chez toutes les espèces dans lesquelles elle a été purifiée (soja, *Forsythia*, peuplier, *Eucalyptus*), la CCR est une enzyme monomérique cytosolique d'environ 37 kDa (Ruelland et al., 2003) (Gross et Kreiten, 1975; Wengenmayer et al., 1976; Sarni et al., 1984; Goffner et al., 1998). Contrairement à la CCR purifiée de pin (Lüderitz et Grisebach, 1981) spécifique du féruloyl CoA, les CCR de dicotylédones possèdent un spectre d'activité plus large. Elles réduisent le féruloyl CoA, le sinapoyl CoA et le *p*-coumaroyl CoA. Toutefois l'efficacité enzymatique vis à vis de ces deux derniers composés est nettement inférieure comparée à celle mesurée avec le féruloyl CoA (Wengenmayer et al., 1976; Goffner et al., 1994). La CRR serait codée par un gène chez l'*Eucalyptus* (Lacombe et al., 1997). Toutefois, un polymorphisme de la CCR a été découvert chez certaines espèces comme *Arabidopsis* (Lauvergeat et al., 2001). Les deux isoformes caractérisées possèderaient des profils d'expression différents, la CCR 1 serait impliquée dans la lignification constitutive des tissus et la CCR2 serait exprimée lors des stress (Pichon et al., 1998).

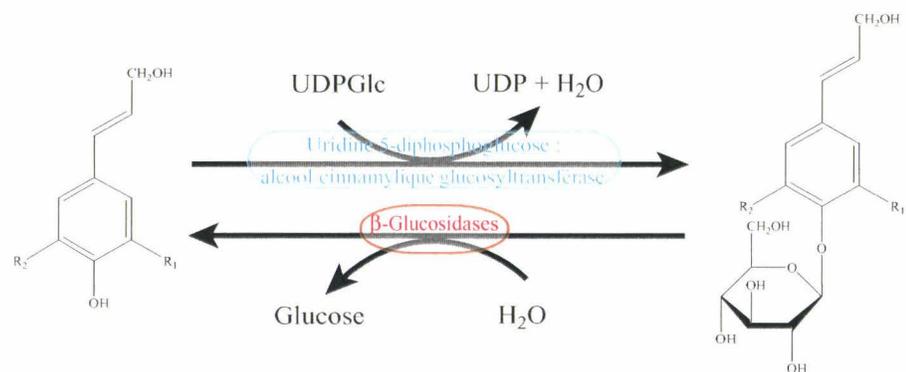
Des tabacs et des *Arabidopsis* dont les activités CCR ont été réduites par stratégie antisens présentent une diminution jusqu'à 50 % de leur teneur en lignines (Piquemal et al., 1998; Ralph et al., 1998b; Pinçon et al., 2001a; Goujon et al., 2003a). La composition monomérique de ces dernières est altérée dans le tabac et sous certaines conditions de croissance chez *Arabidopsis* : la forte baisse des teneurs en sous-unités G induit une augmentation des ratios S/G. Dans ces tabacs les analyses des lignines ont également révélé une proportion plus importante en structures intermonomériques condensées (Piquemal et al., 1998; O'Connell et al., 2002). Ces effets s'additionnent chez le tabac d'une coloration brun-orange du xylème et de la présence de composés phénoliques inhabituels dans sa lignine (Piquemal et al., 1998; Ralph et al., 1998b). Le phénotype des plantes transgéniques des deux espèces est fortement modifié : croissance plus faible, feuilles anormales, écrasement des vaisseaux du xylème, altération des parois des fibres xylémiennes, dépôt anormal de lignines (Chabannes et al., 2001; Pinçon et al., 2001a; Goujon et al., 2003a). Une augmentation des ratios S/G et la coloration du xylème sont également détectées suite à la réduction des activités CCR chez le peuplier (Baucher et al., 2003). Ces effets sont semblables à ceux observés chez un mutant *ccr* d'*Arabidopsis* (*irx4*) (Jones et al., 2001).

2.2 - L'ALCOOL CINNAMYLIQUE DESHYDROGENASE (CAD, E.C. 1.1.1.195)

La CAD catalyse la dernière étape de la biosynthèse des monolignols en convertissant, à l'aide du cofacteur NADPH, la réduction des hydroxycinnamaldéhydes en leur alcool hydroxycinnamylique respectif (figure 25) (Gross et al., 1973). Cette enzyme pourrait être associée dans un complexe multienzymatique cytosolique à la 4-CL et à la CCR (Wengenmayer et al., 1976; Ruelland et al., 2003).

Deux isoformes désignées CAD1 et CAD2, sont généralement présentes chez les angiospermes (*Forsythia* (Mansell et al., 1974), soja (Wyrambik et Grisebach, 1975), peuplier (Sarni et al., 1984), *Eucalyptus* (Goffner et al., 1992), tabac (Halpin et al., 1992)). Ces isoformes se distinguent par leur spécificité de substrats, leur poids moléculaire et leur séquence en acides aminés (Boudet et al., 1995). La CAD 1, monomérique, a une masse moléculaire de ~40 kDa et n'est pas active vis à vis du sinapaldéhyde. Son rôle n'est toujours pas clairement établi : elle interviendrait dans la synthèse de composés phénoliques en réponse à un stress (Knight et al., 1992; Hawkins et Boudet, 1994; Goffner et al., 1998). En revanche, la CAD2 est une enzyme homo- ou hétérodimérique d'environ 80 kDa réduisant efficacement le *p*-coumaraldéhyde, le coniféraldéhyde et le sinapaldéhyde avec une spécificité variable selon sa composition monomérique (Kutsushi et al., 1982; Baucher et al., 1998). Elle serait impliquée dans la biosynthèse des lignines constitutives des tissus où elle participerait au contrôle de leur composition monomérique (Grima-Pettenati et al., 1993; Hawkins et Boudet, 1994).

Aucun changement significatif des teneurs en lignines n'a été détecté dans des plantes transgéniques aux activités CAD2 réduites. Par contre, ces lignines sont enrichies en composés phénoliques inhabituels (aldéhydes) qui pourraient être responsables de la coloration rouge très prononcée de la tige (Halpin et al., 1994; Higuchi et al., 1994; Stewart et al., 1997; Yahiaoui et al., 1998; Ralph et al., 2001b; Kim et al., 2003). L'effet de cette transgénèse sur la composition monomérique des lignines est variable selon les espèces : contrairement au peuplier (Baucher et al., 1996; Lapierre et al., 1999), une baisse des ratios S/G est observée chez le tabac et la luzerne, (Ralph et al., 1998b; Baucher et al., 1999). Globalement, l'incorporation de composés phénoliques inhabituels dans la lignine des plantes aux activités CAD réduites facilite son extraction (Halpin et al., 1994; Baucher et al., 1996; Bernard Vailhé et al., 1996; MacKay et al., 1999). Le mode de liaison de ces composés au polymère serait en cause (Lapierre et al., 1999).



Alcools cinnamyliques :	R1	R2	Glucosides de monolignols :
Alcool <i>p</i> -coumarylique	H	H	Alcool <i>p</i> -coumarilique glycosylé
Alcool coniférylique	OCH ₃	H	Coniférine
Alcool sinapylique	OCH ₃	OCH ₃	Syringine

Figure 26 : Interconversion entre les monolignols et leur forme glycosylée chez les végétaux (d'après Lewis et al., 1999).

2.3 - L'ALCOOL SINAPYLIQUE DESHYDROGENASE (SAD)

Mise en évidence chez le tremble, cette enzyme réduit avec une grande spécificité (60 fois supérieure à la CAD2) le sinapaldéhyde en alcool sinapylique (Li et al., 2001). Contrairement à la CAD très présente dans les éléments du xylème riches en unités G, la SAD est localisée dans les fibres phloémiennes riches en unités S.

III - TRANSPORT ET STOCKAGE DES MONOLIGNOLS

Excepté les ambiguïtés concernant la CAD, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des monolignols ont été localisées dans le cytoplasme ((Ros Barcelo, 1997; Lewis et al., 1999; Dixon et al., 2001)). La polymérisation des monolignols ayant lieu dans la paroi, leur transport représente une étape déterminante dans le contrôle du processus de lignification. Une coopération intercellulaire a été suggérée dans le xylème : les cellules vivantes pourraient synthétiser les précurseurs qui seraient ensuite transportés dans les parois des vaisseaux où ils polymériseraient (Freudenberg, 1965; Feuillet et al., 1995; Hawkins et al., 1997). Cependant de nombreuses incertitudes concernent le mode de transport. Deux hypothèses sont envisageables : i. les monolignols seraient excrétés dans la paroi cellulaire *via* des vésicules golgiennes ii. ces précurseurs seraient acheminés dans la matrice pariétale *via* des transporteurs encore inconnus.

Les monolignols sont des composés toxiques et instables ne pouvant s'accumuler dans les cellules (Whetten et Sederoff, 1995). Freudenberg proposa dès 1963 que les monolignols soient convertis en leur 4-O- β glucoside respectif (figure 26). Cet état glycosylé représente une forme de détoxification et confère aux monolignols une stabilité et une solubilité accrues (Freudenberg et Harkin, 1963). Bien que rarement détectés chez les angiospermes, les glucosides de monolignols peuvent servir d'intermédiaires dans la synthèse des lignanes (Davin et Lewis, 1991) et pourraient être des formes de stockage et de transport des précurseurs des lignines (Matsui et al., 1994; Vogt et Jones, 2000). La formation de ces glycosides implique deux enzymes (figure 26) :

- une UDP-glucose : alcool coniférylique glucosyltransférase (E.C. 2.4.1.111). Cette enzyme permet le greffage d'un résidu glucose au niveau du O₄ du cycle aromatique avec une grande affinité pour les alcools coniférylique et sinapylique (Ibrahim, 1977).
- une coniférine β -glucosidase (E.C. 3.2.1.126). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la liaison 4-O- β libérant le monolignol qui peut alors être oxydé, cette réaction ayant lieu dans la matrice pariétale. Cette enzyme, de ~60 kDa, est active vis à vis de la coniférine et moins efficacement vis à vis de la syringine (Dharmawardhana et al., 1995;1999).

IV - LA POLYMERISATION DES MONOLIGNOLS

La dernière étape de la biosynthèse des lignines correspond à la polymérisation déshydrogénative des monolignols dans la paroi (figure 25). Ce processus est initié par l'oxydation enzymatique des monolignols en radicaux phénoxy lesquels polymérisent ensuite selon des mécanismes radicalaires non-enzymatiques.

La nature des enzymes impliquées lors de l'étape d'oxydation est actuellement débattue, au total six classes d'enzymes ont été proposées (Lewis et al., 1999). Toutefois, les peroxydases et les laccases (ou *p*-diphénol : O₂ oxydoréductase (EC 1.10.3.2)) semblent être les principales classes d'enzymes catalysant ce processus (Freudenberg, 1959; O'Malley et al., 1993; Dean et Eriksson, 1994; Gavnholt et Larsen, 2002).

4.1 - LES PEROXYDASES (E.C. 1.11.1.7)

Les peroxydases sont des métalloenzymes glycosylées à hème capables d'oxyder *in vitro* les monolignols en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'hydrogène et de protons (Dunford, 1991; Onnerud et al., 2002; Piontek, 2002). La disponibilité du H₂O₂ pourrait constituer un facteur de régulation de ces enzymes, ce cofacteur pouvant être généré par diverses enzymes (NAD(P)H oxydases, peroxydases elles mêmes, oxalates oxydases) (Christensen et al., 2003).

Plusieurs isoformes anioniques ou cationiques de peroxydases sont présentes dans une même plante (jusqu'à 70 chez certaines espèces). Elles résulteraient de l'expression de nombreux gènes et de modifications post-traductionnelles (Chen et Vierling, 2000; Tognolli et al., 2002). Cette multiplicité et cette diversité les rendent très réactives pour une large gamme de composés. Selon leur origine et leur structure primaire, ces enzymes sont réparties en trois classes. Des isoformes appartenant aux classes II et/ou III, dénommées alcool coniférylique oxydases (Barcelo et AznarAsensio, 1999) et syringaldazines oxydases (Christensen et al., 2001), ont été localisées dans la paroi (Czaninski et al., 1993; Kim et al., 2002b) et semblent être exprimées dans les tissus lignifiés (Lagrimini et al., 1987; El Mansouri et al., 1999). Leur caractérisation a révélé leur spécificité pour des monolignols.

Les effets d'une réduction des activités peroxidasiqes par transgénèse sont très variables selon les espèces et l'enzyme ciblée. Aucune modification des teneurs en lignines n'est appréciable dans des tabacs déficients en une peroxydase anionique dont l'activité avait été corrélée à la lignification (Lagrimini et al., 1997). Par contre dans des peupliers, une réduction de 44 % des activités d'une peroxydase anionique spécifique des tiges entraîne une baisse de 21 % des teneurs

en lignines et une augmentation des structures intermonomériques non condensées (Baucher et al., 2003). Inversement, la sur-expression de *peroxydases* chez le peuplier et le tabac ne semble avoir aucun effet sur les lignines, seuls les tabacs possèdent des tiges moins souples suggérant de possibles modifications pariétales. (Christensen et al., 2001; Elfstrand et al., 2002).

4.2 - LES LACCASES (E.C. 1.10.3.2)

Les laccases appartiennent à la famille des métalloenzymes à cuivre et sont potentiellement glycosylées. Ces enzymes catalysent *in vitro* l'oxydation des monolignols en utilisant l'oxygène comme accepteur d'hydrogène et de protons (Freudenberg et al., 1958). Ces enzymes ont été localisées dans la matrice pariétale; toutefois, leurs rôles exacts *in muro* restent encore à déterminer (Dean et Eriksson, 1994; LaFayette et al., 1999).

Chez l'érable, des activités laccase, localisées au niveau du xylème, sont corrélées à la lignification (Driouch et al., 1992). Plusieurs isoformes de laccase ont été caractérisées possédant chacune un profil d'expression spatio-temporelle spécifique et pour la plupart une large gamme de substrats (Gavnholt et Larsen, 2002). Chez le peuplier 5 gènes *laccase* ont été caractérisés (Ranocha et al., 1999). La sous-expression par stratégie antisens de 3 de ces gènes n'entraîne aucune modification phénotypique et aucun changement des teneurs et composition en lignines excepté pour un gène (*lac3*) dont la répression entraîne une altération du contour des cellules xylémiennes et une désorganisation pariétale (Ranocha et al., 2002).

4.3 - COMPLEMENTARITE DES PEROXYDASES ET DES LACCASES

Les laccases sembleraient complémentaires des peroxydases en catalysant la polymérisation des lignines dans des assises pariétales très hydrophobes où l'eau et le peroxyde d'hydrogène sont exclus (Northcote et al., 1989). Les laccases seraient impliquées préférentiellement lors des phases précoces de la lignification tandis que les peroxydases catalyseraient la polymérisation des lignines lors des phases tardives de ce processus (Sterjiades et al., 1992; Christensen et al., 2003).

Les profils d'activité et les cinétiques enzymatiques de ces deux classes d'enzymes vis à vis des différents monolignols sont variables suggérant une possible régulation de la polymérisation des sous-unités (Ostergaard et al., 2000). Ces hypothèses toutefois restent à confirmer.

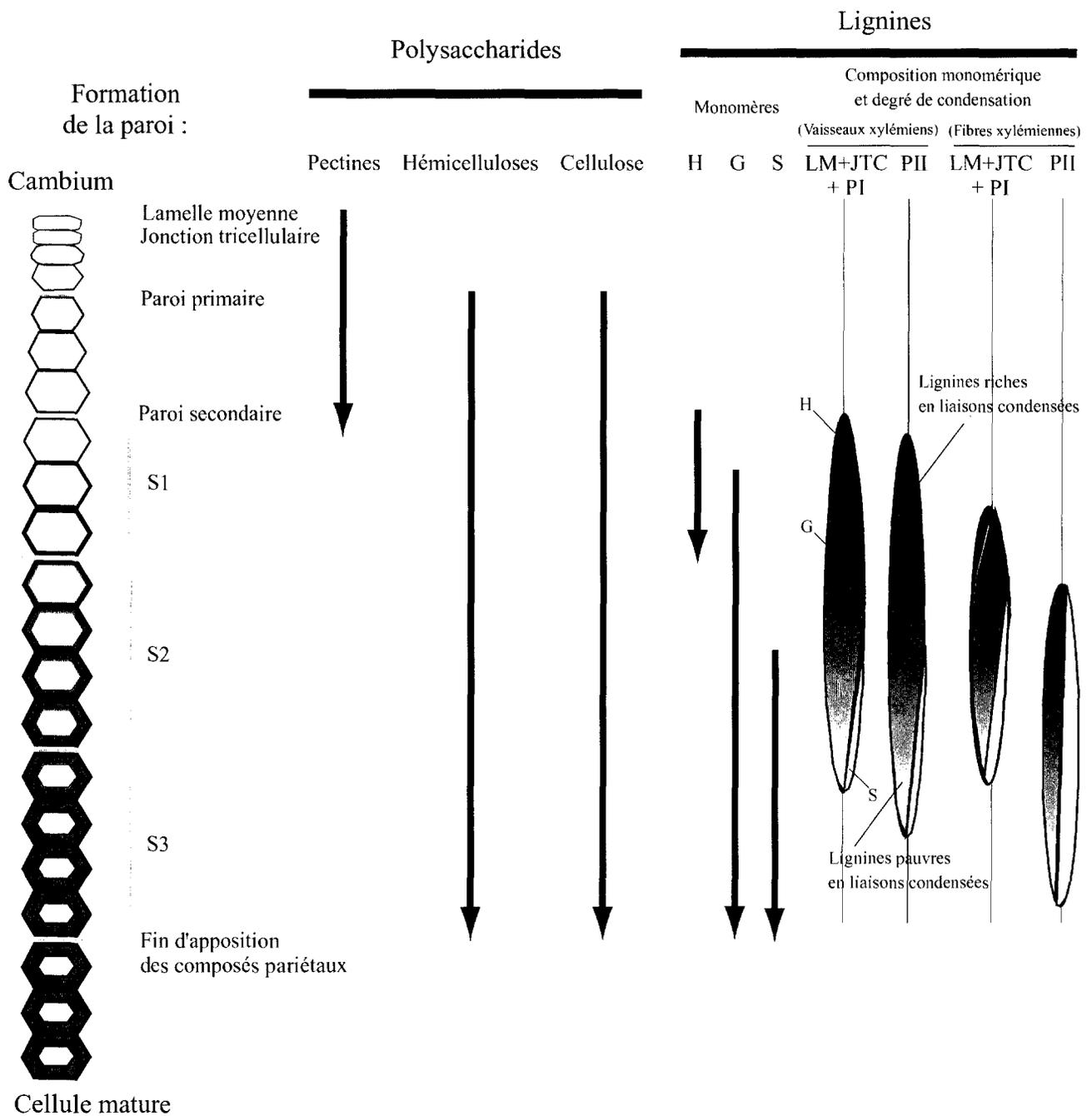


Figure 27 : Représentation schématique de la lignification des parois montrant les relations potentielles entre les dépôts des polysaccharides et de lignines (d'après Terashima et al., 1998 et Terashima, 1990).

La formation de la paroi se réalise en plusieurs étapes distinctes, dans un ordre chronologique : formation de la lamelle moyenne (LM) et des jonctions tricellulaires (JTC), puis de la paroi primaire (PI) et enfin de la paroi secondaire (PII). Cette dernière résulte de la formation successive de S1, de S2 puis de S3. La polymérisation des sous-unités hydroxyphényles (H), puis gâiacyles (G) puis syringyles (S) intervient chronologiquement en trois phases distinctes donnant lieu lors des premières phases de lignification à une lignine condensée (en foncée). Au fur et à mesure de l'enrichissement en sous-unités S, la lignine formée est de moins en moins condensée (en clair). C'est au cours de la formation de S2 et de S3 que la lignification est la plus intense.

V - LA LIGNIFICATION DES PAROIS

La cinétique de lignification, très étudiée dans les cellules xylémiennes, s'effectue une fois la croissance cellulaire achevée au cours de la formation de la paroi secondaire. La lignification s'échelonne en trois étapes distinctes successives toujours précédées par l'apposition de polysaccharides dans la paroi (Terashima et al., 1993). Le modèle présenté ci-contre (figure 27), établi à partir d'études microautoradiographiques dans du xylème d'angiosperme (Terashima et al., 1986; Fukushima et Terashima, 1990;1991), est corrélé à des observations spectrophotométriques sous UV (Fergus et Goring, 1970; Musha et Goring, 1985).

- La première phase débute au niveau des jonctions tricellulaires lors de la formation de S1 par la polymérisation de sous-unités H puis se propage tangentiellement dans la lamelle moyenne puis dans la paroi primaire en s'enrichissant en sous-unités G.
- Le second stade correspond à l'élargissement de la lignification à la paroi secondaire. Il s'effectue au cours de la déposition de cellulose et d'hémicelluloses dans S2. La lignine synthétisée au début de cette phase est constituée d'unités G puis s'enrichie en unités S.
- La troisième phase, la plus longue, affecte principalement la paroi secondaire. Elle commence dès la formation de S3 et se caractérise chez les angiospermes par une lignine riche en S.

Suite à leur sécrétion dans la matrice pariétale, les monolignols, sous forme anionique, diffuseraient dans cette structure gélifiée attirés par les ions Ca^{2+} puis s'adsorberaient dans un premier temps à la surface des microfibrilles de cellulose (Houtman et Atalla, 1995). Au contact des peroxydases et des laccases associées aux polysaccharides pariétaux, les monolignols seraient oxydés puis polymériseraient. La formation de ce complexe lignine-polysaccharides libérerait les enzymes et les ions Ca^{2+} , lesquels migreraient vers les zones non lignifiées (Terashima et al., 1993). Les acides phénoliques préalablement déposés dans la paroi où ils seraient liés aux polysaccharides pourraient servir de point d'initiation de la réaction de polymérisation (Yamamoto et al., 1989). Cette dernière se poursuivrait ensuite par addition de méthylène-quinones au complexe lignine-polysaccharides. Les teneurs en ions Ca^{2+} étant supérieures au niveau des zones intercellulaires (Jarvis, 1984; Moore et Staehelin, 1988), le flux de monolignols serait plus important induisant un mode de polymérisation proche du mode *zulauf* favorisant la formation de structures intermonomériques condensées (Terashima et al., 1993; Terashima et al., 1998). Le dépôt de lignines dans la matrice polysaccharidique convertit cette structure gélifiée hydrophile en structure hydrophobe.

OBJECTIFS
DU TRAVAIL DE RECHERCHE

La culture du lin permet l'obtention de fibres cellulosiques aux propriétés exceptionnelles (finesse, résistance aux tensions et à l'usure, nervosité (Kernaghan, 1992; McDougall et al., 1993; Astley et Donald, 2003)) très appréciées par les industries textiles (Sotton et Sata, 1986; Roland et al., 1995) et dans le domaine des bio-polymères (Van de Velde et Baetens, 2001; Baley, 2002). Localisées dans la tige où elles sont fortement associées entre elles dans des faisceaux, ces fibres se différencient puis se développent au cours de la croissance des plantes (Esau, 1942;1943). A maturité, elles se caractérisent par leur très grande longueur (jusqu'à 150 mm), leur importante paroi secondaire (~90 % de leur section transversale) et leur richesse en cellulose (65 à 80 % de leur masse) laquelle serait hautement cristalline.

Les industriels, notamment ceux du secteur textile (75 % du débouché des fibres), se heurtent à deux problèmes majeurs : la désolidarisation des faisceaux fibreux puis la divisibilité des fibres. Selon une étude récente, l'explication chimique de la cohésion intercellulaire de ces fibres réside dans la quantité et la qualité, au niveau de leur lamelle moyenne et de leurs jonctions tricellulaires, de composés non cellulosiques (Faughey et Sharma, 2000; Rihouey et Mesnage, 2001). Parmi ces derniers, des composés phénoliques joueraient un rôle essentiel en établissant de nombreuses liaisons covalentes avec les polymères osidiques et/ou protéiques pariétaux. Leur présence augmentant la cohésion intercellulaire limiterait l'efficacité de séparation des éléments fibreux et de ce fait altérerait la qualité du produit fini (Yamamoto et al., 1989; McDougall et al., 1993; Mustata, 1994; Lewis et al., 1999). Cependant l'identification de ces composés phénoliques n'est toujours pas clairement établie : pour certains auteurs (Tammes, 1907; Lewin, 1958; McDougall, 1991) il s'agit de lignines tandis que d'autres travaux remettent en cause non seulement la nature de ces composés (Love et al., 1994) mais aussi leur présence (Morrison et al., 2003).

Les quelques travaux ayant caractérisé des lignines dans les fibres périphloémiennes du lin rapportent de fortes proportions en sous-unités monométhoxylées G (Akin et al., 1996a; Akin et al., 1996b; Gorshkova et al., 2000). Or, chez les végétaux, la méthylation des acides et alcools hydroxycinnamiques est sous le contrôle de deux *O*-méthyltransférases : la COMT et la CCoAOMT (Ye, 1997; Zhong et al., 1998). Les travaux de transgénèse ayant conduit à la modélisation de la voie de biosynthèse des monolignols suggèrent que seule la CCoAOMT participe à la fois à la synthèse des sous-unités G et S (Li et al., 2000; Baucher et al., 2003; Boerjan et al., 2003). La CCoAOMT apparaît donc comme une enzyme clé contrôlant à la fois les teneurs mais aussi la composition des lignines.

C'est dans ce contexte que s'insèrent les travaux présentés dans ce mémoire relatif la lignification des fibres périphloémiennes du lin. Des approches distinctes, la microscopie, la biochimie et la biologie moléculaire, ont été mises en œuvre afin de répondre aux trois objectifs majeurs de cette thèse :

- Confirmer, identifier et localiser les lignines associées aux fibres périphloémiennes du lin.
- Quantifier et caractériser ces lignines par différentes techniques afin d'obtenir des résultats rapportant une estimation la plus juste de cette lignification.
- Approfondir au niveau moléculaire les connaissances relatives à la biosynthèse des lignines dans les fibres par la caractérisation de la CCoAOMT.

L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire s'inscrit dans une démarche "amélioration de la production industrielle de fibres végétales" et se place dans un aspect fondamental "étude des parois : organisation/distribution des lignines en relation avec leur biosynthèse".

MATERIELS

ET METHODES

Les diverses techniques de microscopie, de chimie et de biologie moléculaire employées dans cette étude ont été regroupées en trois catégories respectivement intitulées dans la suite de mémoire:

- Etude (ultra)structurale des fibres périphloémiennes du lin au cours de leur maturation.
- Caractérisation des lignines et de leurs précurseurs dans la tige de lin au cours de la maturation des fibres périphloémiennes.
- Caractérisation d'une CCoAOMT impliquée dans la lignification des fibres périphloémiennes.

A – LE LIN COMME MATERIEL BIOLOGIQUE

L'ensemble des techniques mises en œuvre a été accompli à partir de tige de lin (*Linum usitatissimum*) à l'exception d'une analyse moléculaire de la CCoAOMT réalisée à partir des différents organes des plantes. Sauf mention particulière lors de la 3^{ème} partie, ces lins de cultivar hermes sont issus de cultures en plein champ localisées sur la commune de Tétéghem (Nord).

I - DEFINITION DES STADES DE PRELEVEMENT

Semés le 27 mars 2000, les lins se sont développés dans des conditions normales de température et d'hygrométrie. Trois stades spécifiques du développement des lins, dénommés stade 0, stade 1 et stade 3, ont été choisis correspondant respectivement à la pleine croissance végétative des plantes, leur floraison et la maturation des graines. La croissance des lins étant très rapide, le stade 0 se situe approximativement au milieu de cette intense période de grandissement, approximativement après 8 semaines de croissance. Le lin étant pourvu d'une inflorescence en cyme, chaque fleur s'épanouissant tour à tour une journée, la floraison s'étale sur une semaine. Le stade 1 correspond à 50 % de la floraison et à environ 10 semaines de développement des plantes. La maturation des capsules s'étalant également dans le temps, le stade 3 correspond à 50 % des capsules arrivées à maturité, *i.e.* graines mûres, soit environ 14 semaines de culture. En regard de la physiologie des fibres périphloémiennes, le stade 0 correspond à leur croissance intrusive dans la tige et les stades 1 et 3 encadrent leur maturation. Au cours de cette dernière phase, la paroi des cellules fibreuses s'épaissit en conséquence d'une intense apposition de polymères. Tous les prélèvements se sont réalisés de manière aléatoire au milieu de la même parcelle afin de s'assujettir des effets de bordures.

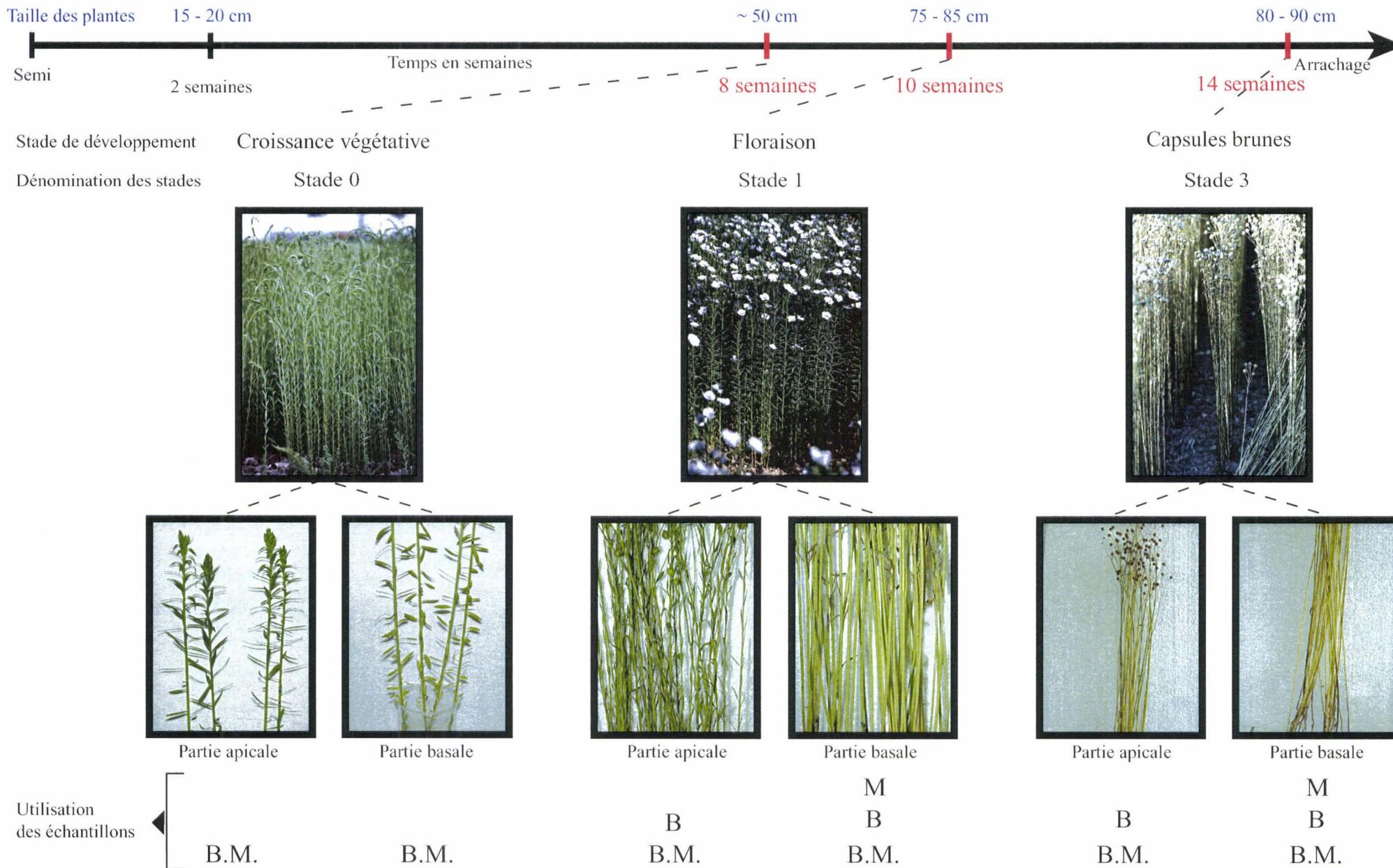


Figure 29: Diagramme synoptique des échantillons employés en microscopie (M), en chimie des composés phénoliques pariétaux (B), en biologie moléculaire (B.M.)

II - DEFINITION DES FRAGMENTS DE TIGE

La méthode et la rigueur apportées à l'échantillonnage ont été les mêmes pour les 3 prélèvements effectués chronologiquement le 23 mai 2000, le 9 juin 2000 et le 4 juillet 2000. Au champ, les lins ont été arrachés en prenant soin de conserver une motte de terre autour de leurs racines. L'échantillonnage des lins s'est effectué dans les 24 h suivant leur récolte. Après effeuillage élimination des racines au niveau du collet, les tiges ont été débitées afin de prélever un segment basal et un segment apical de 10 cm. La localisation de ces fragments est illustrée figure 28. Les feuilles, racines, fleurs et capsules récupérées après échantillonnage ont été congelées dans l'azote liquide avant d'être stocké à -80°C .

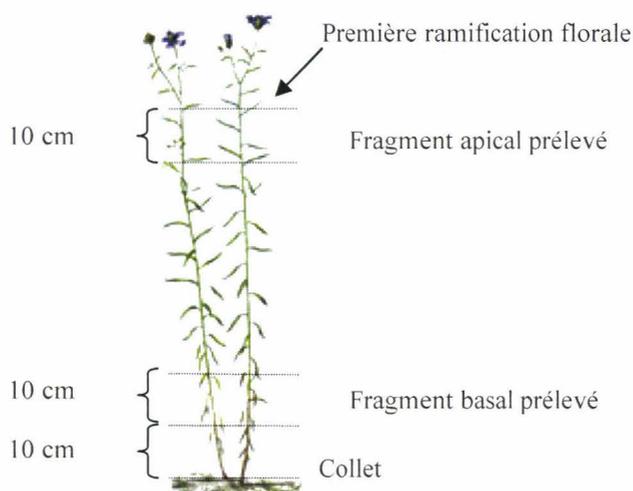


Figure 28 : Localisation des fragments apical et basal prélevés sur les tiges de lin lors de l'échantillonnage. Les 10 cm situés au-dessus du collet sont éliminés, la morphologie des fibres périphloémiennes n'étant pas constante à ce niveau (ITL, Morvan et al., 1989b).

III - SEPARATION DES TISSUS EXTERNES ET INTERNES DES TIGES

Les fragments apicaux et basaux ainsi récupérés sont alors divisés en deux lots : l'un est immédiatement traité pour permettre l'analyse (ultra)structurale des tiges, l'autre est pelé puis stocké. Cette "décortication" vise à séparer les tissus externes riches en fibres périphloémiennes, des tissus internes essentiellement composés de bois. Cette étape s'effectue à l'aide d'un scalpel sur une plaque de verre posée sur de la glace. La qualité de cette manipulation est régulièrement contrôlée par l'observation de coupes transversales effectuées à main levée dans ces tissus. Ces échantillons sont ensuite congelés dans de l'azote liquide puis placés à -80°C . Ils ont été employés lors des études biochimiques et moléculaires des lignines et/ou de la CCoAOMT.

Une synthèse de la méthodologie d'échantillonnage en relation avec les techniques employées postérieurement est présentée figure 29. Les conditions d'échantillonnage varient selon le type d'analyse (microscopique, chimique ou moléculaire), celles-ci seront précisées au cas par cas.

FIXATION

Fixateur aldéhydique
plusieurs bains : 2 x 1 h
4 °C

Fixateur KMnO₄
1 bain: 1 h 30 min
T°C ambiante

plusieurs alternances vide/entrée d'air

RINCAGES

tampon phosphate
4 – 5 x 5 min
eau distillée
3 x 15 min

eau distillée
1 x 5 min
3 – 4 x 15 min

alternance vide/entrée d'air pour chaque bain

DESHYDRATATION

T°C ambiante

Ethanol 25 % : 1 x 20 min

Ethanol 50 % : 2 x 20 min

Possibilité d'arrêt pour la nuit (4°C) dans Ethanol 70 %

Ethanol 70 % : 1 x 20 min

Ethanol 80 % : 2 x 20 min

Ethanol 90 % : 1 x 20 min

Ethanol 100 % : 3 x 20 min

IMPREGNATION

T°C ambiante

Ethanol/LRW dégazée : 2/1 (v/v) : 1 x 30 min

Ethanol/LRW dégazée : 1/1 (v/v) : 1 x 30 min

Ethanol/LRW dégazée : 1/2 (v/v) : 1 x 30 min

LRW dégazée pure : 1 nuit à 4°C

LRW dégazée pure : 1 semaine à - 20°C

alternance vide/entrée d'air pour chaque bain

INCLUSION ET POLYMERISATION

Capsules de gélatine 0,3 mL

LRW dégazée pure

24 h à 50 °C

Figure 30 : Diagramme récapitulatif des différentes étapes, de la fixation à l'inclusion, nécessaires à la préparation des échantillons de tige de lin pour la MET. Après polymérisation de la résine les échantillons peuvent être débités en coupes transversales lesquelles peuvent alors être marquées.

B – ETUDE (ULTRA)STRUCTURALE DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DU LIN AU COURS DE LEUR MATURATION

I - MATERIEL VEGETAL

Les échantillons exploités au cours de ces analyses correspondent aux fragments basaux des tiges de lin prélevé aux stades floraison et capsules brunes. L'obtention de ces échantillons s'est effectuée comme indiquée précédemment (c.f. chapitre A). Les analyses microscopiques nécessitant des tissus non endommagés, l'étape de défoliation a été réalisée à l'aide d'un scalpel.

II - PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MET

Afin d'observer des échantillons au microscope électronique à transmission (MET), il est nécessaire que les tissus biologiques, vivants, soient stabilisés (fixation), déshydratés afin de supporter les conditions de l'observation s'effectuant sous vide et sectionnés en coupes ultrafines de manière à ce que le faisceau d'électron puissent les traverser. Cette dernière étape implique que les échantillons soient imprégnés préalablement d'une résine leur conférant une résistance homogène au contact du couteau (figure 30).

2.1 - FIXATION

Le but de cette étape consiste à immobiliser les structures cellulaires des tissus dans leur état le plus natif possible. Selon le marquage envisagé, deux types de fixation ont été considérés : la fixation aldéhydique et la fixation par le permanganate de potassium (KMnO_4) (figure 30). Toutes les manipulations se déroulent à température ambiante sauf indication contraire.

a - Fixation aldéhydique

Cette méthode de fixation par des réactifs bi-fonctionnels réticule les constituants internes protéiques du matériel étudié, tout en préservant leur réactivité avec les réactifs chimiques et/ou les anticorps utilisés pour les marquages cytochimiques et immunocytochimiques.

Pratiquement, cette étape s'effectue selon le protocole mis au point au CERMAV (CNRS, UPR 5301, Grenoble) et décrit par Joseleau et al. (1997). Avant d'être fixés, les échantillons de tige de lin sont débités en petits tronçons d'environ 1-2 mm d'épaisseur dans de la moelle de sureau de manière similaire à des coupes à main levée. En effet, la section des tiges doit être la plus nette possible afin d'éviter le déchirement des tissus. Ces fragments de tige sont ensuite manipulés par 3 ou 4 dans des piluliers de 20 mL contenant environ 5 mL de réactif additionnés de 0,02 % d'azoture de sodium comme agent antibactérien.

Les échantillons sont fixés dans un mélange composé de 2 % de paraformaldéhyde et de 0,2 % de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7,0 - 7,2 (2 fois 1 heure à 4°C avec plusieurs alternances vide/entrée d'air assurant une bonne pénétration du réactif dans les tissus, les échantillons doivent rester au fond du pilulier). Le matériel est ensuite rincé dans différents bains successifs de 15 min de tampon phosphate (4-5 fois) puis d'eau bidistillée (3 fois). Un passage sous vide est effectué pour chaque bain.

b - Fixation par le permanganate de potassium

Cette fixation a été réalisée parallèlement à la fixation aldéhydique sur les parties basales des tiges de lin. Le permanganate de potassium (KMnO_4) est utilisé avant tout comme contrastant des lignines mais il conserve également l'ultrastructure des organites cellulaires, d'où sa dénomination de fixateur (Mollenhauer, 1959; Bland et al., 1971; Hayat, 1981). En outre, les échantillons ainsi fixés ne nécessitent aucun marquage avant observation au MET

Pratiquement, les échantillons sont manipulés de la même façon que pour la fixation aldéhydique. La fixation est effectuée dans une solution de KMnO_4 à 5 % dans de l'eau bidistillée durant 1 h 30 min exactement selon le protocole mis au point par Kerr et Goring (1975). Plusieurs passages sous vide sont nécessaires pour une bonne pénétration du KMnO_4 dans les échantillons. Ces derniers sont ensuite soigneusement rincés dans plusieurs bains d'eau distillée : un premier bain de 5 min puis 3 - 4 bains de 15 min environ avec un passage sous vide aux 3^{ème} et 4^{ème} rinçage; à terme, la solution de rinçage doit être totalement incolore.

2.2 - DESHYDRATATION

Une déshydratation des échantillons est réalisée, à température ambiante, par passage dans différents bains successifs d'éthanol de concentration croissante : 25 %, 50 % (2 bains), 70 %, 80 % (2 bains), 90 % et 100 % (3 bains). Chaque bain ayant une durée de 20 min chacun, il est cependant possible d'arrêter pour la nuit dans le bain d'éthanol à 70 % (dans ce cas les échantillons sont placés à 4°C).

2.3 - IMPREGNATION

La résine acrylique utilisée (London Resin White (LRWhite), Hard mixture, TAAB) a été choisie pour sa capacité à conserver l'antigénicité des protéines tout en ne donnant que peu de bruit de fond (Newman et al., 1983). En outre, son hydrosolubilité partielle évite des problèmes d'insolubilité avec l'eau résiduelle dans les tissus. Cette résine est stable sous le faisceau d'électrons et son utilisation est facile : il suffit de la mélanger à son catalyseur au minimum 24 h avant utilisation.

Les échantillons déshydratés sont progressivement imprégnés de résine par passage dans des bains successifs de 30 min chacun à température ambiante de solution dégazée éthanol / résine LRWhite en proportion croissante : 2/1, 1/1, 1/2 (v/v) et 0/3 (résine pure). Pour chaque bain, une alternance vide / entrée d'air assure une bonne pénétration de la résine dans les tissus. L'imprégnation est ensuite améliorée par un bain d'une nuit à 4°C et éventuellement d'une semaine à - 20°C dans de la résine pure dégazée.

2.4 - INCLUSION ET POLYMERISATION

Les échantillons sont ensuite inclus dans des capsules de gélatines (TAAB) de 0,3 mL préalablement remplies de résine LRWhite fraîchement dégazée. Après avoir introduit le numéro de l'échantillon, les capsules sont soigneusement fermées de manière à limiter la quantité d'air pouvant être emprisonnée à l'intérieur de ces dernières. En effet, la polymérisation qui se déroule durant 24 h à 50°C est inhibée par l'oxygène. Il est primordial lors de cette étape d'orienter l'échantillon perpendiculairement à l'axe de la capsule ceci afin de faciliter les manipulations d'ultramicrotomie à venir.

III - ULTRAMICROTOMIE

Les échantillons inclus sont débités en coupes transversales ultrafines de 50 nm d'épaisseur à l'aide d'un ultramicrotome (Ultratome® IV, LKB Bromma) et d'un couteau en diamant d'angle de coupe 45°, à réservoir d'eau (Diatome, 45°, n° MS3202) à une vitesse de coupe de 4 mm / s approximativement.

Selon leur utilisation ultérieure, les ultracoupes sont récupérées sur anneaux en plastique (diamètre interne de 2,5 mm), ou sur grilles de 200 mesh en cuivre (Philips, G200) ou en or (Gilder, G200-G3, 3,05 mm) préalablement carbonées. Le dépôt d'un film de carbone sur les grilles protégera les ultracoupes du faisceau d'électron lors de leur observation.

IV - MARQUAGE DES ULTRACOUPES POUR LA MET

Les réactions de marquage réalisées sur les ultracoupes sont de trois types et ont toutes en commun le fait d'être des réactions de surface.

4.1 - MARQUAGES CYTOCHIMIQUES

Deux méthodes cytochimiques ont été utilisées pour étudier la répartition des constituants du complexe lignocellulosique des parois végétales et suivre leur évolution lors de la maturation des fibres périphloémiennes.

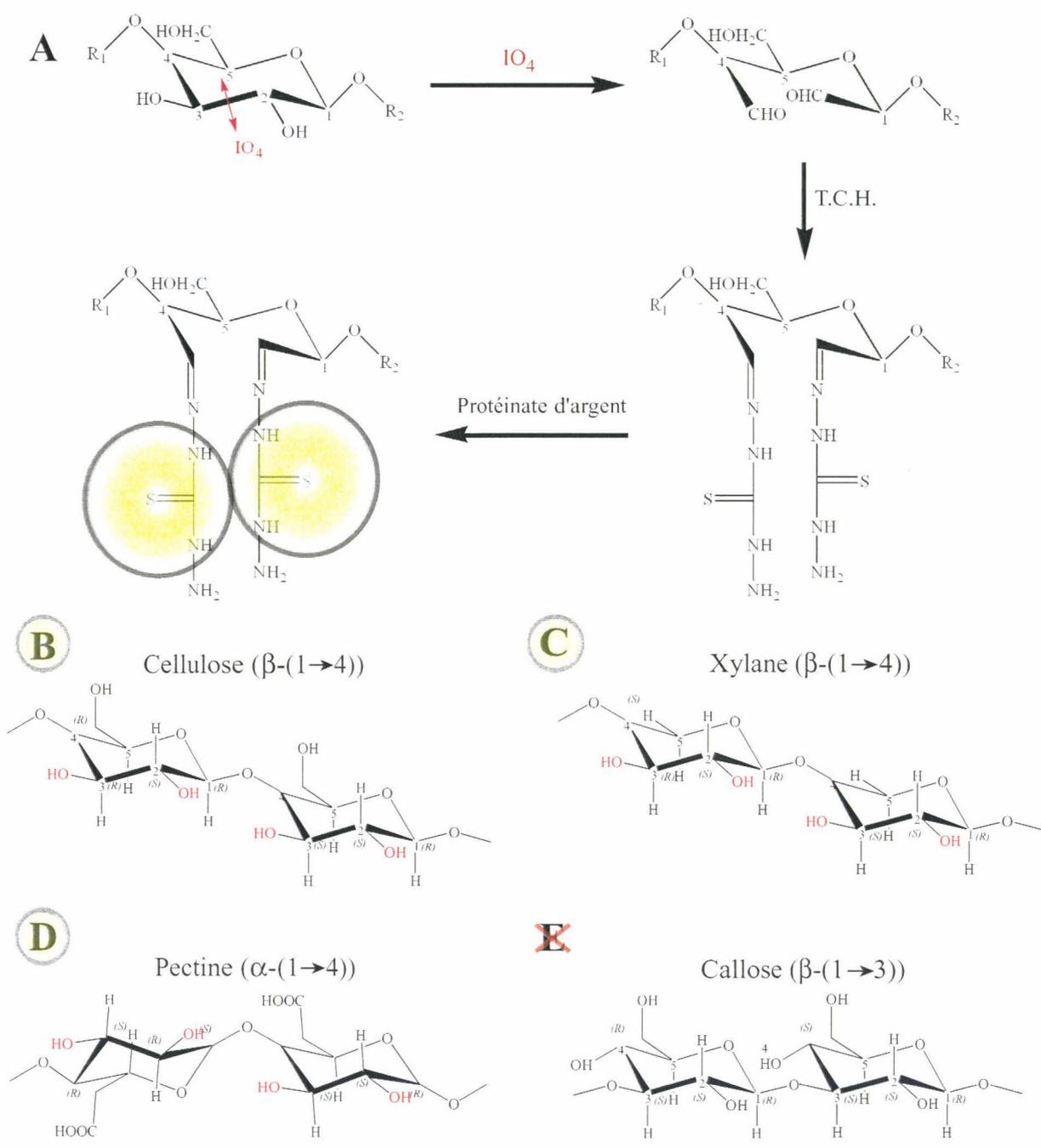


Figure 31 : Principe du marquage des polysaccharides pariétaux par le test du P.A.T.Ag (d'après Burlat, 1997).
 A : 1 : Oxydation des sucres au niveau des alcools vicinaux. 2 : Ouverture du cycle osidique par l'acide périodique (IO_4) et création de fonctions aldéhydes. 3 : Réaction du thiocarbohydrazide (TCH). 4 : Formation d'un complexe métallique opaque aux électrons sur les résidus sulfurés par action du protéinate d'argent.
 B, C, D, E : Exemples des principaux polysaccharides susceptibles d'être (B, C, D) ou non (E) mis en évidence par le test du PATAg. Représentation des motifs minima de chaque sucres (cellulose, xylane, pectine, callose). En rouge : alcools vicinaux accessibles à l'oxydation périodique.

a - Technique du P.A.T.Ag (Periodic Acid, Thiocarbohydrazide, Silver proteinate)

Cette technique permettant la mise en évidence de la majorité des polysaccharides a été mise au point dans le domaine animal par Thiery (1967) puis adaptée au matériel végétal par Reis et Roland (1974). Une modification de Ruel et al. (1977) a permis d'obtenir un marquage des parois secondarisées.

Le principe est basé sur l'oxydation périodique des fonctions vic-glycols (alcools vicinaux des sucres) (figure 31). L'acide périodique provoque l'ouverture des cycles osidiques créant ainsi des fonctions aldéhydes. Ces dernières réagissent avec un composé soufré, la thiocarbohydrazide (TCH). Le protéinate d'argent vient complexer les résidus soufres transparents aux électrons. Les grains d'argent (5 nm de diamètre), denses aux électrons, ainsi fixés permettent de visualiser spécifiquement les polysaccharides ayant réagi.

Cette technique n'est efficace qu'avec les polysaccharides possédant des alcools vicinaux permettant la coupure de la liaison glycol par le périodate (figure 31). Ainsi les macromolécules osidiques possédant des liaisons α - ou β -(1→2), (1→4) et (1→6) sont réactives alors que les polysaccharides à liaison β -(1→3) (callose) ne le sont pas.

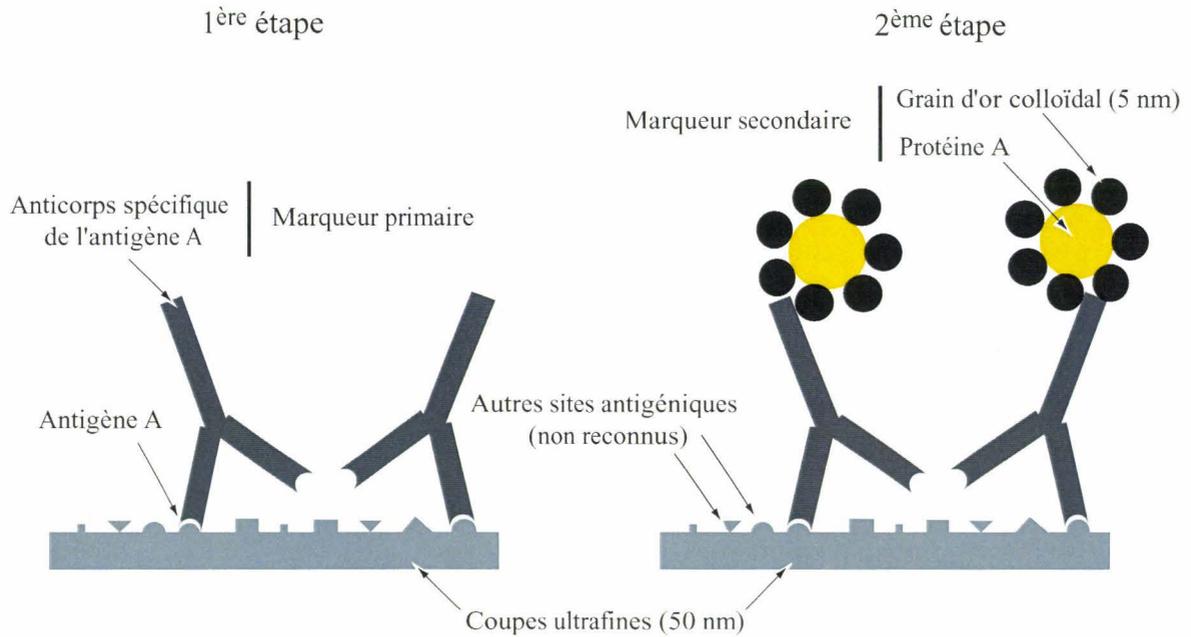
Pratiquement la manipulation se déroule à température ambiante. Les ultracoupes fixées par le mélange aldéhydique et récupérées sur grilles d'or carbonées sont mises à flotter durant 1 h 30 min sur une solution d'acide périodique (Merck) à 5 % (p/v) dans de l'eau bidistillée préparée extemporanément. Après 4 rinçages de 3 min dans de l'eau bidistillée, les grilles sont transférées sur une solution de TCH (Electron Microscopy Sciences) à 0,2 % (p/v) dans de l'acide acétique 20 % pendant 48 h. Pour une bonne solubilisation du TCH, il est impératif de préparer la solution 2 h avant utilisation. Les coupes sont ensuite rincées par flottage sur des solutions d'acides acétiques ayant un titre décroissant : 20 % (3 fois 5min), 10 % (4 fois 5min), 5 % (1 fois 2min), et 2,5 % (1 fois 2min) puis passées sur de l'eau bidistillée (4 fois 5min puis 1 h). La complexation à l'argent est réalisée pendant 30 min exactement à l'obscurité sur une solution de protéinate d'argent (Prolabo) à 1 % dans de l'eau bidistillée. Cette solution étant à saturation il est nécessaire de la préparer une journée à l'avance. Après plusieurs rinçages rapides sur de l'eau bidistillée, les grilles sont séchées et ainsi prêtes à être observées.

b - Technique du permanganate de potassium (KMnO₄)

Le permanganate de potassium joue le double rôle de fixateur des structures membranaires (Mollenhauer, 1959; Hayat, 1981) et de contrastant des structures possédant des doubles liaisons carbone-carbone (protéines, lipides, lignines, composés phénoliques). Dans le cas des parois végétales secondarisées et donc de faible teneur en protéines et en lipides, cette technique permet de visualiser les lignines (Kerr et Goring, 1975).

Le permanganate de potassium (plus exactement l'anion permanganate, MnO₄⁻) oxyde la double liaison carbone-carbone de la chaîne propénoïque des monolignols et est ainsi réduit en oxyde de manganèse, MnO₂ ou Mn₂O₃ (figure 32) (Crocker, 1921). Complexé aux monomères, le dioxyde de manganèse

A. Marquage immunocytochimique



B. Intensification du marquage

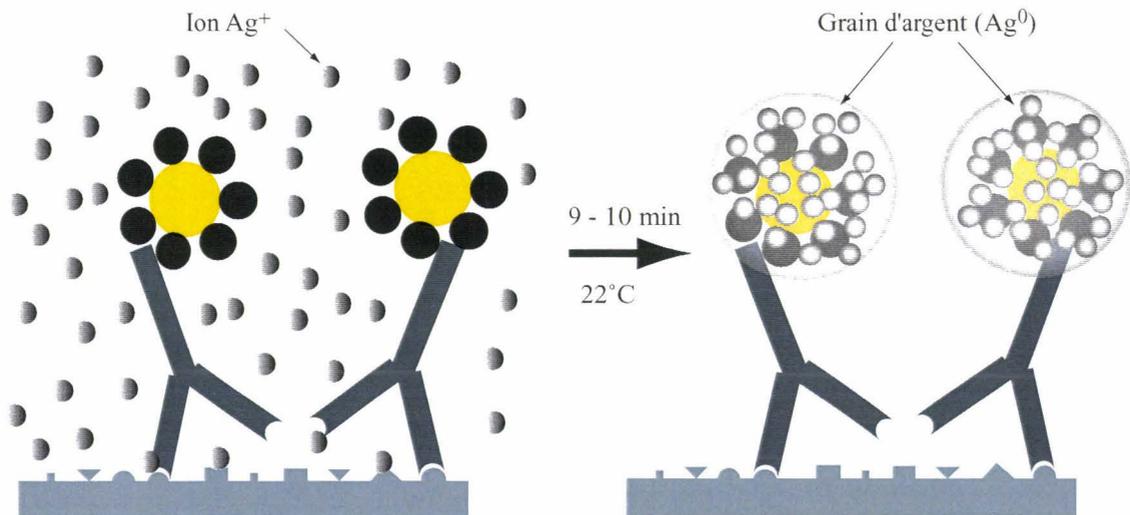


Figure 33 : Principe du marquage immunocytochimique en deux étapes et de l'intensification du signal (d'après Burlat, 1997).

A : La 1^{ère} étape correspond à la reconnaissance du site antigénique par l'anticorps contenu dans l'immunsérum puis lors de la 2^{ème} étape, la protéine A couplée à des grains d'or colloïdal se fixe spécifiquement sur le marqueur primaire.

B : Intensification du marquage permettant une meilleure visualisation de ce dernier lors de l'observation en M.E.T. Cette étape, basée sur le principe de la réduction d'ions Ag^+ en Ag^0 au contact de l'or, est dépendante de la température et du temps d'incubation. A terme les grains d'or sont enrobés d'argent induisant une augmentation de leur diamètre les rendant plus visibles.

(MnO₂), opaque aux électrons, apparaît alors au MET sous forme de grains noirs de 5 nm de diamètre environ permettant de visualiser les lignines (Hepler et al., 1970; Bland et al., 1971).

Pratiquement, les différents échantillons de tige de lin sont traités selon le protocole décrit précédemment (paragraphe 2.1 - b).

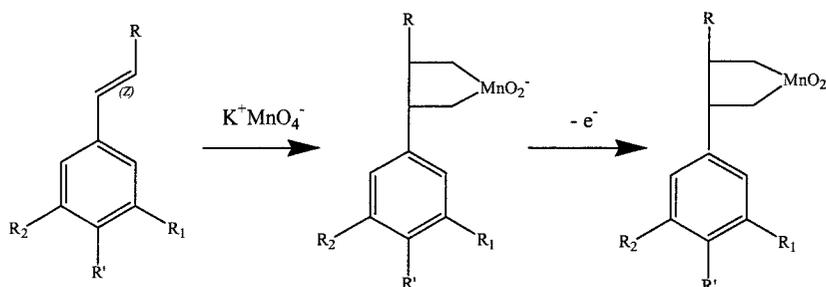


Figure 32 : Principe du marquage de la lignine par le permanganate de potassium

4.2 - MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

a - Principe

La technique du marquage immunocytochimique est basée sur l'aptitude d'un anticorps à se lier spécifiquement à son antigène. Cette réaction a lieu à la surface des ultracoupes des échantillons fixés par le mélange aldéhydique et récupérées sur anneaux en plastique. Il s'agit d'un marquage indirect en deux étapes qui s'effectue après inclusion des fragments de tiges. Dans un premier temps, l'incubation avec le marqueur primaire permet la formation du complexe anticorps-antigène, lequel est ensuite rendu opaque aux électrons grâce à l'interaction avec un marqueur secondaire couplé à l'or colloïdal (figure 33).

b - Marquages immunocytochimiques avec les antisera polyclonaux anti-lignines

Le marquage est réalisé sur des anneaux en plastique contenant les ultracoupes réalisées le jour même et maintenues sur de l'eau bidistillée. Ces dernières sont incubées sur des gouttes de 50 µL des différents réactifs et/ou solutions de rinçage disposées sur du parafilm et protégées de la dessiccation pendant toute la durée de l'expérience (figure 34). La manipulation se déroule à température ambiante sauf indication contraire.

Les coupes sont d'abord incubées sur une solution de glycine (Prolabo) 0,15 M dans un tampon Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6 (Tris : Pharmacia Biotech, HCl : Titrisol - Merck) durant 15 min afin de bloquer les interactions non-spécifiques avec les aldéhydes du fixateur qui n'auraient pas été éliminés lors des lavages. Les échantillons ont ensuite rincés sur 4 bains de Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6 de 3 min chacun.

Les interactions non spécifiques protéines-protéines sont bloquées par une incubation de 30 min sur une solution de lait écrémé déshydraté (Régilait) à 5 % (p/v) dans du TBS₅₀₀ 0,01 M (Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6, NaCl 0,5 M (Prolabo)).

BLOPAGE DES SITES ALDEHYDIQUES

Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6 / Glycine 0,15 M----- 15 min

RINCAGES

Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6----- 4 x 3 min

BLOPAGE DES INTERACTIONS NON SPECIFIQUES PROTEINES-PROTEINES

TBS₅₀₀ 0,01 M / lait écrémé 5 % (p/v) ----- 30 min

FORMATION DU COMPLEXE ANTICORPS-ANTIGENES

Anticorps primaires dilués dans TBS₅₀₀ 0,01 M/lait écrémé 5 % (p/v)-----3 h à T° ambiante et 1 nuit à 4 °C

RINCAGES

TBS₅₀₀ 0,01 M----- 5 x 3 min

Eau bidistillée ----- 3 x 3 min

MARQUAGE SECONDAIRE (Visualisation du complexe anticorps-antigènes)

Protéine A à 1/50 dans Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6 / gélatine de poisson 0,2 % (p/v)-----1 h 30 min

RINCAGES

Tris-HCl 0,01 M, pH : 7,6----- 4 x 2 min

Eau bidistillée ----- 3 x 1 min

POST-FIXATION

Glutaraldéhyde 2 % (v/v) dans de l'eau bidistillée----- 10 min

RINCAGES

Eau bidistillée ----- 4 x 2 min

INTENSIFICATION DU MARQUAGE A L'OR

Solution du kit IntenSE™, Amersham----- 9 – 10 min à 22°C

RINCAGES

Eau bidistillée -----10 x 30 s

RECUPERATION DES COUPES SUR GRILLES DE CUIVRE CARBONEES

INTENSIFICATION DU CONTRASTE DES ULTRACOUPES

Eau bidistillée ----- 1 min

Acétate d'uranyle 2 % (p/v) dans de l'eau bidistillée -----2 min 30

RINCAGES

Eau bidistillée -----3 x 2 s

Figure 34 : Diagramme récapitulatif du protocole de marquage immunocytochimique employé avec les ultracoupes de tige de lin.

Les ultracoupes sont ensuite incubées en présence des anticorps primaires dilués à différents titres selon les cas dans la solution de blocage (TBS₅₀₀ 0,01 M / lait 5 %) pendant 3 h à température ambiante suivi d'une nuit à 4°C. Afin de déterminer le titre auquel l'anticorps donne un marquage le plus spécifique, il est nécessaire de tester une large gamme de concentrations d'anticorps, notamment lors des premiers essais. A terme les analyses sont affinées en utilisant des dilutions plus restreintes encadrant le titre optimal d'utilisation de l'anticorps. Cette étape d'incubation avec le marqueur primaire est suivie de plusieurs rinçages de 3 min chacun : 5 sur du TBS₅₀₀ 0,01 M puis 3 sur de l'eau bidistillée.

Les ultracoupes sont alors mises en contact pendant 1 h 30 min avec le marqueur secondaire dilué au 1/50 dans un tampon Tris-HCl / gélatine de poisson (Sigma) 0,2 % (p/v). La protéine A couplée à des grains d'or colloïdal d'un diamètre de 5 nm environ est utilisée comme marqueur secondaire (AuroProbe™ LM, Amersham Life Science). 4 rinçages de 2 min sur le tampon Tris-HCl sont ensuite effectués suivis de 3 rapides rinçages sur de l'eau bidistillée.

Une post-fixation de 10 min sur une solution de glutaraldéhyde (Electron Microscopy Sciences) à 2 % dans de l'eau permet de stabiliser les complexes antigène-anticorps-marqueur secondaire. Puis les échantillons sont rincés sur 4 bains d'eau bidistillée de 2 min chacun.

L'utilisation de grains d'or de 5 nm couplés à la protéine A permet un marquage à la fois dense et précis mais peu visible. Ainsi, une intensification des grains d'or par un enrobage à l'argent est réalisée à l'aide d'un kit commercial (IntenSE™ M, Amersham Life Science). Cette technique introduite en immunocytochimie par Holgate et al. (1983) et Danscher et Norgaard (1983) repose sur la réduction d'ions Ag⁺ en Ag⁰ par des molécules d'hydroquinones qui adhèrent sous leur forme réduite à l'or. La taille du grain d'argent formé dépend de la température et de la durée d'incubation avec le réactif. Des incubations de 9-10 min à 22°C donnent de bonnes intensifications spécifiques. En effet, il est impératif d'éviter les temps trop longs conduisant à une "self-nucléation" correspondant à la formation de grains d'argent de manière aléatoire sur l'échantillon et donc à un fort bruit de fond.

Après un rinçage rapide sur une dizaine de gouttes d'eau, les ultracoupes sont transférées sur des grilles en cuivre carbonées puis contrastées par l'acétate d'uranyle 2 % comme indiqué ci dessous.

Pour chaque immunomarquage, plusieurs témoins sont réalisés :

- Un contrôle en absence d'anticorps primaires afin de vérifier que les résultats visualisés ne sont pas dus au marqueur secondaire.
- Un contrôle en remplaçant le sérum immun par le sérum pré-immun du même animal dans le but de contrôler que les marquages observés sont dus aux anticorps induits en réponse aux antigènes injectés.

c - Les anticorps utilisés

Trois anticorps polyclonaux préparés au CERMAV (CNRS, UPR5301, Grenoble) ont été utilisés. Ces antisera sont dirigés contre des polymères de lignine de synthèse (DHP) synthétisés par déshydrogénation radicalaire par le Pr. O. Faix (Hamburg). Les DHP présentent l'avantage par rapport aux lignines d'extraction d'être exempts de fractions osidiques résiduelles (xylanes...). De plus, la composition monomérique de ces DHP peut être contrôlée : l'emploi d'un ou de plusieurs précurseurs permet d'obtenir respectivement des homo ou des hétéropolymères.

α - Mode d'obtention des antigènes

Les DHP utilisés ont été synthétisés en utilisant deux modes conventionnels de polymérisation *in vitro* des alcools hydroxycinnamyliques : la méthode *zulauf* (zl) et la méthode *zutropf* (zt) (Sarkanen, 1971; Faix, 1986; Saake et al., 1996). Le tableau 3 résume les différents DHP synthétisés et utilisés pour la production des trois antisera.

Précurseurs	Type de polymère	Mode de polymérisation	
		<i>zulauf</i>	<i>zutropf</i>
Alcool coniférylique	Homopolymère	DHP-G-zl	
Mélange d'alcools coniférylique et sinapylique	Hétéropolymère	DHP-GS-zl	DHP-GS-zt

Tableau 3 : Déhydrogénopolymères (DHP) polymérisés selon les deux modes conventionnels de polymérisation *in vitro* et employés comme antigènes.

β - Obtention des antisera

Ces différents DHP ont ensuite servi d'antigènes pour la production d'antisera polyclonaux chez le lapin. Ils ont été utilisés sans couplage et injectés aux animaux sous la forme de solutions (Ruel et al., 1994). Les antisera purifiés ont alors été caractérisés et leur spécificité vis à vis des différentes sous-unités constitutives des lignines et des liaisons inter-monomères a été démontrée (Ruel et al., 1994; Joseleau et Ruel, 1997).

4.3 - POST-MARQUAGE PAR SIMPLE CONTRASTE A L'ACETATE D'URANYLE

Les constituants de la matière vivante sont constitués essentiellement d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote lesquels sont faiblement opaques aux électrons. Ainsi pour pouvoir observer rapidement l'ultrastructure des échantillons en MET, il est nécessaire d'accentuer leur contraste. L'acétate d'uranyle, composé dense aux électrons, permet cela en se venant se loger dans les microaspérités présentes à la surface des ultracoupes. Par son mode d'action, ce type de marquage est totalement aspécifique.

Pratiquement, les ultracoupes d'échantillons fixés par le mélange aldéhydique et récupérées sur grilles en cuivre carbonées sont incubées à l'obscurité pendant 2 min 30 exactement à température ambiante sur une solution d'acétate d'uranyle (Electron Microscopy Sciences) à 2 % (p/v) dans de l'eau distillée. Les grilles sont ensuite très rapidement rincées à l'eau avant d'être séchées sur papier filtre.

Avant de procéder à ce marquage, il peut s'avérer nécessaire de réhydrater les coupes par incubation de ces dernières sur une goutte d'eau bidistillée pendant 1 à 2 min.

V - OBSERVATION EN MET ET PHOTOGRAPHIE

Les observations en MET sont réalisées à 80 kV avec un microscope électronique à transmission Philips CM200 Cryo. Les micrographies sont prises sur des plans films Kodaks (E.M. film, ESTAR thick base 4489, 8.3 x 10.2 cm) et développées à l'aide du révélateur Kodak D19 (solution stock diluée au 1/3 (v/v) dans de l'eau) pendant 4 min 30 à 20°C. Les négatifs ainsi obtenues sont tirés manuellement sur papier (12,7 x 17,8 cm ; grain n°2 ; Ilford). Après un temps d'exposition variable, les photos sont révélées dans un bain de 1 min 30 dans un révélateur photo Ilford, PQ universal revel paper (solution stock diluée au 1/9 (v/v) dans de l'eau), puis suite à un bref rinçage dans de l'eau, fixées durant 30 s minimum dans une solution de fixateur Kodak Professional Repro (solution stock diluée au 1/5 (v/v)). Après un rinçage abondant dans de l'eau, les photos sont séchées.

VI - COLORATION DES CONSTITUANTS PARIETAUX EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Des échantillons de tige de lin fixés et inclus pour la MET ont été utilisés pour réaliser des coupes semi-fines (1 µm): pour l'obtention de ces coupes à l'ultramicrotome la vitesse de coupe a été réduite à 1 mm/s approximativement. Une coloration safranine O - bleu astra est effectuée, à température ambiante, sur ces coupes permettant ainsi la mise en évidence des tissus lignifiés (apparaissant en rose) et cellulosiques (colorés en bleu) respectivement (Tolivia et Tolivia, 1987; Vasquez-Cooz et Meyer, 2002). Pratiquement, les coupes récupérées sur anneaux en plastique sont traitées par une solution de Safranine O (Electron Microscopy Sciences) à 0,1 % (p/v) dans de l'eau distillée durant 10 min puis rincées plusieurs fois sur de l'eau avant d'être incubées 45 min sur une solution de bleu astra (Electron Microscopy Sciences) à 0,1 % (p/v) dans de l'eau. Après plusieurs rinçages sur de l'eau distillée, les coupes sont déposées sur une lame de verre puis délicatement séchées. Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique Axioplan 2, Zeiss, et photographiées *via* une caméra ColorView 12, Axiophot 2, Zeiss pilotée par le logiciel de traitement d'image AnalySIS v 3.1 (Soft Imaging System)

VII - DETECTION HISTOCHIMIQUE DES LIGNINES EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Une réponse colorimétrique spécifique d'un tissu lignifié suite à un traitement d'un réactif inorganique est connue depuis le XIX^{ème} siècle par les travaux de Runge (1834). Depuis les réactions colorimétriques se sont multipliées et sont largement utilisées pour la détection et l'identification des lignines (Kutscha et Gray, 1972). Près de 200 méthodes sont connues ayant un degré variable de spécificité. Parmi celles-ci, deux sont très généralement utilisées :

- La réaction de Weisner (phloroglucinol-HCl) (Weisner, 1878) colore la lignine en rouge, plus précisément l'apparition du chromophore a été rapportée comme résultant de la condensation, catalysée par l'acide chlorhydrique, du phloroglucinol avec les unités coniféraldéhydes et sinapaldéhydes des lignines (figure 35) (Clifford, 1974).
- Le test de Maüle (permanganate de potassium-HCl-ammoniaque) (Mäule, 1901). Lors de ce test, les traitements successifs par le permanganate de potassium et l'acide chlorhydrique transforment les résidus gäiacyles et syringyles en catéchols et méthoxycatechols respectivement. Puis le traitement avec l'hydroxyde d'ammonium concentré convertit ces catéchols en 5-alkyl-o-quinone et 3-méthoxy-5-alkyl-o-quinone respectivement révélant ainsi une coloration orange-brune (lignines de type G) ou une coloration pourpre-rouge (lignines de type G-S) (figure 36) (Meshitsuka et Nakano, 1978;1979; Iiyama et Pant, 1988).

Pratiquement, des sections transversales de tige de lin sont réalisées à main-levée avec une lame de rasoir à partir de fragments de tiges insérés dans de la moelle de sureau. Ces coupes ont été aussitôt utilisées.

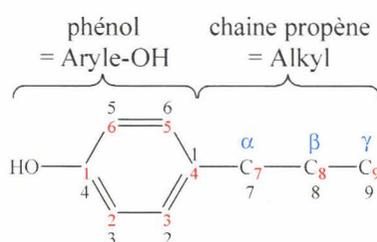
Lors de la réaction de Weisner, les coupes déposées sur une lame de verre ont été recouvertes d'une solution de phloroglucinol (Prolabo) à 2 % (p/v) dans de l'alcool à 95 %. Après évaporation quasi totale de l'alcool, ces sections de tiges sont montées entre lame et lamelle dans une solution d'acide chlorhydrique, HCl, (Acros Organics) à 8 N puis observées et photographiées immédiatement, la coloration rouge n'étant stable que 15 min environ.

Lors de la réaction de Maüle, les coupes sont placées dans une solution de permanganate de potassium (Prolabo) à 1 % (p/v) dans de l'eau distillée pendant 5 min. Après 3 à 4 rinçages rapides à l'eau distillée, les coupes ont été traitées dans une solution d'acide chlorhydrique (Acros Organics) à 6 N jusqu'à la disparition de la couleur brunâtre. Puis les sections de tiges sont rincées 3 - 4 fois dans de l'eau distillée avant d'être montées entre lame et lamelle dans de l'hydroxyde d'ammonium (Acros Organics) concentré. Comme précédemment, cette coloration n'étant pas stable, les observations et les photographies sont réalisées immédiatement.

Ces observations sont réalisées au travers d'un microscope Nikon Eclipse TS 100 relié à une caméra digitale Nikon Coolpix E-950.

C – CARACTERISATION DES LIGNINES ET DE LEURS PRECURSEURS DANS LA TIGE DE LIN AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

Les lignines proviennent de la copolymérisation de trois alcools phénylpropénoïques nommés dans la **nomenclature usuelle** (dans la nomenclature IUPAC) : **alcool *p*-coumarylique** (hydroxy-1-benzène-propényl-4), **alcool coniférylique** (méthoxy-2-hydroxy-1-benzène-propényl-4), **alcool sinapylique** (diméthoxy-2,6-hydroxy-1-benzène-propényl-4). Dans le tableau 4, la structure de ces alcools hydroxycinnamiques (C₆-C₃) est mise en relation avec celle d'autres dérivés apparentés et cités par la suite. Les désignations retenues dans la suite de ce mémoire correspondent au nom usuel. Cette incohérence de la nomenclature usuelle par rapport à celle officielle (IUPAC) a été revue par Sarkanen et Ludwig (1971a).



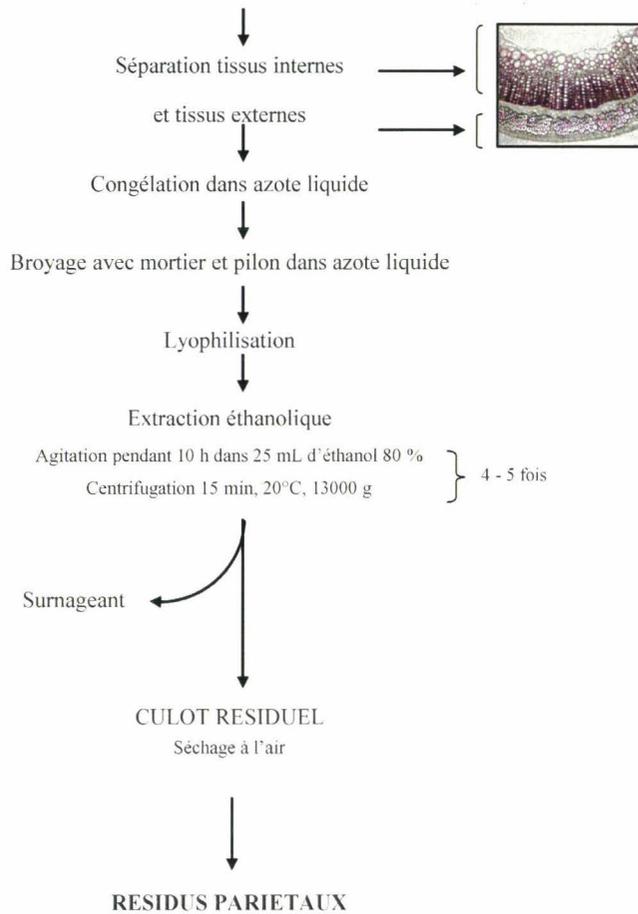
Numérotation des carbones en rouge selon l'IUPAC (International Union Pure & Applied Chemistry), en noir selon la notation usuelle utilisé dans le tableau ci dessous et en bleu selon la notation usuelle pour désigner les carbones de la chaîne propène

Nom du cycle	Hydroxybenzoyl (H) ou Hydroxyphenyl	Gaïacyle (G)	Syringyle (S)
Substitution du cycle	4-hydroxy	3- méthoxy (OCH ₃) 4-hydroxy (OH)	3-méthoxy 4-hydroxy 5-méthoxy
Acide en C ₇ ⁽¹⁾ αCOOH	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	vanillique	syringique
Aldéhyde en C ₇ ⁽¹⁾ αCHO	hydroxybenzaldéhyde	vanilline	syringaldehyde
Alcool en C ₉ ⁽¹⁾ γCH ₂ OH	coumarylique	coniférylique	sinapylique
Acide en C ₉ ⁽¹⁾ γCOOH	<i>p</i> -coumarique (PC)	férulique (FE)	sinapique (SI)

⁽¹⁾ Lors du compte des carbones des unités H, G et S les carbones des méthoxyles sont négligés : les séries en C₇ sont dites benzoyles par référence à l'acide benzoïque ou benzylcarboxylique, les séries C₉ dites hydroxycinnamiques correspondant à l'acide cinnamique ou benzylpropène carboxylique.

Tableau 4 : Structure du squelette carboné et nomenclature des unités phénylpropanes et des alcools, aldéhydes, acides benzoïques et phénylpropénoïques (d'après Monties, 1980).

FRAGMENTS APICAUX ET BASAUX DE TIGE DE LIN



- ANALYSE DES PHENOLS LIES AUX PAROIS
- DOSAGE DES LIGNINES
Klason, Bromure d'acétyle
- CARACTERISATION DES LIGNINES
Nitrobenzène, Thioacidolyse

Figure 37 : Schéma récapitulatif des différentes étapes suivies pour l'obtention des résidus pariétaux. Photo : coupe transversale effectuée à main levée de tige de lin dans sa partie basale après coloration au phloroglucinol.

I - MATERIEL VEGETAL

La floraison et le stade capsules brunes correspondent aux stades de développement des lins encadrant la maturation des fibres périphloémiennes. Ainsi, les analyses biochimiques ont été réalisées à partir des tissus externes et internes des fragments basaux et apicaux de tige de lin issus de ces deux stades. Leur échantillonnage s'est réalisé comme indiqué dans le chapitre A.

II - OBTENTION DES RESIDUS PARIETAUX ET ANALYSES PRELIMINAIRES

Parmi la grande diversité des constituants cellulaires, des composés phénoliques et/ou protéiques peuvent interférer avec la caractérisation des constituants pariétaux. Aussi ; préalablement à toute technique de quantification et/ou de caractérisation des lignines, il est nécessaire de les ôter et/ou de les doser sans toutefois modifier les structures et la composition pariétales.

2.1 - EXTRACTION ETHANOLIQUE

Ce traitement a pour but d'éliminer tous les composés non liés de manière covalente aux parois. La méthode employée s'appuie sur l'analyse chimique des matériaux lignocellulosiques d'après Theander (1991).

Les tissus végétaux, stockés à - 80°C, sont broyés finement dans un mortier en présence d'azote liquide, puis lyophilisés. La poudre obtenue est alors additionnée de 25 ml d'éthanol 80 % et cette suspension est incubée pendant 10 h à température ambiante sous agitation constante avant d'être centrifugée à 13 000 g pendant 15 min à 20°C. Après récupération du surnageant, l'extraction est répétée en moyenne 4 fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore. A terme le culot résiduel est séché à température ambiante. Cette poudre correspond aux résidus pariétaux utilisés lors des analyses ultérieures (figure 37).

Le calcul de la différence de masse de la poudre après lyophilisation et du culot résiduel permet d'estimer la masse de composés phénoliques éliminés au cours de cette étape.

2.2 - DETERMINATION DES TENEURS EN PROTEINES DANS LES RESIDUS PARIETAUX.

La teneur en azote a été estimée selon la méthode de Dumas (1831) : l'oxydation catalytique à haute température des échantillons suivie d'une réduction permet de mesurer les quantités de N₂ libérées par ces derniers.

Pratiquement, 4 à 5 mg de résidus pariétaux, préalablement incubés une nuit à 80°C, sont transférés dans des nacelles en étain. Ces dernières sont ensuite placées dans un four à 1000°C en présence d'une forte concentration de O₂ entraînant une combustion flash sublimant ainsi les échantillons (la matière minérale

RESIDUS PARIETAUX



Hydrolyse alcaline forte :

NaOH 4 M, 170°C, 2 h, dans bombe en téflon

Refroidissement à température ambiante



HCl 6 N

pH \approx 1

Extraction organique

3 fois { 25 mL d'éther éthylique, agitation puis décantation
récupération phase organique



Séchage sur Na₂SO₄



Concentration

Evaporation à sec, 900 mbar, 45°C



Reprise résidus

dans 2 mL solution méthanol/eau distillée, 1/1 (v/v)



Filtration 0,45 μ m



Analyse des acides phénoliques en HPLC

Figure 38 : Principe de l'analyse des acides phénoliques liés aux parois: schéma récapitulatif des différentes étapes du mode opératoire.

se retrouve sous forme de cendres). L'azote organique est ainsi transformé en oxyde d'azote lequel, au contact d'un catalyseur cuivrique, est réduit en azote minéral, N₂. La teneur de N₂ ainsi formé est quantifiée par un détecteur de conductibilité thermique (analyseur NA-1500, Carlo-Erba). La teneur en protéines est ensuite obtenue en appliquant un facteur de 6,25 à la teneur en N₂ mesurée. Pour chaque échantillon, ces analyses ont été triplées.

IV - CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES PARIETAUX

Contrairement aux acides phénoliques cytoplasmiques facilement extraits par l'eau et l'éthanol, les acides phénoliques liés par des structures éthers et/ou esters aux polymères pariétaux nécessitent des conditions d'extraction plus drastiques (Scalbert et al., 1985; Wallace et Fry, 1994; Jacquet et al., 1997). La rupture de ces liaisons covalentes par hydrolyse est donc un prérequis à toute caractérisation des acides phénoliques pariétaux. Par la suite, ces derniers sont isolés sur la base de leur solubilité différentielle selon l'acidité du milieu. En fonction du pH de la solution, inférieur ou supérieur à leur pKa, les acides phénoliques se retrouvent, respectivement, sous leur forme acide ((Ph-OH)-R-COOH) soluble dans les solvants organiques ou sous leur forme basique ((Ph-OH)-R-COO⁻) soluble en milieu aqueux.

Ainsi, le principe d'extraction et d'isolement comporte 4 étapes (figure 38) : une hydrolyse alcaline précède une extraction organique puis après concentration, les acides phénoliques sont caractérisés par HPLC. Pour chaque échantillon, 3 analyses indépendantes ont été effectuées.

4.1 - HYDROLYSE ALCALINE

Selon le protocole de Iiyama et al. (1990), la totalité des acides phénoliques estérifiés et étherifiés à des polymères pariétaux peut être estimée suite à une hydrolyse alcaline des résidus pariétaux à haute température et sous haute pression. Ainsi, 40 mg de résidus pariétaux ont été pesés dans des gaines en téflon puis additionnés de 10 mL de soude 4 M (Prolabo). L'ensemble a été enfermé dans des réacteurs en acier et incubé dans un bain d'huile à 170°C pendant 2 h. Après refroidissement à température ambiante pendant 2 h pour annuler la pression interne, les gaines sont délicatement ouvertes et 1 mL d'étalon interne (solution méthanolique / eau, 1/1 (v/v) d'acide triméthoxy-3,4,5-cinnamique à 20 µg / mL (Sigma-Aldrich)) est ajouté.

4.2 - EXTRACTION ORGANIQUE ET CONCENTRATION

Le contenu de la gaine en téflon est transféré dans un bêcher dans lequel est également versé l'eau distillée utilisée pour rincer la gaine. Cette solution est ensuite acidifiée à pH~1, vérifiée avec du papier pH, par l'addition de 7 mL d'acide chlorhydrique 6 N (SDSTM) permettant d'une part la neutralisation de

Composés dissous dans du méthanol		Solution A	Solution B
Etalon interne	acide triméthoxy-3,4,5-cinnamique	X	X
	acide 4-hydroxybenzoïque	X	X
Acides en C7	acide vanillique	X	X
	acide syringique	X	
	acide <i>p</i> -coumarique	X	X
Acides en C9	acide férulique	X	X
	acide caféique	X	X
	acide sinapique	X	
	vanilline		X
Aldéhydes en C7	4-hydroxybenzaldéhyde	X	X
	syringaldéhyde	X	X

Tableau 5 : Composition des solutions "de référence" employées pour étalonner la colonne de HPLC. La croix, X, indique la présence du composé dans la solution "de référence". La concentration de chaque composé (Sigma-Aldrich) calculée à 0,01 mg près est de l'ordre de 50 mg / mL, excepté pour l'étalon interne en solution à 20 µg / mL.

	Temps en min	Solvant A en %	Solvant B en %	Solvant C en %	Evolution du gradient
SEPARATION	0	100	0	0	
	6	92,5	5	2,5	3
	13,5	85	10	5	6
	27,5	60	20	20	7
	30	60	20	20	6
NETTOYAGE	35	0	50	50	8
EQUILIBRAGE	50	100	0	0	8
	55	100	0	0	6

Solvant A : Eau ultrapure 95 % (v/v), Acétonitrile 5 % (v/v), Acide orthophosphorique 1^{0/00} (v/v)

Solvant B : Méthanol 80 % (v/v) (SDSTM), Eau ultrapure 20 % (v/v), Acide orthophosphorique 1^{0/00} (v/v)

Solvant C : Acétonitrile 80 % (v/v), Eau ultrapure 20 % (v/v), Acide orthophosphorique 1^{0/00} (v/v)

Tableau 6 : Gradient d'élution utilisé lors de la HPLC en phase inverse pour la caractérisation des acides phénoliques pariétaux.

Le gradient de polarité décroissant utilisé lors de l'élution a un débit de 1 mL/min, le dégazage des solvants (SDSTM ou Sigma-Fluka) est réalisé en continu au cours de l'analyse. 1 : échelle de 1 à 11 traduisant l'évolution du gradient, celui ci est linéaire pour un indice de 6, en deçà, il a une évolution exponentielle, au dessous, logarithmique.

la soude et d'autre part la solubilisation des acides phénoliques dans la phase organique, le pH étant inférieur au pKa de la fonction acide carboxylique. Ainsi, trois extractions dans 25 mL d'éther éthylique (SDSTM) sont réalisées dans des ampoules à décanter. Après homogénéisation et décantation, *i.e.* séparation des phases aqueuse et organique, la phase organique est récupérée dans un erlenmeyer contenant environ 2 g de sulfate d'ammonium. Ce composé, très hygroscopique, sèche la fraction organique en emprisonnant l'eau.

Les extraits organiques sont évaporés à sec sous pression réduite (900 mbar) à 45°C. Le résidu est repris dans 2 mL d'un mélange équivolume méthanol/eau puis filtré à 0,45 µm (microfiltre en PTFE, WATERS, Wat200821). Le filtrat est transféré dans un flacon adapté à la HPLC (Waters, Wat270946).

4.3 - ANALYSE PAR HPLC

La fraction aliquote des solutions méthanoliques est analysée le jour même par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) en phase inverse, les échantillons ne se conservant pas plus de 48 h à 4°C. Le dosage est réalisé selon la méthode de l'étalonnage interne et après calibrage de la colonne. En effet, il est nécessaire de tester i. la réponse de la colonne vis à vis des composés à identifier et ii. la reproductibilité des conditions analytiques.

Pour cela, deux solutions "de référence" sont analysées avant, pendant et après la série d'échantillons étudiée. La composition de ces deux solutions "de référence", nommées A et B, est indiquée dans le tableau 5. Pour une plus grande fiabilité chaque solution est dupliquée et réalisée indépendamment. De ce fait, chaque étalonnage de la colonne correspond à 4 analyses consécutives.

La séparation des acides phénoliques est réalisée à l'aide d'un chromatographe (WATERS, module 2690) à 30°C, sur une colonne analytique de silice greffée C₁₈ (WATERS Sphérisorb S5 ODS2, 4,6 x 250 mm, 5µm) dans les conditions d'élution présentées tableau 6. Les spectres UV ont été enregistrés en continu pendant l'élution à l'aide d'un détecteur équipé d'une barrette de diode (WATERS, module 996); l'acquisition s'étant effectuée entre 200 nm et 380 nm, avec une résolution de 1,2. L'intégration, permettant de mesurer l'aire des pics détectés et donc de quantifier le composé sélectionné, a été réalisée manuellement à 301,9 nm à l'aide du logiciel "WATERS, Millennium³², version : 3.05.01 (1998)". En outre l'identification de chaque composé a été validée par l'analyse de son spectre.

V - DETERMINATION DES TENEURS EN LIGNINE

Les nombreuses méthodes de quantification des lignines peuvent être distinguées en fonction de leur méthodologie: les méthodes "directes" et les méthodes "indirectes". Les premières, telles la méthode de Klason, quantifient la lignine des échantillons comme un résidu solide, les secondes, telles le dosage au bromure d'acétyle, déterminent la teneur en lignine présente dans une solution.

5.1 - METHODE DE KLASON

Cette méthode de quantification des lignines est la plus couramment employée des méthodes directes, elle est devenue un standard universel auquel les autres méthodes de quantification des lignines sont comparées. La teneur en lignine est estimée par la masse de résidu obtenu après hydrolyse et solubilisation des polysaccharides pariétaux par l'acide sulfurique. La lignine isolée par ce traitement est qualifiée de lignine acide insoluble et communément appelée "lignine Klason".

Le protocole utilisé et décrit ci-dessous dérive de l'adaptation du protocole originel (Klason, 1908) à des quantités plus faibles par Effland (1977) et Monties (1984a). Cette technique reposant sur une différence de pesés, chacune de ces étapes s'effectue avec des gants afin d'éviter le dépôt d'eau et de graisse sur la verrerie. Pratiquement, 300 mg de résidus pariétaux (P_0), placés dans des béchers de 10 ml, subissent un gonflement dans 3 ml d'acide sulfurique 72 % soit 12 M (SDSTM) pendant 2 h à 20°C. Durant ce temps, le mélange est régulièrement agité avec une baguette de verre afin d'assurer une bonne homogénéisation. Après cette étape, l'acide est dilué à 5 % par addition de 40 mL d'eau distillée permettant de transférer le mélange dans des erlenmeyers à col rodé en rinçant minutieusement les béchers. Les erlenmeyers surmontés d'une colonne réfrigérante sont ensuite placés sur des bains à sable à 300°C et la solution contenue portée ainsi à reflux pendant 3 h sous agitation. La colonne réfrigérante évite l'évaporation et la concentration de l'acide. Cette étape permet une hydrolyse totale des polysaccharides pariétaux dont l'accessibilité a été assurée par le gonflement préalable des parois. Les résidus insolubles sont ensuite séparés de l'hydrolysate sur des verres frittés de porosité 1. Ces derniers auront été préalablement surmontés d'un filtre en fibre de verre (Whatman GF/A 24 mm de diamètre, n°1820 024), placés à l'étuve à 100°C pendant 1 h minimum et, après refroidissement dans un dessiccateur, tarés (P_T). Les erlenmeyers sont minutieusement rincés à l'eau distillée afin de transférer toute trace de résidus sur le verre fritté puis jusqu'à la neutralité du filtrat à la sortie du verre fritté. L'ensemble verre fritté, filtre, résidus est ensuite séché à 100°C pendant 20 h approximativement puis pesé après refroidissement dans un dessiccateur (P_1). Une dernière pesée (P_2) déterminant les teneurs en cendres est effectuée de manière similaire après une dernière étape d'incubation à 500°C pendant 3 h 30 pour calciner les résidus. Ces analyses ont été triplées pour chaque échantillon.

La teneur en lignine dans les résidus pariétaux s'obtient en calculant la différence : $P_1 - P_2$. Le pourcentage de lignine Klason correspond donc à : $(P_1 - P_2) / P_0 \times 100$.

5.2 - METHODE AU BROMURE D'ACÉTYLE

Cette méthode indirecte, décrite initialement par Johnson et al. (1961) quantifie une réponse chimique des lignines relatives à leur concentration en solution. Plus précisément, la quantification s'effectue à partir de l'absorbance mesurée à 280 nm, longueur d'onde à laquelle les lignines, en raison de leur nature aromatique, présentent le maximum d'absorption. Parmi les méthodes spectrophotométriques de détermination de la teneur en lignine, le bromure d'acétyle est la technique la plus couramment employée. La solubilisation des lignines présentes dans le matériel lignocellulosique étudié est réalisée à 70°C par du bromure d'acétyle en solution dans de l'acide acétique. La révision de cette technique par Iiyama et Wallis (1988) suggère d'ajouter de l'acide perchlorique au volume réactionnel afin de faciliter la solubilisation des parois des échantillons.

Le bromure d'acétyle agit comme un catalyseur d'une réaction d'acétylyse au cours de laquelle il est transformé en bromure d'hydrogène. Le bromure d'acétyle étant très sensible à l'eau, il est impératif que l'ensemble de la verrerie utilisé soit sec (Van Zyl, 1978). La manipulation s'effectue sous la hotte avec des gants. Approximativement 15 mg de résidus pariétaux sont placés dans des tubes à vis en verre de 25 mL puis additionnés de 5 mL de solution de bromure d'acétyle (Labosi, Acros) à 25 % (p/v) dans de l'acide acétique cristallisable à 99,8 % minimum (R.P. Normapur, Prolabo). 0,2 mL d'acide perchlorique à 70 % (Sigma-Aldrich) sont ensuite ajoutés dans chaque tube. Les tubes, fermés, sont agités au vortex pendant 5 s puis placés 30 min à 70°C dans un bain d'huile. Durant cette incubation, les tubes sont agités toutes les 10 min au vortex pour assurer une parfaite solubilisation des échantillons. Après refroidissement du mélange réactionnel par transfert des tubes dans la glace, une aliquote précise de 1 ou 4 mL suivant les échantillons, tissus internes ou tissus externes respectivement, est transférée dans des tubes en verre gradués de 20 mL contenant 5 mL d'une solution de soude à 2N (Prolabo) et 6 mL d'acide acétique cristallisable à 99,8 % minimum (R.P. Normapur, Prolabo). Le volume de ces tubes est ensuite ajusté à 20 mL de l'acide acétique à 99,8 % minimum. Après homogénéisation du mélange, les tubes sont placés à l'obscurité pendant 45 min environ afin de permettre le développement et la stabilisation de la coloration. La teneur en lignine est déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm (Spectrophotomètre Perkin-Elmer, Lambda 14 UV-Visible) par rapport à un témoin sans paroi traité de façon similaire aux échantillons. Chaque analyse est réalisée en triple.

Le pourcentage de lignine dans l'échantillon est calculé à partir de la formule de Beer-Lambert : $DO = \epsilon Cl$ où DO correspond à l'absorbance mesurée, ϵ ($20 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) au coefficient d'extinction massique de la lignine déterminé par Iiyama et Wallis (1988), C à la concentration en lignine dans l'échantillon en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ et l à la distance du trajet optique dans la cuve (1 cm).

La validation de l'analyse et du réactif est effectuée par le contrôle du coefficient d'extinction massique d'une lignine de référence. Ainsi, parallèlement et de façon similaire aux traitements des échantillons, un dosage est effectué sur de la lignine extraite d'*Epicéa* et donc de concentration connue. Le ϵ obtenu doit être égal à 20.

VI - CARACTERISATION STRUCTURALE DES LIGNINES

Les méthodes de caractérisation chimique des lignines nécessitent la dégradation du "réseau lignine" puis l'analyse des produits résultants. La dégradation chimique des lignines est réalisable par différentes méthodes oxydatives, réductives ou de solvolyses pouvant inclure une ou plusieurs étapes. Parmi ces différentes techniques deux sont couramment employées, l'oxydation alcaline au nitrobenzène et la thioacidolyse, et sont devenues respectivement les techniques standards de référence des méthodes oxydatives et de solvolyses.

6.1 - L'OXYDATION AU NITROBENZENE ALCALIN

Cette technique a été introduite par Freudenberg et ses collaborateurs (Freudenberg ; 1939, Freudenberg et al., 1940) pour obtenir de plus amples informations sur la nature aromatique des lignines mise en évidence par l'oxydation au permanganate de potassium.

a - Principe

Cette dégradation oxydative de la lignine provoque principalement la rupture entre les monolignols des liaisons éther entre un carbone (α ou β) de la chaîne propène (alkyle) et le O_4 du cycle aromatique (aryle) : liaisons α -O-4 ou β -O-4, *i.e.* liaisons alkyle-aryle-éther (figures 39 et 40). Les produits d'oxydations correspondent aux aldéhydes et acides en C7 des alcool coumarylique, coniférylique et sinapylique (Tableau 4). Les aldéhydes étant très majoritaires, ils sont extraits du mélange réactionnel et quantifiés par chromatographie (HPLC, GC ou GC-MS). Cette méthode permet ainsi d'analyser et de quantifier les unités monomériques de la lignine liées à ce polymère par des liaisons "non-condensées".

b - Mode opératoire

Le nitrobenzène étant un composé très toxique et volatile, l'ensemble de la manipulation se déroule sous une hotte. 20 ou 30 mg approximativement de résidus pariétaux, tissus internes ou tissus externes respectivement, sont placés dans des gaines en téflon de 25 mL réservées à cet usage puis additionnés de 5 mL de soude 2 M (Prolabo) et de 0,5 mL de nitrobenzène (pur, Merck). Les gaines sont ensuite enfermées dans des réacteurs en acier et l'ensemble est placé dans un bain d'huile à 160°C pendant 3 h. Suite à cette incubation, les réacteurs en acier sont sortis et laissés à température ambiante pendant 1 h 30 environ afin d'annuler la pression interne de chaque gaine et de limiter une trop grande perte des aldéhydes volatiles. Les gaines sont ensuite délicatement ouvertes et 1 mL d'étalon interne (solution méthanol / eau, 1/1 (v/v) d'éthoxy-3-hydroxy-4-benzaldéhyde (Sigma-Aldrich) à une concentration adaptée à l'échantillon peu ou très lignifié, de 20 μ g / mL à 200 μ g / mL respectivement) est ajouté. Ce mélange est transféré dans des béchers de 150 mL puis les gaines sont rincées avec 20 mL environ d'eau distillée. Trois rinçages successifs avec 25 mL de dichlorométhane (SDSTM) permettent d'éliminer du mélange réactionnel l'excédent de nitrobenzène, ce dernier étant soluble en phase organique

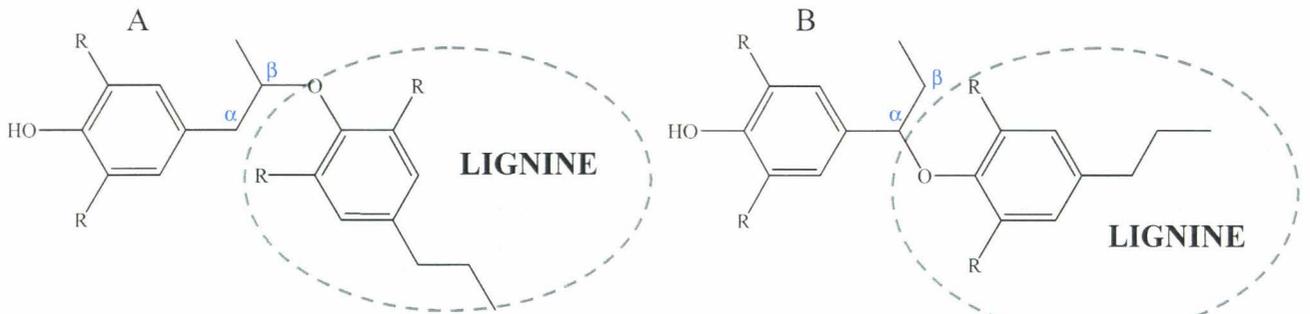


Figure 39 : Liaisons intermonomères de type non condensé alkyl-aryl-éther identifiées au sein des lignines (A : liaison β -aryl-éther (β -O-4), B : liaison α -aryl éther (α -O-4)) et susceptibles d'être clivées lors du nitrobenzène et/ou de la thioacidolyse. R=H ou OCH₃.

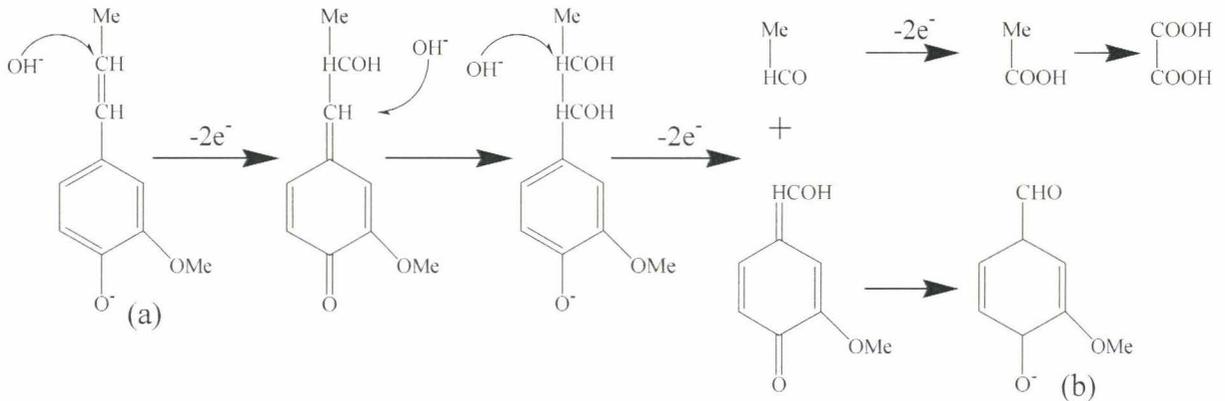


Figure 40 : Mécanisme de l'oxydation au nitrobenzène par transfert de 2 électrons d'après Chang H.M., et al. (1971) : oxydation de l'isoeugénol (a) en vanilline (b). Toutefois les travaux de Schultz et Templeton (1986) relatent le transfert d'un seul électron lors de cette oxydation. En outre, Iiyama et Lam (1990) ont suggéré que la réaction suivie un mécanisme hétérolytique lors des températures élevées.

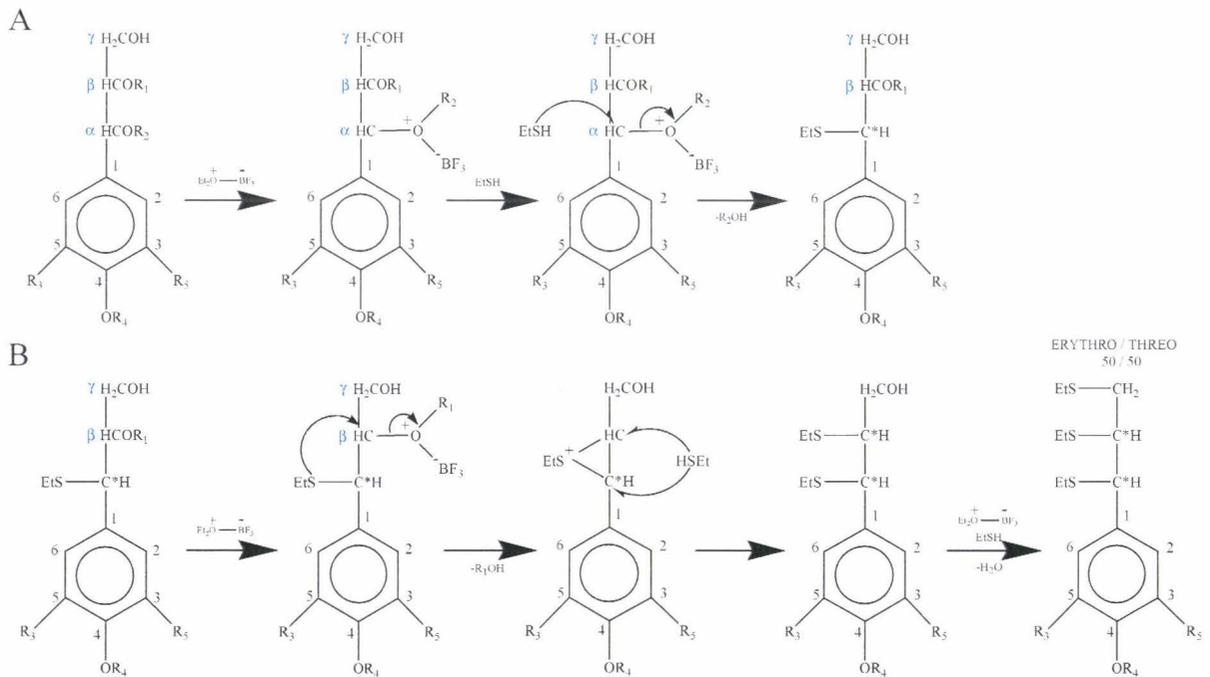


Figure 41 : Mécanisme de la réaction de thioacidolyse des lignines (d'après Rolando et al., 1992).

R₁ = Aryl ; R₂ = H ou Aryl ; R₃, R₅ = H ou OCH₃ ; R₄ = H ou Alkyl ; A : substitution du C_α, B : substitution du C_β, puis du C_γ via la participation des groupements voisins.

contrairement aux produits d'oxydation. Cette étape s'effectue dans des ampoules à décanter : après ajout du dichlorométhane et agitation, la phase organique, jaune, est éliminée. La phase aqueuse est additionnée de 2 mL d'acide chlorhydrique 6 N (SDSTM) ayant pour fonction de neutraliser la soude et d'abaisser le pH du mélange à 1 (vérifié au papier pH). Ces conditions de pH induisent une modification des aldéhydes de leur forme phénolate (soluble en milieu aqueux) en conditions basiques, en leur forme phénolique (soluble en milieu organique) en conditions acides. Ces aldéhydes phénoliques résultant de la réaction d'oxydation sont alors isolés par 3 extractions au dichlorométhane de 25 mL. Les phases organiques sont recueillies et concentrées puis analysées par HPLC dans des conditions similaires à celles décrites lors de l'étude des phénols pariétaux. Néanmoins, deux paramètres diffèrent de l'analyse précédente : i. l'étalon interne dans les solutions "de référence" et ii. l'intégration des pics qui s'effectue dans ce cas à 280 nm ce qui correspond au maximum d'absorption de l'étalon interne et des aldéhydes phénoliques. Chaque échantillon est analysé en triple, les résultats présentés sont la moyenne des trois analyses.

6.2 - THIOACIDOLYSE

a - Principe

Contrairement à la technique précédente, cette dégradation chimique des lignines par solvolysse préserve le squelette phénylpropène (C₆-C₃) des monolignols. La thioacidolyse, *i.e.* solvolysse dans le dioxane-éthanethiol, dépolymérise les lignines au cours d'une réaction catalysée par un acide, le trifluorure étherate de bore (Rolando et al., 1992; Lapierre, 1993). En effet, la combinaison de cet acide fort selon Lewis avec un agent nucléophile, l'éthanethiol, provoque la rupture des liaisons intermonomères de type alkyle-aryle-éther avec une grande spécificité (figures 39 et 41). Les monomères sont libérés sous forme de composés trithioéthylés possédant deux carbones asymétriques (α et β). Les deux diastéréoisomères (*erythro* et *threo*) se retrouve en mélange racémique, la réaction ne privilégiant pas une conformation. Ainsi, après purification et concentration, les monomères sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cependant, l'analyse quantitative et qualitative des composés trithioéthérés nécessite, pour leur passage en chromatographie phase gazeuse, d'être silylés. Cette étape a pour but de fixer sur les groupements polaires (OH) présents sur le cycle aromatique des groupement triméthylsilyles (Si(CH₃)₃) afin d'obtenir des groupement apolaires (O- Si(CH₃)₃) permettant leur élution de la colonne. En effet, l'absence de silylation de composés présentant des groupements polaires provoque leur fixation irréversible sur la phase stationnaire de la colonne capillaire. Après intégration de chacun de ces pics à l'issue de la CPG et regroupement des valeurs des deux diastéréoisomères, il est possible d'identifier et de quantifier les teneurs des unités monomériques engagées dans des structures non condensées dans la lignine.

b - Mode opératoire

α - Dégradation des lignines par thioacidolyse

Le mode opératoire dérive de Lapiere et al. (1986). La manipulation étant très odorante et les réactifs sensibles à l'eau, il est impératif de travailler sous une hotte et d'employer une verrerie sèche. Les résidus pariétaux, 10 mg pour les tissus internes, 15 mg pour les tissus externes sont placés dans des tubes à vis en verre de 25 mL dans lesquels 10 mL de réactif trifluorure de bore / éthanethiol / dioxane, 2,5/10/87,5 (v/v/v) (Sigma, SDSTM) préparé extemporanément sont ajoutés. A ce mélange, 1 mL d'étalon interne est additionné : du tétracosane (C₂₄H₅₀, Sigma Aldrich) dissout dans quelques gouttes d'hexane et dilué dans du dichlorométhane à une concentration variant entre 25 µg / mL et 250 µg / mL selon la teneur en lignines de l'échantillon. Le mélange réactionnel est placé à 100°C pendant 4 h, en agitation magnétique constante. A l'issue de cette incubation, les tubes sont mis à refroidir dans la glace et/ou à température ambiante pour annuler la pression interne. Le contenu des tubes est transféré dans un bécher contenant 30 mL de dichlorométhane (SDSTM) et 5 mL d'une solution aqueuse d'hydrogencarbonate de sodium à 0,4 M (Rectapur, Prolabo). Ce dernier réactif a pour fonction de détruire l'excès d'acide trifluorure étherate de bore en augmentant le pH du mélange réactionnel. Cependant, ces conditions de pH favorisent la forme phénolate des monomères trithioéthérés et de ce fait leur solubilité en phase aqueuse. Leur extraction nécessitant leur solubilisation en phase organique, quelques gouttes d'acide chlorhydrique 6 N (SDSTM) sont additionnées au milieu réactionnel jusqu'à acidification du mélange (vérifié avec du papier pH). Ce faible pH induit la forme phénolique des monomères qui sont alors récupérés par 3 extractions avec 30 mL de dichlorométhane dans une ampoule à décanter comme indiqué précédemment. Les extraits sont ensuite évaporés à sec sous pression réduite à 45°C. Cette étape s'effectue en deux temps : afin d'évaporer le dichlorométhane utilisé lors des extractions, la pression est abaissée à 475 mbar ; puis pour éliminer le dioxane (reste du réactif initial), la pression est réduite à 70 mbar. Les résidus sont ensuite dissous dans 1 mL de dichlorométhane et transférés dans un flacon (Interchim, CH771540) en présence de sulfate de sodium. Ainsi conditionnés, les thioacidolysats peuvent être conservés plusieurs mois à 4°C. Chaque échantillon de résidus pariétaux a fait l'objet de 3 analyses par thioacidolyse.

β - Silylation des monomères trithioéthérés libérés

La silylation des composés trithioéthérés présents dans les extraits permet leur détection en CPG et leur quantification par rapport à l'aire du pic de l'étalon interne. Cette étape est réalisée à partir de 10 µL de thioacidolysat, exempt de sulfate de sodium. L'échantillon à silyler est additionné à 20 µL de pyridine (SDSTM) et 70 µL de N-O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA, Sigma-Aldrich) préalablement placées dans un microtube (Waters, Wat094171) adapté au chromatographe. Les seringues Hamilton utilisées lors de cette manipulation doivent être, préalablement, minutieusement rincées au dichlorométhane (SDSTM). Les microtubes placés dans des flacons (Interchim, n°5182-0714) adaptés au chromatographe, sont fermés avec des bouchons en téflon (Interchim, n°5182-0717) puis

agités doucement afin d'homogénéiser le mélange en évitant la formation de bulles. La silylation s'effectue à température ambiante pendant toute la nuit. Les échantillons sont ainsi prêts à être analysés par CPG.

γ- Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Le chromatographe (Hewlet Packard 6890) utilisé lors de cette analyse est équipé d'une colonne microcapillaire d'une longueur de 30 m et d'un diamètre de 0,25 mm recouvert sur sa face interne d'une phase stationnaire composée à 100 % de polydiméthylsiloxane, de 0,25 µm d'épaisseur (J&W Scientific, DB-1, n°122-1032).

1 µL d'échantillon silylé est vaporisé dans la colonne via un injecteur chauffé à 260°C par fraction de 0,1 µL (10 x 0,1 µL). Le gaz vecteur, l'hélium, est appliqué à une pression constante de 0,6 bars à un volume de 20 mL / min. Le gradient de température dans la colonne est le suivant : de 160°C à 220°C (10°C / min), de 220°C à 240°C (5°C / min) puis de 240°C à 260°C (2°C / min) suivi de 15 min à 260°C. La détection des composés élués s'effectue par ionisation de flamme (FID) ; la température du détecteur est de 280°C. Préalablement à toute injection d'un nouvel échantillon, la seringue est rincée 4 fois avec du dichlorométhane. Les chromatogrammes sont enregistrés en continu. L'intégration, permettant de mesurer l'aire des pics détectés et donc de quantifier le composé sélectionné, est réalisée manuellement à l'aide du logiciel "Hewlet Packard, ChemStation, RevA 06.01(405)".

Une "référence peuplier", i.e. thioacidolysat de parois de bois de peuplier, silylé en même temps que les échantillons, est analysée par CPG au début, au milieu et à la fin de la série d'échantillon étudiée. Le contrôle du profil d'élution et des quantités d'unités syringyles (S) et gäiacyles (G) (indices S/G et S+G) de cette référence permet de valider l'ensemble analytique.

D – CARACTERISATIONS D'UNE CC₆AOMT IMPLIQUEE DANS LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

1.1 - MATERIEL VEGETAL

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

a - Lins de plein champ

En plus des lins à fibres hermes, certaines analyses préliminaires ont été réalisées à partir de lin oléagineux, barbara. L'emploi de ce cultivar étant mineur et spécifique des techniques biochimiques, il sera mentionné au cas par cas.

Excepté une hauteur de tige moindre, les lins barbara ont un développement identique aux lins hermes. Ainsi, les lins des deux cultivars ont été prélevés à des stades identiques puis échantillonnés et analysés de manières analogues. Toutefois, la culture des lins barbara s'étant effectuée l'année précédente au prélèvement des lins hermes, les dates d'échantillonnages sont sensiblement différentes.

En plus des stades floraison et capsules brunes encadrant la maturation des fibres périphloémiennes, un stade antérieur, référencé "croissance végétative", a été utilisé lors de certaines analyses. L'échantillonnage des fragments basaux et apicaux puis la séparation des tissus externes des tissus internes s'est effectué comme indiqué précédemment chapitre A. Afin d'éviter de potentielles dégradations enzymatiques, les manipulations du matériel végétal, ont été effectuées avec des gants, à 4°C, sur des plaques de verre à l'aide de scalpel et de pinces traitées une nuit à 200°C.

b - Lins transgéniques

Ces plantes sont issues des travaux de transgénèse réalisés au LPPV par Wanhui Kim (Kim, 2002) à partir de lin barbara dont les graines ont été fournies par la coopérative linière Terre de Lin (St Pierre le Viger, Seine Maritime).

α - Transformation et multiplication des vitroplants

Les expériences de transgénèse par *A. tumefaciens* ont été réalisées à partir de segments d'hypocotyles de lin sectionnés sur des plantules de 4 jours ayant poussé en conditions axéniques. Le protocole utilisé dérive de celui décrit par Mlynarova et al. (1994) auquel ont été apportées certaines modifications (Lamblin et al., 2001; Kim, 2002). Les bourgeons issus des cals s'étant développés à l'extrémité des hypocotyles sont sectionnés et repiqués individuellement sur un milieu d'élongation sélectif en boîtes de Petri puis en tubes

Pyrex® lesquels sont ensuite fermés par des bouchons en cellulose. Ainsi, chaque clone de vitroplant provient d'un bourgeon unique isolé d'un cal organogène issu lui-même d'un explant initial donné.

La multiplication des clones s'est effectuée par repiquage de ou des apex de chaque vitroplant. Après 1 mois de culture sur milieu d'élongation sélectif, les apex (~4 cm) des vitroplants d'une taille moyenne de 12 cm, sont sectionnés et repiqués sur un même milieu. Privées de leur apex, les plantes développent, à l'aisselle des feuilles, 1 à 4 bourgeons axillaires qui, après 3 semaines d'élongation, peuvent à leur tour être individualisés. Parallèlement, des témoins non transformés barbara ont été cultivés dans des conditions identiques aux plantes transformées excepté l'absence d'agents de sélection dans le milieu de culture.

Les plantes *in vitro* ont toutes été cultivées dans une chambre de culture à température et hygrométrie constantes de 24 - 25°C et de 45 %, avec une photopériode de 16 h et un éclairage fluorescent (tubes Sylvania, Gro-Lux, F 30W/GRO-T8).

β- Transfert en serre

Afin d'étudier l'impact de la transgénèse sur des plantes cultivées en conditions semi-naturelles, des vitroplants ont été transférés en serre. Outre un développement rapide, le milieu d'élongation permet, en 1 mois, la formation d'un système racinaire à la base de chaque apex repiqué. Après rinçage des racines dans de l'eau stérilisée en prenant soin de bien éliminer la gélose résiduelle, les vitroplants sont repiqués individuellement dans des pots contenant un mélange "terre de champ-terreau", 1/1 (v/v) préalablement stérilisé par autoclavage. Après avoir attaché à un tuteur chaque plante, ces dernières sont recouvertes d'une protection adéquate transparente favorisant une atmosphère confinée et maintenant une hygrométrie importante. Les plantes placées dans les mêmes conditions de température et d'éclairage que les vitroplants, sont quotidiennement arrosées avec une solution de repiquage pendant 3 – 4 jours. Passé ce délai, une ouverture dans la protection est aménagée et les plantes sont arrosées tous les 2 jours avec de l'eau. Après 3 semaines, la protection transparente est ôtée et les plantes sont placées sous une lampe à sodium (Mazda, MAC 400W). Les paramètres de culture sont similaires à ceux utilisés pour les vitroplants.

γ- Echantillonnage

Les plantes sont prélevées après 11 semaines de culture en serre. Après leur arrachage, elles sont effeuillées; les tiges sont alors sectionnées 5 cm au-dessus du collet afin d'éliminer les racines puis congelées dans l'azote liquide avant d'être stockées à - 80°C. Les précautions de manipulation sont identiques à celle employées pour l'échantillonnage des lins de plein champ.

Composition	du milieu d'élongation :	de la solution de repiquage :
Macroéléments MS ¹	x 1/2	x 1/2
Microéléments MS ¹	x 1	x 1
Fe-EDTA ¹	x 1	x 1
Saccharose (Duchefa)	44 mM	
MES (Duchefa)	3,5 mM	3,5 mM
	pH rectifié à 5,7 avec du KOH	
Phytigel (Duchefa)	8 g / L	
	Autoclavage à 121°C pendant 20 min	
Vitamines MW ²	x 1	x 1
Hygromycine ³ (Sigma)	20 mg / L	
Timentin ³ (Duchefa)	250 mg / L	

Macro-, Microéléments MS ¹, Fe-EDTA ¹ : Composition d'après Murashige et Skoog, 1962.

Vitamines MW ² : Composition d'après Morel et Wetmore, 1951.

Hygromycine ³, Timentin ³ : Agents de sélection ajoutés stérilement après autoclavage et refroidissement du milieu (~50°C). Les solutions mères d'hygromycine et de timentin sont préparées à une concentration x 1000 dans de l'eau milliQ puis stérilisées par filtration à 0,2 µm.

1.2 - MATERIEL BACTERIEN

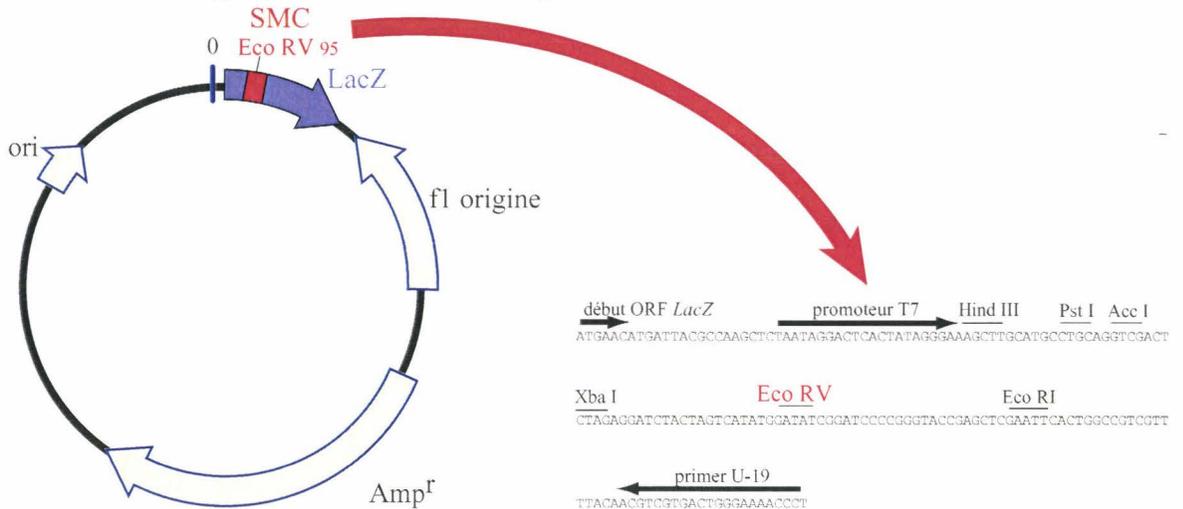
a - Souches bactériennes

En fonction des objectifs, différentes souches d'*Escherichia coli* ont été employées ayant la capacité d'héberger divers plasmides ou phagemides d'intérêt (tableau 7). Les résistances aux antibiotiques portées par ces bactéries permettent leur sélection en culture; cet avantage sélectif peut également provenir du plasmide ou du phagemide abrité.

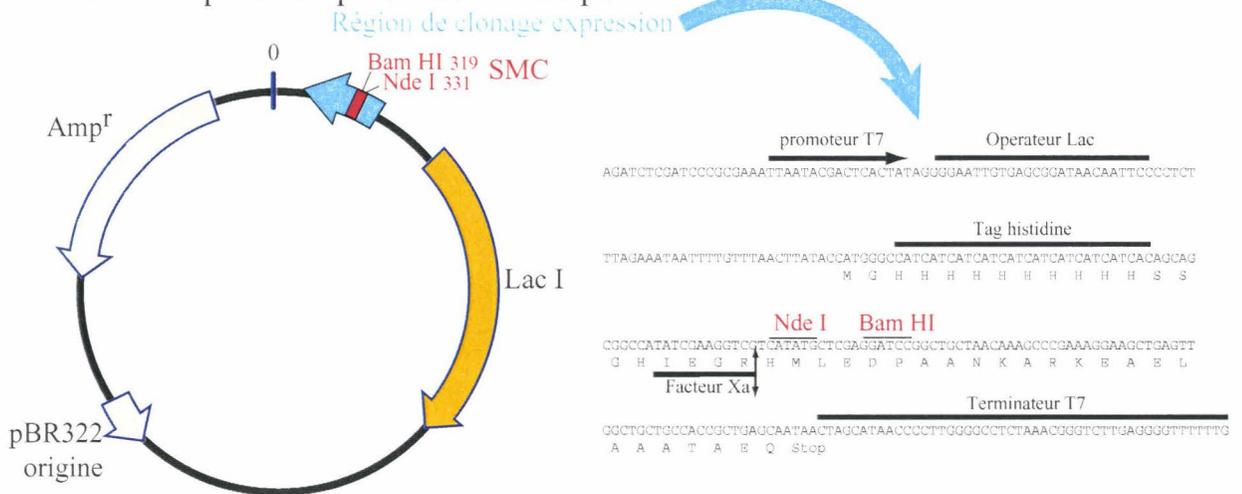
Souches d' <i>E. coli</i>	Plasmides hébergés	Résistance aux antibiotiques	Utilisation	Concentration des antibiotiques employés en culture
MOSBlue® (Amersham)	pMOSBlue	Tet , Amp	Multiplication de fragments nucléotidiques amplifiés par PCR	Tet : 15 µg / mL Amp : 50 µg / mL
XL1-Blue® MRF' (Stratagène)		Tet	Multiplications des phages recombinants UNIZAP	Tet : 15 µg / mL
SOLR® (Stratagène)	pBluescript	Kan , Amp	Excision et hébergement de pBluescript contenant les ADNc	Kan : 50 µg / mL Amp : 50 µg / mL
BL21-Gold (DE3)® (Stratagène)	pET16b	Tet , Amp	Production de la CCoAOMT recombinante	Tet : 15 µg / mL Amp : 50 µg / mL
MC1061	pET16b	Tet , Amp	Multiplication du plasmide pET16b avant son transfert dans BL21-Gold (DE3)	Tet : 15 µg / mL Amp : 50 µg / mL

Tableau 7 : Souches d'*E. coli* employées selon leur utilisation et concentrations des antibiotiques utilisées pour leur sélection. Surligné en gris: résistance portée par l'ADN chromosomique des bactéries. Toutes les solutions mères d'antibiotiques sont préparées dans de l'eau milliQ à une concentration x 1000, puis stérilisées par filtration 0,2 µm., Amp : ampicilline, Kan : kanamycine, Tet : tétracycline.

A - Plasmide de clonage pMOSBlue : 2887 pb



B - Plasmide d'expression pET-16b : 5711 pb



C - Phagemide pBluescript SK (-) : 2958 pb

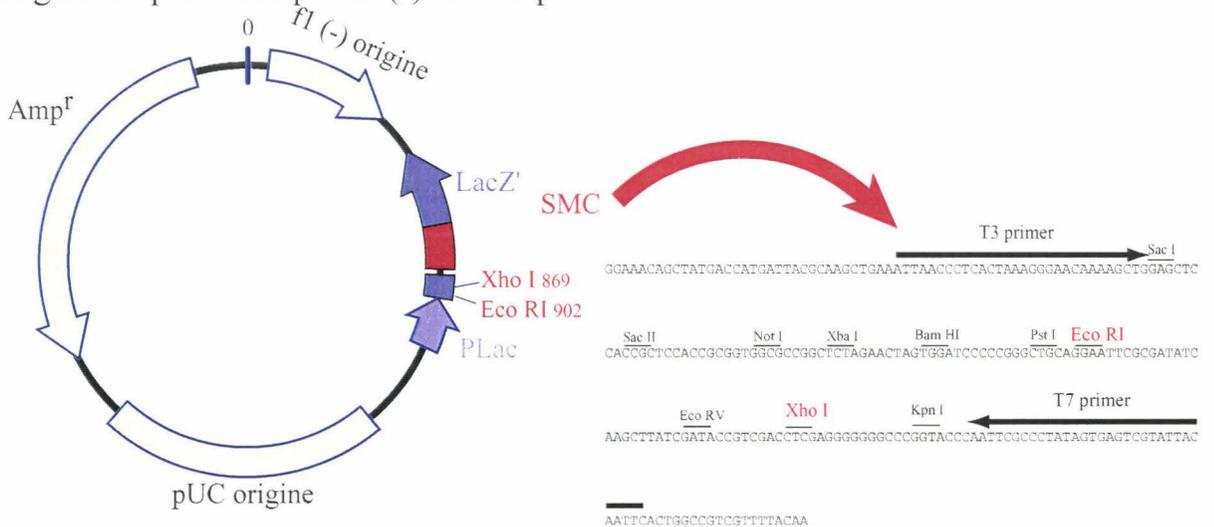


Figure 42 : Schémas simplifiés des vecteurs, pMOSBlue[®] (A), pET-16b[®] (B) et pBluescript[®] (C) employés respectivement pour cloner des fragments d'ADN, produire une protéine recombinante et construire un banque d'ADNc.

Le gène amplicilline (*Amp^r*) porté par ces trois vecteurs confère une résistance à cet antibiotique aux bactéries hébergeant ces plasmides permettant ainsi leur sélection. Le détail du SMC est indiqué à droite de la carte plasmidique : en rouge, les sites de restriction employés pour l'insertion des fragments d'ADN d'intérêt.

b - Matériel génétique extrachromosomique

α - Vecteur de clonage pMOSBlue[®]

Ce vecteur est un plasmide de 2887 pb (figure 42, A) permettant l'insertion de fragments nucléotidiques à extrémités franches au niveau du site Eco RV du site multiple de clonage (SMC). Ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline et un fragment du gène *lacZ* (Δ M15, région codant pour le fragment α de la β -galactosidase) interrompu par le SMC permettant ainsi la sélection des bactéries transformées portant l'insert d'intérêt. En effet, l'absence d'insert au niveau du SMC permet la synthèse, après induction par l'IPTG (isopropyl β -D thiogalactopyranoside, un inducteur non métabolisable de l'opéron lactose), d'une β -galactosidase active, par α -complémentation, capable de dégrader le substrat chromogène X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) ajouté au milieu de culture (Ullman et al., 1967). Incolore, le X-gal donne un produit bleu aisément visualisable lorsqu'il est clivé par l'enzyme. Ainsi, les bactéries portant le plasmide sans insert seront capables de métaboliser ce substrat et apparaissent de ce fait bleu. Inversement, les colonies incolores, *i.e.* blanches, révèlent la présence d'un insert dans le vecteur. Ce test, très employé, est couramment appelé test blanc-bleu.

β - Phagemide pBluescript[®]

Ce vecteur de 2958 pb (figure 42, B) 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 MRF'. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et un fragment du gène *lacZ* (Δ M15) interrompu par le SMC permettant comme précédemment la sélection des bactéries transformées. 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 SMC entre les sites Eco RI et Xho I permettant de ce fait leur orientation dans le vecteur.

γ - Vecteur d'expression pET16b[®]

Ce plasmide de 5711 pb (figure 42, C) permet, quand il est porté par les bactéries BL21-Gold (DE3), l'expression inductible par l'IPTG des gènes clonés au niveau du SMC. pET16b contient un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries transformées, une région spécifique au clonage et à l'expression du gène d'intérêt et le répresseur lac (*lacI*) contrôlant cette expression. Le clonage du gène d'intérêt se réalise dans le SMC entre les sites Nde I et Xho I.

c - Culture et conservation des souches bactériennes

α - Cultures en milieu gélosé

Après étalement des bactéries *E. coli* sur un milieu de Luria-Bertani (LB) gélosé additionné des antibiotiques correspondants (tableau 7) les boîtes de Petri sont scellées avec du parafilm et placées à 37°C pendant 1 nuit.

En cas de test blanc-bleu, 20 μ L d'une solution aqueuse d'IPTG à 100 mM puis 35 μ L d'une solution de X-gal à 50 mg / ml dissout dans du DMF sont étalés sur le milieu LB. Après 10 minutes de séchage à l'air, les bactéries peuvent être étalées.

β - Cultures en milieu liquide

Ces cultures se réalisent à 37°C, 1 nuit, en agitation à 250 rpm dans du milieu de Luria-Bertani sans agent gélifiant additionné des antibiotiques correspondant (tableau 7). La mesure de l'absorbance à 600 nm permet de contrôler la croissance bactérienne : une DO comprise entre 1,0 et 2,0 indique que la suspension bactérienne est en phase exponentielle de croissance ; au-delà de 2,0 la culture est saturée.

Composition du milieu de Luria-Bertani :

Bacto-tryptone (Duchefa)	10 g / L
Extrait de levure (Duchefa)	5 g / L
NaCl (Sigma)	170 mM
Le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH	
Pour un <u>milieu gélosé</u> , ajout de Bacto-agar (Sigma)	15 g / L
Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 min	
L'addition d'antibiotique s'effectue après refroidissement à ~50°C du milieu	

γ - Stockage

Toutes les souches bactériennes sont conservées à - 80°C. Dans un microtube, 700 μ L d'une culture liquide en phase exponentielle de croissance sont ajoutés à 300 μ L d'une solution de glycérol à 50 % (p/v). Après homogénéisation douce, les tubes sont aussitôt congelés à - 80°C.

II - TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1 - EXTRACTION ET PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES

Les techniques d'extraction des acides nucléiques visent à séparer le matériel génétique (ADN ou ARN) du contenu des cellules. L'ensemble des manipulations doit s'effectuer à 4°C, sauf mention particulière. Le port systématique et le changement fréquent des gants sont indispensables.

Les extractions et purifications d'ADN nécessitent l'utilisation de matériels préalablement stérilisés. La qualité des extractions et purifications d'ARN est très 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) excepté les solutions de TRIS qui doivent être préparées dans de l'eau milliQ déjà traitée. Le DEPC réagit avec les groupements histidine et tyrosine des protéines inactivant ainsi les nucléases. Après autoclavage détruisant le DEPC, le matériel est séché à 80°C et les solutions stockées jusqu'à leur emploi.

a - ADN génomique

La méthode ci-utilisée est adaptée du protocole de Doyle et Doyle (1990) modifié par Plomion et al. (1995). Le matériel végétal, 100 mg environ, est broyé dans un mortier en présence d'azote liquide puis transféré dans un tube contenant 700 µl de tampon d'extraction ADN préchauffé à 65°C. Le tube est placé au bain-marie à la même température pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante et 500 µl de chloroforme / alcool isoamylique (CI) 24/1 (Sigma) sont ajoutés. Après homogénéisation et centrifugation à 12 000 g pendant 5 min à 20°C, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et additionnée de 1/10^{ème} de son volume d'une solution de CTAB, 0,27 M (Sigma) et NaCl, 0,7 M (Sigma) puis de 500 µL de CI. Après homogénéisation et centrifugation (12 000 g, 5 min; 20°C), la phase aqueuse est prélevée à l'aide d'un cône coupé (la solution est très visqueuse) et l'ADN est précipité dans la glace pendant 1 heure avec 1 volume d'isopropanol (Sigma) conservé à - 20°C. Le culot d'acides nucléiques obtenu après centrifugation à 12 000 g, pendant 15 min, à 4°C est lavé deux fois à l'éthanol 70 % puis séché sous cloche à vide. Le culot est ensuite dissout dans 50 µl de tampon TE (TRIS-HCl, 10 mM pH 8,0 ; EDTA, 1 mM, (Sigma)) pendant une nuit. Les ARN ayant coprecipités avec l'ADN sont détruits par la RNaseA additionnée au TE à une concentration finale de 2 µg / µl. La solution d'ADN ainsi obtenue peut être stockée à 4°C jusqu'au dosage et contrôle électrophorétique.

Composition du tampon d'extraction ADN :

Cethyltriméthylammonium bromide (CTAB) (Sigma)	54 mM
NaCl (Sigma)	1,4 M
Acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) (Sigma)	20 mM
TRIS-HCl pH 8,0 (Sigma)	100 mM
<u>Ajouter extemporanément à l'emploi :</u>	
β-mercaptoéthanol (Sigma)	25 mM <i>i.e.</i> 0,2 %
Protéinase K (Sigma)	0,5 mg / mL
<u>Le pH est ajusté à 8,0 avec du HCl</u>	

b - ADN plasmidique

Les plasmides sont purifiés à l'aide du kit QIAprep® Miniprep (Qiagen) basé sur le protocole de Birnboim et Doly (1979). Le principe est le suivant : après lyse des bactéries, les ADN chromosomique et plasmidique sont, dans un premier temps, dénaturés par un traitement alcalin, puis rapidement renaturés en ajoutant de l'acide. L'ADN chromosomique ne se renature pas de façon ordonnée et se retrouve sous une forme insoluble alors que l'ADN plasmidique, beaucoup plus petit, se renature correctement et reste ainsi soluble. L'ADN étant une macromolécule chargée négativement, elle s'adsorbe sur une colonne échangeuse d'anions en conditions de hautes forces ioniques contrairement aux autres molécules qui passent au travers.

A partir d'une colonie unique prélevée sur milieu gélosé, une culture d'une nuit en phase liquide est réalisée. 2 mL de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance sont prélevés et centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 20°C. Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans le tampon de lyse et l'ADN plasmidique est purifié selon les instructions données par le fournisseur.

c - ARN totaux

Cette technique, dérivée du protocole de Palmiter (1974), utilise le principe de solubilité différentielle des acides nucléiques, des protéines et des lipides dans 2 phases non miscibles. L'extraction est réalisée par un mélange phénol / chloroforme / alcool isoamylique (PCI), 25/24/1 (v/v/v), équilibré à pH : 8 (Sigma). Le phénol solubilise les lipides, le chloroforme aide à dénaturer les protéines et piéger le phénol et l'alcool isoamylique évite la formation de mousse.

α - Extraction des acides nucléiques

Le matériel végétal, 1,5 g, est broyé dans un mortier refroidi dans l'azote liquide. La poudre obtenue est transférée dans un tube en téflon de 30 mL (Nalgène) contenant 15 mL de tampon d'extraction ARN. Après homogénéisation 5 ml de PCI sont ajoutés, puis après agitation douce pendant 2 min, l'ensemble est incubé 20 min à 50°C. La phase aqueuse (*i.e.* supérieure), récupérée après centrifugation à 17 700 g pendant 20 min à 4°C, est transférée dans un nouveau tube puis additionnée de 5 ml de PCI. Après homogénéisation, une centrifugation à 17 700 g pendant 15 min permet à nouveau d'extraire la phase aqueuse. Cette étape est renouvelée jusqu'à ne plus obtenir d'interface. A terme, 5 ml de CI sont ajoutés à la phase aqueuse puis après homogénéisation le mélange est centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment.

β - Précipitation sélective des ARN

La phase aqueuse recueillie après centrifugation est additionnée de 1/4 de son volume de LiCl 10 M (Sigma). La précipitation des ARN s'effectue durant une nuit à 4°C. Le culot d'ARN, récupéré par centrifugation à 18 000 g pendant 30 min à 4°C, est rincé une fois avec du LiCl 2 M puis est ensuite dissout dans 500 μ L d'eau milliQ. Les ARN sont de nouveau précipités sélectivement après ajout de 125 μ L de LiCl 10 M puis placés à 4°C pendant 2 heures minimum. Une étape de centrifugation à 18 000 g pendant 30 min à 4°C permet de récupérer un culot d'ARN qui est alors lavé avec du LiCl 2 M comme précédemment. Ce culot est alors resuspendu dans 200 μ l d'eau milliQ auxquels sont additionnés 20 μ l d'acétate de sodium 3 M (Sigma) et 550 μ l d'éthanol absolu conservé à 4°C. Après précipitation pendant une nuit à - 20°C (ou 2 h à - 80°C), la solution est centrifugée à 18 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant éliminé, le culot d'ARN est lavé 2 fois avec de l'éthanol 70 % puis séché modérément à l'air libre. Les ARN purifiés sont solubilisés dans de l'eau milliQ (~10 μ L) et peuvent alors être conservés à - 80°C en attendant leur dosage et le contrôle électrophorétique.

Composition du tampon d'extraction ARN :

Tri (hydroxyméthyl) amino méthane (TRIS) (Sigma)	0,18 M
LiCl (Sigma)	0,09 M
EDTA (Sigma)	4,5 mM
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (BioRad)	1 %
<u>pH ajuster à 8,2 avec du HCl</u>	

d - Isolement des ARN messagers (ARNm)

La structure particulière de l'extrémité 3' des ARNm, *i.e.* la queue poly (A), combinée aux règles d'appariement des bases azotées permet l'isolement des ARNm à partir des ARN totaux. Sur ce principe, l'isolement des ARNm est effectué avec le kit, PolyAtract® mRNA Isolation Systems (Promega) suivant les instructions du fournisseur. Ce protocole utilise des amorces oligo(dT) biotinylées s'hybridant fortement à la queue poly(A) des ARNm. Ces duplex sont ensuite capturés par des billes magnétiques couplées à la streptavidine et peuvent ainsi être facilement retenus par un aimant lors des étapes de lavages en conditions de faibles stringences éliminant les ARNr et les ARNt. Finalement, l'addition d'eau, désapparie les duplex permettant ainsi l'élution des ARNm. Afin de s'assurer un rendement maximum, les ARNm sont élués par 3 rinçages de 150 µL d'eau milliQ puis concentrés par lyophilisation jusqu'à ~10 µL. Les ARNm peuvent alors être stockés à - 80°C en attendant leur dosage et leur utilisation.

2.2 - DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

Une analyse de la variation de l'absorbance dans une gamme de longueurs d'ondes 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 µg / ml ou 40 µg / ml 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.

2.3 - DIGESTION DE L'ADN GENOMIQUE ET PLASMIDIQUE

La digestion de l'ADN s'effectue au moyen d'endonucléases de restriction (Roche). Ces enzymes reconnaissent de courtes séquences d'ADN spécifiques à chacune d'entre elles (sites de restriction) et coupent le double-brin d'ADN dans ou à côté du site de reconnaissance. Selon les enzymes, les extrémités des fragments coupés sont francs (coupure face à face des 2 brins) ou cohésifs (coupure décalée des 2 brins).

a - Digestion enzymatique

Les ADN plasmidique et génomique sont digérés par 4 et 25 U d'enzymes / µg d'ADN respectivement en présence du tampon optimal de l'enzyme. La digestion de l'ADN génomique est améliorée par l'addition de spermidine (Sigma) au mélange réactionnel à une concentration finale de 1 mM. Les digestions sont effectuées pendant 16 h (ADN génomique) ou 2 h (ADN plasmidique) à la température optimale préconisée par le fournisseur. En cas de double digestion, les quantités de chaque enzyme restent inchangées et le tampon le mieux adapté suivant les conseils du fournisseur a été employé.

b - Purification

Les enzymes sont inactivées selon les instructions du fournisseur puis extraites du mélange réactionnel par l'ajout d'un volume de PCI. Après homogénéisation et centrifugation à 12 000 g pendant 5 min à 4°C, la phase aqueuse est prélevée et additionnée d'un volume de CI puis centrifugée dans les mêmes conditions. L'ADN est ensuite précipité par l'ajout, à la phase aqueuse, de 1/10^{ème} de son volume d'acétate de sodium 3 M (Sigma) puis de 2 volumes d'éthanol absolu (SDSTM). Après 2 h d'incubation à - 80°C et centrifugation à 15 000 g pendant 15 min à 4°C, le culot d'ADN est lavé deux fois à l'éthanol 70 %, séché et redissout dans de l'eau milliQ stérile puis stocké à - 20°C avant utilisation.

2.4 - CONSTRUCTION DE MOLECULES D'ADN "HYBRIDES"

La ligation de 2 fragments d'ADN s'effectue en présence d'une T4 DNA ligase (Roche, Amersham). La réunion de ces deux fragments peut se réaliser suite à l'appariement de leurs extrémités cohésives ou aléatoirement par leurs extrémités franches.

Les ligations s'effectuent à 16°C pendant 16 h dans un mélange réactionnel contenant les deux fragments d'ADN à lier dans un ratio compris entre 3 et 10, le tampon optimisé pour l'enzyme, 1 à 5 unités / µg d'ADN de T4 DNA ligase et de 0,5 mM d'ATP (cofacteur de l'enzyme). Après inactivation de l'enzyme, par incubation à 65°C pendant 10 min, le mélange réactionnel est stocké à - 20°C.

2.5 - AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR

a - Principe

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est employée pour amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN bordé par deux régions connues (Mullis et al., 1986). En fonction de l'utilisation du produit PCR, 3 ADN polymérases différentes ont été employées :

- Une Taq polymérase (divers fournisseur) dépourvue d'activité exonucléase 3'-5' ne pouvant de ce fait pas corriger ses erreurs. Cette enzyme génère des fragments à extrémités cohésives possédant une adénine supplémentaire à leur extrémité 3'.
- Une Pwo® DNA Polymerase (Roche) douée d'activité correctrice.
- Un mélange de ces deux ADN polymérases vendu sous l'appellation Expand Long Template® PCR System (Roche) permettant une amplification fiable de longs fragments d'ADN.

b - PCR classique

Chaque réaction d'amplification comprend dans un volume final de 20 à 100 µL, les éléments suivants aux concentrations finales indiquées ci dessous :

▪ Le tampon de PCR nécessaire au fonctionnement de l'enzyme		x 1
▪ Du Mg ²⁺ sous forme de MgCl ₂ (Taq-Sigma, Long Template-Roche) ou MgSO ₄ (Pwo-Roche)		de 1,5 mM à 2 mM
▪ Des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)		0,2 mM de chaque
▪ Les deux amorces de 15 à 30 pb pouvant posséder à leur extrémité 5' un site de restriction		0,2 μM de chaque
▪ L'enzyme polymérase	Taq polymérase (Sigma) Pwo (Roche)	0,5 unité / 50 μL 5 unités / 50 μL
▪ L'ADN matrice :	si ADN génomique si ADNc si ADN plasmidique	500 ng 10 ng 10 ng

Dans le cas d'un criblage d'une population bactérienne, les colonies sélectionnées sont prélevées et suspendues dans 50 μL d'eau milliQ stérile. L'ensemble est incubé 5 min à 100°C puis 5 min dans la glace avant d'être centrifugé à 12 000 g pendant 5 min à 20°C. Le surnageant est récupéré et 5 μL sont utilisés comme ADN matrice dans la PCR. L'amplification peut également être effectuée avec 5 μL de la banque d'ADNc comme source d'ADN.

Les amplifications se réalisent dans un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf) en 3 étapes successives selon le programme type suivant :

1- Dénaturation initiale de l'ADN :	4 min	94°C
2- Amplification 35 cycles :	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Dénaturation} \\ \text{Hybridation} \\ \text{Extension} \end{array} \right.$	45 s 93°C
		45 s 50 à 64°C (selon le T _m des amorces)
		45 s à 90 s 72°C (selon la taille du fragment)
3- Elongation terminale :	5 min	72°C

Ces conditions peuvent varier suivant la nature de l'ADN, les amorces et la polymérase. De ce fait, toutes les modifications majeures de ces conditions d'amplification seront mentionnées au cas par cas.

c - Nested PCR

Le code génétique étant dégénéré, les amorces désignées à partir d'une séquence protéique sont constitués en fait d'un mélange des différentes possibilités. Parmi ce mélange, une seule correspond à la séquence nucléotidique cible, les autres ne permettent aucune amplification ou génèrent des réactions aspécifiques. L'emploi de telles amorces implique une réduction de la spécificité d'hybridation afin de favoriser les appariements avec la matrice ADN. Ce paramètre se traduit expérimentalement par une baisse de la température d'hybridation, entre 35 et 45°C, et une augmentation de la concentration en Mg²⁺, entre 2 et 3 mM. Pour compenser cette baisse de spécificité, il est nécessaire de réaliser deux amplifications successives avec 2 couples d'amorces, le second couple utilisé étant plus interne au premier. L'amplifiat de la 1^{ère} PCR, 1/10 du volume, sert directement de matrice ADN lors de la seconde réaction d'amplification réalisée dans des conditions plus spécifiques. Excepté les températures d'hybridation, les paramètres PCR employés sont identiques à ceux précédemment décrits.

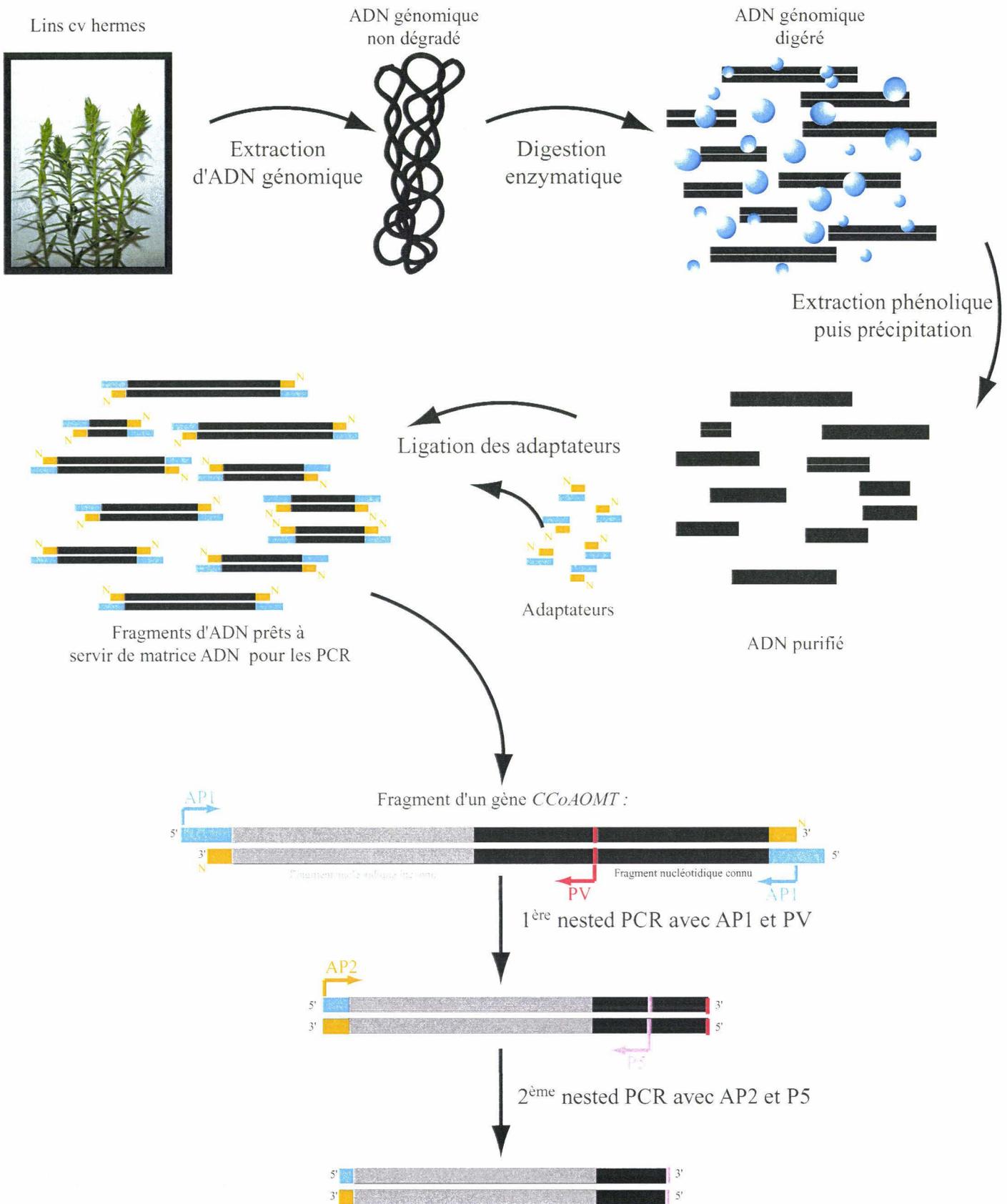


Figure 43 : Principe et méthodologie de la marche par PCR sur l'ADN génomique : stratégie d'amplification d'une séquence inconnue (grisée) à partir de deux amorces spécifiques d'une *CCoAOMT*.

Les N situés à l'extrémité du fragment des adaptateurs représentent le groupement amine stoppant la polymérase lors de la 1^{ère} PCR qui s'effectue avec les amorces AP1 et PV. Une aliquote du produit de cette 1^{ère} PCR est utilisée pour une seconde amplification avec les amorces AP2 et P5 (d'après Devic et al. , 1997).

d - Marche par PCR sur l'ADN génomique

Cette technique décrite par Devic et al. (1997) permet d'amplifier des fragments génomiques situés en amont ou en aval d'une séquence d'ADN connue. Le principe consiste à digérer de l'ADN génomique avec des enzymes de restrictions, de ligaturer des adaptateurs à l'extrémité des fragments générés, puis d'utiliser ces derniers comme matrice ADN pour une nested-PCR avec des amorces non dégénérées. Chaque couple d'amorce employé est constitué d'une amorce complémentaire de l'adaptateur et d'une amorce spécifique de la séquence connue (figure 43).

Pratiquement, 5 aliquotes de 2,5 µg d'ADN génomique sont digérées par 5 enzymes de restriction Dra I, Eco RV, Pvu II, Sma I, Xmn I (1 enzyme / aliquote). Après purification et précipitation, les culots d'ADN digérés sont resuspendus dans de l'eau milliQ à une concentration finale de 125 ng / µL. Aux extrémités franches des fragments d'ADN générés (10 µL du produit de digestion purifié) des adaptateurs de séquence connue (5 µM en concentration finale) sont ligaturés à l'aide de T4 DNA Ligase (Roche). Après dilution par 10 dans de l'eau milliQ, le produit de ligation peut servir de matrice d'ADN pour les réactions d'amplification. Les couples d'amorces utilisés lors de la 1^{ère} puis de la 2^{ème} PCR sont respectivement AP1 - PV et AP2 - P5 (tableau 8), AP1 et AP2 étant les amorces complémentaires des adaptateurs. Les nested PCR sont réalisées avec 4 unités / 50 µL d'Expand Long Template (Roche) et le tampon 3 fourni avec l'enzyme. Les conditions de PCR employées dérivent des recommandations du fournisseur et restent semblables aux conditions énoncées précédemment. Après dilution par 100 du produit de 1^{ère} PCR, ce dernier sert de matrice d'ADN pour la seconde PCR (1µL / 50 µL). Les nested PCR 1 et 2 sont réalisées avec le programme suivant :

1- 7 cycles :	{	Dénaturation	45 s	94°C
		Hybridation-Extention	4 min	72°C
2- 30 cycles :	{	Dénaturation	45 s	94°C
		Hybridation-Extention	4 min	67°C

e - Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées

Au cours des diverses PCR réalisées, différentes amorces ont été employées pouvant se classer en deux catégories (tableau 8) :

- Les amorces dégénérées (dPx) désignées à partir de séquence en acide aminé. La dégénérescence de l'amorce est calculée en fonction du nombre de combinaisons, au maximum 128. Une inosine (I) remplace les 4 bases azotées quand ces dernières occupent la même position.
- Les amorces strictes (Px) désignées à partir d'une séquence nucléotidique connue.

Nom des amorces	Séquence nucléotidique de 5' en 3'	
dPI	AA (C/T) TA (C/T) GA (A/G) AT (A/C/T) GGI (T/C) TIIC	} Amorces désignées de <i>CCoAOMT</i>
dP1	GGI (T/C) TICCIAT (A/C/T) AT (A/C/T) CA	
dPII	C (T/G) (G/A) CAIA (A/G/T) IGTIA (T/C) ICC	
dP2	CCI (T/C/A) (T/C/A) CCAIA (A/G) IGT (G/A) TT (G/A) TC	
dPIII	GAIACI (A/T) (G/C) IG (T/C) IT (A/T) C/T) CCI (A/C/G) GIGA	
dP3	ACI (A/T) (G/C) IG (T/C) IT (A/T) (C/T) CCI (A/C/G) GIGA	
P4	GAAGTCGTACGCTCCGTGGTTGGC	} Amorces spécifiques de plasmides
PV	GTGAGCAAGTCCGGCTTTCTCGAT	
P5	GCAGACGTAGTAGTCATGATATTCAGG	
P6	GACCCGGAGTCCATGAAGGAACTC	
LuForw	GCCATATGGCTGAGCAACAGCAATCAG	
LuBack	GCATCCGAAGATCCAATATTTAGTGATCC	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	} Amorces spécifiques d'adaptateurs
U19	GTTTTCACGTCACGACGT	
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	} Amorces spécifiques d'adaptateurs
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC	

Tableau 8 : Liste des amorces employées lors des différentes réactions de PCR. dPx : amorces dégénérées, Px : amorces strictes.

2.6 - SYNTHÈSE D'ADNc

Les ARNm étant des molécules très peu représentées dans le matériel génétique cellulaire et très instables *in vitro*, leurs études impliquent très souvent leur transcription inverse en ADN appelé ADN complémentaire (ADNc). Contrairement aux ARNm, les ADNc peuvent être facilement amplifiés par PCR et/ou clonés dans des vecteurs.

La synthèse d'ADNc est effectuée à l'aide du kit cDNA Synthesis Kit (Stratagène) selon les recommandations du fournisseur excepté les premières étapes de dénaturation des ARNm. Après ajout des amorces oligo d(T) à la solution d'ARNm, l'ensemble est chauffé à 70°C pendant 10 min puis laissé à refroidir à température ambiante avant l'addition des différents réactifs permettant la synthèse du 1^{er} brin. A terme, les ADNc sont purifiés par extraction phénolique au PCI puis CI et précipités par l'addition d'1/3 de volume d'acétate d'ammonium 10 M (Sigma) puis de 2,5 volumes d'éthanol absolue (SDSTM). Après incubation 2 h à - 80°C et centrifugation à 12 000 g pendant 20 min à 4°C, le culot d'ADNc est lavé deux fois avec de l'éthanol 70 %, séché puis dissout dans de l'eau milliQ avant d'être stockée à - 20°C. Un contrôle électrophorétique sur une aliquote permet de contrôler l'intégrité des ADNc.

2.7 - MIGRATION ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES

Dans un tampon neutre, les acides nucléiques étant des polyanions, ils sont attirés, lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique, constant vers l'anode (*i.e.* borne +). Utilisant cette propriété, l'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille, les petits fragments

migrant plus vite et donc plus loin que les grands (Sambrook et al., 1989). La concentration du gel d'agarose est adaptée à la taille des fragments à séparer.

La mise en évidence des acides nucléiques dans un gel s'effectue à l'aide du bromure d'éthidium (BET). Ce réactif contenant des groupements aromatiques plans s'intercale entre les bases nucléiques. Sous UV, l'excitation du BET rend l'ADN et l'ARN fluorescents et donc visibles.

a - Electrophorèse d'ADN

L'ADN est analysé par électrophorèse horizontale (cuve Appligène de 250 mL) en gel d'agarose non dénaturant. La préparation du gel se réalise en solubilisant la quantité d'agarose nécessaire dans du tampon TAE+ (TRIS 0,04 M ; acétate de sodium 5 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8,0 ; BET 150 µg / L (Sigma)). Avant leur dépôt, les échantillons sont additionnés de 1/6 de leur volume de tampon de charge (0,25 % bleu de bromophénol (Sigma), 0,25 % xylène cyanol (Sigma), 30 % glycérol, (Sigma)). Après chargement dans le gel des échantillons et des marqueurs de taille (SmartLadder, Eurogentec), la migration électrophorétique a lieu dans un tampon TAE (TAE+ sans Bet) à 100 V sauf indication contraire. Le suivi de la migration s'effectue par la localisation des colorants du tampon de charge.

Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont visualisés sur un banc U.V. (TransIlluminator, UVP) à une longueur d'onde de 312 nm et les gels sont photographiés (GelCam, Polaroid).

b - Electrophorèse des ARN

Les ARN totaux sont séparés selon leur taille dans un gel dénaturant contenant 1 % d'agarose (p/v) dissout dans du tampon MOPS x 1 (acide 3 (N-morphino) propanesulfonique (MOPS) 20 mM (Sigma)), acétate de sodium 5 mM, EDTA 1 mM) additionné de 3 % (v/v) de formaldéhyde 37 %. Les ARN sont décongelés à 4°C puis 20 µg sont prélevés. Après rectification du volume à 6 µL avec de l'eau traitée au DEPC, les échantillons sont additionnés de 12 µl de formamide, de 2 µl de tampon MOPS x 10 et de 4 µl de formaldéhyde 37 %. Après homogénéisation et incubation à 65°C pendant 15 min (dénaturation des ARN), 2 µl de tampon de charge (glycérol 50 %, EDTA 1 mM, bleu de bromophénol 0,4 %) et 2 µg de BET sont mélangés aux échantillons. Ces derniers sont ensuite chargés dans le gel. La migration s'effectue dans un tampon MOPS x 1 à 60 V pendant 3 h. La migration du bleu de bromophénol permet d'apprécier l'avancement de la migration.

La qualité des ARN est contrôlée par visualisation sur un banc U.V. à 312 nm du profil de migration des ARN. Ce dernier est considéré comme correct si 2 bandes majeures correspondant aux ARN ribosomaux 25S et 18S sont distinctement visibles.

2.8 - PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN A PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE

Suite à une électrophorèse en gel d'agarose, le fragment d'intérêt est alors découpé à l'aide d'une lame de scalpel stérile et extrait de la matrice d'agarose à l'aide du kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit utilise le principe suivant : l'ADN s'adsorbe spécifiquement à pH neutre sur une membrane de silice en présence d'une forte concentration en sel tandis que les contaminants passent au travers. L'élution de l'ADN de la colonne s'effectue avec 30 µL d'eau milliQ.

2.9 - CLONAGE DE FRAGMENTS D'ADN AMPLIFIES PAR PCR

Cette technique permet de stocker et de multiplier à l'infini des fragments d'ADN d'intérêt après leur ligation dans le plasmide pMOSBlue puis l'insertion de ce dernier dans des bactéries MOSBlue.

a - Ligation dans le vecteur pMOSBlue et transformation des bactéries MOSBlue®

Tous les fragments d'ADN clonés ont été préalablement purifiés à partir d'un gel d'agarose. La ligation et la transformation des bactéries sont réalisées à l'aide du kit pMOSBlue blunt ended cloning (Amersham) en suivant les recommandations du fournisseur.

Le principe du kit repose sur la capacité du vecteur pMOSBlue d'incorporer des fragments d'ADN à bouts francs. La réaction de ligation permet leur insertion au niveau du site Eco RV du SMC du vecteur qui va ainsi se recirculariser. Le vecteur portant le fragment d'intérêt est ensuite introduit dans les bactéries MOSBlue par choc thermique.

Les bactéries contenant un plasmide pMOSBlue sont sélectionnées suite à leur étalement sur un milieu LB solide additionné de tétracycline et d'ampicilline (tableau 7). La sélection des bactéries portant les plasmides recombinants est rendue possible grâce à un test blanc-bleu. Les colonies blanches sont prélevées puis individuellement étalées comme indiqué ci-dessus.

b - Criblage des bactéries par PCR

L'appréciation du test blanc-bleu n'étant pas toujours évidente et la présence de "faux-positifs" n'étant pas à exclure, le criblage par PCR permet de sélectionner avec confiance les colonies bactériennes d'intérêt. Ainsi, les bactéries blanches sont utilisées comme matrice ADN lors d'une amplification classique par PCR avec les amorces T7 et/ou U19, situées de part et d'autre du SMC dans pMOSBlue (figure 42), et si possible, avec une amorce spécifique du fragment d'intérêt cloné. Après électrophorèse en gel d'agarose pour vérifier les fragments amplifiés, les colonies positives sont sélectionnées, cultivées puis stockées.

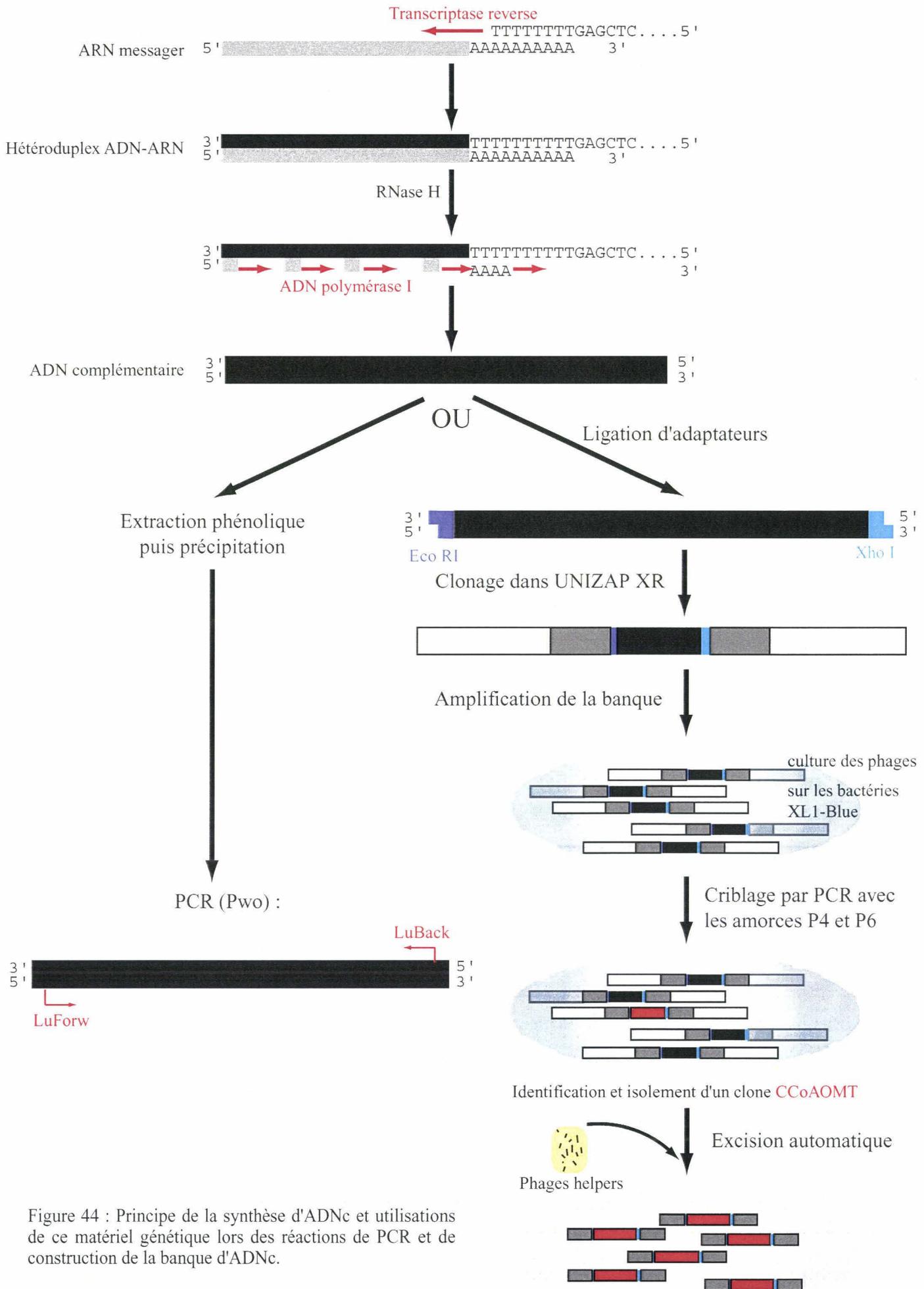


Figure 44 : Principe de la synthèse d'ADNc et utilisations de ce matériel génétique lors des réactions de PCR et de construction de la banque d'ADNc.

Multiplication des clones CCoAOMT dans les bactéries SOLR

2.10 - CONSTRUCTION ET EXPLOITATION D'UNE BANQUE D'ADNc

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 respectivement 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 tige de lin prélevés au stade floraison. L'ensemble des manipulations a été réalisé à partir de 3 kits commercialisés par la société Amersham : cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA® Synthesis Kit et ZAP-cDNA® Gigapack III. Les protocoles fournis ayant été suivis sauf lors de la synthèse d'ADNc, seul le principe est énoncé ci-dessous (figure 44).

a - Synthèse d'ADNc

A partir de 5 µg d'ARNm des ADNc ont été synthétisés comme indiqué précédemment. Aussitôt la synthèse du 2^{ème} brin d'ADNc achevée, les extrémités de ces derniers sont rendues franches pour permettre la ligation d'adaptateurs.

b - Clonage des ADNc

Après digestion enzymatique restreinte, les ADNc possédant des extrémités cohésives différentes sont ligaturés au niveau du SMC du phagemide pBluescript inséré dans le vecteur phagique UNI-ZAP XR. Employant le mécanisme d'autoassemblage, les vecteurs phagiques sont encapsidés automatiquement en présence des protéines de la capsid produisant ainsi des phages recombinants. Cette banque primaire est amplifiée après sa titration en cultivant sur milieu solide les phages recombinants sur des bactéries XL1-Blue.

c - 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 de banque (pfu : unité de formation de plages de lyse c'est un dire 1 phage).

d - 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 solide 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.

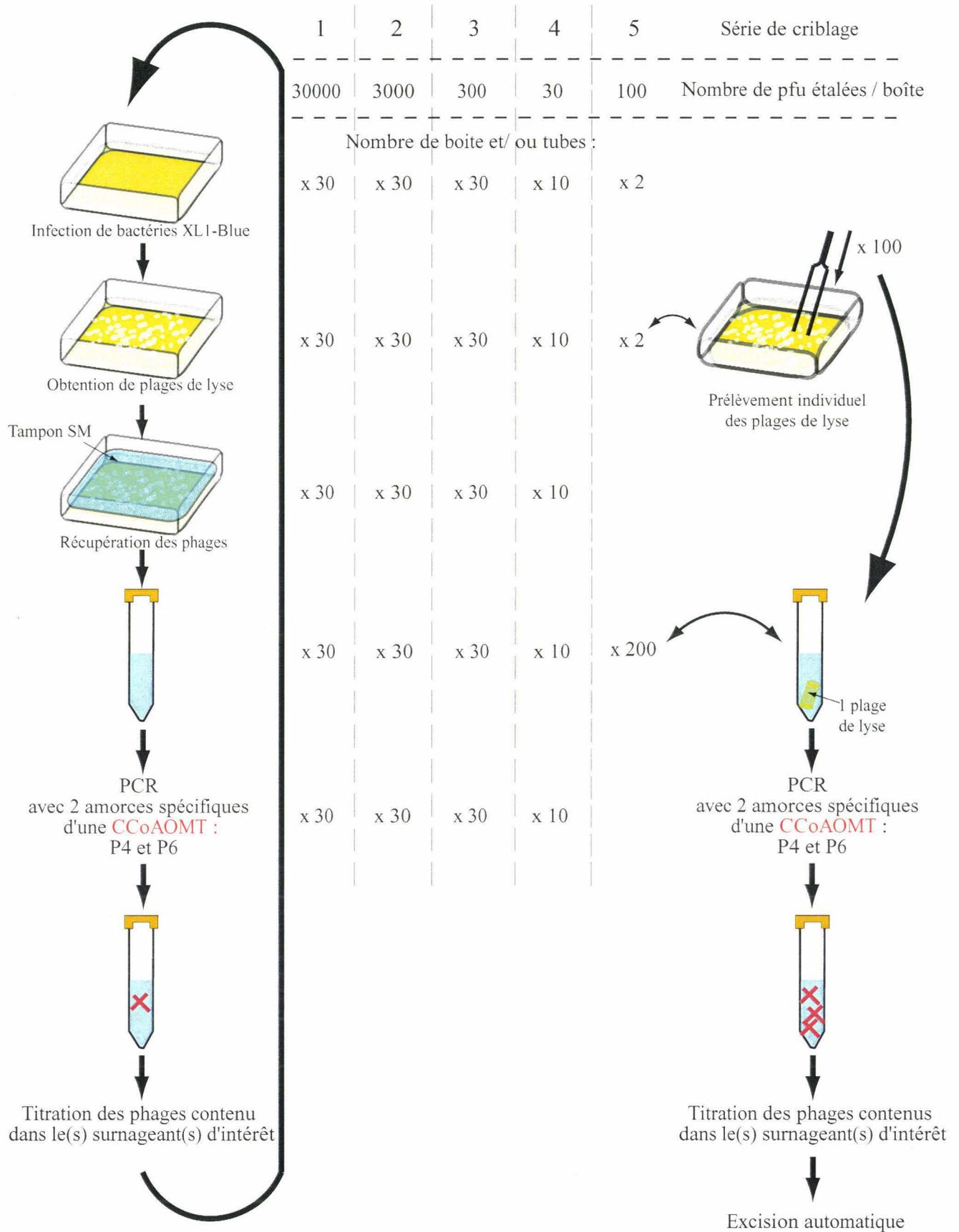


Figure 45 : Synopsis des différentes étapes du criblage de la banque d'ADNc par PCR.

e - Amplification de la banque

Le titre de la banque déterminé, il est nécessaire de l'amplifier afin d'augmenter le nombre de copie de chaque phage recombinant. Pour cela, les phages sont cultivés comme indiqué précédemment. Pour une bonne représentativité de tous les phages recombinants, il est nécessaire d'amplifier au minimum 1.10^6 plages de lyse.

Les phages sont récupérés dans un tampon SM versé sur les plages de lyse et après incubation des boîtes une nuit à 4°C en agitation modérée. Les surnageants sont alors regroupés puis l'ensemble est additionné de 0,3 % de chloroforme (v/v) pour éliminer les bactéries résiduelles et de 7 % de DMSO (v/v), un cryoprotecteur, avant d'être stockés à - 80°C.

f - Criblage de la banque par PCR

A partir de la banque phagique d'ADNc non amplifiée titrée, 900 000 pfu réparties également dans 30 boîtes sont étalées et cultivées comme indiqué ci-dessus. Les phages de chaque boîte sont récupérés dans 5 mL de tampon SM additionnés ensuite de 0,3 % de chloroforme. Ces 30 suspensions servent alors de matrice ADN pour une réaction de PCR réalisée avec les amorces P4 et P6 spécifiques d'une CCoAOMT. Les conditions de PCR sont similaires à celles décrites précédemment (paragraphe 2.5 - b), la concentration en $MgCl_2$ étant dans ce cas de 2 mM et la température d'hybridation de 54°C. Après électrophorèse des produits d'amplification, les suspensions positives sont sélectionnées puis titrées.

Un nouveau cycle de criblage analogue au précédent est effectué sur ce ou ces surnageant(s). La finalité étant d'isoler une plage de lyse contenant les phages recombinants portant l'ADNc d'une CCoAOMT, chaque nouveau cycle de criblage s'effectue à partir d'un nombre de pfu 10 fois moins important que le cycle précédent. Lors du dernier cycle de criblage, la densité d'étalement permet le prélèvement individuel des plages de lyse. Dans ce cas, chaque plage de lyse est ensuite recouverte de 500 μ L de tampon SM. Finalement, les phages contenus dans la plage de lyse positive choisie sont titrés puis amplifiés (figure 45).

g - Procédé d'excision automatique

En présence de phages auxiliaires (ici le phage ExAssist), l'infection de bactéries XL1-Blue par des phages recombinants UNIZAP-XR provoque l'excision des fragments d'ADN phagique contenant l'insert cloné, *i.e.* des phagemides pBluescript. Ces derniers sont ensuite encapsidés donnant des particules phagiques capables d'infection mais incapables de se répliquer dans les bactéries SOLR. De ce fait, lorsqu'ils sont cultivés avec les bactéries SOLR, les phagemides pénètrent dans les bactéries où ils se recircularisent puis se maintiennent comme élément extrachromosomique dans le génome bactérien. Les phages ci-utilisés n'autorisant pas la multiplicité d'infection des bactéries, chacune d'entre elles possède un seul type de phagemide.

A partir des phages amplifiés possédant un ADNc de *CCoAOMT*, l'excision automatique est réalisée en suivant les recommandations du fournisseur. La présence du phagemide d'intérêt est contrôlée par PCR dans des conditions analogues à celles utilisées pour le criblage de la banque.

Composition du milieu	NZY solide :	top-NZY :
NaCl (Sigma)	85,6 mM	85,6 mM
MgSO ₄ , 2 H ₂ O (Sigma)	8,1 mM	8,1 mM
Extrait de levure (Duchefa)	5 g / L	5 g / L
Hydrolysate de caséine (Duchefa)	10 g / L	10 g / L
	pH rectifié à 5,7 avec du NaOH	
Agent gélifiant	Bacto-Agar (Sigma): 15 g / L	Agarose (Sigma) : 7 g / L
	Autoclavage à 121°C pendant 20 min	

Composition du tampon SM :

NaCl (Sigma)	10 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O (Prolabo)	8,1 mM
TRIS-HCl 1 M; pH 7,5 (SDS™)	5 %
Solution aqueuse de gélatine (BioRad) 2 % (p/v)	0,5 % (v/v)

2.11 - SEQUENÇAGE DE FRAGMENTS D'ADN ET ANALYSE DES SEQUENCES

Les divers fragments d'ADN séquencés ont tous été préalablement clonés. Ainsi, après culture liquide des bactéries, les plasmides ou phagemides ont été purifiés, dosés et envoyés aux services de séquençage.

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 for Biotechnology Information à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.12 - HYBRIDATION DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC UNE SONDE RADIOMARQUEE

Ces techniques utilisent le principe d'association qui peut avoir lieu entre deux molécules d'acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires conduisant à la formation d'un duplex ADN-ADN (Southern) ou ADN-ARN (northern). La formation et la stabilité du duplex dépendent de nombreux facteurs dont les principaux sont i. le degré de complémentarité des séquences, ii. la température d'incubation et iii. la concentration saline du tampon d'hybridation et/ou de lavage. En effet, plus cette concentration est faible, plus les duplex sont instables. De même, l'augmentation des températures d'incubation favorise le désappariement des duplex les moins complémentaires.

a - Synthèse de sondes ADN radiomarquées

Les sondes ont été synthétisées et radiomarquées à l'aide du kit *Rediprime* DNA labelling system (Amersham) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit utilise la technique de l'extension d'amorces aléatoire permettant la synthèse d'une copie de la matrice ADN en présence [α -³²P]-dCTP (ICN).

L'ADN utilisé comme matrice correspond au fragment amplifié par PCR avec les amorces P4 et P6 de l'insert *CCoAOMT* contenu dans des bactéries (banque d'ADNc). La sonde obtenue marquée est purifiée à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion Micro Bio-Spin® (BioRad) selon les recommandations du fournisseur. Après dénaturation 5 min à 100°C, la sonde est placée dans la glace jusqu'à l'hybridation.

Une aliquote d'1 µL de la sonde ainsi purifiée est additionnée à 5 mL de liquide scintillant LunaGel (Lumac) puis la radioactivité incorporée est estimée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman, LS 2800).

b - Hybridation de type Southern

Cette technique permettant d'estimer le nombre de copie d'un gène a été initialement décrite par Southern (1975). Cette méthode consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN issu de la digestion enzymatique d'ADN génomique après séparation électrophorétique et transfert sur membrane.

L'ADN génomique est digéré à l'aide d'enzymes de restriction puis après extraction phénolique et précipitation à l'acétate de sodium, les fragments digérés sont séparés dans un gel d'agarose 0,7 % à 50 V pendant 4 h 30. Le gel est ensuite incubé dans une solution de HCl 0,25 M pendant 15 min afin de fragmenter l'ADN par dépurination partielle, puis deux fois dans une solution de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M pendant 20 min afin de séparer les doubles brins et enfin deux fois dans une solution de neutralisation TRIS-HCl 1 M, pH 7,4 ; NaCl, 1,5 M pendant 20 min.

Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon (Hybond N, Amersham) par capillarité selon la technique décrite par Southern (1975) pendant une nuit en présence de tampon 20 x SSC. Ils sont ensuite irréversiblement fixés à la membrane en incubant cette dernière pendant 2 h à 80°C permettant l'établissement de liaisons covalentes entre l'ADN et la membrane.

Les membranes sont préhybridées pendant 3 h à 60°C en agitation dans 30 mL de tampon de pré/hybridation, puis hybridées pendant 18 h environ dans les mêmes conditions après addition à ce tampon de la sonde ADN monobrin radiomarquée afin d'obtenir approximativement 1.10^6 dpm / mL.

Après élimination de la solution d'hybridation, les membranes subissent des lavages successifs de 10 min à des températures d'incubation croissantes (de 37°C à 55°C) dans 100 mL de solutions de concentration saline décroissante : du SSC x 2, SDS 0,1 % à du SSC x 0,1, SDS 0,1%. La radioactivité présente sur la membrane est contrôlée entre chaque bain à l'aide d'un ictomètre (MIP™ 10, Nardeux). Lorsque le bruit de fond est devenu faible, les membranes sont égouttées sur un papier filtre puis enveloppées dans du Saran-Wrap®.

L'autoradiographie a lieu à - 80°C dans des cassettes possédant des écrans intensificateurs en présence de films Kodak X-Omat™ pendant des temps variables. Le développement des films a lieu dans un bain de révélateur (Kodak, X-Ray developer) pendant 5 min puis, après un lavage sommaire dans de l'eau, dans un bain de fixateur (Kodak, X-Ray fixer) pendant 6 min.

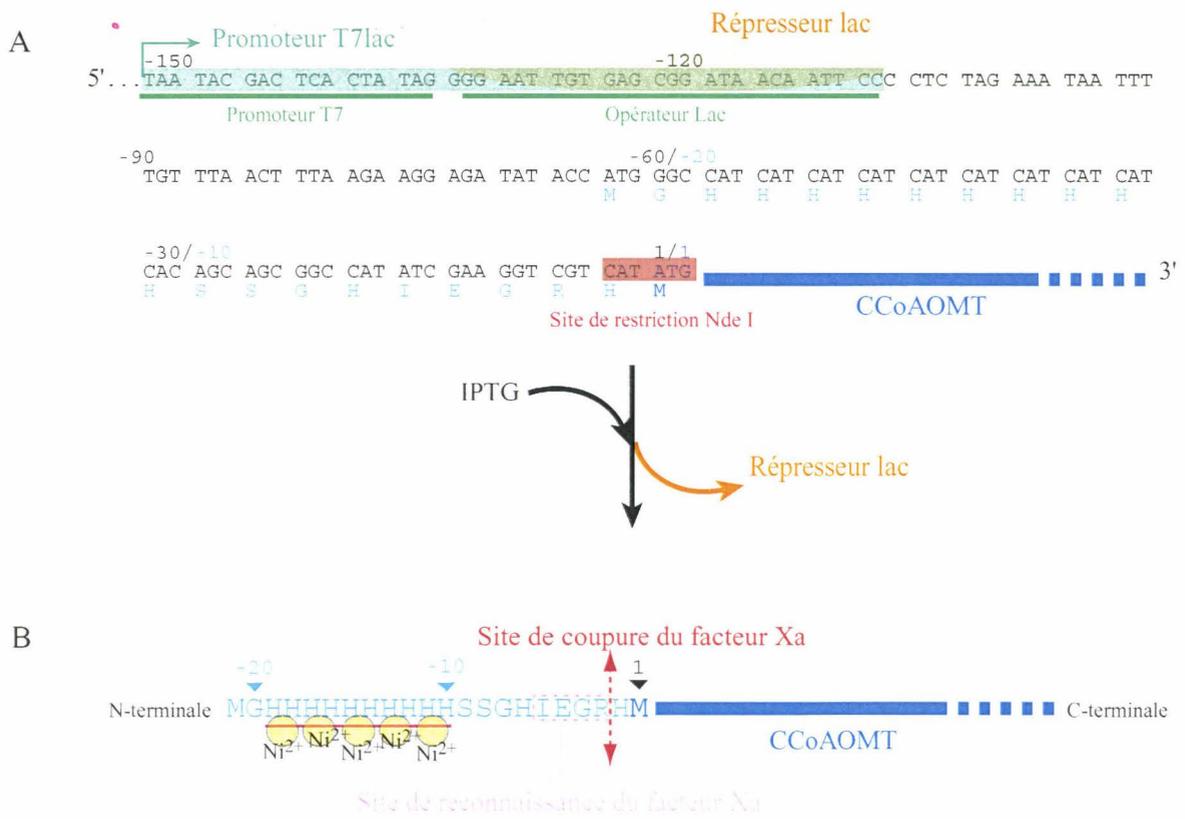


Figure 46 : Environnements nucléotidique (A) et protéique (B) de l'extrémité N-terminale de la CCoAOMT recombinante clonée dans le vecteur d'expression pET 16b.

Composition du tampon de pré/hybridation :

SSC	x 5
Denhart	x 5
SDS (BioRad)	0,5 %
ADN de sperme de saumon (Sigma) : 100 µg / mL (agent bloquant ajouté extemporanément après incubation 5 min à 100°C)	

Composition du SSC x 20 :

NaCl	3 M
Citrate de sodium	0,3 M

Composition du Denhart x 100 :

Ficoll 400	20 g / L
Polyvinylpyrrolidone	20 g / L
Sérum albumine bovine	20 g / L

c - Hybridation de type northern

Cette technique dérivant de l'hybridation de type Southern, la méthode est similaire excepté que les ARN n'ont pas à subir de digestion enzymatique. L'hybridation de type northern permet d'apprécier l'expression d'un gène donné par visualisation de la relative abondance de ses ARNm.

Après migration, visualisation sous UV et photographie, les gels d'agarose sont rincés 5 fois pendant 5 min dans l'eau afin d'éliminer le formaldéhyde pouvant gêner le transfert puis équilibrés pendant 30 min dans du SSC x 20. Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane de nylon (Hybond N, Amersham) et fixés à cette dernière de façon similaire aux hybridations de type Southern.

Les étapes d'hybridation des ARN avec la sonde et de lavages des membranes sont également réalisées comme indiqué lors du Southern hormis que la température d'hybridation est réduite à 42°C et que le tampon contient en plus 50 % de formaldéhyde (Sigma). A terme, les membranes sont alors placées en contact avec des cassettes de révélation pendant 1 semaine. Ces cassettes sont révélées à l'aide du système PhosphorImager.

2.13 - PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE CCoAOMT RECOMBINANTE

La production de CCoAOMT recombinante chez *E. coli* (BL21-Gold (DE3)) est réalisée après clonage de son ADNc dans le vecteur d'expression pET 16b (Novagen). La ligation de l'ADNc s'effectue entre les sites Nde I et Xho I du SMC permettant son insertion en phase avec le cadre de lecture de la protéine (figure 42). La région de clonage et d'expression de ce vecteur est détaillée figure 46. En considérant comme origine le site de coupure de Nde I, cette région de 150 pb comprend :

- A la position - 63, un codon start (ATG). La traduction de la séquence comprise entre ce dernier et l'extrémité 5' de l'ADNc *CCoAOMT* correspond un peptide de 21 acides aminés contenant une séquence de 10 histidines (H) consécutives. Ce tag 10xH, fusionné coté 5' de l'ADNc codant la protéine d'intérêt, facilite sa purification ultérieure.
- Entre les positions - 150 et - 133, un promoteur *T7lac*. Ce dernier est composé du promoteur *T7* et d'une séquence opéron lac sur laquelle se fixe le répresseur lac (codé par le gène *lacI*) empêchant l'activation du promoteur *T7lac* (figure 46, A). L'ARN polymérase T7 est codée par un gène porté par

le phage λ DE3 intégré dans le génome de la bactérie hôte BL21-Gold. L'expression de ce gène est dépendante de l'activation du promoteur *lac UV5* également réprimé par la fixation du répresseur lac. Au cours de la croissance bactérienne, le gène *lacI* porté sur le chromosome bactérien et sur pET16b est continuellement exprimé bloquant ainsi toute expression de l'ARN polymérase T7 et de la protéine d'intérêt. Seul l'apport de lactose, d'allolactose ou d'autres métabolites trouvés dans les *E. coli* sauvages, ou d'IPTG permet la dissociation du répresseur lac.

L'adjonction d'IPTG dans le milieu de culture des BL21-Gold au début de la phase exponentielle de croissance induit l'expression de l'ARN polymérase T7 puis la traduction de la protéine de fusion "tag 10xH-CCoAOMT" (figure 46, B).

a - Clonage dans les bactéries hôtes BL21-Gold (DE3)[®]

Le clonage de l'ADNc d'une CCoAOMT s'est effectué en 3 étapes dans l'ordre chronologique suivant :

- Isolement du fragment d'ADNc par PCR avec insertion de sites de restriction à chaque extrémité.
- Insertion de l'ADNc dans pET16b.
- Transformation des bactéries BL21-Gold.

Afin de permettre le clonage en phase avec le cadre de lecture dans pET 16b, les sites de restriction *Nde I*, portant le codon ATG, et *BamH I* ont été intégrés respectivement coté 5' et coté 3' de la séquence codante de l'ADNc. Ces modifications ont été introduites par une réaction de PCR à l'aide des amorces LuForw et LuBack. Des ADNc synthétisés à partir d'ARNm isolés de tissus externes de tige de lin prélevés au stade floraison ont été utilisés comme matrice pour cette PCR réalisée avec de la Pwo (Roche) dans les conditions décrites précédemment (paragraphe 2.5 - b) et avec le programme suivant :

1- 1 cycle	Dénaturation	2 min	94°C
		pause	80°C
	Ajout du mélange composé de l'enzyme et de son tampon (recommandations du fournisseur)		
2- 10 cycles :	}	Dénaturation	30 s 94°C
		Hybridation	30 s 61°C
		Extension	2 min 72°C
3- 20 cycles :	}	Dénaturation	15 s 94°C
		Hybridation	4 min 67°C
		Extension	1 min à 2 min 35s* 72°C
		1 min à 2 min 35s*: 1 min au 1 ^{er} cycle puis incrémentation du temps à chaque cycle + 5s	
4- 1 cycles	Extension	7 min	72°C

Après électrophorèse, les fragments amplifiés sont purifiés du gel puis clonés dans le vecteur pMOSBlue avant d'être contrôlés par séquençage.

Par digestion enzymatique avec Nde I et Bam HI, l'ADNc *CCoAOMT* est excisé de pMOSBLUE et le vecteur pET 16b est linéarisé. Après leur purification respective, l'ADNc *CCoAOMT* est inséré dans ce vecteur suite à une étape de ligation effectuée à l'aide de la T4 DNA ligase. Après inactivation de la ligase, 0,5 µL de produit de ligation sont ajoutés à 100 µL de bactéries compétentes BL21 Gold (DE3) puis l'ensemble est incubé 30 min dans la glace avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 20 s. Aussitôt replacée dans la glace pendant 2 min, la suspension bactérienne est additionnée de 900 µL de milieu SOC+ puis incubée à 37°C pendant 1 h en agitation à 225 rpm. La suspension est alors étalée sur un milieu LB solide additionné d'ampicilline (tableau 7). Les colonies obtenues après une nuit à 37°C sont criblées par PCR à l'aide des amorces LuForw et LuBack. Les colonies positives sont alors sélectionnées et étalées sur un même milieu sélectif avant d'être stockées à 4°C.

Composition du milieu SOC +:

Bacto-tryptone (Duchefa)	10 g / L
Extrait de levure (Duchefa)	5 g /L
NaCl (Sigma)	170 mM
KCl (Sigma)	2,5 mM

Le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH

Après stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min, le milieu est complété en condition stérile avec

MgSO ₄ (Sigma)	10 mM
MgCl ₂ ¹ (Sigma)	10 mM
Glucose ¹ (SDS TM)	20 mM

¹: Les solutions mères de MgCl₂, MgSO₄ et de glucose sont préparées à une concentration x 1000 dans de l'eau milliQ puis stérilisées par filtration à 0,45 µm.

b - Culture et induction des bactéries BL21 transformées

Une colonie positive est inoculée à 15 ml de milieu LB additionné d'ampicilline puis cultivée à 37°C en agitation à 225 rpm. Lorsque la culture a atteint une DO à 600 nm de ~0,6, l'expression de la protéine recombinante est induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM dans le milieu de culture. Après 4 h de production, la suspension bactérienne est aliquotée puis centrifugée à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Après élimination du surnageant, les culots bactériens sont stockés à - 20°C.

c - Purification de la protéine de fusion 10xH-CCoAOMT

Cette étape repose sur la forte affinité des résidus imidazole des histidines pour les ions nickel, Ni²⁺, auxquels ils se fixent de façon réversible (Porath et al., 1975; Yip et al., 1989). Associant cette propriété à un système de billes magnétiques, le kit Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen) a été employé pour purifier la CCoAOMT recombinante possédant à son extrémité N-terminale le tag 10xH (figure 46, B). La finalité étant d'obtenir une CCoAOMT douée d'activité enzymatique, les manipulations se sont effectuées en conditions natives à 4°C en suivant les recommandations du fournisseur.

Après décongélation dans la glace des culots bactériens précédemment obtenus, les cellules sont ressuspendues dans un tampon de lyse additionné de lysozyme à une concentration finale de 1 mg / mL

(tampon 1). Suite à une incubation de 30 min dans la glace, 10 µg / mL de RNase A et 5 µg / mL de DNase I sont ajoutés puis le lysat bactérien est clarifié par centrifugation à 10 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est alors incubé 2 h en agitation avec la suspension de billes magnétiques couplées au Ni²⁺. Après 4 étapes de lavage dans le tampon 2 afin d'éliminer les protéines contaminantes susceptibles de s'accrocher, la protéine de fusion 10xH-CCoAOMT est éluée par compétition suite à 3 rinçages dans le tampon 3 contenant une forte concentration en imidazole.

Composition du	tampon 1 :	tampon 2 :	tampon 3 :
Na ₂ HPO ₄ (Prolabo)	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl (Sigma)	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazole (Sigma)	10 mM	25 mM	250 mM
pH rectifié à 8,0 avec du HCl			

d - Elimination du tag 10xH

Le peptide tag, pouvant altérer les fonctions enzymatiques de la CCoAOMT recombinante, il est éliminé par digestion enzymatique avec le facteur Xa. En effet, un site de coupure par ce facteur protéolytique est inclus dans le peptide tag et se situe immédiatement devant la méthionine N-terminale de la CCoAOMT (figure 46, B). Une étape de purification ultérieure permet la séparation de la CCoAOMT recombinante du facteur Xa. Ces différentes manipulations s'effectuent à 4°C à l'aide du kit Factor Xa Cleavage/Capture Kits (Novagen).

Suivant les recommandations du fournisseur, le facteur Xa est inhibé par la présence d'imidazole dans le volume réactionnel. Ainsi, le tampon d'éluion contenant la protéine de fusion est dialysé une nuit contre le tampon d'activité avec un boudin de dialyse dont la limite d'exclusion est de 12 000 - 14 000 (Spectra/Por® Membrane, Spectrum). La protéine de fusion est ensuite digérée par incubation à 4°C pendant 20 h de la fraction dialysée avec 0,1 unités de facteur Xa / µg de protéine. L'élimination du facteur Xa est réalisée suite à deux étapes successives de purification selon les recommandations du fournisseur à l'aide d'une résine piégeant cet agent protéolytique. La CCoAOMT recombinante n'étant pas retenue dans la résine, elle est facilement éluée dans le tampon d'activité (c.f. paragraphe 3.1) puis elle est stockée à - 80°C.

III - TECHNIQUES DE BIOCHIMIE DES PROTEINES

3.1 - EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES

Le protocole suivi permet l'extraction de protéines totales des tissus végétaux destinées à des analyses en conditions dénaturantes et des analyses en conditions natives. De ce fait, les manipulations se déroulent à 4°C. La poudre végétale, obtenue après broyage dans l'azote liquide des tissus, est malaxée dans un mortier en présence de sable et du tampon d'extraction/activité jusqu'à homogénéisation. Après ajout de 100 mg de polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) (Prolabo) et homogénéisation, le broyat est transféré dans des microtubes puis maintenu à 4°C pendant 2 h. Une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C permet d'éliminer ensuite les particules solides.

Composition du tampon d'extraction/activité :

TRIS-HCl pH 7,5 (BioRad)	0,1 M
MgCl ₂ (Prolabo)	0,2 mM
EDTA (Sigma)	3 mM
Glycérol (SDS™)	10 %
β-mercaptoéthanol (Sigma)	14 mM
Dithiothréitol (DTT) (Sigma)	3 mM

3.2 - DOSAGE DES PROTEINES

La quantité de protéines présentes dans les extraits est estimée selon la méthode de Bradford (1976) à l'aide du kit de micro-dosage BioRad selon les recommandations du fournisseur. La réaction est basée sur la modification de la couleur du bleu de coomassie G-250 dont l'absorbance évolue de 475 nm à 595 nm quand il se fixe aux protéines.

3.3 - ANALYSE DES PROTEINES EN CONDITIONS DENATURANTES

a - Electrophorèse mono-dimensionnelle SDS-PAGE

Cette technique, dérivée de la méthode de Laemmli (1970), sépare les protéines en fonction de leur taille. En effet, la charge globale des protéines est masquée par la fixation d'un détergent anionique, le SDS, qui forme un manchon négatif autour des polypeptides. Ainsi chargées, les protéines migreront vers l'anode (+) dans un gel vertical d'acrylamide/bis-acrylamide comprenant un gel de concentration de grande porosité et un gel de résolution permettant respectivement de les concentrer avant de les séparer. Les complexes SDS-polypeptides ayant tous des densités de charge identique, seule la taille des protéines intervient : celles de petite taille migrant plus vite et donc plus loin que celles de grande taille. La concentration en acrylamide/bis-acrylamide (10 à 12,5 %) et le rapport acrylamide/bis-acrylamide (29/1 ou 37,5/1) du gel de résolution sont respectivement fonction de la taille des protéines à séparer et de la résolution de séparation souhaitée.

α -Préparation des échantillons

Après dosage des protéines, les échantillons à analyser sont additionnés de 1/4 de leur volume de tampon de charge Laemmli x4 puis les protéines sont dénaturées par incubation pendant 5 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite déposés dans le gel. Les quantités de protéines chargées dans le gel, 4 ou 6 μg , varient selon la méthode de révélation employée ensuite, coloration au nitrate d'argent ou immunolocalisation respectivement.

Composition du tampon de Laemmli x4 :

TRIS-HCl pH 6,8 (BioRad)	250 mM
Glycérol (SDS™)	10 %
SDS (BioRad)	2 %
Bleu de Bromophénol (Sigma)	0,1 %
β -mercaptoéthanol (Sigma)	20 %

 β -Migration électrophorétique

Les migrations sont effectuées avec l'équipement Mini Protean II (BioRad) dont la petite taille permet une migration rapide (1 h) et la possibilité de charger de faible quantité de protéines (3 μg par puits). Les gels de résolution puis de concentration, de 1,5 mm d'épaisseur, dont la composition est donnée ci-dessous, sont préparés séparément et extemporanément.

Composition du	gel de résolution :	gel de concentration :
Acrylamide/bis-acrylamide, 37,5/1 (BioRad)	10 - 12,5 %	3,9 %
TRIS HCl pH 8,8 (BioRad)	365 mM	
TRIS HCl pH 6,8 (BioRad)		62,5 mM
SDS (BioRad)	0,1 %	0,1 %

Ammonium Persulfate (APS) (BioRad)	0,03 %	0,03 %
N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (BioRad)	0,05 %	0,05 %

Préalablement à l'ajout des deux polymérisateurs APS et TEMED, le gel de résolution est dégazé. La réaction de polymérisation s'effectue pendant 1 h à 20°C en recouvrant ce gel d'eau milliQ afin d'uniformiser sa surface et de l'isoler de l'oxygène atmosphérique inhibant sa polymérisation.

Le gel de concentration est alors coulé au-dessus du gel de résolution dont le sommet a été abondamment rincé à l'eau milliQ. La polymérisation s'effectue comme précédemment excepté qu'un peigne dessine les puits au sommet du gel de concentration. Après polymérisation et rinçage des puits à l'eau milliQ, les échantillons sont chargés à côté d'un marqueur de taille précoloré (Standard Low Range, BioRad). La migration a lieu à raison de 20 mA par gel pendant environ 1 h dans un tampon d'électrophorèse (TRIS-HCl 0,025 M, glycine 0,192 M, SDS 0,1 %, pH : 8,2-8,3).

b - Electrophorèse bi-dimensionnelle NEpHGE-PAGE

L'électrophorèse bi-dimensionnelle (2-D), combinant deux techniques électrophorétiques séparatives des protéines : l'isoélectrofocalisation (IEF) et la SDS-PAGE, est de ce fait une méthode très résolutive pour l'analyse d'échantillons protéiques complexes (O'Farrel, 1975).

Lors d'une première dimension, l'IEF, les protéines solubilisées sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans un gel cylindrique à faible concentration d'acrylamide/bis-acrylamide dans lequel a été créé un gradient de pH. Les protéines étant des polyélectrolytes à caractère amphotère, lorsque le pH du milieu est supérieur à leur pI, elles portent une charge globale négative et inversement si le pH est inférieur, cette charge est positive. Soumises à un champ électrique, les protéines migrent dans le gradient de pH jusqu'à rencontrer la zone où le pH est égal à leur pI. La technique NEpHGE (Non-Equilibrium pH Gradient Electrophoresis) dérivant de la 2-D s'effectue de manière similaire excepté que la première dimension est arrêtée avant que les protéines n'atteignent l'équilibre évitant ainsi la perte des protéines basiques (O'Farrel et al., 1977). Lors d'une seconde dimension SDS-PAGE, les protéines migrent en fonction de leur taille moléculaire comme indiqué précédemment.

La 1^{ère} et la 2^{ème} dimensions sont réalisées respectivement à l'aide des systèmes Mini 2-D Electrophoresis Cell et Mini Protean II de BioRad pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment.

α - Préparation des échantillons

Après leur extraction, les protéines sont précipitées pendant 4 h à 4°C en présence d'acide trichloroacétique à une concentration finale de 12,5 % (m/v). La solution est ensuite centrifugée à 10 000 g pendant 10 min à 4°C et le culot ainsi obtenu est lavé trois fois dans de l'acétone 90 %. Le culot protéique est finalement séché à l'air puis repris dans le tampon approprié pour le dosage ou l'électrophorèse. Ce dernier tampon (tampon de lyse) contient de l'urée permettant la dénaturation des protéines sans affecter leur charge intrinsèque et du CHAPSO, un détergeant zwitterionique, aidant à leur solubilisation.

Tampon de lyse :

Urée (Prolabo)	9,2 M
Chapso (BioRad)	2 %
Ampholines pH : 3,5-10 (Pharmacia)	2 %
β-mercaptoéthanol (Sigma)	5 %

β - Première dimension NEpHGE

Le gel de première dimension est composé d'acrylamide/bis-acrylamide (29/1) 4%, d'urée 9,2 M, de chapso 1 %, de Nonidet P40 1 % un agent favorise la solubilisation des protéines et d'ampholines pH 3,5-10 : 2 %, un mélange d'ampholytes créant lors de la migration un gradient de pH théorique de 3,5 à 10 dans le gel. Après dégazage, 0,02 % d'APS et 0,14 % de TEMED sont additionnés à cette solution qui est introduite par capillarité dans des tubes cylindriques de 1 mm de diamètre. La polymérisation s'effectue pendant 1 h 30 à 20°C.

Les extraits protéiques, environ 80 µg, contenus dans le tampon de lyse sont déposés au sommet du gel puis recouverts d'un tampon de recouvrement assurant leur protection vis à vis de l'acide phosphorique 0,01 M, présent dans le compartiment supérieur de la cuve. Ce dernier est relié à l'anode (+) tandis que le compartiment inférieur de la cuve contenant une solution de soude 0,02 M est relié à la cathode (-).

La migration se fait par paliers : 100 V pendant 30 min, 200 V pendant 45 min, 300 V pendant 45 min et 500 V pendant 60 min. Les gels sont extrudés aussitôt après la migration et congelés à -80°C dans le tampon de dialyse pendant 1 nuit minimum.

Composition du tampon de recouvrement :

Urée (Prolabo)	8 M
Nonidet P40 (NP40) (Prolabo)	0,2 %
Ampholines pH : 3,5-10 (Pharmacia)	2,5 %

γ- Deuxième dimension SDS-PAGE

La préparation des gels de seconde dimension s'effectue dans les mêmes conditions que lors des électrophorèses SDS-PAGE excepté l'utilisation d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (29/1) et l'absence de peigne au sommet du gel de concentration. La polymérisation des gels de seconde dimension achevée, les gels de première dimension sont décongelés rapidement, rincés dans un tampon de rinçage puis incubés pendant 5 min dans le tampon de dialyse contenant du bleu de bromophénol permettant la visualisation du front de migration. Les gels de première dimension sont scellés sur le gel de concentration à l'aide d'une solution d'agarose à 0,8 % dans du tampon de dialyse. Les conditions de migration sont similaires à celles employées lors de l'électrophorèse mono-dimensionnelle.

Composition du	tampon de dialyse :	tampon de rinçage :
TRIS HCl pH 8,0 (BioRad)	62,5 mM	150 mM
SDS (BioRad)	2,3 %	0,1 %
β-mercaptoéthanol (Sigma)	5 %	5 %
Glycérol (SDS™)	10 %	

3.4 - FIXATION ET DETECTION DES PROTEINES TOTALES

Les protéines séparées par électrophorèses sont visualisées par coloration au bleu de coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) ou par coloration au nitrate d'argent selon la sensibilité recherchée.

a - Coloration au bleu de coomassie

Cette méthode, simple et rapide, permet la détection des polypeptides présents au minimum à 0,3 µg / spots. Aussitôt après la migration, les gels sont immergés dans une solution de fixation contenant 15 % d'acide acétique et 20 % d'éthanol pendant 20 min, permettant de fixer les protéines et d'éliminer le SDS. La coloration a ensuite lieu dans la même solution contenant 0,25 % de bleu de coomassie (Sigma) pendant 20 min. Les gels sont finalement lavés pendant 20 min dans la solution de fixation afin d'éliminer l'excès de colorant puis incubés pendant une nuit dans une solution d'acide acétique 10 % (SDS™) afin de décolorer le fond. Chaque bain s'effectue avec 100 mL de solution excepté la dernière étape se réalisant dans 200 mL.

b - Coloration au nitrate d'argent

Cette technique utilisée pour la détection des protéines présentes dans les gels possède un seuil de détection inférieur à la coloration précédente. En effet, la fixation des ions Ag^+ sur les groupements carboxyles (COO^-) des protéines permet la détection de polypeptides présents au minimum à 2 ng / bande.

La migration achevée, les gels sont placés 1 h minimum dans 100 mL d'une solution de fixation (acide acétique 12 % ; éthanol 50 %) additionné de 100 μL de formaldéhyde 35 %. Après 3 rinçages de 20 min dans une solution d'éthanol 50 %, les gels sont prétraités 1 min dans 100 mL d'une solution de thiosulfate de sodium 1,3 mM (Prolabo) puis une nouvelle fois rincés 3 fois 20 s dans de l'eau milliQ. Une étape d'imprégnation à l'obscurité de 20 min dans 100 mL de solution de nitrate d'argent 5,9 mM (Acros Organics) additionnée de 75 μL de formaldéhyde 35 % (Prolabo) est ensuite effectuée. Après 2 lavages de 20 s dans de l'eau milliQ, les protéines sont révélées à l'aide de 100 mL d'une solution composée de 25,3 mM de thiosulfate de sodium et de 566 mM de carbonate de sodium (Sigma) supplémentée de 50 μL de formaldéhyde à 35 %. L'arrêt de la révélation s'effectue, après un rinçage rapide dans l'eau, dans la solution de fixation. Toutes les solutions utilisées sont préparées extemporanément.

3.5 - DETECTION IMMUNOLOGIQUE SUR EMPREINTE (WESTERN-BLOT)

Contrairement aux méthodes précédentes, cette technique permet, après transfert des protéines du gel vers une membrane, la révélation d'un polypeptide spécifique de la sonde immunologique employée. La protéine cible est d'abord reconnue par un anticorps primaire spécifique puis ce complexe antigène-anticorps est localisé à l'aide d'un anticorps secondaire (IgG) couplé à la peroxydase de raifort. La révélation de l'activité peroxydasique à l'aide d'un substrat chromogène permet sa visualisation.

a - Electrotransfert

Les protéines séparées par électrophorèses sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (porosité 0,45 μm , Trans-Blot, BioRad) selon le principe décrit par Burnette (1981). Dans un champ électrique constant, les protéines chargées négativement vont migrer vers l'anode jusqu'à rencontrer la membrane. Celle-ci, par des liaisons hydrophobes et électrostatiques, piège les protéines à sa surface.

Avant utilisation, la membrane est hydratée dans le tampon de transfert pendant 30 min. Aussitôt la migration électrophorétique terminée, le gel de résolution est récupéré puis placé contre la membrane de nitrocellulose dans un système assurant son maintien dans cette position. Le transfert est réalisé à l'aide du système Mini TransBlot (BioRad) dans un tampon composé de TRIS 0,025 M (BioRad), de glycine 0,192 M (BioRad) et de 20 % d'éthanol (pH : 8,2-8,3). L'électrotransfert a lieu pendant 2 h à 4°C à l'aide d'un courant électrique de 250 mA.

b - Immunodétection

Après le transfert, les protéines sont fixées sur la membrane par un bain de 10 min dans une solution d'acide acétique 10 % et d'isopropanol 25 % puis rincées dans l'eau distillée. La membrane est alors conservée une nuit à 4°C dans une solution de TBS contenant 3 % de gélatine agissant comme agent bloquant pour masquer les sites antigéniques non-spécifiques. Après une incubation de 5 min à 37°C, la membrane est immergée dans une solution de TTBS contenant 1 % de gélatine pendant 10 min puis l'anticorps primaire est dilué à la dilution souhaitée dans cette solution. Suite à une incubation en agitation de 2 h à 20°C, la membrane est lavée 4 fois pendant 10 min dans une solution de TTBS. La membrane est à nouveau placée pendant 5 min dans une solution de TTBS additionnée de 1 % de gélatine avant d'être mise en contact avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Ce dernier anticorps est ajouté à la solution à une dilution finale de 1/2000. Après 1 h d'incubation à 20-25°C en agitation, la membrane est alors rincée 3 fois 10 min dans une solution de TTBS puis 1 fois 10 min dans une solution de TBS. L'activité peroxydasique est révélée par incubation à l'obscurité de la membrane dans une solution contenant 30 mg de 4-chloro 1-naphtol préalablement dissout dans 10 ml de méthanol ajoutés extemporanément à 50 ml de TBS contenant 30 µl de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30 %. L'oxydation de ce substrat catalysée par la peroxydase en présence de H₂O₂ produit un précipité violet foncé. La réaction enzymatique est arrêtée par plusieurs rinçages à l'eau distillée.

Pour chaque immunodétection, un contrôle sans anticorps primaire a permis de vérifier que les résultats visualisés ne sont pas dus au marqueur secondaire et / ou à l'activité de peroxydases endogènes du lin.

Deux sondes immunologiques sont utilisées pour révéler la présence de CCoAOMT dans les extraits protéiques, dirigées i. contre une protéine de fusion recombinante GST-CCoAOMT de peuplier et ii. contre la même protéine recombinante après élimination du tag GST. Ces deux immunosérums ont été produits et caractérisés par l'équipe du Pr. W. Boerjan (Vakgroep Moleculaire Genetica Department Plantengenetica, Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, Universiteit Gent, Belgique).

Composition des solutions de	TBS :	TTBS :
TRIS HCl pH 7,5 (Biorad)	0,02 M	0,02 M
NaCl (Sigma)	0,5 M	0,5 M
Tween 20 (Prolabo)		0,1 %

3.6 - SEQUENÇAGE DES PEPTIDES ET ANALYSE DES SEQUENCES

Les spots d'intérêts identifiés et localisés sur les gels d'électrophorèses NEpHGE-PAGE après leur coloration au bleu de coomassie sont découpés puis transmis aux centres de séquençage. Deux prestataires ont été sollicités employant soit la technique de dégradation d'Edmann (Hartley, 1970) (Laboratoire de Biochimie Physiologique, Unité FYSA, Université Catholique de Louvain-La-Neuve, Belgique), soit la spectrométrie de masse (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR-CNR S 8576,

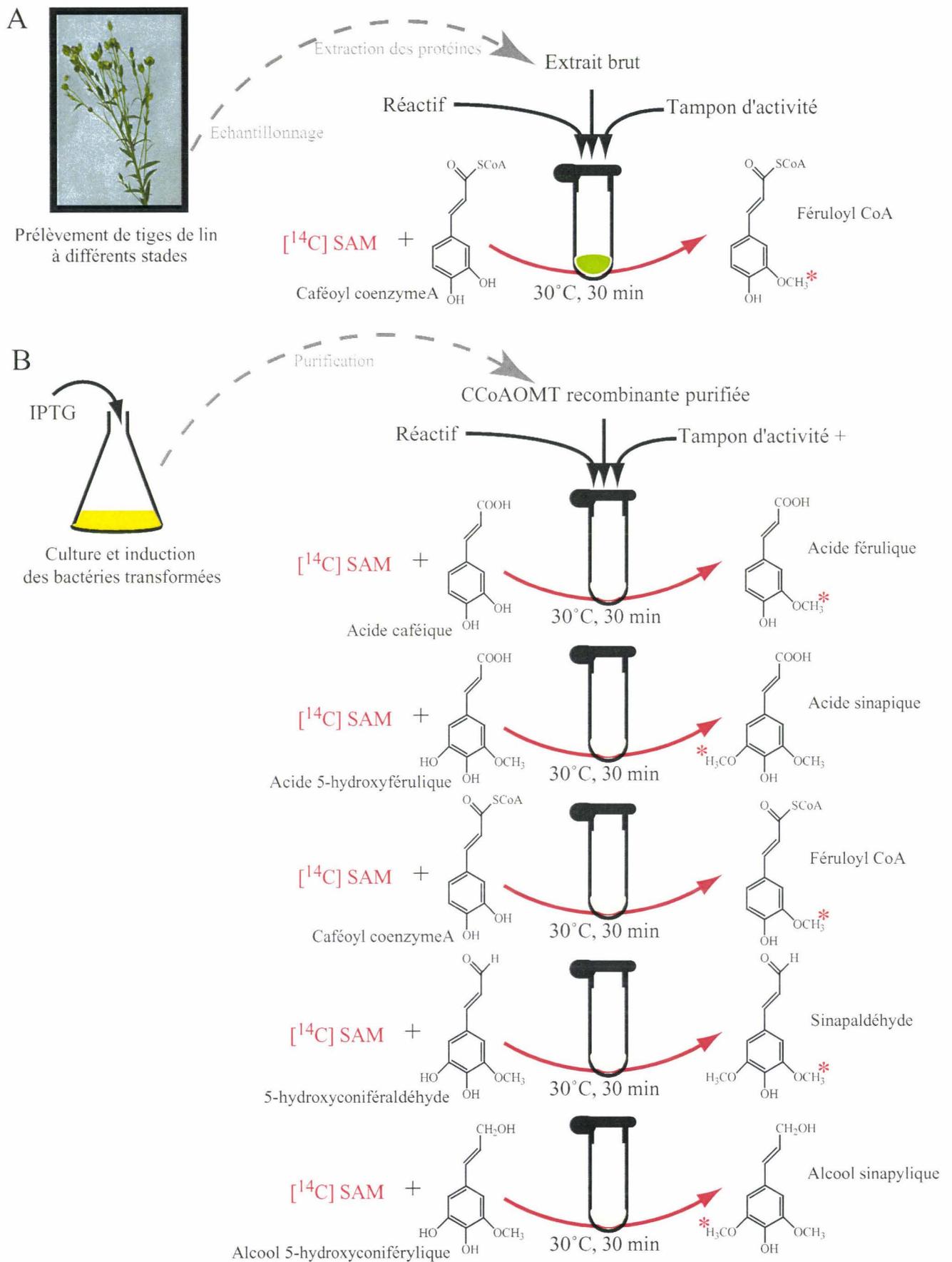


Figure 47: Principe du dosage des activités CCoAOMT notifiant les différents substrats testés et les produits correspondants formés et dosés.

Deux types d'extrait enzymatique ont été employés : des extraits bruts (A) et de CCoAOMT recombinante purifiée (B).

USTL, Villeneuve d'Ascq, France). La stratégie employée est similaire dans les deux cas : après digestion trypsique du polypeptide d'intérêt, les peptides obtenus ont été purifiés par HPLC puis séquencés.

Les microséquences obtenues ont été comparées à celles contenues dans des banques de données non redondantes en utilisant l'interface de PeptideSearch disponible en ligne à l'adresse <http://www.mann.embl-heidelberg.de/peptidesearchpage.html>

Les séquences protéiques déduites de l'ADNc sont analysées avec les outils bioinformatiques disponibles en ligne à partir des interfaces PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) et Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>).

3.7 - ANALYSE DE PROTEINES NATIVES

a - Mesures des activités enzymatiques CCoAOMT (E.C. 6.2.1.12)

La CCoAOMT utilisant la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle, l'emploi de [¹⁴C]-SAM marquée au niveau du méthyle transféré permet la mesure de son activité enzymatique *via* la quantification des produits formés. La méthode employée, basée sur les travaux de Pakusch et al. (1989), Ni et al. (1996), Meng et Campbell (1998) et Inoue et al. (1998), a été optimisée pour le lin par le Dr. B. Dehorter (LPPV, UFR de Biologie, USTL, Villeneuve d'Ascq, France). Les nombreux essais préliminaires justifient une bonne corrélation entre la quantité de protéine utilisée, les temps de réaction de dosage et l'activité enzymatique mesurée. Ces analyses sont effectuées à partir de deux types d'échantillons référencés "extrait brut" et "CCoAOMT recombinante". Le premier correspond au surnageant 10 000 g, obtenu après extraction des protéines des tissus végétaux; le second se rapporte à la CCoAOMT recombinante produite dans *E.Coli* BL21-Gold (DE 3) et séparée du tag 10xH puis purifiée. Différents substrats ont été testés : le caféoyl coenzyme A, l'acide caféique, l'acide 5-hydroxyfêrulique, le 5-hydroxyconifêraldéhyde et l'alcool 5-hydroxyconifêrylique (figure 47). Excepté l'acide caféique commercialisé (Sigma), tous ces substrats ont été synthétisés et purifiés par le Pr. C. Rolando (Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, UPRESA CNRS 8009, Bât C4, USTL, Villeneuve d'Ascq, France).

L'extrait enzymatique, composé de 10 µL d'échantillon dilués dans 15 µL de tampon d'extraction/activité (extrait brut) ou de tampon d'extraction/activité+ (CCoAOMT recombinante), est incubé 5 min à 30°C puis additionné de 25 µL de réactif. La réaction enzymatique s'effectue pendant 30 min à 30°C puis elle est stoppée par l'ajout de 60 µL de HCl 1N excepté lors des dosages avec le caféoyl coenzyme A nécessitant l'addition de 6 µL de NaOH 5M suivi d'une d'incubation de 15 min à 40°C. Cette étape supplémentaire permettant l'hydrolyse des liaisons ester CoA est arrêtée par l'ajout de 60 µL de HCl 1N. L'addition de HCl entraîne une acidification du mélange réactionnel favorisant la forme protonée des acides, esters, aldéhydes et alcools phénylpropénoïques solubles en phase organique. Ces composés hydroxycinnamiques sont alors extraits du mélange réactionnel par l'ajout

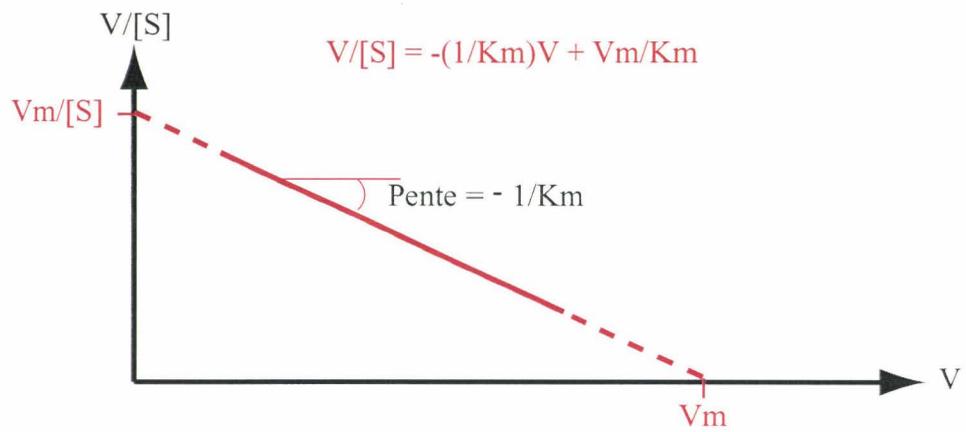


Figure 48 : Méthode de représentation graphique des activités catalytiques d'une enzyme michaélienne selon Eadie-Hofstee (Eadie, 1942 ; Hofstee, 1952).

L'équation de la droite est donnée au dessus du graphe. Cette méthode permet de calculer les constantes enzymatiques V_m et K_m , *i.e.* $V_m/2$, dont la détermination est très imprécise avec la méthode classique V versus $[S]$ (*i.e.* $V = f([S])$), la courbe étant dans ce cas une hyperbole. Les concentrations en substrats ($[S]$) sont exprimées en molaire, la vitesse (V) en katal.

d'1 mL d'éthyle acétate / hexane 1/1 (v/v), la [^{14}C]-SAM restant insoluble en phase organique. Après homogénéisation pendant 1 min, une centrifugation à 5 000 g pendant 5 min permet la séparation des deux phases. 800 μL de phase organique sont alors mélangés à 5 mL de liquide scintillant (LunaGel, Lumac) dans des fioles (Mini Poly QTM vials, Beckmann) adaptées au compteur à scintillation (Beckman LS 2800) qui permet de mesurer la radioactivité présente dans la phase prélevée.

Pour chaque test enzymatique, un témoin est réalisé avec de l'extrait enzymatique chauffé à 100°C pendant 10 min. Les valeurs obtenues correspondent au bruit de fond de la manipulation. Les activités enzymatiques de la CCoAOMT exprimées en pkat / mg de protéines correspondent à la moyenne de 3 réactions de dosage indépendante. La formule permettant la conversion des cpm (coups par minute) indiqués par le compteur à scintillation en activité exprimé en pkat / mg de protéines est la suivante :

$$[(\text{CPM}_{\text{échantillon}} - \text{CPM}_{\text{témoin}}) \times 5/4 \times 1/130 \times 1/1800] / \text{mg de protéines dans l'extrait testé}$$

- Le facteur 5/4 permet la correction du volume prélevé à 1 mL.
- Le facteur 1/130 permet la conversion des CPM en pmol en tenant compte de l'efficacité de comptage (relation entre les CPM en DPM : désintégrations par minute) et des données du fournisseur de [^{14}C]-SAM.
- Le facteur 1/1800 corrige les résultats en pmol / seconde *i.e.* en pkat.

Les paramètres de cinétique enzymatique K_m (constante de Michaelis) et V_m (vitesse maximale) de la CCoAOMT recombinante sont calculés pour chacun des différents substrats disponibles selon la méthode de Eadie – Hofstee (figure 48) (Eadie, 1942; Hofstee, 1952). Dans chaque cas et dans des conditions opératoires identiques, l'activité enzymatique de la CCoAOMT est mesurée à partir d'une gamme de concentration de substrat contenu dans le réactif comprise entre 40 et 800 μM .

Composition du réactif :

Dans du tampon d'extraction/activité sont additionnés extemporanément au dosage :

- La [^{14}C]-SAM (2,18 GBq / mmol, Amersham Pharmacia) dilué préalablement à une concentration finale de 4 μM dans de l'eau acidifiée à pH 3 avec du HCl.
- Le substrat en concentration variable solubilisé dans du DMSO. Une concentration en caféoyl coenzyme A de 200 μM est employée pour mesurer l'activité enzymatique des extraits bruts. Tous les substrats sont utilisés à 40, 80, 160, 300, 400, 600 et 800 μM avec la protéine recombinante.

Composition du tampon d'extraction/activité + :

Au tampon d'extraction/activité (c.f. paragraphe 3.1), du MgCl_2 est additionné à une concentration finale de 4 mM.

b - Localisation d'une CCoAOMT par empreintes tissulaires

Cette méthode, permettant de déterminer les zones tissulaires où la CCoAOMT est présente, combine les techniques d'immunolocalisation et de coloration histochimique des lignines. Les empreintes tissulaires ne s'effectuant qu'à partir d'une seule tige de lin; la validité des résultats obtenus a nécessité la répétition de cette manipulation à 10 plantes.

α - Empreintes tissulaires et localisation des lignines

Des fragments de tige de lin prélevés 15 cm au-dessus du collet, *i.e.* au milieu du fragment basal (chapitre A), sont insérées dans de la moelle de sureau puis deux coupes transversales sont réalisées à main levée avec une lame de rasoir. Une des coupes est soumise au test de Weisner (chapitre B) puis photographiée afin de visualiser les lignines. La seconde est appliquée en une seule étape sur une membrane de nitrocellulose déposée sur du papier Whatmann 3M. Cette coupe est ensuite recouverte d'une autre membrane de nitrocellulose et de papier Whatmann 3M avant d'être comprimée par un poids de 500 g pendant 10 s. Après démontage du système, la membrane inférieure est utilisée pour une immunodétection et la membrane supérieure sert de témoin. Pour cela, cette dernière membrane est employée pour réaliser une immunodétection en l'absence d'anticorps primaire ou pour visualiser l'ensemble des protéines fixées sur la membrane.

β - Immunodétections

Les immunodétections sont réalisées selon un principe similaire à celui décrit précédemment (chapitre 3.5 - b) mais l'emploi d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase implique quelques modifications. La plus grande sensibilité de révélation de ce marqueur secondaire par rapport aux anticorps couplés à la peroxydase justifie ce choix. La solution de blocage utilisée lors de ces immunodétections est composée d'une solution de TBS additionnée de 2 % (p/v) de PVP 40 000 (Prolabo). Les étapes de rinçages et d'incubation avec les anticorps primaires puis secondaires s'effectuent dans un tampon TBS; PVP 40 000, 1 % (p/v); Triton 100, 0,2 % (v/v) (Prolabo). Les conditions de lavage des membranes et d'incubation avec les anticorps primaires puis secondaires sont identiques à celles décrites précédemment excepté la durée des étapes d'incubation d'une heure dans ce cas. La localisation du marquage s'effectue suite à la révélation de l'activité phosphatase. Pour cela, les membranes sont incubées dans 100 mL de tampon carbonate complétement extemporanément de 30 mg de NBT (nitrobleu tetrazolium (BioRad)), comme agent chromogène, et de 15 mg de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BioRad)), comme substrat de l'enzyme (Le NBT et BCIP sont préalablement dissout dans 1 mL de DMF 70 % et 100 % respectivement). Le produit de déphosphorylation du BCIP réagit avec le NBT pour former un précipité violet. Après apparition de la coloration, la réaction enzymatique est arrêtée par plusieurs rinçages à l'eau distillée.

Les contrôles effectués sans anticorps primaires sont toujours restés négatifs attestant que les résultats visualisés ne sont pas dus aux marqueurs secondaires et /ou à l'activité de phosphatases endogènes du lin.

γ - Révélation des protéines totales

Les protéines totales fixées sur les membranes sont mises en évidence suite à leur coloration au naphthol blue black. Pratiquement, les membranes sont incubées pendant 5 min en agitation dans une solution d'acide acétique 7 % (v/v) et de méthanol 45 % (v/v) contenant 0,1 % de naphthol blue black (p/v). L'excès de colorant est ensuite éliminé par plusieurs bains d'eau milliQ jusqu'à décoloration du fond des membranes.

RESULTATS - DISCUSSION

A – ETUDE (ULTRA)STRUCTURALE DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DU LIN AU COURS DE LEUR MATURATION

Caractéristique commune à quelques dicotylédones, la présence de fibres caulinaires périphloémiennes est très généralement associée *in planta* à une fonction de soutien (Lewin, 1958; McDougall et al., 1993). Chez le lin, elles constituent un renforcement de type "périphéro-axial" parfait dans lequel la distribution spatiale des fibres est parfaitement organisée (anisotropie parfaite) (Soton, 1989). Dans ce premier chapitre, l'étude de ces fibres est envisagée par une approche microscopique. La disposition des polysaccharides pariétaux dans les parois de ces cellules a été étudiée puis la présence et la distribution des lignines dans cet environnement tissulaire a été recherchée. Suite à leur caractérisation à un niveau sub-cellulaire, l'évolution de la lignification au cours de la maturation de ces fibres a été analysée.

I - LES DIFFERENTS TISSUS ET LA DISPOSITION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES DANS LA TIGE DE LIN

L'examen au microscope optique de coupes transversales de tiges de lin hermes à maturité (stade capsules brunes, lin de 14 semaines) permet d'apprécier leur organisation tissulaire. La figure 49 et la photo A, figure 50 illustrent ces observations sans et après coloration histochimique respectivement.

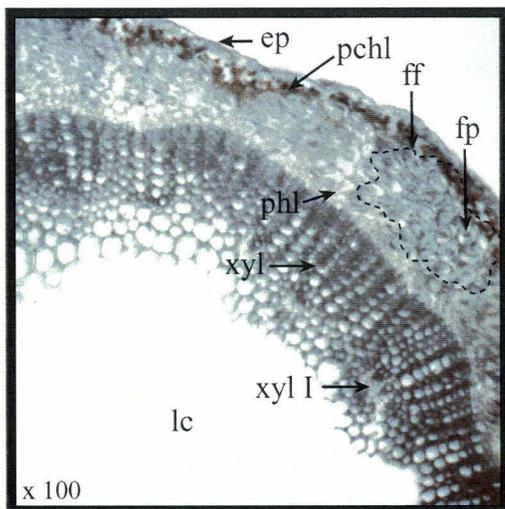


Figure 49: Organisation tissulaire d'une tige de lin.

Observation au microscope optique d'une coupe transversale de tige de lin au stade capsules brunes sans coloration préalable. De l'extérieur vers l'intérieur de la tige, les tissus suivant sont distinguables : épiderme (ep), parenchyme chlorophyllien (pchl), faisceaux fibreux (ff) composés de plusieurs fibres périphloémiennes (fp), phloème (phl), xylème secondaire (xyl), xylème primaire (xyl I), lacune centrale (lc).

Le faible grossissement de la figure 49 montre l'architecture générale de la tige : une gaine de fibres à parois épaisses entoure les tissus conducteurs. Cette organisation est précisée dans la photo 2 figure 50 qui correspond à une observation à plus fort grossissement après coloration des constituants pariétaux à la safranine O (révèle en rose les tissus lignifiés) et au le bleu astra (colore en bleu les tissus cellulosiques).

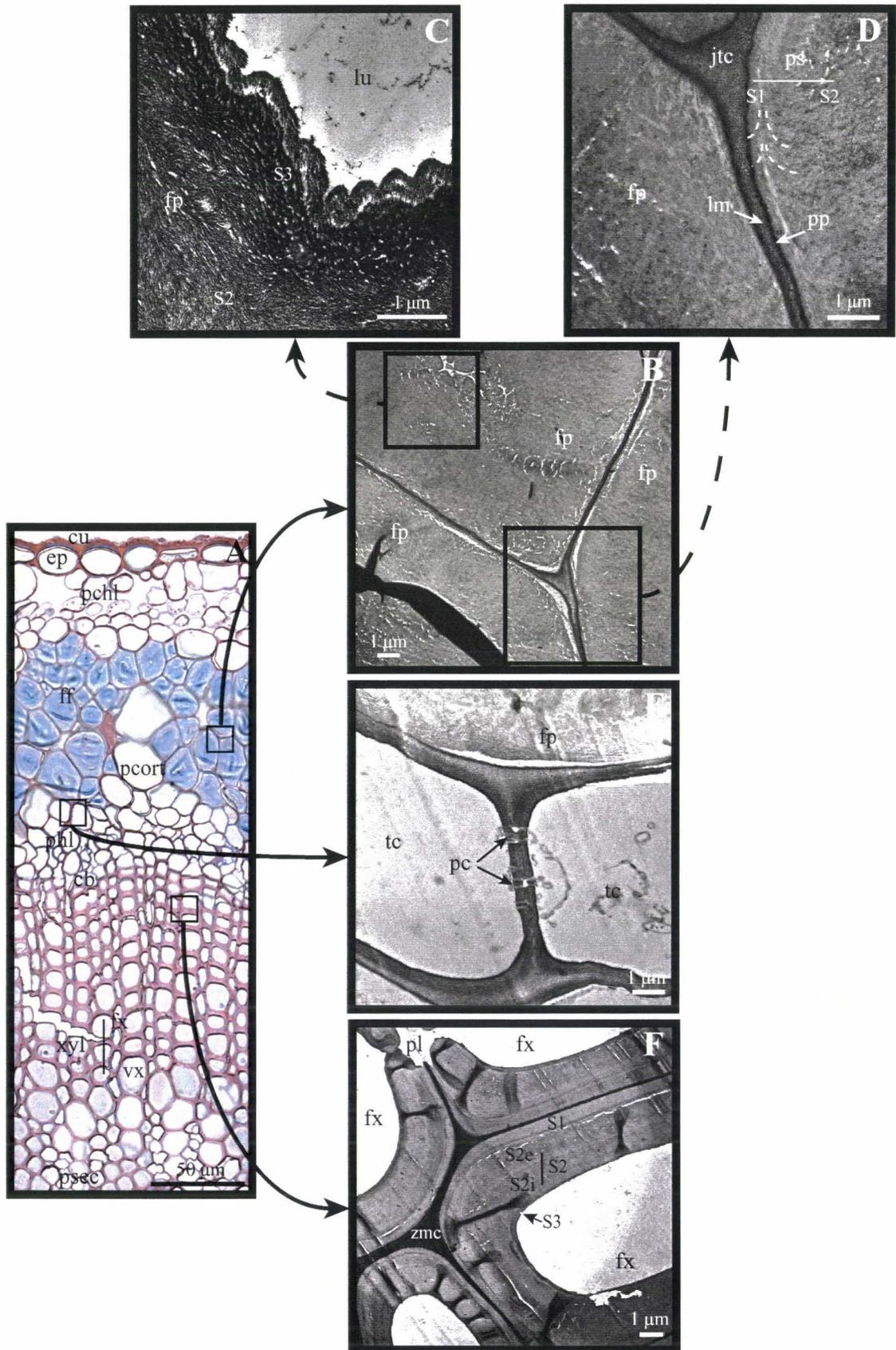


Figure 50 : Organisation (ultra)-structurale d'une coupe transversale de tige de lin au stade capsules brunes.

A : Observation au microscope optique après coloration safranine O - bleu astra. B, D, E, F : Marquage cytochimique des polysaccharides pariétaux par la méthode du PATag au sein des fibres périphloémiennes (B et D) ; du phloème (E) et du xylème (F). C : Contraste à l'acétate d'uranyle à proximité du lumen d'une cellule fibreuse. L'orientation des microfibrilles de cellulose (schématisée en blanc) dans les fibres est appréciable entre les sous couches S1 et S2 (D) et S2 et S3 (C).

cu : cuticule, ed : endoderme; ep : épiderme; ff : faisceaux fibreux; fp : fibre périphloémienne; fx : fibre xylémienne; jtc : jonction tricellulaire; lm : lamelle moyenne; lu : lumen; pchl : parenchyme chlorophyllien; pc : ponctuation; pcort : parenchyme cortical; pl : plasmodesme; phl : phloème secondaire; pp : paroi primaire; ps : paroi secondaire; psec : parenchyme lignifié; tc : tube criblé; xyl : xylème secondaire ; vx : vaisseau xylémien ; zmc : zone mitoyenne composite.

En partant de la périphérie, une première couche de cellules très jointives, à parois épaisses est observable et constitue l'épiderme recouvert d'une cuticule cireuse protectrice. Ce tissu apparaît fortement coloré en rouge, ses parois cellulaires et la cuticule étant riches en composés phénoliques et en tannins (Stewart et al., 1995; Himmelsbach et Akin, 1998; Morrison III et Akin, 2001) qui peuvent interagir avec la safranine O. Sous cette couche épidermique se trouve le parenchyme chlorophyllien constitué de cellules arrondies, plus ou moins grandes, montrant de nombreux et larges méats. La faible épaisseur des parois de ces cellules explique que ce tissu peut être parfois comprimé lors de la croissance des tissus plus internes (bois, faisceaux fibreux notamment).

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 les lins à fibres, comme celui ci, le nombre de faisceaux fibreux dans la tige varie de 30 à 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 et 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). Les fibres apparaissent ici colorées en bleu indiquant que leur épaisse paroi est essentiellement cellulosique, conformément aux conclusions de nombreux travaux (Roland et al., 1995; Akin et al., 1996a; Girault et al., 1997). Par opposition, les plus faibles proportions en cellulose dans les minces parois des tissus environnants se traduisent par leur coloration rose-violet.

Plus interne à cette assise fibreuse, apparaît le phloème secondaire formé de cellules à parois minces de nature cellulosique. Sous ce tissu se trouve un anneau de cellules à parois minces correspondant au cambium vasculaire (ou libéro-ligneux). Sous ce dernier, des cellules alignées, à parois épaisses, très jointives les unes aux autres sont observables colorées en rose suggérant la nature lignifiée de leur paroi : le xylème secondaire ou bois. Composé de vaisseaux, de fibres et de parenchyme, 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 interne à ce tissu, des groupes de cellules se distinguent dans un parenchyme, ils correspondent aux pôles de xylème primaire. Enfin, la moelle centrale est constituée d'un parenchyme cellulosique qui évolue au cours de la croissance en se lignifiant à proximité du bois ou en se désagrégeant laissant une cavité centrale.

Ces faisceaux fibreux résultent de la différenciation de cellules initiales situées en périphérie du protophloème et à ce titre ont une origine procambiale (Esau, 1942;1943; Bolwell, 1988). Dans ce sens, chaque faisceau fibreux semble associé à un faisceau vasculaire, *i.e.* pôles de xylème et phloème primaires. Leur croissance évoluant, les tiges plus âgées, par la mise en place des tissus d'origine cambiale, présentent la succession tissulaire centrifuge suivante : xylème primaire, bois, cambium, liber, phloème primaire, fibres périphloémiennes. Ainsi, l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (MET) combiné à des tests cytochimiques permettra de préciser l'ultrastructure pariétale des trois tissus majoritaires de cet ensemble : le bois, le liber et les fibres périphloémiennes. La distribution des principaux polymères pariétaux sera abordée par l'observation comparée des fibres xylémiennes et périphloémiennes, ayant toutes deux une fonction de soutien.

II - DISTRIBUTION DES POLYSACCHARIDES PARIETAUX DANS LES PRINCIPAUX TISSUS DU CYLINDRE CENTRAL

Parmi les trois principaux polymères pariétaux (polysaccharides, lignines, protéines), seuls les polysaccharides sont constitutifs de tous les types cellulaires et sont aisément mis en évidence (Goodwin et Mercer, 1990). Ils représentent ainsi une cible privilégiée des techniques cytochimiques employées pour apprécier l'organisation pariétale. Dans ce sens, le test PATAg permet de révéler la cellulose, les hémicelluloses et la majorité des pectines sur la base de la nature de leurs liaisons osidiques. Cette technique a été utilisée pour étudier l'architecture pariétale du xylème, du phloème et des fibres périphloémiennes de lin prélevé au stade capsules brunes.

2.1 - LES TISSUS XYLEMIENS

Dans le xylème du lin (photo F, figure 50), la distribution des polysaccharides, appréciée par les différences de contraste, est très hétérogène suivant la zone pariétale considérée. La paroi secondaire des cellules xylémiennes réagit plus faiblement au PATAg par rapport à la zone mitoyenne fortement contrastée. Cette dernière constituée de la lamelle moyenne et de la paroi primaire est dans ce sens généralement qualifiée de "composite" (Fujita et Harada, 1991). Le bois de lin étant hétéroxylé, l'observation comparée du marquage au PATAg entre les fibres (photo F, figure 50) et les vaisseaux (non montré) n'a révélé aucune différence.

La forte réactivité de la zone mitoyenne composite chez le lin est en accord avec des analyses chimiques des constituants pariétaux du xylème chez diverses dicotylédones. En effet, la lamelle moyenne et la paroi primaire sont rapportées comme étant très riches en polysaccharides dont la

composition évolue au cours de la croissance des plantes (Carpita et Gibeau, 1993). Constituée de microfibrilles de cellulose (environ 30 %) noyées dans une matrice extracellulaire pectique (environ 30 %) et hémicellulosique (environ 30 %) dans les tissus xylémiens jeunes, la zone mitoyenne composite s'enrichit en hémicelluloses et cellulose puis en lignines dès la fin de l'expansion cellulaire et le début de la formation de S1 (Cosgrove, 1997a; Lewis et al., 1999).

Nettement visible dans la photo F figure 50, la paroi secondaire des cellules xylémiennes forme la couche pariétale la plus importante en terme d'épaisseur. Le plus faible contraste observé par rapport à la zone mitoyenne composite, couramment rapporté dans le bois de dicotylédones, correspond à une modification des polysaccharides pariétaux et surtout à un dépôt de lignines. Il a été montré que le bois du lin renferme environ 32 % de cellulose et 60 % d'hémicelluloses, notamment des xylanes substitués par des arabinanes et des galactanes. Les pectines, ne représentant qu'une faible fraction des polysaccharides pariétaux dans le xylème, sont composées notamment de d'homogalacturonanes et de rhamnogalacturonanes (Akin et al., 1996a; Gorshkova et al., 1996).

Par ailleurs, trois différentes sous-couches référencées comme externe : S1, moyenne : S2 et interne : S3 (Fengel et Wegener, 1984; Timell, 1986) sont distinguables dans ces fibres xylémiennes. L'observation de chacune de ces sous-couches montre une organisation des microfibrilles de cellulose qui lui est propre exceptée dans S2 constituée d'une S2 externe et d'une S2 interne. Ces observations, communes à la plupart des angiospermes, sont en accord avec l'alignement et l'arrangement parallèle des microfibrilles de cellulose dans une sous-couche donnée (Chafe, 1974; Chafe et Chauret, 1992). Dans les tissus xylémiens, les mesures de l'angle de ces microfibrilles par rapport à l'axe de la cellule révèlent une déviation de 15 à 30° entre les différentes sous-couches et suggèrent l'existence d'une variation possible de cet angle au sein même d'une sous-couche (Terashima et al., 1993; Plomion et al., 2001). Une telle structure confère aux parois des fibres xylémiennes une forte résistance mécanique essentielle aux fonctions de soutien de ce tissu (Bolwell, 1988; Iiyama et al., 1994).

Il ressort de cette analyse cytochimique des polysaccharides pariétaux que le bois des tiges de lin présente des caractéristiques structurales communes au bois des angiospermes. A ce titre, il pourra constituer un témoin lors de nos analyses ultérieures de manière similaire à de précédentes analyses effectuées dans des tiges de lin (Gorshkova et al., 1996).

2.2 - LE PHLOEME

Contrairement au xylème, les parois cellulaires des cellules phloémiennes sont nettement plus fines et présentent une organisation moins structurée (photo E, figure 50). Les limites distinguant la paroi primaire de la paroi secondaire sont difficilement observables, le terme de "pseudo paroi secondaire" peut s'appliquer dans ce cas. Ces parois présentent une intensité de réactivité croissante vers le lumen et semblent donc s'enrichir en polysaccharides sensibles à l'oxydation périodique. Par ailleurs, ces "pseudo parois secondaires" semblent être pluristratifiées. En outre, la zone correspondant à la lamelle moyenne de ces cellules se démarque des différents tissus observés, moelle (non montrée), xylème, fibres périphloémiennes, parenchyme (non montré) par son absence quasi totale de contraste.

2.3 - LES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

La structure pariétale des fibres périphloémiennes peut être partiellement démasquée par le test PATAg. La photo B, figure 50 montre clairement au stade capsules brunes le contour polygonal des fibres (5 à 7 cotés) dont le diamètre moyen incluant la paroi secondaire et la paroi primaire est d'environ 18 µm. Le grossissement utilisé à la photo B permet d'apprécier l'importance de la paroi secondaire des fibres de lin représentant, à ce stade, plus de 90 % de leur section transversale.

D'un point de vue général, les cellules fibreuses périphloémiennes paraissent plus réactives au test PATAg que le bois. Cette observation est corrélée aux quantifications des teneurs en polysaccharides dans ces tissus rapportant 65 à 70 % de cellulose, 10 à 16 % d'hémicelluloses et 2 à 4 % de pectines en fonction des cultivars et des conditions analytiques (Rahman, 1979; McDougall, 1993; Akin et al., 1996a; Girault et al., 2000). En outre, le rapport cellulose (estimé par le taux de glucose) - polysaccharides non cellulosiques (représenté par la somme des taux de rhamnose, arabinose, xylose, mannose et galactose) est d'environ 4 : 1 pour les fibres ; ce même rapport est de seulement 1,4 : 1 pour le bois (Akin et al., 1996a).

Une observation plus approfondie révèle une importante hétérogénéité de marquage au niveau cellulaire et même pariétal. Dans ce sens, la zone mitoyenne composite réagit plus intensément au test PATAg que la paroi secondaire ce qui traduit une distribution différentielle des polysaccharides sensibles à ce test. En effet, des tests histochimiques effectués sur ces cellules fibreuses ont montré que leur zone mitoyenne composite est 5 fois plus riche en pectines que leur paroi secondaire (Akin et al., 1996a). Ces premières constatations rappellent les observations effectuées au niveau des fibres xylémiennes avec toutefois un contraste moins accentué au niveau des fibres périphloémiennes.

a - La zone mitoyenne composite

L'observation à plus fort grossissement de la zone mitoyenne composite au niveau d'une jonction tricellulaire au sein du faisceau fibreux (photo D, figure 50), révèle une importante différence de marquage entre la lamelle moyenne et la paroi primaire. Cette dernière apparaît très foncée tandis que la lamelle moyenne est moins contrastée. Ce constat suggère une composition polysaccharidique spécifique pour chacune de ces deux structures pariétales lesquelles n'ont pu être différenciées par ce test au niveau des fibres xylémiennes.

L'identification et le dosage des différents polysaccharides pariétaux constitutifs des faisceaux fibreux de diverses variétés de lin attestent que la composition des parois primaires de ces tissus était typique des plantes à fleur. Toutefois, la présence de glucomannanes dans ces fibres constitue une exception : ces hémicelluloses, rarement retrouvées chez les angiospermes, ont été localisées à l'interface entre la paroi primaire et la paroi secondaire (McDougall, 1993; Goubet, 1995; Gorshkova et al., 1996). De ce fait, la forte réactivité au PATAg de cette structure pariétale semblerait cohérente (photo D, figure 50).

Le marquage moins intense visualisé au niveau de la lamelle moyenne et des jonctions tricellulaires révèle une teneur plus faible en composés sensibles à l'oxydation périodique par rapport à la paroi primaire (photo D, figure 50). L'analyse de la lamelle moyenne des fibres périphloémiennes révèle effectivement de faibles teneurs en hémicelluloses dans cette structure riche en pectines (Lewin, 1958; McDougall, 1993). Plus récemment, des homogalacturonanes (HG) ont été localisées dans des fibres de lin mature par immunomarquage en MET (His et al., 2001). Ces composés pectiques sont spécifiquement distribués dans les lamelles moyennes et les jonctions tricellulaires des fibres mais sont totalement absents ou non détectés dans leurs parois primaire et secondaire. Des rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) possédant de courtes chaînes latérales β -(1→4)-galactanes ont été mises en évidence dans les parois primaires et dans les jonctions tricellulaires des fibres (McDougall, 1993; Girault et al., 1997). Par ailleurs, des "pectines mixtes" présentant des motifs HG et RG-I sont uniformément distribuées dans les fibres en différenciation mais ne sont uniquement détectées au niveau des lamelles moyennes et des jonctions tricellulaires des fibres matures. Ces résultats sont à rapprocher des propriétés des composés et/ou motifs HG à fixer des ions Ca^{2+} lesquels ont été abondamment détectés dans la lamelle moyenne et les jonctions tricellulaires des fibres (Jauneau et al., 1992). Ces ions, permettant l'établissement de liaisons ioniques entre les blocs d'HG non méthylés, joueraient un rôle essentiel dans la cohésion interfibre (Morvan et al., 1990). Plus généralement, la solubilisation des pectines de cette zone entraîne la dissociation des faisceaux fibreux; ce postula

peut s'illustrer par le rôle des enzymes hydrolysantes lors du rouissage (Morvan et al., 1989; Van Sumere, 1992). Cette richesse en pectines se manifesterait par la réactivité accrue au PATAG de la lamelle moyenne et des jonctions tricellulaires par rapport à la paroi secondaire. Toutefois, ce marquage restant moins intense en comparaison de la paroi primaire peut s'expliquer par l'incapacité du test PATAG à révéler tous les composés pectiques. En effet, l'oxydation par l'acide périodique nécessitant que les alcools vicinaux (en position 2 et 3) des polysaccharides soient libres, les RG-I ne peuvent être marqués par le test PATAG.

b - La paroi secondaire

La réactivité de la paroi secondaire des fibres périphloémiennes, supérieure à celle des fibres xylémiennes témoigne d'une composition polysaccharidique sensiblement différente. En outre, comparé au marquage des parois secondaires des fibres xylémiennes, la distribution des polysaccharides sensible au test PATAG dans l'épaisse paroi secondaire des fibres périphloémiennes semble moins homogène (photo B, figure 50).

α - L'architecture cellulosique de la paroi secondaire

L'observation à fort grossissement des cellules fibreuses périphloémiennes après contraste à l'acétate d'uranyle (photo C, figure 50) ou test PATAG (photo D, figure 50) permet d'apprécier les changements d'orientation des microfibrilles de cellulose dans leur paroi secondaire.

Différentes couches successives sont distinguables, chacune caractérisée par une orientation spécifique des microfibrilles de cellulose. Une première transition est visible à proximité de la paroi primaire (photo D) et une seconde est révélée près du lumen (photo C). Ces observations sont en accord avec l'existence de plusieurs couches pariétales ayant une structure différente (spirale Z ou S) dans des fibres végétales. Cette hypothèse émise par Anderson (1927) a été confirmée par microscopie par Roelofsen (1951) qui a proposé pour les fibres de lin un schéma devenu classique avec des régions S1, S2 et S3.

La photo D permet d'apprécier la modification de l'orientation des microfibrilles de cellulose entre S1 et S2. La première, accolée à la paroi primaire, est la plus fine tandis que la seconde constitue la majorité de la paroi secondaire des fibres. Des points de rebroussement des microfibrilles de cellulose sont distinguables à la transition S1-S2 (photo D) et traduisent le changement d'orientation des microfibrilles positionnées de façon unidirectionnelle dans chaque couche. L'orientation des microfibrilles de cellulose, très redressée, presque parallèle à l'axe longitudinal de la cellule notamment dans S2 (photo D) est à rapprocher du fort indice de cristallinité de la cellulose constitutive de ces fibres (Focher et al., 2001). L'observation de zones

plus contrastées dans S2, révélatrice d'un marquage différentiel du PATAg (photo D), s'explique soit par un artefact lié à l'obtention des coupes, soit des modifications ponctuelles de l'orientation des microfibrilles. De telles variations sont en accords avec les différences de cristallinité de la cellulose observées dans des fibres en développement (AndemeOnzighi et al., 2000). Contrairement à la transition S1-S2, le passage entre S2 et S3 n'est pas visible. La couche S3 est difficile à distinguer en raison des modifications concentriques successives de l'orientation des microfibrilles de cellulose à proximité du lumen (photo C).

Ces observations concordent avec le développement pariétal centrifuge des cellules périphloémiennes débutant dès la formation de la paroi secondaire (Stewart et al., 1995). La réduction du lumen (photos B et C) atteste d'une intense apposition de polysaccharides dans la paroi secondaire qui est maximale à la floraison et se poursuit pendant la fructification (Roland et al., 1995). En outre, l'absence d'organites cellulaires dans le lumen (photo C) témoigne qu'une autolyse du contenu cytoplasmique a déjà eu lieu dans certaines cellules fibreuses au stade capsules brunes.

Les parois secondaires des fibres de lin apparaissent donc comme un composite complexe ayant une structure tripartite dans lesquelles les microfibrilles de cellulose gardent une orientation constante qui procure à l'ensemble une forte ténacité et rigidité. Une telle structure rappelle les observations effectuées au niveau des fibres xylémiennes présentant également une S1, une importante S2 et une S3. Cependant, la mesure de l'angle formé entre l'axe de la cellule et les microfibrilles de cellulose dans la paroi secondaire des fibres périphloémiennes du lin varie de $4,4^\circ$ à $8,8^\circ$ pour une moyenne de $3,5^\circ$ (Müller et al., 1998). Or, dans les parois secondaires des fibres xylémiennes, ce même angle varie de 5° à 30° pour une moyenne d'environ 11° (Plomion et al., 2001; Wang et al., 2001).

α - Distribution des hémicelluloses et des pectines

Des travaux antérieurs ont identifié certaines hémicelluloses liées aux microfibrilles de cellulose dans la paroi secondaire des fibres périphloémiennes de lin (Focher, 1992; Vanhazendonk et al., 1996). L'analyse structurale de ces composés révèle la présence de xylanes, de glucomannanes et de galactomannanes comportant des ramifications d'acide glucuronique et d'unités L-arabinofuranosyle.

Des composés pectiques ont également été mis en évidence dans la paroi secondaire de ces fibres avec cependant une composition différente de ceux identifiés dans les parois primaires, les lamelles moyennes et les jonctions tricellulaires. Des β -(1→3)- et β -(1→6)-galactanes (Goubet, 1995), des longues chaînes de β -(1→4)-galactanes (Girault et al., 1997) et des α -(1→5)-

arabinanes (Gorshkova et al., 1996) ont été identifiées à proximité des microfibrilles de cellulose. Ces composés pectiques sont retrouvés dans la paroi secondaire des fibres de lin sous forme de polymères neutres, liés à des RG-I et/ou associés à des arabinogalactanes protéines (Gorshkova et al., 1996; Girault et al., 2000; His et al., 2001). Ces RG-I assurant un rôle structural sont distribuées de manière hétérogène au sein des parois secondaires des cellules fibreuses mais ne peuvent être mises en évidence par le test PATAg. Par contre, le marquage plus intense de la paroi secondaire à proximité du lumen (photo B) est en accord avec la concentration plus importante des β -(1 \rightarrow 4)-galactanes dans la zone proche de la membrane plasmique (His et al., 2001). Sensibles à l'oxydation périodique, des rhamnogalacturonanes de type II (RG-II) ont également été identifiées dans la paroi secondaire des fibres périphloémiennes où elles joueraient un rôle structural. Ces RG-II, uniformément distribuées dans cette structure sont absentes des lamelles moyennes et des jonctions tricellulaires (AndemeOnzighi et al., 2000).

En conclusion l'existence de similitudes dans l'organisation pariétale des fibres xylémiennes et périphloémiennes du lin est à corrélérer avec leur même fonction de soutien qu'elles exercent.

III - DISTRIBUTION DE LA LIGNINE DANS LES DIFFERENTS TISSUS DE LA TIGE DE LIN

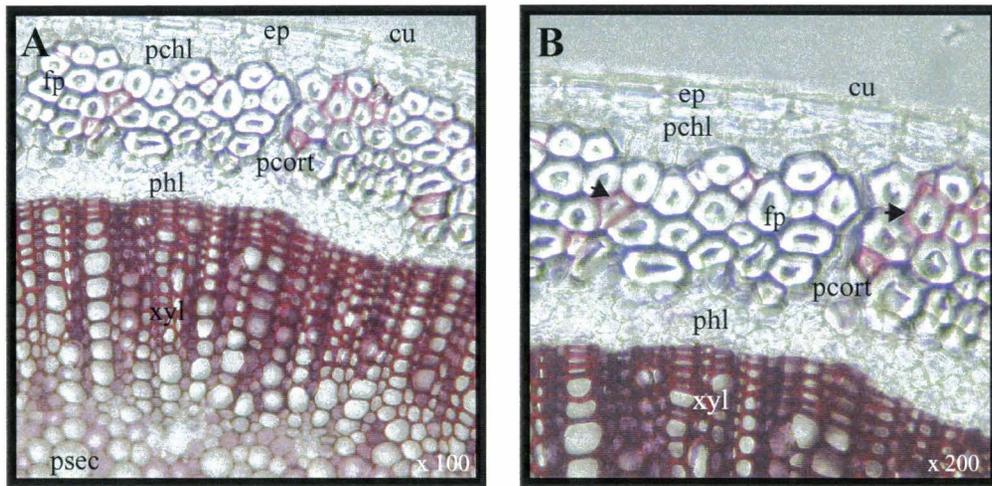
En raison de leur complexité et de leur hétérogénéité, l'étude des lignines chez le lin repose sur la combinaison de différentes techniques indépendantes et ceci tant à l'échelle cellulaire que sub-cellulaire. L'utilisation de plusieurs méthodes histochimiques a permis, dans un premier temps, de confirmer et de caractériser la distribution de la lignine dans la tige. Puis, dans un deuxième temps, la localisation ultrastructurale des lignines a été réalisée *via* deux techniques de microscopie électronique : le contraste par le permanganate de potassium et parallèlement l'immunomarquage.

3.1 - DETECTION HISTOCHIMIQUE DES LIGNINES DANS LA TIGE DE LIN

Parmi les nombreuses méthodes colorimétriques de mise en évidence des lignines, deux très courantes ont été employées car simples et reproductibles :

- La réaction de Weisner. Toutes les lignines donnent une réaction positive, *i.e.* une coloration rouge, à cette réaction (Chen, 1991).
- La réaction de Maüle. Ce test produit une coloration rouge-pourpre ou brune avec les lignines de nature G-S ou G respectivement (Meshitsuka et Nakano, 1978;1979).

Réponses des fragments basaux des tiges de lin au stade capsules brunes
à la réaction de Weisner



au test de Maüle

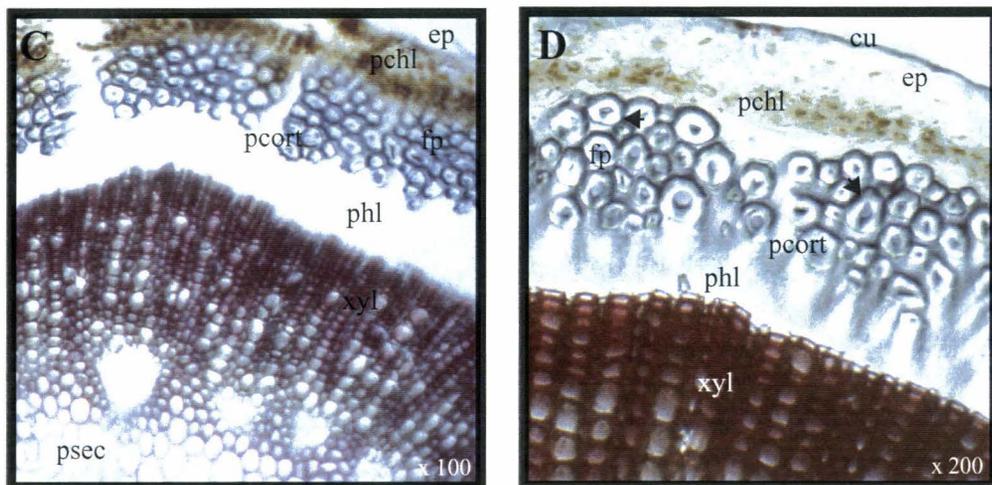


Figure 51 : Réactivité des différents tissus constitutifs de la tige de lin aux tests de Weisner (phloroglucinol-HCl) et de Maüle (KMnO₄-HCl-ammoniaque).

Les lignines des coupes transversales de tiges de lin au stade capsules brunes mises en évidence par les tests de Weisner et de Maüle apparaissent respectivement en rouge (A et B) et en rouge-pourpre ou brune selon leur composition (C et D). B et D correspondent à une observation à plus fort grossissement des coupes A et C respectivement.

cu : cuticule; ep : épiderme; pchl : parenchyme chlorophyllien; fp : fibre périphloémienne; pcort : parenchyme cortical; phl : phloème secondaire ; psec : parenchyme lignifié; xyl : xylème secondaire.

a - Les colorations différentielles de la tige de lin

Des coupes à main levée de tiges de lin prélevés au stade capsules brunes ont été soumises aux deux réactions histochimiques énoncées ci-dessus (figure 51). L'organisation tissulaire précédemment décrite est retrouvée dans les deux cas, néanmoins, la réaction de Weisner, moins drastique, permet une meilleure conservation de l'intégrité cellulaire (photos A et B).

Ces deux tests révèlent une large différence du contenu en lignines entre les différents tissus de la tige. Fortement lignifié, le xylème présente une intense coloration quel que soit le réactif utilisé, et à cet égard représente ici un témoin positif. En outre, la coloration homogène rouge-pourpre, du xylème en réponse au test de Maïle indique que ce tissu est constitué d'une lignine de nature G-S caractéristique des angiospermes dicotylédones (Monties, 1984b; Terashima et al., 1986b; Fukushima, 2001).

Dans les tissus plus externes (phloème, faisceaux fibreux, parenchyme cortical, épiderme) seul les faisceaux fibreux donnent une réponse positive plus ou moins discrète suivant le test usité. Une coloration rouge est bien visible autour de certaines cellules fibreuses lorsque ces tissus sont traités au phloroglucinol-HCl (photos A et B). En réponse au test permanganate de potassium - HCl - ammoniacque, une coloration brune est détectable autour de quelques fibres périphloémiennes (photos C et D) contrairement aux résultats de précédents travaux (Gorshkova et al., 2000).

L'observation de ces mêmes coupes à plus fort grossissement permet de préciser la localisation des colorations visualisées au sein des faisceaux fibreux (photos B et D) au niveau de la zone mitoyenne et des jonctions tricellulaires. Cette réponse positive des faisceaux fibreux du lin au test de Weisner a été rapportée par de précédents travaux avec une intensité et une localisation différentes selon les auteurs. Gorshkova et al (2000) ne révèlent qu'une discrète coloration rouge dans la lamelle moyenne de quelques fibres périphloémiennes. Par contre, Akin et al, (1996a) détectent une réponse positive dont l'intensité au niveau de la lamelle moyenne et des jonctions tricellulaires des fibres est semblable aux tissus xylémiens. Une telle disparité des résultats entre ces différents travaux pourrait résulter de différences variétales et/ou culturelles entre les lins.

b - Discussion

Sarkanen et Ludwig (1971b) rapportent que le phloroglucinol-HCl a "une application universelle pour toutes les lignines, bien que cette réaction soit faible voire absente avec les lignines contenant une forte proportion d'unités syringyles". L'étude de sa spécificité a montré que ce test donne une réaction positive en réagissant avec la plupart des alcools et aldéhydes cinnamiques et les composés pouvant donner sous les conditions du test ces molécules (Adler et al., 1948;

Geiger et Fuggerer, 1979; Hartley et Keene, 1984). Toutefois, seuls les aldéhydes produiraient un chromophore rouge (Clifford, 1974; Pomar et al., 2002).

Plus spécifique des lignines, la réaction de Maüle présente également certaines limites : le permanganate de potassium utilisé lors de ce test pouvant réagir avec divers composés aromatiques analogues aux monolignols G et S notamment certains acides aminés (Yoshinaga A., comm pers à B. Chabbert). La coloration visible au niveau du parenchyme chlorophyllien illustre cet artefact.

La colocalisation des colorations rouge et brune obtenues respectivement des tests de Weisner et de Maüle autour des fibres périphloémiennes permet néanmoins de supposer que de telles réponses colorimétriques sont dues à la présence de lignines. Dans les tiges de lin, l'analyse chimique des tissus périphériques au bois montre que les concentrations en aldéhydes phénoliques sont maximales dans la cuticule, l'épiderme et le parenchyme (Himmelsbach et Akin, 1998; Morrison III et Akin, 2001). En regard de ces résultats et de l'absence de coloration rouge en dehors des faisceaux fibreux dans les tissus périphériques au bois, le test de Weisner semble spécifique de la lignine. Par ailleurs, considérant la plus faible réactivité des lignines S (Chabbert B., comm. pers) au test de Weisner et la coloration brune au test de Maüle révélant une faible teneur en unité S, les lignines détectées dans les faisceaux fibreux pourraient être riches en unités G.

Néanmoins, dans le cas de coupes réalisées à main levée, l'épaisseur variable de ces dernières peut se traduire par une variation de l'intensité de coloration. De ce fait, les techniques histochimiques de détection des lignines appliquées à des coupes à main levée ne peuvent être employées pour quantifier le degré de lignification des fibres périphloémiennes. Considérant les limites et les spécificités des tests de Weisner et de Maüle, la sensibilité de ces méthodes est-elle suffisante pour vraiment rendre compte de la réelle lignification des fibres de lin ?

3.2 - DETECTION DES LIGNINES DANS LA TIGE DE LIN EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

De nombreuses études chimiques, spectrométriques ou autoradiographiques ont montré "l'inhomogénéité" des lignines (Fergus et Goring, 1970; Saka et Thomas, 1982; Terashima et al., 1986b) néanmoins aucune de ces méthodes n'a donné une résolution équivalente à celle fournie par la microscopie électronique à transmission (MET). La haute résolution de cet outil autorise l'emploi d'autres méthodes de détection des lignines, notamment leur marquage par le permanganate de potassium ainsi que par des sondes immunologiques.

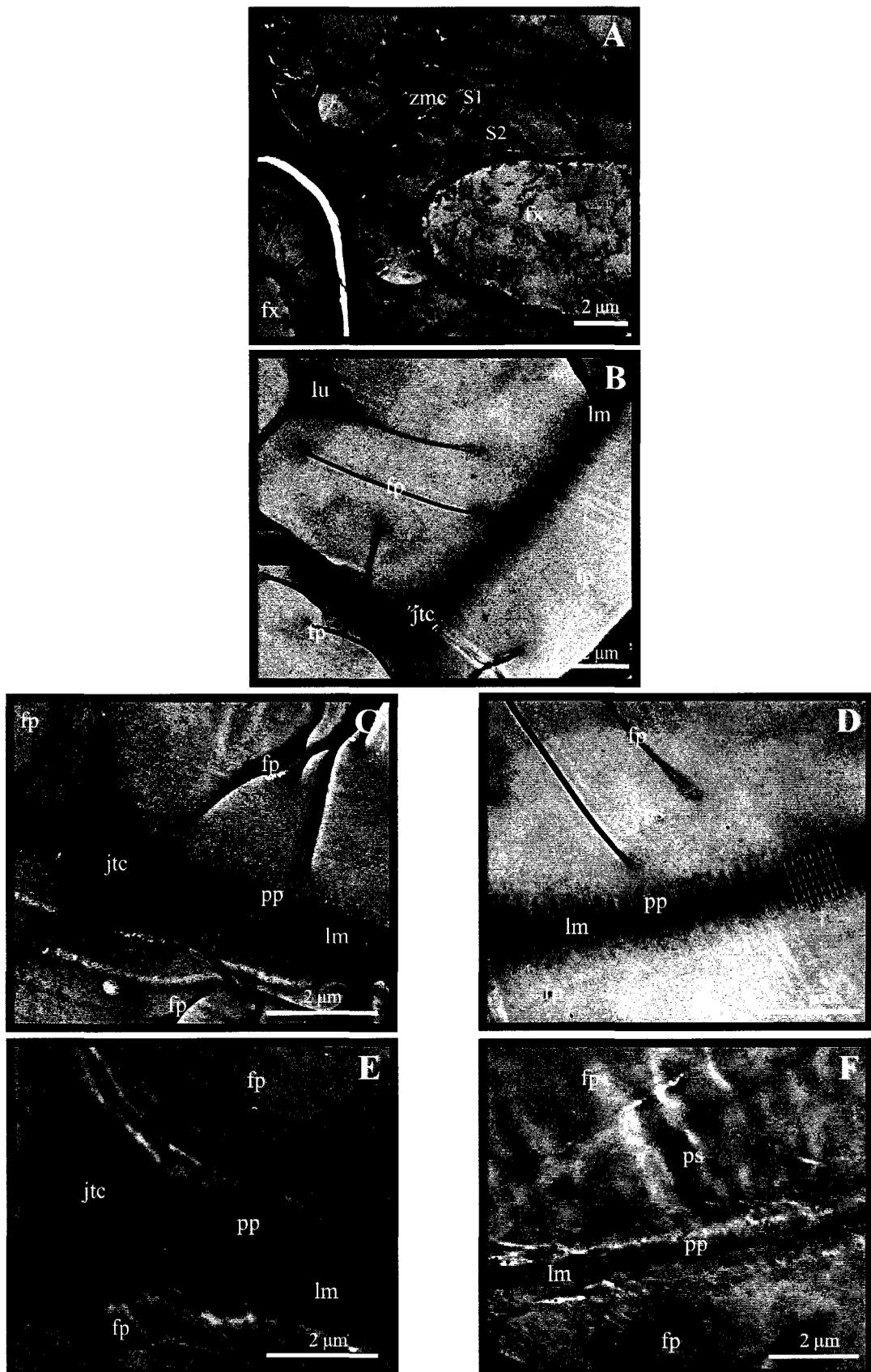


Figure 52: Mise en évidence des lignines au niveau des fibres périphloémiennes du lin.

A, B, C, D : Marquage cytochimique des lignines par le permanganate de potassium. A : intense marquage du xylème, utilisé ici comme témoin. B, C, D : marquage des lignines au niveau des fibres périphloémiennes, la zone mitoyenne composite apparaît très contrastée, seule la zone périphérique de la paroi secondaire, *i.e.* S1, présente un marquage lequel semble former des traits d'union (schématisés par les pointillés blancs) entre les cellules fibreuses.

E et F : Immunomarquage des lignines de nature G de type condensé par l'immunsérum anti-Gzl au niveau des zones interfibrilles similaires à C et D. Observation d'un marquage dans les zones mitoyennes composites et en périphérie de la paroi secondaire. fp : fibre périphloémienne; fx : fibre xylémienne; jtc : jonction tricellulaire; lm : lamelle moyenne; lu : lumen; pp : paroi primaire; ps : paroi secondaire, zmc : zone mitoyenne composite.

a - Détection de la lignification des tiges de lin par la méthode du permanganate de potassium

Grâce à son double rôle de fixateur et de contrastant des lignines, le permanganate de potassium permet une visualisation fine des lignines au sein des parois (Hepler et al., 1970; Bland et al., 1971) avec une résolution à l'échelle de la microfibrille de cellulose (Ruel et al., 1978).

α - Mise en évidence des lignines constitutives du bois

Dans un tissu fortement lignifié tel que le bois (photo A, figure 52), le marquage résultant de la fixation des échantillons au permanganate de potassium est globalement intense et homogène. Cette réponse du xylème du lin au permanganate de potassium est similaire aux observations effectuées dans le bois d'angiospermes dicotylédones ligneuses, composé d'environ 25 à 30 % de lignines (Wardrop, 1976; Donaldson et al., 2001).

Une observation plus fine de cette photo révèle les différentes sous-couches constitutives de ces parois: la lamelle moyenne, la paroi primaire, les sous-couches S1, S2 et S3 de la paroi secondaire. La zone mitoyenne composite apparaît comme plus contrastée par rapport à la paroi secondaire. Au sein de cette dernière un gradient du marquage décroissant semble exister entre S1 et S2. Ces différences de contraste traduisent des variations de la teneur en lignines dans ces différentes assises pariétales. Ces variations sont en accord avec la distribution des lignines dans les parois des cellules xylémiennes de diverses angiospermes chez lesquelles un gradient décroissant des concentrations en lignines a été mesuré entre les jonctions tricellulaires, les lamelles moyennes, les parois primaires puis secondaires (Fergus et Goring, 1970; Saka et Goring, 1985; He et Terashima, 1991; Higuchi, 1998; Monties et Fukushima, 2001). Les teneurs en lignines dans la zone mitoyenne sont rapportées 3 à 4 fois supérieures par rapport aux parois secondaires. Dans ces dernières, les variations enregistrées sont moins importantes et suggèrent, au niveau des fibres xylémiennes, un gradient décroissant de S1 à S3. La lignification hétérogène des couches et sous-couches pariétales est à rapprocher des différences de la distribution des polysaccharides dans ces structures. En effet, il est maintenant bien établi que la lignification des tissus est influencée par la matrice polysaccharidique dans lequel elle a lieu (Siegel, 1957; Higuchi, 1990; Ruel et al., 2002). Ainsi, il n'est pas surprenant de retrouver au niveau des fibres xylémiennes, les différentes couches pariétales mises en évidence précédemment lors du test PATAg.

β - Mise en évidence des lignines incrustant les fibres périphloémiennes

La fixation des fibres périphloémiennes par le permanganate de potassium (photos B, C, D, figures 52) révèle un fort contraste entre les parois secondaires des fibres et la zone mitoyenne composite. Dans cette dernière, incluant les jonctions tricellulaires, la lamelle moyenne et la paroi primaire, l'intensité du marquage observé est semblable à celui visualisé dans les fibres xylémiennes. Par contre, au niveau de la paroi secondaire des fibres périphloémiennes, le marquage est nettement plus discret. Cette localisation périphérique du marquage est à rapprocher de la coloration rouge observée autour des fibres périphloémiennes lors du test de Weisner. Ces résultats rappellent les conclusions des travaux quantifiant les lignines à l'échelle cellulaire dans le xylème. En effet, l'intensité de la lignification de la paroi secondaire apparaît comme la seule différence dans la distribution des lignines entre les fibres périphloémiennes xylémiennes. Cette dissemblance suggère une architecture pariétale différente de ces cellules fibreuses ayant pourtant une fonction similaire de soutien des tiges.

L'observation à plus fort grossissement des zones intercellulaires en MET permet de préciser la localisation du marquage au niveau des fibres périphloémiennes (photos C et D). La paroi primaire et les jonctions tricellulaires présentent un contraste globalement plus soutenu que la lamelle moyenne. Une observation plus détaillée du marquage de la zone mitoyenne composite révèle la réactivité plus forte de la paroi primaire très sombre, *i.e.* la plus contrastée. De plus, un marquage très fin et hétérogène est observable sur tout le pourtour de ces cellules fibreuses périphloémiennes en périphérie de la paroi secondaire sur une largeur d'environ 1µm, zone correspondant à S1. Ce marquage de la paroi secondaire, d'intensité décroissante vers le lumen des fibres, dessine des arcs parallèles entre deux cellules fibreuses et montre la présence de lignines incrustant la partie externe des fibres.

L'ensemble des résultats observés avec les différentes méthodes de mise en évidence des lignines suggère non seulement la présence de lignines enrobant mais aussi incrustant les fibres périphloémiennes. Cette conclusion peut être rapprochée du corollaire établi entre les difficultés de séparation des éléments fibreux et la présence de lignines (Sharma et al., 1999a).

γ - La spécificité du marquage des lignines au permanganate de potassium

Le permanganate de potassium étant un agent oxydant très puissant, cette méthode de fixation peut être considérée comme destructive. En effet, ce composé peut réagir dès son contact avec le cytoplasme et pénètre donc difficilement dans les cellules. De plus contrairement aux conclusions de Hepler P.K., et al. (1970) rapportant sa grande spécificité vis à vis des lignines, le

permanganate de potassium peut également, par ses propriétés oxydantes, marquer les polysaccharides pariétaux et les protéines riches en acides aminés aromatiques. Ces réactions aspécifiques se distinguent toutefois par un marquage d'intensité moindre par rapport aux lignines (Kutscha et Gray, 1972; Hoffmann et Parameswaran, 1976; Parameswaran et Liese, 1982). Par ailleurs, les conditions d'utilisation du permanganate de potassium rendent la probabilité d'un marquage des polysaccharides faibles (T. Higuchi, comm pers à K. Ruel).

Compte tenu de ces limitations, la mise en œuvre d'une approche complémentaire devrait contribuer à l'identification formelle des composés phénoliques présents dans les faisceaux fibreux. De ce fait, la confirmation de la présence de lignines et l'étude de leur hétérogénéité spatiale et structurale dans les fibres périphloémiennes du lin a été abordée en MET à l'aide d'outils immunocytochimiques notamment des antisera polyclonaux dirigés contre différents types de lignines synthétiques (Ruel et al., 1994; Joseleau et Ruel, 1997; Musel et al., 1997; Ruel et al., 1999; Burlat et al., 2000).

b - Approche de la lignification des fibres du lin par immunocytochimie

α - Caractéristiques des sondes immunologiques utilisées

Les polymères de lignine de synthèse (DHP), ayant servi d'antigènes pour la production d'antisera polyclonaux, ont été obtenus par déshydrogénation radicalaire selon deux modes conventionnels de polymérisation *in vitro* des alcools hydroxycinnamyliques : la méthode *zulauf* (zl) et la méthode *zutropf* (zt) (Sarkanen, 1971; Faix, 1986; Saake et al., 1996).

Les DHP préparés par la méthode *zutropf* sont riches en liaisons intermonomériques de type non-condensé et seront désignés comme des DHP de type non-condensé. Au contraire les DHP de la série *zulauf*, riches en liaisons de type condensé, seront désignés comme des DHP de type condensé. Au total trois différents DHP ont servi d'antigène pour la production d'antisera (tableau 9) lesquels ont été précédemment caractérisés (Ruel et al., 1994; Joseleau et Ruel, 1997).

Liaisons intermonomériques majoritaires	condensées (méthode <i>zulauf</i>)	non-condensées (méthode <i>zutropf</i>)
Type de polymère		
Homopolymère G	anti-Gzl	
Hétéropolymère G-S	anti-GSzl	anti-GSzt

Tableau 9 : Nomenclature des anticorps présents dans les différents antisera polyclonaux utilisés pour la caractérisation des lignines des fibres périphloémiennes.

Les antisera utilisés étant polyclonaux, il n'est pas possible de déterminer l'affinité des anticorps présents pour leur épitope. De ce fait, la comparaison d'intensité des marquages entre les différents antisera n'est pas envisageable.

β- Immunomarquage des lignines constitutives des tiges de lin

Les techniques histochimiques de détection des lignines précédemment employées et discutées suggérant la présence de lignines pauvre en sous-unités S au sein des faisceaux fibreux, les premiers immunomarquages ont été effectués à l'aide de l'antisérum anti-Gzl (Ruel et al., 1994). Un marquage est obtenu au niveau des différentes structures pariétales des fibres avec une intensité différentielle selon sa localisation (photos E et F figure 52). La zone périphérique de la paroi secondaire et les jonctions tricellulaires présentent un marquage similaire, plus dense (photo E) que celui observé dans la paroi primaire et la lamelle moyenne. Dans ces deux dernières structures le marquage est identique (photo F). La photo F permet également de préciser le marquage dans la paroi secondaire, le nombre d'épitopes reconnus par l'immunsérum est plus important dans la zone correspondant à S1 puis décroît de manière centripète et devient nul à moitié de S2 (non montré).

Ces résultats d'immunomarquages complètent ceux de la fixation au permanganate de potassium. Les différences observées entre ces deux méthodes de visualisation des lignines s'expliquent tout d'abord par leur niveau différent de précision, nettement supérieure dans le cas de l'immunomarquage. En effet, les anticorps contenus dans l'immunsérum anti-Gzl reconnaissent des épitopes dispersés dans la paroi secondaire des cellules fibreuses révélant la présence de lignines jusque dans S2. Or les lignines marquées par le permanganate de potassium sont détectées dans la paroi secondaire uniquement dans une zone correspondant à S1. D'autre part, contrairement aux anticorps, le permanganate de potassium n'est pas spécifique d'un type de lignine particulier mais révèle l'ensemble des lignines dans le tissu. En effet, l'antisérum utilisé contient des anticorps ne reconnaissant que certains épitopes, par conséquent sa fixation informe à la fois sur la présence de lignines mais aussi sur le type de lignine détectée. La visualisation de témoins réalisés en l'absence de l'anticorps primaire ou avec le sérum préimmun ne présentant, dans ces deux cas, aucun marquage permet de valider le test et prouve que le marquage présenté avec l'antisérum anti-Gzl est bien spécifique.

c - L'appréciation de la lignification des fibres périphloémiennes en fonction des techniques employées

D'un point de vue méthodologique, les résultats obtenus en MET confirment et précisent les données recueillies lors des réactions histochimiques en microscopie optique (test de Weisner et test de Maüle). En effet, les colorations rouge et brune révélées par ces deux tests au niveau des faisceaux fibreux du lin sont colocalisées aux zones lignifiées détectées en MET. Ces deux réactions histochimiques révèlent une lignification sporadique des cellules fibreuses au niveau des jonctions tricellulaires et dans les zones mitoyennes. Or les techniques de marquage des lignines en MET ont démontré que l'incrustation des lignines au sein des faisceaux fibreux était ubiquiste. Ainsi, la détermination du degré de lignification des fibres de lin est considérablement sous-estimée lors du comptage du nombre de fibres réagissant positivement au test de Weisner (McDougall, 1991). En effet, le manque de sensibilité de ce dernier test ainsi que la résolution à l'échelle du microscope optique ne permettent pas d'appréhender globalement la discrète mais très présente lignification des fibres périphloémiennes du lin. La MET apparaît donc comme un outil très résolutif adapté à l'étude de la distribution des lignines dans ces fibres. Toutefois, la détection des lignines en MET est dépendante de la sensibilité de la technique de marquage mise en œuvre. Les variations des marquages précédemment observées témoignent de l'importance de ce paramètre.

De précédents travaux sur le lin utilisant la microscopie optique combinée à la spectrométrie (FT-IR, Raman, spectrométrie/chromatographie de masse après pyrolyse) concluent à l'inexistence de lignines dans les faisceaux fibreux périphloémiens (Himmelsbach et al., 1998; Morrison et Akin, 2001; Morrison et al., 2003). Or, ces techniques possèdent une moins bonne résolution que la MET. En effet, dans des tissus faiblement lignifiés, les spectres d'absorption des lignines peuvent être masqués ou dilués par ceux provenant de la matrice polysaccharidique (Atalla et al., 1992; Meier et Faix, 1992). Basée sur un principe semblable, seule la microspectrométrie UV, combinant microscopie optique et spectrométrie UV, permet de détecter des lignines au sein des faisceaux fibreux. Cependant, la faible résolution et la sensibilité moindre de cette dernière technique autorisent leur détection uniquement dans les zones révélées par le test de Weisner, *i.e.* les jonctions tricellulaires (Akin et al., 1996a). Ainsi, ces auteurs sous-estiment la lignification des fibres périphloémiennes du lin en qualifiant ce processus de sporadique.

Par ailleurs, la méthode physique généralement employée pour définir la composition des fibres périphloémiennes du lin, la RMN ^{13}C , ne permet pas toujours l'identification des composés phénoliques (Gamble et al., 2000) ou définit ces derniers de type cyanidine (Love et al., 1994).

La RMN C¹³ possède une faible résolution pour l'identification des lignines condensées car dans ce cas il est très difficile d'obtenir une corrélation linéaire entre l'intensité du signal et le nombre correspondant d'atomes de carbone (Monties, 1989b). Or la coloration brune visualisée autour des fibres lors du test de Maüle et le marquage positif obtenu avec les anticorps anti-Gzl suggèrent que les lignines incrustant les fibres périphloémiennes seraient riches en unités G et de nature condensée, conformément à de précédents travaux (Gorshkova et al., 1996).

Parmi les différentes méthodes développées dans cette étude, les techniques d'immunocytochimie apparaissent comme les plus résolutive et les plus sensibles. En effet, elles permettent d'une part de déterminer la nature des lignines incrustant les fibres et d'autre part de visualiser l'hétérogénéité de leur distribution dans ces mêmes cellules. Le marquage des lignines en MET notamment à l'aide de sondes immunologiques apparaît être l'outil le plus approprié pour étudier la discrète lignification des fibres périphloémiennes du lin. Dans ce sens, le développement de cette approche avec d'autres sondes immunologiques permettra de préciser ce processus dont la très faible intensité constitue l'une des caractéristiques majeures de ces fibres.

d - La lignification des fibres périphloémiennes du lin : une exception ?

Globalement, les résultats positifs obtenus par les différentes méthodes cytochimiques employées, réactions de Wiesner et de Maüle, marquage des lignines par le permanganate de potassium, par immunocytochimie permettent d'attester la présence de lignines au niveau des fibres périphloémiennes du lin. Ces résultats montrent que ces lignines sont distribuées de manière hétérogène au niveau des fibres : très présentes dans les jonctions tricellulaires et les zones interfibrilles (lamelle moyenne et paroi primaire) et plus discrètes dans les parois secondaires. A ce niveau, la lignine est principalement localisée au sein de S1. Une telle distribution des lignines dans les différentes assises pariétales rappelle les phases précoces de la lignification des fibres xylémiennes.

Par ailleurs, ces observations corroborent et précisent de précédents résultats. Tammes (1907) fut la première à détecter la lignification des fibres périphloémiennes du lin en précisant qu'il s'agissait d'un processus isolé n'affectant que quelques fibres. Lindeberg et Lange (1949), suite à leurs travaux sur l'étude de la lamelle moyenne des fibres de lin, avaient conclu que la lignine était un des constituants majeurs de cette zone avec les pectines et les hémicelluloses. Crozier en 1950 précisait cette idée en attestant que la lignification des fibres était plus importante au niveau des jonctions tricellulaires.

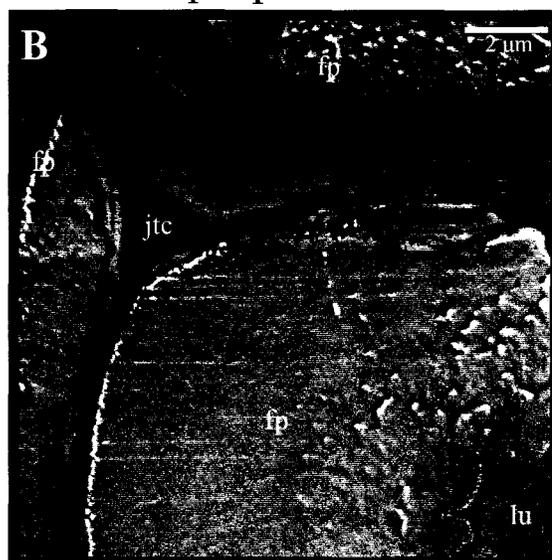
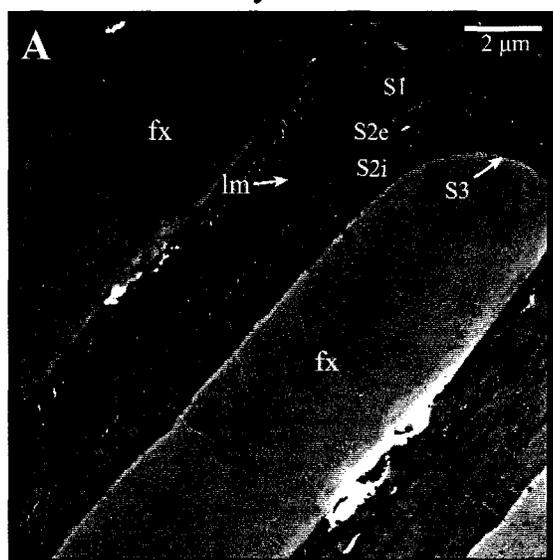
La lignification de fibres périphloémiennes n'est pas spécifique au lin et a été rapportée dans diverses dicotylédones : la luzerne, le chanvre, le kénaf, le jute et la ramie. Par contre le profil de lignification semble particulier à chaque espèce :

- Les fibres sclérenchymateuses de la luzerne (*Medicago sativa*) présentent une lignification spécifique en trois phases. Après un épaississement de leur paroi primaire durant la croissance des entrenœuds, la formation de la paroi secondaire coïncide avec l'initiation de sa lignification. Ce processus s'étend ensuite à la paroi primaire et à la lamelle moyenne durant l'épaississement de la paroi secondaire (Vallet et al., 1996; Engels et Jung, 1998). Une telle évolution de la lignification des fibres périphloémiennes de luzerne se traduit par des teneurs élevées en lignines (McDougall et al., 1993; Vallet et al., 1996).
- Contrairement à la luzerne, les fibres périphloémiennes de la ramie (*Boehmeria nivea*) sont très peu lignifiées. Une telle distinction est à rapprocher de leur organisation dans la tige : ces fibres sont isolées dans le parenchyme cortical ou rassemblées en petits faisceaux fibreux de quelques cellules (Lewin, 1958; Catling et Grayson, 1982).
- Regroupées en faisceaux, de 25 à 50 cellules, localisés entre le cambium vasculaire et le phloème, les fibres de jute (*Corchorus capsularis*) sont séparées entre elles par une lamelle moyenne très riche en lignines lesquelles incrustent également leur paroi secondaire (Rahman, 1978; Mukherjee et al., 1986). Les fortes teneurs en lignines de ces fibres expliquent leur qualité textile très médiocre (McDougall et al., 1993). Cette caractéristique est corrélée à une grande difficulté de dissociation des fibres entre elles et/ou avec les tissus environnants.
- Contrairement à l'ensemble des modèles ci-présentés, les fibres du chanvre (*Cannabis sativa*) sont divisées en deux faisceaux séparés par des cellules parenchymateuses. Le premier, externe, est qualifié de primaire car dérivant du procambium; le deuxième plus interne est désigné comme secondaire car issu du phloème secondaire (Kundu, 1942). Les fibres primaires, qui donnent lieu à des applications industrielles, montrent une lignification relativement homogène essentiellement au niveau de leur lamelle moyenne et de leur paroi primaire (Chabbert, B., comm pers).

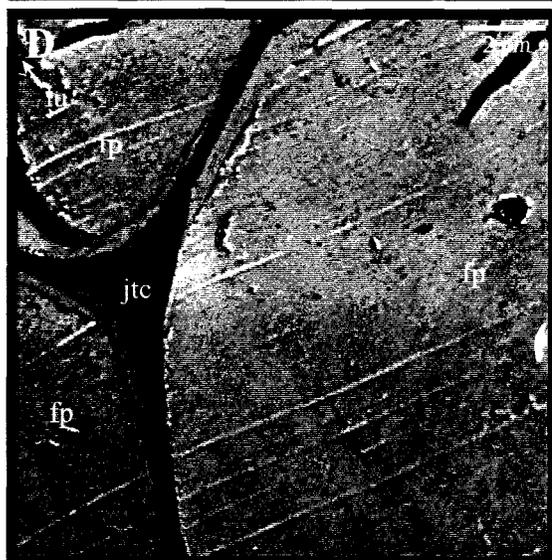
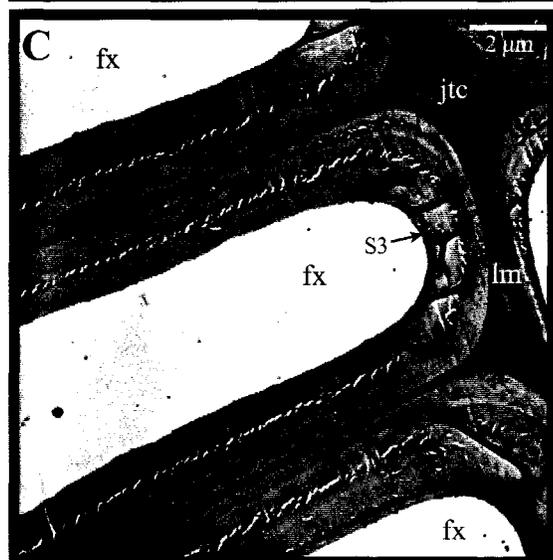
Comparées à ces différentes dicotylédones, le profil de lignification des fibres périphloémiennes du lin se rapproche des fibres primaires du chanvre par la localisation des lignines dans leur paroi. Cette constatation peut être reliée à l'indice élevé de la cristallinité de la cellulose de ces deux fibres périphloémiennes (Focher et al., 2001).

Fibres xylémiennes

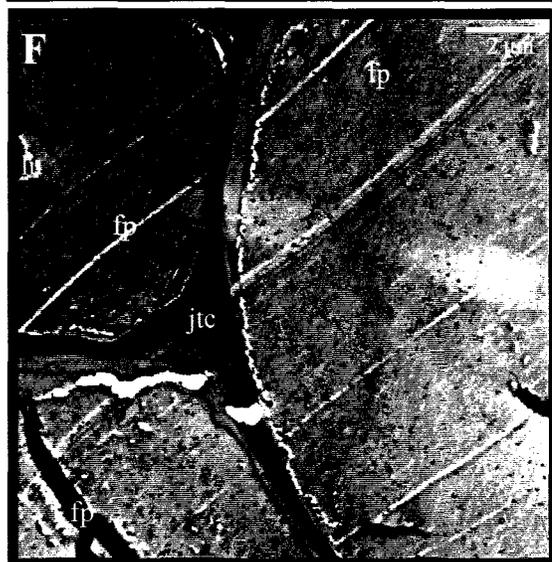
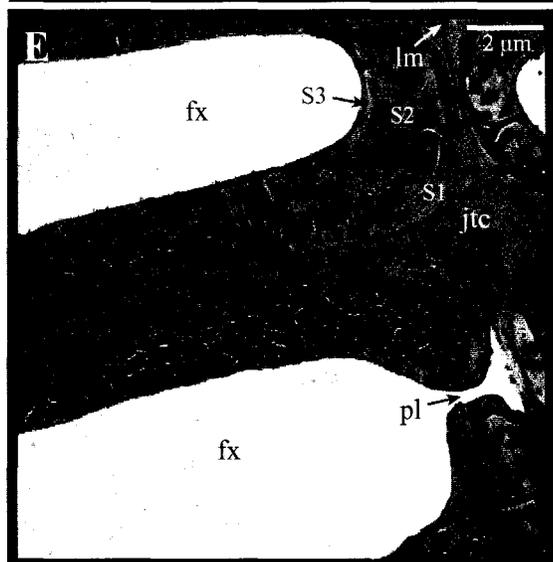
Fibres périphloémiennes



G
Z
l



G
S
Z
l



G
S
Z
t

Figure 53 : Immunomarquages des lignines des fibres xylémiennes (A, C, E) et périphloémiennes (B, D, F).

A et B : Immunomarquages des lignines G de type condensé avec l'immunsérum anti-Gzl. C et D : Immunomarquages avec l'immunsérum anti-GSzl, révélant les lignines condensées de nature G-S. E et F : Immunomarquages des lignines G-S de type non condensé avec l'immunsérum anti-GSzt. fp : fibre périphloémienne; jtc : jonction tricellulaire; lm : lamelle moyenne; lu : lumen; pp : paroi primaire; ps : paroi secondaire; vx : vaisseau xylémien.

IV - ETUDE DES VARIATIONS QUALITATIVES DES LIGNINES AU NIVEAU SUB-CELLULAIRE

Dans cette approche, les trois 3 antisera produits (chapitre 3.2 - b) ont servi de sondes immunologiques au cours de trois immunomarquages différents des lignines. Les tissus xylémiens du lin possédant des caractéristiques communes au bois des dicotylédones (distribution des polysaccharides pariétaux (test PATAg), type de lignines (tests de Maüle et de Weisner)), ont été utilisés comme témoin afin de s'assurer de la qualité du marquage réalisé. De ce fait, les immunomarquages des lignines des fibres périphloémiennes ont été comparés aux résultats visualisés dans le bois au niveau des fibres xylémiennes qui ont la même fonction de soutien. Les photos A et B, C et D, E et F (figure 53) correspondent à 3 expériences d'immunomarquages réalisées avec les anticorps anti-Gzl, anti-GSzl et anti-GSzt respectivement.

4.1 - DISTRIBUTION DES LIGNINES DANS LES FIBRES XYLEMIENNES

Dans ces fibres xylémiennes, chacun trois immunosera présente un profil de marquage caractéristique:

- L'anti-Gzl (photo A) marque la paroi secondaire des fibres xylémiennes de façon relativement homogène, aucune différence n'étant observable entre les 3 sous-couches de cette paroi. En outre, dans la zone mitoyenne composite, cette immunosérum révèle un marquage seulement au niveau des jonctions tricellulaires; la paroi primaire et les lamelles moyennes n'étant pas ou très peu marquées.
- Contrairement au précédent, l'anti-GSzl marque préférentiellement dans la paroi secondaire les sous-couches S1 et la partie externe de S2 (photo C). Le marquage de la zone mitoyenne composite avec cette sonde est opposé à celui observé avec l'anti-Gzl : seules la lamelle moyenne et la paroi primaire sont faiblement marquées.
- L'anti-GSzt, spécifique des lignines de nature G-S de type non condensées, donne un marquage intense dans la paroi secondaire, notamment dans S2 (photo E). Contrairement aux anticorps dirigés contre des épitopes condensés des lignines, l'anti-GSzl ne reconnaît aucun épitope dans la zone mitoyenne composite. La grosseur des signaux visualisés par rapport aux photos A et C s'explique par le procédé d'intensification du marquage trop long dans ce cas.

Le profil de marquage pour chacun des trois antisera utilisés dans les tissus xylémiens du lin est semblable au bois de diverses angiospermes dicotylédones (Burlat et al., 2000; Grünwald et al., 2002). Ces différents immunomarquages, résumés dans le tableau 10, illustrent l'hétérogénéité de la distribution des lignines à l'intérieur des parois cellulaires.

La zone mitoyenne composite et S1 semblent principalement constituées de lignines de type condensé (seul les antisera de la série *zulauf* marque ces zones). L'anti-Gzl étant le seul à marquer les jonctions tricellulaires, ces dernières contiendraient des lignines de nature gäiacycle. Les marquages observés au niveau de S2 indiquent que la lignine constitutive de cette sous-couche est de nature mixte gäiacycle-syringyle. En outre, les profils de marquage observés avec les immunsera GSzt et GSzl suggèrent l'existence, dans la paroi secondaire des fibres xylémiennes, d'une hétérogénéité structurale des lignines, ces dernières présentant un degré de condensation décroissant de S1 à S3. Ces résultats sont en accord avec la distribution des lignines observée dans les fibres xylémiennes de dicotylédones (Terashima et al., 1986a; Fukushima et Terashima, 1990; Terashima et al., 1993).

4.2 - DISTRIBUTION DES LIGNINES DANS LES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

Les résultats obtenus avec ces trois antisera, anti-Gzl, anti-GSzl et anti-GSzt, au niveau des fibres périphloémiennes sont illustrés respectivement par les photos B, D et F, figure 53. La dissociation de la paroi secondaire de la zone mitoyenne composite au niveau de la paroi primaire est un artefact de coupe attestant la grande hétérogénéité de structure et de dureté des différentes couches pariétales des cellules périphloémiennes. Un tel artefact est également rapporté lors d'études cytochimiques de tiges de lin à maturité (Roland et al., 1995).

Pour chacune des trois sondes immunologiques, un marquage est détecté avec une intensité inférieure par rapport aux fibres xylémiennes. Cette comparaison avec les fibres xylémiennes atteste de la plus faible lignification des fibres périphloémiennes et confirme les observations précédentes basées sur la détection des lignines par le permanganate de potassium (figure 53).

- Comme précédemment, (photos E et F, figure 53), l'immunsérum anti-Gzl reconnaît de nombreux épitopes au niveau de la zone mitoyenne composite et en périphérie de la paroi secondaire dans une zone correspondant à S1 (photo B, figure 53). Dans S2, cette sonde immunologique présente un gradient de marquage décroissant vers le lumen de la cellule. S3 n'est pas marquée, contrairement au profil de marquage observé dans les fibres xylémiennes.
- L'anti-GSzl présente par contre un marquage homogène dans S1 et S2, S3 n'étant pas ou très faiblement marquée. En outre, cet immunsérum reconnaît des épitopes dans la lamelle moyenne mais aucun signal n'est détecté dans les jonctions tricellulaires (peu visible sur la photo D mais confirmé). Un tel profil de marquage avec l'immunsérum anti-GSzl est semblable à celui obtenu au niveau des fibres xylémiennes.

- Un intense marquage dans la paroi secondaire est obtenu avec l'anti-GSzt reconnaissant un nombre décroissant d'épitopes de S1 vers l'intérieur de la cellule, S3 étant très faiblement marqué. Un tel gradient de marquage est spécifique aux fibres périphloémiennes. Par contre, le très faible marquage détecté dans la zone mitoyenne composite est identique à la réaction donnée par cette même sonde au niveau des fibres xylémiennes.

L'ensemble de ces observations (tableau 10) confirme la présence de lignines au sein des faisceaux fibreux et permet d'établir un schéma hypothétique de l'hétérogénéité des lignines dans les cellules fibreuses.

Tissus Immunsérum	Fibres périphloémiennes						Fibres xylémiennes					
	jtc	lm	pI	S1	S2	S3	jtc	lm	pI	S1	S2	S3
Gzl	+	++	nd	++	+	-	+	+/-	+/-	++	++	++
GSzl	-	+	nd	++	++	+/-	-	+	+	++	++	+
GSzt	-	-	nd	++	+	-	-	-	-	++	++	++

Tableau 10 : Intensité relative des immunomarquages des lignines par les immunosera anti-Gzl, anti-GSzl et anti-GSzt dans les fibres périphloémiennes et xylémiennes des tiges de lin prélevé au stade capsules brunes. jtc : jonction tricellulaire; lm : lamelle moyenne; pI : paroi primaire; S1, S2, S3 : sous-couches concentriques de l'extérieur vers l'intérieur de la paroi secondaire des fibres. +, ++ : intensité relative du marquage ; - : réponse négative.

L'absence de marquage de la zone mitoyenne composite (jonction tricellulaire, lamelle moyenne et paroi primaire) par l'anti-GSzt indique que les lignines déposées dans cette assise sont de type condensé. Le marquage différent donné par les deux sondes reconnaissant des lignines condensées révèle que les lignines présentent au niveau des jonctions tricellulaires sembleraient être de nature G condensé. Le marquage de la paroi secondaire par les 3 immunosera témoigne de la présence d'une lignine de nature G-S. Cependant, la localisation préférentielle des épitopes reconnus par l'anti-Gzl dans S1 précise que cette sous-couche pariétale est riche en lignines G de type condensé. Considérant le marquage des lignines au permanganate de potassium plus soutenu en périphérie de ces cellules fibreuses, la majorité des lignines présentes au sein des faisceaux fibreux serait de nature G condensée. Ces résultats concordent avec les analyses par microspectrométrie UV et spectrométrie de masse révélant la présence de lignines riches en G autour de certaines cellules fibreuses (Akin et al., 1996b; Morrison III et Akin, 2001). Les lignines de nature G-S, détectées seulement par immunomarquage dans toute la paroi secondaire, représenteraient une fraction mineure expliquant que les réactifs histochimiques et/ou les méthodes dégradatives ne puissent pas la détecter et/ou la caractériser. De plus, ces lignines G-S étant noyées dans la matrice polysaccharidique pariétale pourraient être inaccessibles à ces techniques.

La présence d'une lignine condensée riche en G dans la zone mitoyenne composite et dans S1, et l'incrustation d'une lignine de nature G-S dans S2 rappelle la distribution des lignines établie dans les fibres xylémiennes (Terashima et al., 1993). En effet, d'une manière globale, les fibres périphloémiennes donnent pour chacun des 3 immunosera, un profil de marquage semblable à celui observé dans les fibres xylémiennes. Les dissemblances constatées avec l'anti-Gzl et l'anti-GSzt pourraient s'expliquer par une intensité nettement inférieure du marquage des fibres périphloémiennes en conséquence de leur discrète lignification.

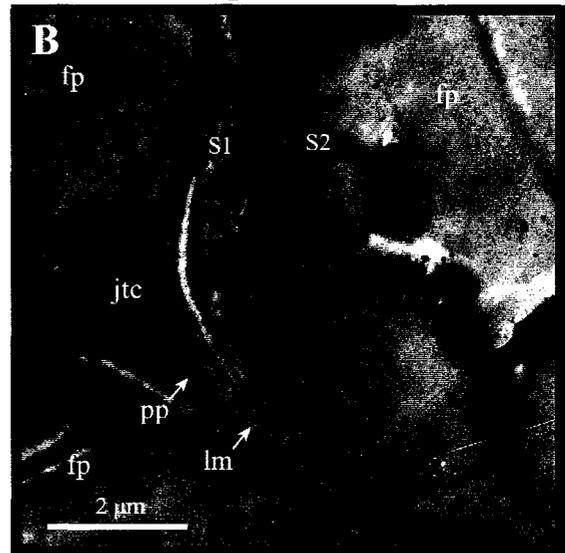
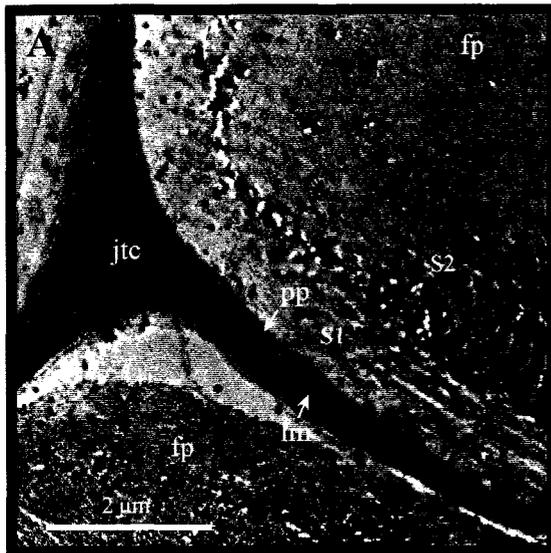
Cette hétérogénéité de la distribution des lignines dans les différentes assises pariétales des cellules fibreuses peut également être rapprochée de l'organisation de la matrice polysaccharidique. Les différences observées entre l'immunomarquage des lignines par les 3 antisera coïncident avec les variations de la composition en polysaccharides pariétaux révélées par les tests PATAg. Or, l'influence de la matrice polysaccharidique sur la mise en place d'un réseau ligneux a été démontrée (Tanahashi et al., 1981; Donaldson, 1994). En effet, les contraintes mécaniques, stériques et chimiques créées par les polysaccharides peuvent affecter la polymérisation des lignines, orientant par exemple les noyaux aromatiques des unités phénylpropénoïques parallèlement aux microfibrilles de cellulose (Atalla et Agarwal, 1985; Guan et al., 1997). La cristallinité élevée de la cellulose constitutive des fibres périphloémiennes et leur richesse en polysaccharides, ~90 % de leur masse sèche (Morvan et al., 1989; Focher, 1992; Keijzer et Metz, 1992; Müller et al., 1998), pourraient constituer un facteur déterminant de leur lignification.

V - EVOLUTION DE LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES PENDANT LEUR MATURATION

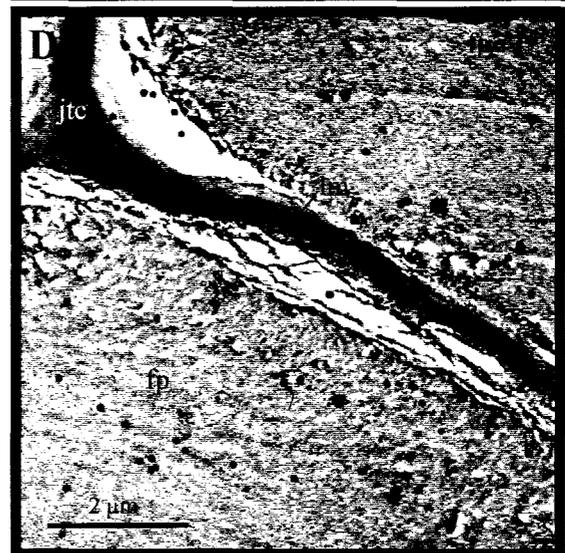
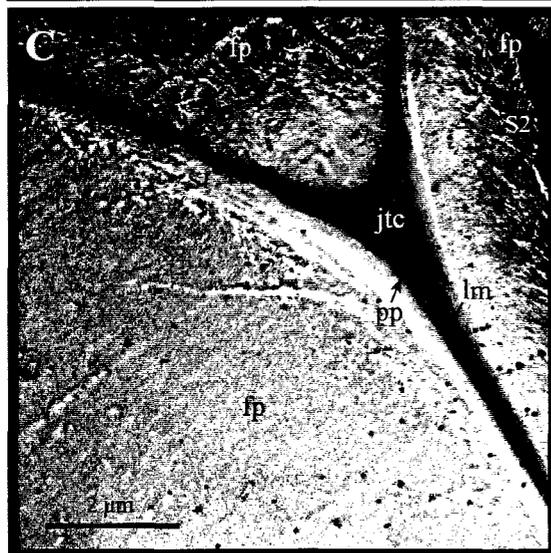
La maturation des fibres de lin pouvant conditionner leur lignification, des prélèvements ont été effectués aux stades floraison (lins âgés de 10 semaines) et capsules brunes (lins de 14 semaines) correspondant respectivement au début et à la fin de la maturation des fibres. L'immunomarquage des lignines a été réalisé comme précédemment avec les 3 antisera à notre disposition (tableau 9). La figure 54 présente les résultats obtenus aux stades floraison (photos A, C, E) et capsules brunes (photos B, D, F). Les immunomarquages du bois ont été observés à chaque stade et pour chaque sonde comme témoin (non montré).

Stade floraison

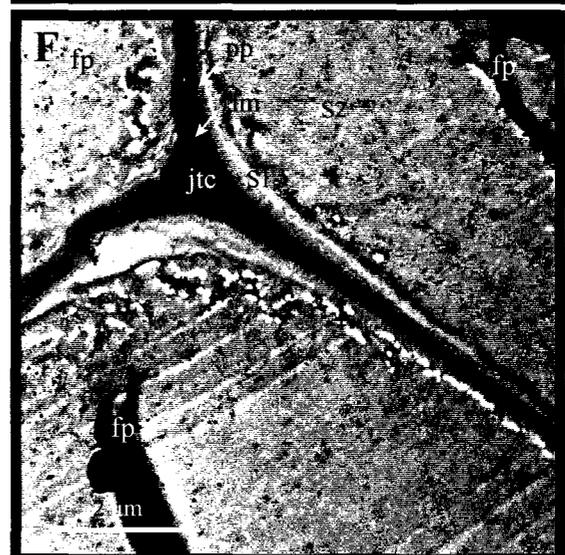
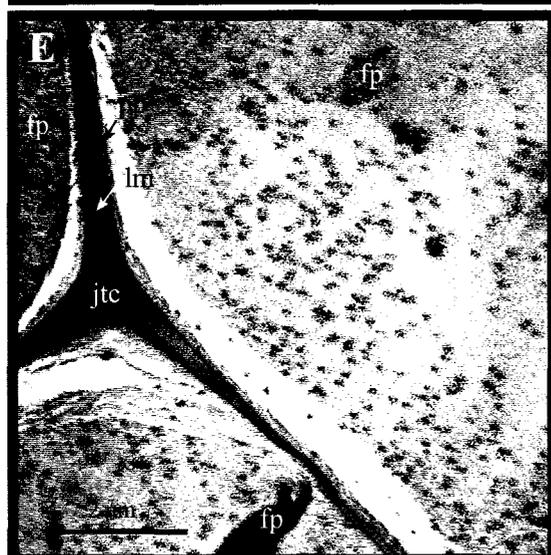
Stade capsules brunes



G
Z
l



G
S
Z
l



G
S
Z
t

Figure 54 : Analyse immunocytochimique de la lignification des fibres périphloémiennes du lin au cours de leur maturation.

A, C, E : Tiges de lin au stade floraison ; B, D, F : Tiges de lin au stade capsules brunes. Immunomarquages des lignines de nature G de type condensé avec l'immunsérum anti-Gzl (A et B), de nature G-S de type condensé avec l'immunsérum anti-GSzl (C et D), de nature G-S de type non condensé avec l'immunsérum anti-GSzt (E et F). Les profils de marquage observés pour chaque immunsérum sont similaires à ceux obtenus précédemment (Figure 53). Quel que soit l'immunsérum utilisé, aucune différence significative du marquage n'est observable entre les deux stades. fp : fibre périphloémienne; jtc : jonction tricellulaire; lm : lamelle moyenne; lu : lumen; pp : paroi primaire; ps : paroi secondaire.

5.1 - IMMUNOMARQUAGES DES LIGNINES AU DEBUT ET EN FIN DU PROCESSUS DE MATURATION

Les profils de marquage des trois anticorps (figure 54) sont similaires à ceux observés précédemment (figure 53, D, D, F). L'anti-Gzl marque la zone mitoyenne composite et la paroi secondaire de façon différentielle : intensément dans S1 et faiblement dans S2. L'anti-GSzl reconnaît, de manière homogène, des épitopes dispersés dans l'ensemble de la paroi secondaire et marque les lignines de la lamelle moyenne mais pas celles des jonctions tricellulaires. L'intense marquage observé avec l'anti-GSzt dans la paroi secondaire contraste avec l'absence de signal au niveau de la zone mitoyenne composite. La taille grossière des signaux observés sur la photo E s'explique par un temps d'intensification du marquage plus long. Comme précédemment les trois immunosera ne reconnaissent pas (anti-Gzl et anti-GSzt) ou très peu (anti-GSzl) d'épitopes dans la région la plus interne de la paroi secondaire, correspondant à S3, au stade capsules brunes.

Pour chaque sonde employée aucune différence de marquage n'est constatable aux deux stades encadrant la maturation des fibres de lin, ces immunomarquages ayant été réalisés simultanément avec la même dilution d'immunsérum. En outre, les intensités de marquage observées pour chaque antisérum semblent similaires quel que soit le stade considéré : floraison et capsules brunes.

5.2 - EVOLUTION DE LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

Considérant la distribution des lignines et l'évolution des immunomarquages au début et en fin de maturation, le processus de lignification des fibres périphloémiennes semblerait s'établir suivant le modèle décrit dans les fibres xylémiennes de dicotylédone (Fukushima et Terashima, 1991; Terashima et al., 1993). L'initiation de la lignification des fibres périphloémiennes débiterait au niveau des jonctions tricellulaires par la polymérisation de lignines de type condensé H puis G expliquant le faible marquage de cette zone par l'anti-Gzl. Ce processus se propagerait ensuite tangentiellement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire avec la formation d'une lignine condensée riche en G, justifiant l'intense marquage obtenu par l'anti-Gzl et le marquage moins dense observé avec l'anti-GSzl. Enfin, la lignification se poursuivrait dans la paroi secondaire de manière centripète (S1 puis S2 puis S3) par la polymérisation de sous-unités G et S dans un flux graduel s'enrichissant en S. Le marquage observé au stade floraison avec l'anti-GSzl pourrait être corrélé à cette dernière phase de la lignification. Ainsi, la maturation des fibres périphloémiennes coïnciderait avec la fin de leur lignification. Une telle cinétique de lignification expliquerait l'absence d'une évolution visible des immunomarquages entre les stades floraison et capsules brunes.

Toutefois, dès le stade floraison, la synthèse de polysaccharides pariétaux augmente brusquement dans les fibres périphloémiennes (Roland et al., 1995). Parallèlement, l'apposition de ces polymères au niveau de leur paroi secondaire conduit à l'épaississement caractéristique de cette dernière puis à l'autolyse du cytoplasme des cellules. Cette évolution pariétale des cellules fibreuses, visible en microscopie optique (non montré), n'a toutefois pas été quantifiée.

L'immunomarquage étant une réaction de surface, il est envisageable que les lignines polymérisées durant cette synthèse accrue de polysaccharides pariétaux soient masquées par cette matrice. Les épitopes de reconnaissance des anticorps n'étant pas accessibles, la lignine synthétisée pendant la maturation des fibres n'est pas détectable se traduisant d'un point de vue expérimental par une absence d'intensification du marquage. Cette hypothèse peut être rapprochée de l'absence d'une évolution visible du discret marquage des zones les plus internes de la paroi secondaire avec l'anti-GSzl (non montré).

Ces observations immunocytochimiques s'opposent aux conclusions rapportées suite à la détection des lignines par autofluorescence suggérant que la lignification des fibres périphloémiennes du lin débiterait à partir du stade floraison (Roland et al., 1995). Ces auteurs précisent que ce processus se poursuit ensuite pendant 2 à 4 semaines au cours de l'intense activité cellulaire liée à la maturation des fibres. L'immunomarquage des lignines réfute cette datation de l'initiation de la lignification en montrant qu'au stade floraison l'incrustation des lignines dans les zones mitoyennes et les parois secondaires des cellules fibreuses périphloémiennes a déjà eu lieu (photos A, C, E, figure 54). Ce constat est corrélé aux résultats des analyses de la lignification des fibres périphloémiennes par la mesure de l'activité de peroxydases pariétales parallèlement à l'emploi du test de Weisner. Ces travaux ont permis de détecter la lignification des fibres périphloémiennes de lin dès la 5^{ème} semaine de croissance et d'apprécier l'évolution de ce processus : croissante jusqu'à la formation des premiers bourgeons floraux (~2 semaines avant la floraison), stationnaire jusqu'à la floraison puis décroissante (Tiver, 1942; McDougall, 1991;1992).

En conclusion, la lignification des fibres périphloémiennes du lin est bien antérieure au stade floraison. Ce processus serait lié à la formation de la paroi secondaire des fibres et s'effectuerait avec une intensité soutenue jusqu'au stade floraison puis serait plus faible durant le remplissage des fibres. Les immunosera utilisés dans cette étude ne permettant pas de visualiser les lignines synthétisées au cours de la maturation des fibres (masquage et/ou reconnaissance partielle des épitopes), ces lignines pourraient être riches en unités S et en structures non-condensées. Une approche chimique globale doit être envisagée, elle complètera cette étude microscopique et permettra d'apprécier l'évolution éventuelle de la lignification au cours de la maturation des fibres.

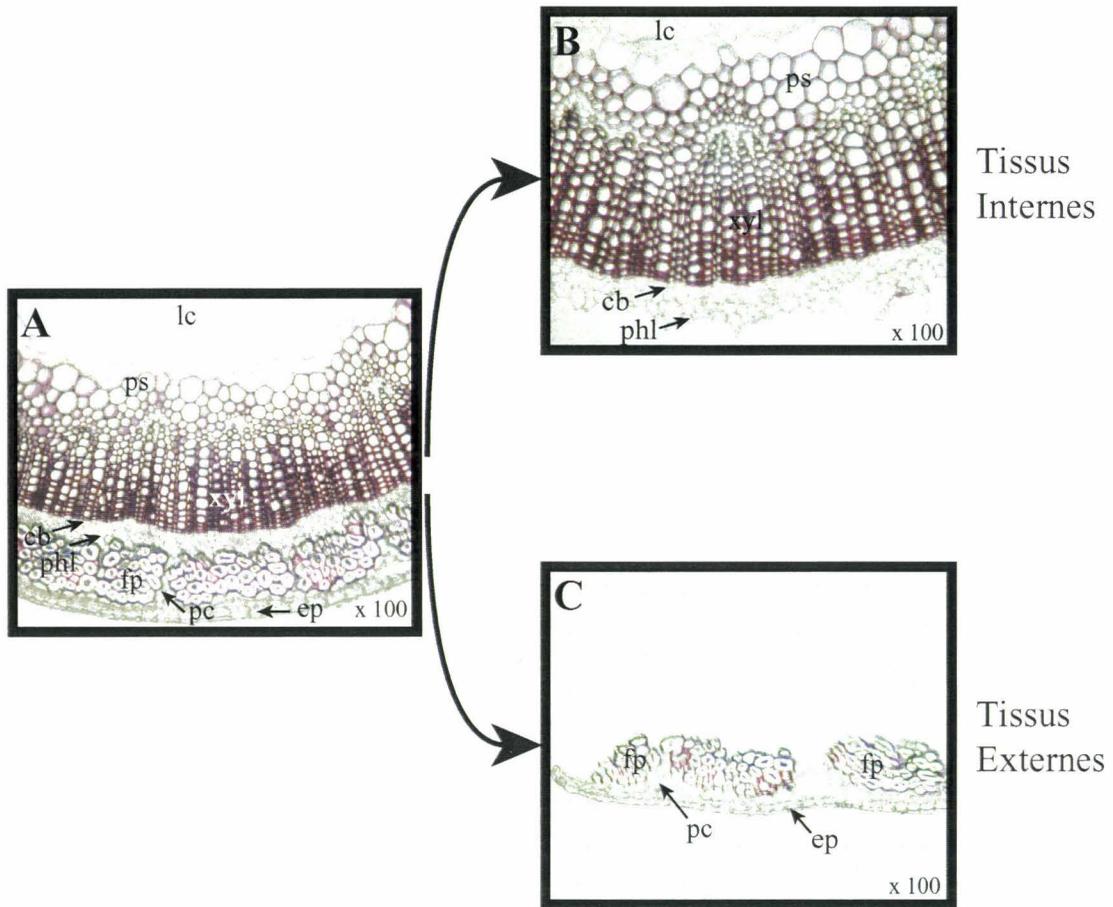


Figure 55 : Définition du matériel végétal utilisé dans les analyses ultérieures.

A, B, C : Coupes transversales de tige de lin soumises au test de Weisner (phloroglucinol-HCl) avant (A) et après séparation du bois (B) des tissus plus périphériques contenant les fibres périphloémiennes (C) dénommés respectivement tissus internes et tissus externes. La séparation entre ces tissus se réalise au niveau du phloème. Les tissus externes, riches en fibres, incluent également l'épiderme, la cuticule et le parenchyme corticale (C). ep : épiderme; pcort : parenchyme cortical; fp : fibres périphloémiennes, phl : phloème secondaire; cb : cambium; xyl : xylème secondaire ou bois; psec : parenchyme secondarisé; lc : lacune centrale.

B – CARACTERISATION DES LIGNINES ET DE LEURS PRECURSEURS DANS LA TIGE DE LIN AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

Les études (immuno-)cytochimiques de la distribution des lignines dans la tige de lin ont révélé de grandes disparités tant tissulaires (xylème / fibres périphloémiennes), que cellulaires (zone mitoyenne composite / paroi secondaire). Cette "inhomogénéité" des lignines illustre parfaitement le concept introduit pour la première fois dans le titre de l'ouvrage de Sarkanen et Ludwig (1971a) : le pluriel "Lignins". Cette formulation vise à rendre compte de la mise en évidence de plusieurs types de lignines. Cette complexité a été l'instigatrice de très nombreuses recherches qui ont conduit au développement de techniques chimiques permettant leur caractérisation. De telles méthodes doivent être sélectives, sensibles et adaptées à la diversité des échantillons lignocellulosiques. Toutefois aucune d'entre elles ne peut se définir comme une méthode de référence universelle et, par conséquent, la meilleure appréhension des lignines est révélée grâce à l'application de diverses approches analytiques.

L'analyse des lignines de la tige de lin, présentée dans ce chapitre, a été réalisée en différenciant les tissus internes principalement composés du xylème secondaire (*i.e.* du bois), des tissus externes riches en fibres périphloémiennes. Après une estimation de la teneur en lignines dans ces deux tissus par les méthodes du bromure d'acétyle et de Klason ; ce polymère a été caractérisé par des réactions d'oxydation (nitrobenzène) et de solvanolyse (thioacidolyse).

I - DEFINITION DU MATERIEL VEGETAL UTILISE EN RELATION AVEC LA LIGNIFICATION DES TIGES DE LIN

L'étude microscopique a permis d'apprécier dans la tige de lin la distribution des lignines. Ces dernières sont uniquement détectées par les techniques histochimiques dans le bois et les faisceaux fibreux périphloémiens. Le processus de lignification apparaît nettement plus intense dans le xylème par rapport aux fibres périphloémiennes. Par conséquent, la séparation de ces deux tissus s'avère indispensable lors des analyses chimiques afin d'appréhender la discrète lignification des fibres périphloémiennes. Une telle méthodologie a été employée par différents auteurs pour l'étude de ces mêmes fibres (McDougall, 1992; Gorshkova et al., 2000; Morrison et Akin, 2001).

La séparation des tissus périphériques contenant les fibres, des tissus plus internes de la tige composés essentiellement de bois s'effectue toujours au niveau du phloème. Ces tissus seront respectivement dénommés tissus externes et tissus internes, dans la suite de ce mémoire. La figure 55 illustre cette opération effectuée lors du prélèvement du matériel végétal et atteste de la non-contamination des tissus externes par du bois. De ce fait, les résultats des analyses chimiques des lignines obtenus sur ces tissus internes et externes seront spécifiques au bois, utilisé comme témoin, et aux fibres périphloémiennes respectivement.

II - DOSAGE DES LIGNINES PRESENTES DANS LA TIGE DE LIN AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

La détermination des teneurs en lignine dans les tiges de lin s'appuie sur deux méthodes distinctes :

- Une méthode spectrophotométrique basée sur la dégradation des lignines par le bromure d'acétyle en produits solubles lesquels sont ensuite quantifiés grâce à leur absorbance dans l'UV à 280 nm (Johnson et al., 1961).
- Une méthode gravimétrique basée sur l'isolement d'un résidu solide après hydrolyse acide des polysaccharides pariétaux selon la technique Klason (Effland, 1977).

1.1 - ESTIMATION DE LA TENEUR EN LIGNINE PAR LA METHODE DU BROMURE D'ACETYLE.

Cette technique spectrophotométrique développée par Johnson et al. (1961) sur le bois a été révisée et adaptée aux plantes herbacées par Iiyama et Wallis (1988 et 1990). Ces derniers ont déterminées et validées expérimentalement, sur du bois de feuillus et de conifères, la longueur d'onde employée, 280 nm, et la valeur du coefficient d'extinction massique (ϵ) de la lignine, $20 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

a - Les teneurs en lignines dans les tissus externes et internes

Les résultats obtenus à partir des résidus pariétaux des tissus externes et internes des tiges de lin sont présentés sur la figure 56. Les teneurs en lignines sont fortement variables en fonction des tissus considérés et ce, quel que soit le stade de développement : les tissus internes sont en moyenne 9 fois plus riches en lignines que les tissus externes. En effet, la teneur moyenne dans ces derniers est de l'ordre de 2,9 % de la masse sèche des résidus pariétaux tandis que les

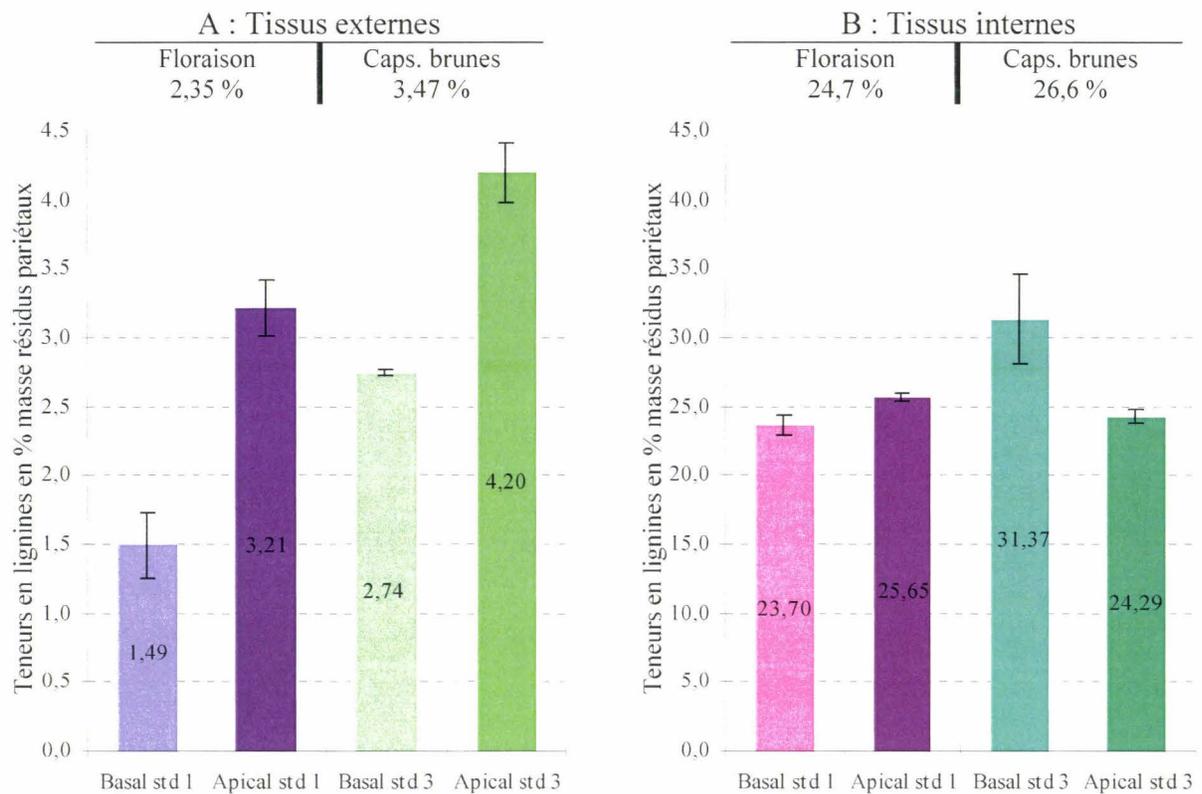


Figure 56 : Teneurs en lignines estimées par la méthode du bromure d'acétyle dans les tissus externes (A) et les tissus internes (B) des tiges de lin aux stades floraison et capsules brunes, *i.e.* stades 1 et 3 respectivement. Les résultats sont exprimés en % de la masse de résidus pariétaux secs et sont la moyenne de trois analyses séparées. Les barres représentent l'écart à la moyenne.

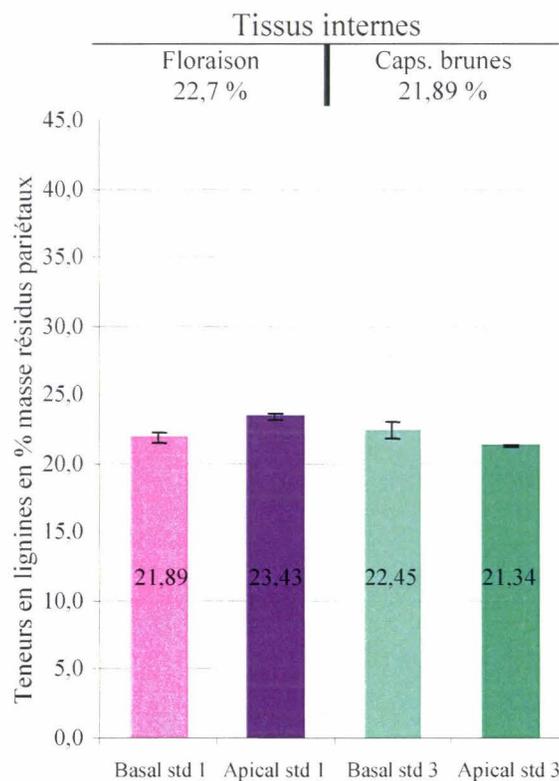


Figure 57 : Teneurs en lignines Klason dans les tissus internes de tige de lin aux stades floraison et capsules brunes. Les résultats sont exprimés en % de la masse de résidus pariétaux et sont la moyenne de trois analyses séparées. Les barres représentent l'écart à la moyenne.

lignines des tissus internes représentent environ 25,6 %. La confirmation par microscopie de l'absence de contamination par du bois des tissus externes lors de la séparation de ces deux tissus (figure 55) atteste que les teneurs en lignines mesurées dans les tissus riches en fibres sont bien spécifiques de ces derniers.

Dans les tissus externes (figure 56, A), le pourcentage de lignines présente de plus fortes variations en comparaison du bois. Ces différences, les teneurs en lignines variant de 1,49 % (basal stade 1) à 4,20 % (apical stade 3), se retrouvent tant au niveau spatiales que temporelles. Concernant les niveaux de tige, la proportion de lignines déterminée dans les fragments apicaux est nettement plus élevée par rapport aux fragments basaux : environ 2 fois plus au stade 1 et 1,5 fois plus au stade 3. D'un point de vue temporel, la maturation des fibres est liée à une augmentation de leurs teneurs en lignines : les fragments basaux présentent la plus forte évolution, 83 %, par rapport aux fragments apicaux, 30 %.

Dans les tissus internes (figure 56, B), les teneurs en lignines sont plus homogènes et s'échelonnent de 23,70 % (basal stade 1) à 31,37 % (basal stade 3). D'un point de vue spatial, seule une variation significative des proportions de lignines apparaît au stade 3 : les fragments basaux sont 1,3 fois plus riches en lignines que les fragments apicaux. D'un point de vue temporel, le pourcentage en lignines dans les tissus internes augmente significativement de 32,4 % dans les fragments basaux contrairement aux fragments apicaux dans lesquels il varie peu.

b - Estimations des artefacts potentiels

α - Le coefficient d'extinction molaire: ϵ

La teneur en lignines des échantillons est calculée en utilisant la formule de Beer-Lambert. La longueur d'onde choisie correspond au maximum d'absorption de la lignine solubilisée par le bromure d'acétyle (Johnson et al., 1961; Iiyama et Wallis, 1988). La valeur du coefficient d'extinction massique de la lignine à 280 nm, *i.e.* ϵ , considéré dans les calculs constitue un paramètre essentiel du dosage. Initialement déterminée à 23.6 g⁻¹.L.cm⁻¹ pour les lignines de dicotylédones ligneuses, la valeur de ce coefficient varie en fonction des proportions de sous-unités G et/ou S (Johnson et al., 1961). L'analyse par diverses techniques de lignines extraites de monocotylédones et de dicotylédones a montré que l'addition d'acide perchlorique au mélange réactionnel permet de standardiser cet ϵ à 20 g⁻¹.L.cm⁻¹ (Iiyama et Wallis, 1990). Dans nos essais, de la lignine extraite est utilisée à chaque dosage afin de vérifier cette valeur de ϵ et également de valider la réactivité du bromure d'acétyle.

β - L'acide perchlorique

La quantification des lignines dans la tige de lin est effectuée en additionnant de l'acide perchlorique au mélange réactionnel (Iiyama et Wallis, 1988). Ce réactif améliore la solubilité des échantillons en favorisant la dégradation des polymères pariétaux (Iiyama et Wallis, 1990). Cette meilleure solubilité peut cependant conduire à une surestimation des teneurs en lignines. De récents travaux sur la luzerne montrent que l'augmentation de l'absorbance lors de l'ajout d'acide perchlorique peut être liée à la dégradation de certains polysaccharides pariétaux (Hatfield et al., 1999; Fukushima et Hatfield, 2001). En particulier, la dégradation des xylanes génère des composés de type furfural et alcool furfuryl dont le maximum d'absorption se situe à 280 nm.

Ainsi, afin de vérifier une potentielle surestimation des teneurs en lignines dans les tiges de lin suite à l'ajout d'acide perchlorique, un contrôle a été réalisé dans des conditions de dosage similaires excepté l'omission de ce réactif dans le mélange réactionnel. Les résultats obtenus (non montrés) présentent globalement une baisse des teneurs en lignines ; en particulier dans les tissus externes au niveau des fragments apicaux où les valeurs sont ~30 % inférieures aux teneurs déterminées en présence d'acide perchlorique. Cette diminution a déjà été mentionnée dans le cas de plantes herbacées et ligneuses (Iiyama et Wallis, 1990). Malgré ces observations, ces auteurs, caractérisant des lignines extraites, concluent que l'addition d'acide perchlorique au mélange réactionnel fournit les valeurs les plus exactes du dosage des lignines.

 *γ - Les protéines pariétales**Interférence des protéines pariétales*

L'interférence de protéines pariétales riches en acides aminés aromatiques peut être envisagée, les protéines absorbant à 280 nm (Morrison, 1976; Iiyama et Wallis, 1990). De ce fait, l'estimation de la teneur en protéine dans les résidus pariétaux s'est avérée être un prérequis pour la validation des résultats obtenus lors des dosages des lignines, notamment dans les tissus externes peu lignifiés.

Estimation des teneurs en protéines pariétales dans les tissus externes

Les teneurs en protéines des résidus pariétaux sont estimées à partir des teneurs en azote mesurées dans les tissus externes par la méthode de Dumas (1831). Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Stades de prélèvement	Stade 1	Stade 3
Fragments de tige		
Basal	2,84 ± 0,16	1,25 ± 0,06
Apical	6,25 ± 0,06	2,13 ± 0,01

Tableau 11 : Estimation des teneurs en protéines dans les tissus externes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la masse de résidus pariétaux secs et sont la moyenne de 3 dosages séparés

De fortes variations des teneurs en protéines sont notées en fonction des stades et des niveaux de tiges échantillonnés. Les tissus prélevés au stade floraison sont les plus riches en protéines, jusqu'à 6,25 % de la masse sèche de résidus pariétaux au niveau apical, tandis que le stade capsule brune présente un maximum de 2,13 % et ce, pour un même niveau de tige. Les fragments basaux renferment les teneurs les plus faibles en protéines, 1,49 % et 1,25 % pour les stades 1 et 3 respectivement. Une telle évolution des teneurs en protéines est similaire à celle mesurée dans les résidus pariétaux des tissus externes riches en fibres périphloémiennes du kénaf (Neto et al., 1996). Ces résultats pourraient résulter d'un métabolisme cellulaire plus intense au niveau des parties juvéniles des tiges.

Comparaison avec les teneurs en lignines

La comparaison des proportions de protéines avec les teneurs en lignines (Figure 56, A) montre une évolution similaire: quel que soit le stade de développement, les valeurs les plus importantes sont enregistrées au niveau des fragments apicaux. Plus précisément, les ratios traduisant l'augmentation des teneurs en protéines et en lignines entre les fragments basaux et apicaux sont respectivement de 2,20 et de 2,15 au stade floraison et de 1,70 et de 1,53 au stade capsules brunes. Ces résultats suggèrent une possible interférence des protéines pariétales avec les dosages des lignines par la méthode du bromure d'acétyle. Les variations des teneurs en lignines dans les tissus externes des tiges de lin seraient donc à considérer avec prudence.

Une telle interférence protéique dans le dosage des lignines au bromure d'acétyle serait cependant à modérer. Différentes études ont en effet établi que l'absorption des acides aminés aromatiques est fortement réduite après traitement au bromure d'acétyle avec ou sans acide perchlorique (Morrison, 1972; Iiyama et Wallis, 1990).

De plus, parmi les différentes protéines pariétales, représentant en général 10 à 15 % de la masse pariétale sèche, seules les extensines possèdent un motif conservé riche en tyrosine (Cassab et Varner, 1988; Carpita, 1996; Cosgrove et al., 2002). Ces dernières sont notamment présentes dans les parois primaires des cellules où elles constituent au maximum 5 % de la masse pariétal (Fry, 1988). Dans les fibres périphloémiennes du lin, les principales protéines constitutives ont été identifiées comme des AGP et des GRP (deux classes de protéines pauvres en acides aminés aromatiques), représentant respectivement 0,1 % et 1 % de la masse des fibres (Girault et al., 2000).

L'ensemble de ces remarques suggère l'intervention d'une très faible proportion d'acides aminés aromatiques dans les résidus pariétaux de lin susceptible d'interagir avec la quantification des lignines.

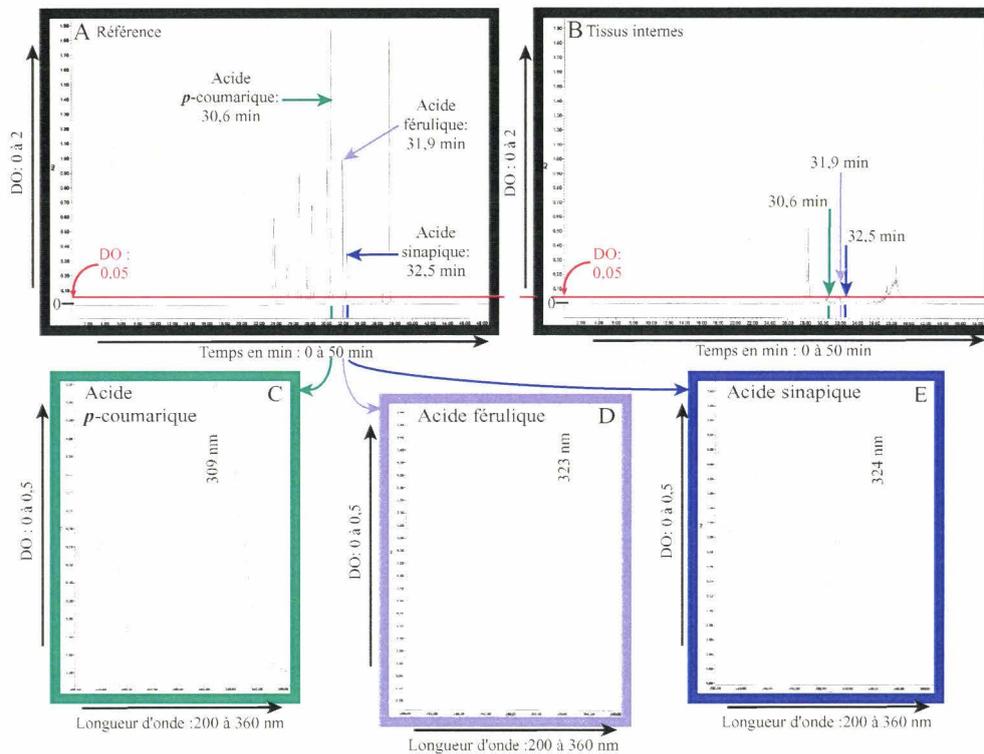


Figure 58 : Chromatogramme en HPLC à 301,9 nm des acides phénoliques présents dans une solution de référence (A) et libérés par hydrolyse alcaline dans un échantillon représentatif des tissus internes : basal, stade floraison (B).

Profil UV des acides *p*-coumarique (C), férulique (D) et sinapique (E) entre 200 et 360 nm, exprimé en unité d'absorbance.

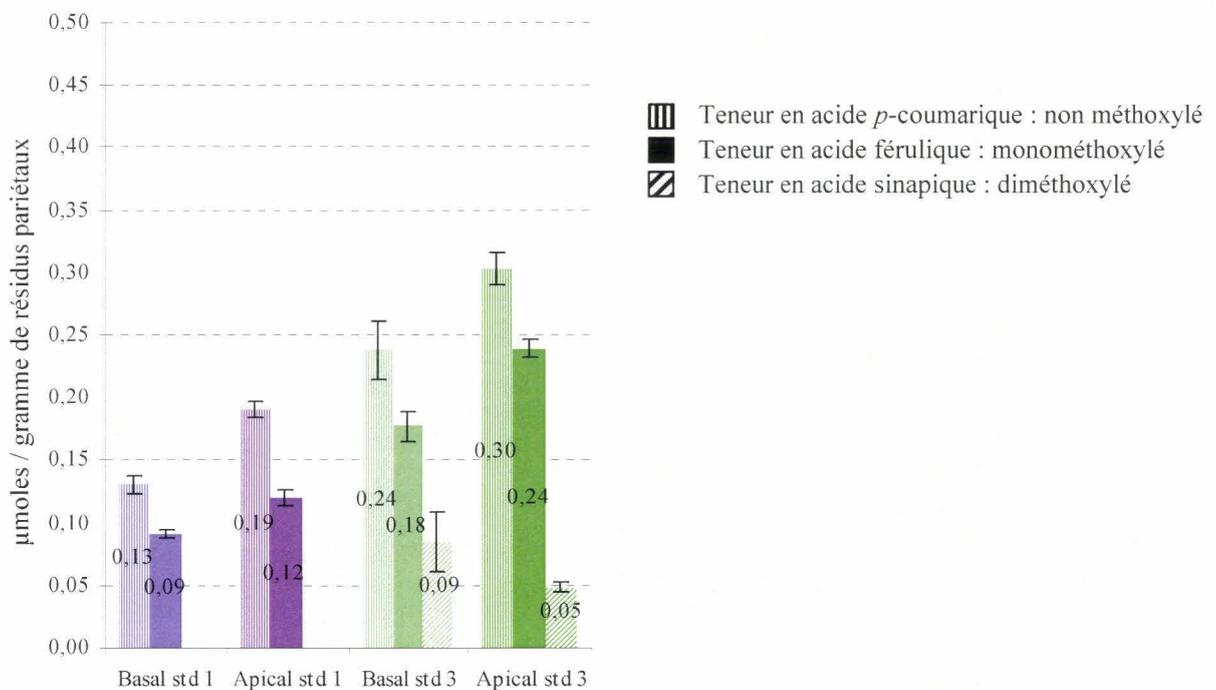


Figure 59 : Composition et teneur des acides phénoliques libérés par hydrolyse alcaline dans les tissus externes de tige de lin aux stades floraison et capsules brunes. Les résultats sont exprimés en micromoles par gramme de résidus pariétaux et sont la moyenne de trois analyses séparées. L'écart par rapport à la moyenne est schématisé par une barre.

δ - Les acides phénoliques pariétaux

Interférence des acides phénoliques pariétaux

Les acides phénoliques présents dans les échantillons peuvent également induire une erreur par excès car ils absorbent dans l'UV à 280 nm (Morrison, 1972). Ces composés pouvant être liés de façon covalente à des polymères pariétaux (Iiyama et al., 1990), ils ne sont pas totalement éliminés lors de la préparation des résidus pariétaux. De ce fait, leur quantification s'avère nécessaire avant toute conclusion concernant les teneurs en lignines mesurées.

Teneurs en acides phénoliques pariétaux

▪ Dans les tissus internes

Le chromatogramme figure 58 illustre le profil d'élution d'un échantillon caractéristique des tissus internes : quel que soit le niveau de tige et/ou le stade de prélèvement, aucun pic ayant une absorbance supérieure à 0,05 n'est présent dans ces tissus. Cette valeur d'absorbance correspond à une teneur moyenne en acides phénoliques de 0,01 μ moles/gramme de résidus pariétaux. En dessous de ce seuil, leur identification et leur quantification ne sont pas possibles. Les données obtenues indiquent que le bois des tiges de lin ne contient que des traces d'acides phénoliques.

▪ Dans les tissus externes

Dans les tissus externes, seuls les acides *p*-coumarique, férulique et sinapique sont identifiables et quantifiables (figure 59). Leur proportion reste cependant très faible : le maximum enregistré est de 0,30 μ moles/gramme de résidus pariétaux (acide *p*-coumarique, apical, stade 3). Les acides *p*-coumarique et férulique constituent les acides hydroxycinnamiques majoritaires; l'acide *p*-coumarique étant présent à des teneurs plus élevées que l'acide férulique. Leur profil de variation quantitative est identique et révèle une évolution croissante des niveaux basaux à apicaux et des stades 1 à 3. De ce fait, le rapport acide *p*-coumarique : acide férulique varie peu : il est compris entre 0,6 : 1 (apical stade 3) et 0,8 : 1 (apical stade 1). En plus de ces deux acides phénoliques, les tissus externes prélevés au stade 3 contiennent de l'acide sinapique en moindres quantités (maximum de 0,09 μ moles/gramme de résidus pariétaux). Contrairement aux acides *p*-coumarique et férulique, les teneurs en acide sinapique diminuent entre les fragments basaux et apicaux.

▪ Discussion des teneurs mesurées

Comparées aux monocotylédones, les teneurs en acides phénoliques enregistrées dans les tissus externes des tiges de lin sont considérablement faibles. Pour exemple, chez certaines graminées (blé), les proportions d'acides phénoliques peuvent atteindre 0,3 % de la masse de résidus pariétaux (Lempereur et al., 1997). Chez le lin, les teneurs maximales globales enregistrées dans un

échantillon sont de 0,6 μ moles/gramme de résidus pariétaux soit 0,012 % de la masse pariétale (apical stade 3). Ces faibles valeurs sont caractéristiques des dicotylédones (Iiyama et al., 1990; Ishii, 1994; 1997a). La prédominance des teneurs en acides *p*-coumarique et férulique dans les résidus pariétaux des tiges de lin est conforme à la composition des parois d'angiospermes (Wallace et Fry, 1994). En outre, l'augmentation des teneurs en monomères phénoliques au cours de la maturation des fibres périphloémiennes s'accorde avec le rôle potentiel de ces composés, identifié chez les monocotylédones notamment, dans la lignification des tissus (He et Terashima, 1989; Jacquet et al., 1995; Ralph et al., 1995; Ward et al., 2001). Enfin la présence d'acide sinapique peut être assimilé comme une caractéristique du lin ou de cette famille de plante, cet acide phénolique étant rarement détecté chez les dicotylédones (Bate-Smith, 1962).

Les proportions d'acide phénolique déterminées dans les tissus externes diffèrent des résultats de précédentes analyses d'échantillons similaires. Les divergences du mode d'obtention des résidus pariétaux et de la méthode destinée à la caractérisation des acides phénoliques pourraient expliquer la grande hétérogénéité des résultats. En omettant d'éliminer les acides phénoliques extractibles, *i.e.* présent dans le cytoplasme (Akin et al., 1996a; Morrison III et Akin, 2001) ou en retenant une méthode susceptible de libérer des monomères à partir des lignines, l'oxydation cuprique (Lozovaya et al., 1999; Gorshkova et al., 2000), l'identification et la quantification des acides phénoliques pariétaux peuvent être erronées et surestimées. Ces données de la littérature sont donc difficilement comparables aux résultats présentés ci-dessus. La prédominance des acides *p*-coumarique et férulique est retrouvée dans les tiges de kénaif (Seca et al., 1998; Morrison et al., 1999) avec des teneurs également très faibles (Lam et al., 2003). Cependant dans cette plante et contrairement au lin, ces acides phénoliques sont aussi présents dans le bois.

Comparaison avec les teneurs en lignines

Ces analyses révèlent de très faibles teneurs en acides phénoliques dans les tissus externes et internes des tiges de lin. De plus, parmi les trois acides hydroxycinnamiques détectés, les acides *p*-coumarique et férulique sont majoritaires. Ces composés possèdent un maximum d'absorption dans l'UV à 312 nm et à 322 nm respectivement (Harris et Hartley, 1976). L'acétylation de ces composés par le bromure d'acétyle induit une très forte réduction à 280 nm de leur ϵ (Iiyama et Wallis, 1989) lequel devient inférieur à celui de la lignine: le ϵ des acides férulique et *p*-coumarique passe respectivement de 65 à 15.8 $\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ et de 88 à 11 $\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Iiyama et Wallis, 1990).

En conclusion, l'interférence des acides phénoliques pariétaux lors du dosage des lignines paraît négligeable et ne modifierait pas sensiblement les teneurs en lignines mesurées.

ε - Conclusion

Considérant l'ensemble des artéfacts potentiels liés à la méthode du bromure d'acétyle en présence d'acide perchlorique, les teneurs en lignines ci-présentées pour les tissus externes et internes des tiges de lin semblent refléter une estimation juste de la lignification des fibres périphloémiennes et du xylème respectivement. Compte tenu des faibles teneurs en lignines et des résultats constatés suite au dosage des lignines sans acide perchlorique, les variations constatées entre les différents niveaux de tige dans les tissus externes peuvent être modérées. Par ailleurs, ces résultats seront confrontés aux données obtenues avec une méthode de quantification des lignines basée sur un principe différent.

1.2 - DETERMINATION DES TENEURS EN LIGNINES PAR LA METHODE KLASON

Lorsque des tissus végétaux lignifiés sont traités par de l'acide sulfurique, les polysides sont hydrolysés et dissous (Klason, 1908). Le résidu insoluble correspond par définition aux lignines acido-insolubles. Ce type de dosage, couramment employé en chimie végétale, est choisi dans le cas du bois comme standard ; les lignines ainsi déterminées sont dite "lignines Klason". Cette fraction correspond à la masse du résidu insoluble dans l'acide sulfurique après correction de la teneur en cendres.

Dans un premier temps, cette technique a été utilisée pour quantifier les lignines dans les tissus internes (figure 57). Dans ces derniers, les teneurs en lignines "Klason" varient peu selon l'échantillon et s'échelonnent entre 21,34 % (apical stade capsule brune) et 23,43 % (apical stade floraison) pour une moyenne d'environ 22,3 %. Ces fluctuations rappellent les résultats obtenus par la technique UV/bromure d'acétyle; toutefois, les valeurs des lignines "Klason" dans le bois sont plus faibles, en particulier au stade 3 (baisse de 12 % environ).

Par la suite, la technique Klason a été employée avec les tissus externes. Les résultats obtenus sont aberrants et absolument pas reproductibles (données non montrées). Ces résultats révèlent que cette méthode est inappropriée à la quantification des lignines dans les tissus peu lignifiés. Ce constat, précédemment dénoncé chez diverses plantes annuelles et/ou bois juvéniles, a été corrélé à la richesse de ces tissus en hémicelluloses et en protéines (Morrison, 1976; Dence, 1992).

De nombreux travaux ont rapporté des erreurs par excès résultant principalement de la présence de protéines et/ou d'hémicelluloses de type xylanes pouvant précipiter avec les lignines (Norman et Jenkins, 1934a;1934b). Les produits de dégradation de ces polysaccharides, sous forme furfural et hydroxy-méthylfurfural sont insolubles dans le mélange réactionnel. Seule une préhydrolyse permet d'atténuer ces surestimations en solubilisant les hémicelluloses et les protéines pariétales.

Toutefois, Monties et al. (1984a) ont montré qu'au cours de cette étape une fraction des lignines était entraînée engendrant à terme une erreur par défaut des teneurs en lignines.

Par ailleurs, la méthode Klason peut également conduire à une sous-estimation des teneurs en lignines. En effet, une fraction des lignines, dite lignines acido-solubles, non précipitables après traitement à l'acide sulfurique concentré est perdue lors de l'analyse (Monties, 1984a). Cette fraction peut représenter, dans le bois des dicotylédones, 3 à 5 % de la teneur globale en lignines (TAPPI Official Test Method T222 om-83, 1983). Dans le bois de la ramie, une plante riche en fibres périphloémiennes, cette fraction acido-soluble représente 4,1 % de la teneur globale en lignines (Angelini et al., 2000).

1.3 - DISCUSSION

a - Comparaison des deux méthodes employées pour le dosage des lignines

Considérant les limites de chaque méthode, les teneurs en lignines dans les tissus internes estimées par les techniques Klason et UV/bromure d'acétyle présentent de grandes similitudes : i. même ordre de grandeur, 22,3 % et 25,6 % respectivement et ii. une faible évolution en fonction des stades et des niveaux de tiges. Une telle corrélation entre ces deux méthodologies a été rapportée par Dence (1992) dans le cas du pin et de l'eucalyptus. Un coefficient comparatif de 0,97 a également été déterminé dans les tiges de kénaf (Bagby et al., 1973). Les techniques Klason et UV/bromure d'acétyle apparaissent comme des méthodes standards pour la quantification des lignines et sont par conséquent utilisées comme référence pour la validation et/ou la calibration d'autres procédures : IFTR (Silva et al., 1999), DRIFTR (Pappas et al., 1998), C^{13} RMN (Leary et al., 1986) pour exemples. La technique Klason est référencée comme la plus précise pour l'étude de la lignification des fourrages en relation avec leur digestibilité (Jung, 1997; Jung et al., 1997). En outre, cette technique reste la plus employée pour la détermination de la teneur en lignines dans les espèces ligneuses. Toutefois, Yokoyama et al. (2002) jugent la méthode UV/bromure d'acétyle comme la plus adaptée pour la quantification des lignines dans des fibres lignifiées. Dans ce sens, la détermination des teneurs en lignines dans des échantillons faiblement lignifiés tels que les tissus externes des tiges de lin est possible et reproductible.

Les techniques Klason et UV/bromure d'acétyle possèdent cependant une même limite: le degré de méthylation des lignines influence leur solubilisation dans l'acide sulfurique (Musha et Goring, 1974) et le bromure d'acétyle (Saka et al., 1988) respectivement. En effet, plus le ratio méthoxyl/ C_9 augmente, *i.e.* plus les lignines sont riches en sous-unités diméthoxylées (syringyles), plus elles sont solubles. Les conséquences de cette augmentation de solubilité des

lignines sont opposées entre la méthode Klason et UV/bromure d'acétyle. Dans le premier cas, elle réduit la fraction acido-insoluble et donc les teneurs en lignines Klason; dans le second cas, elle favorise une augmentation des quantités en lignines.

b - Etude comparative des teneurs en lignines dans les tiges de lin

Les lignines présentes dans les tissus externes riches en fibres sont quantifiables uniquement par la méthode UV/bromure d'acétyle. Les faibles teneurs mesurées dans ces tissus périphériques contrastent fortement avec la forte lignification des tissus internes principalement composés de bois. Ces données concordent parfaitement avec les résultats obtenus précédemment lors des marquages (immuno-)cytochimiques des lignines : le discret marquage des lignines dans les fibres se traduit d'un point de vue chimique par des teneurs en lignines comprises entre 1,5 % et 4,2 % de la masse sèche des résidus pariétaux. Par opposition, l'intense marquage observé dans les tissus internes correspond à des proportions de lignines d'environ 22 % - 26 % suivant la méthode utilisée, Klason, UV/bromure d'acétyle respectivement. En outre, ces analyses chimiques spatio-temporelles révèlent dans les tissus internes une faible évolution de la lignification entre les deux stades de prélèvement indiquant qu'à la floraison la formation du bois est quasiment achevée ou n'évolue plus sensiblement. Par contre, dans les tissus externes, une forte augmentation de la teneur en lignines, d'environ 47,6 %, est constatée entre les stades floraison et capsules brunes. Une telle évolution des teneurs en lignines dans les tissus externes des tiges de lin est en accord avec les augmentations de 30 % relatées par Meijer et al. (1995) sur deux cultivars de lin à fibres et de 25 % environ enregistrées par Sharma (1986a) sur 5 cultivars à fibres sur cette même période.

L'évolution de la lignification des fibres périphloémiennes durant leur maturation semble très difficilement appréciable par l'immunomarquage des lignines avec les immunosera anti-DHP. Toutefois, les immunomarquages restent des réactions de surface reconnaissant certains épitopes des lignines contrairement aux analyses chimiques qui permettent leur quantification globale.

α - Les teneurs en lignines dans les tissus internes

Les valeurs moyennes obtenues dans les tissus internes, 25,6 % (UV/bromure d'acétyle) et 22,3 % (Klason), sont caractéristiques du bois des angiospermes et gymnospermes dont les teneurs en lignines sont comprises entre 15 et 36 % (Higuchi, 1981). Chez différentes espèces ligneuses communes telles que le peuplier, le cerisier (*Prunus avium*) et l'aulne (*Alnus glutinosa* Goertn), la proportion de lignines "Klason" représentent en moyenne respectivement 20 % (Chen et al., 2001a), 18,1 % et 23,1 % (Tollier et al., 1986).

Les tissus internes des tiges de lin présentent des taux de lignification proches, dans la limite supérieure, des valeurs décrites chez d'autres dicotylédones herbacées. Le bois de tabac, une espèce modèle, possède des teneurs en lignines Klason de 17 % environ (Pinçon et al., 2001b). Parmi différentes espèces riches en fibres périphloémiennes (tableau 12), seul le bois du chanvre possède des teneurs en lignines plus importantes par rapport au lin; et le bois de jute, des valeurs semblables. La très faible évolution des teneurs en lignines dans les tissus internes du lin est similaire aux variations mesurées dans le bois de chanvre (Van Der Werf et al., 1994) et du kénaf (Morrison et al., 1999). De même les teneurs en lignines dans le bois de la luzerne évoluent peu en fonction du stade de développement et restent globalement constantes dans toute la tige sauf dans les parties très juvéniles (Vallet et al., 1996).

β - La lignification des tissus externes riches en fibres périphloémiennes

Les teneurs en lignines déterminées par UV/bromure d'acétyle dans les tissus externes des tiges de lin (en moyenne 2,9 % de la masse pariétale sèche) sont supérieures aux valeurs décrites par ailleurs. Seule une étude effectuée sur deux cultivars russes de lin estime par spectrophotométrie FT-IR des proportions de lignines dans les fibres périphloémiennes à environ 7 % de la masse pariétale (Kotelnikova et al., 2000). Hormis ces derniers résultats, la plupart des travaux récents portant sur les tissus externes de tige de lin tendent à conclure à l'inexistence de lignines au sein des faisceaux fibreux (Morrison III et Akin, 2001; Morrison et al., 2003) ou à la présence de lignines dans des proportions infimes (~0,5 % de la masse de résidus pariétaux) (Gorshkova et al., 2000). Ces différents auteurs suggèrent une erreur par surestimation des précédents dosages des lignines dans ces tissus suite à la présence d'aldéhydes phénoliques et/ou de leur contamination par du bois. Toutefois, ces très faibles valeurs résultent de la mise en œuvre de méthodes de caractérisation telles que l'UV/acide thioglycolique ou l'analyse spectroscopique globale lesquelles sont rapportées comme peu sensibles et susceptibles d'artefacts (Himmelsbach et al., 1998; Brinkmann et al., 2002) (paragraphe 3.2 - c, chapitre A, Résultats-Discussion). Dans le cadre des analyses ci-rapportées, les contrôles microscopiques effectués régulièrement au cours de l'échantillonnage du matériel végétal montrent que les tissus externes destinés au dosage des lignines sont exempts de bois.

Espèces	Tissus externes riches en fibres	Tissus internes (bois)	Auteurs
Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)**	2,9*	22,3 - 25,6*	
Chanvre (<i>Cannabis sativa</i>)	4,0	28,0	Vignon et al. (1995)
Jute (<i>Corchorus capsularis</i>)	4,3	20,9	Van der Werf et al. (1994)
Kenaf (<i>Hibicus cannabinus</i>)	12,7	23,9	Islam et Sarkanen (1993)
Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	9,4	15,0	Neto et al. (1996)
	8,3*	20,9*	Grabber et al. (2002)
	8,2	25,3	Vallet et al. (1998)
Ramie (<i>Boehmeria nivea</i>)	1,5 ⁺	21,5	Angelini et al. (2000)

La méthode Klason a été employée dans chaque analyse sauf * correspondant à des teneurs en lignines déterminées par la méthode UV/bromure d'acétyle; ⁺ : somme des lignines acidosolubles et acidoinsolubles ** : moyennes des teneurs en lignines présentées figures 1 et 2.

Tableau 12 : Teneurs en lignines exprimées en pourcentage de masse sèche dans diverses dicotylédones riches en fibres périphloémiennes.

Le lin se distingue des autres espèces riches en fibres périphloémiennes par de faibles teneurs en lignines dans les tissus externes riches en fibres (tableau 12). En comparaison, les tissus externes de chanvres, dont les fibres périphloémiennes présentent des dépôts de lignines semblables au lin, sont constitués d'environ 4 % de lignines. Cette proportion est doublée dans les tissus externes de luzerne et de kénaf et triplée chez le jute. Seule les fibres périphloémiennes de la ramie sont moins lignifiées que celles du lin. Cette dernière comparaison peut être rapprochée de la dispersion des cellules fibreuses dans le parenchyme cortical et donc d'une absence de structure en faisceau (Lewin, 1958; Catling et Grayson, 1982). Par ailleurs, l'emploi de la méthode Klason pour l'étude de ces fibres hypolignifiées peut conduire à modérer ces faibles valeurs, cette méthode permettant difficilement de quantifier de très faibles teneurs en lignines (Dence, 1992).

La nette augmentation des teneurs en lignines dans les fibres périphloémiennes du lin, 47,6 % entre les stades floraison et capsules brunes, est comparable au chanvre. En effet, dans les tissus externes du chanvre, la lignification des fibres primaires accroît de 40 % durant leur maturation (Keller et al., 2001). Cependant, cette moyenne résulte d'une augmentation de 26 % dans les fragments basaux et de 55 % dans les fragments apicaux. Une telle évolution est opposée au lin dans lequel l'accroissement des teneurs en lignines est plus important au niveau basal des tiges. Comparé au lin et au chanvre, les teneurs en lignines dans les tissus externes des tiges de luzerne évoluent peu (augmentation de 13 %) entre le début et la fin de la floraison (Sewalt et al., 1997a). Par contre, les teneurs en lignines déterminées par hydrolyse alcaline et UV/bromure d'acétyle dans les tissus externes des tiges de kénaf restent stables entre les stades floraison et sénescence

des plantes (Morrison et al., 1999; Lam et al., 2003). Dans ce dernier modèle, la lignification des fibres périphloémiennes paraît s'établir lors des phases précoces de leur développement.

Les variations des quantités en lignines en fonction des tissus et des stades de développement chez une même plante ont été rapportées par de nombreux auteurs (Scalbert et al., 1985; Wu et al., 1992; Baucher et al., 1998). Cependant, considérant l'ensemble des résultats présentés, le lin se distingue par l'amplitude des variations des teneurs en lignines détectées dans les tiges. D'une part, la forte lignification des tissus internes contraste avec les faibles teneurs en lignines mesurées dans les tissus externes. D'autre part, l'évolution de lignification des fibres périphloémiennes entre les stades floraison et capsules brunes se caractérise par sa forte intensité. Ces particularités sont-elles corrélées à une évolution des caractéristiques structurales des lignines chez le lin ?

II - CARACTERISATION DES LIGNINES DES TIGES DE LIN PENDANT LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

2.1 - GENERALITES

Compte tenu de leur structure tridimensionnelle, la caractérisation chimique des lignines se heurte à divers problèmes : i. le nombre et la complexité des produits issus des réactions de dégradation rendent très ardues leur identification et leur quantification, ii. les produits de dégradations, des dérivés phénoliques, sont susceptibles d'intervenir dans des réactions parallèles faussant ainsi leur concentration et/ou créant des artefacts, iii. la présence de liaisons intermonomériques résistantes aux méthodes mises en œuvre limitent les taux de dégradation de l'hétéropolymère "Lignine".

Depuis les travaux de Freudenberg (Freudenberg, 1939; Freudenberg et Lautsch, 1939) qui ont initié la plupart des méthodes dégradatives, de nombreux auteurs ont optimisé ces techniques et/ou en ont développé de nouvelles. A ce titre, l'oxydation réductive par le nitrobenzène et la thioacidolyse représentent actuellement des modes de caractérisation de référence. Ainsi, ces deux techniques ont été retenues afin de préciser la composition monomérique des lignines des tiges de lin. A l'issue de ces techniques dégradatives, différents facteurs sont employés pour définir les lignines ainsi analysées :

- Le rapport $H+G+S$ /teneur en lignines (ou $H+V+S$ /teneur en lignines). La somme " $H+G+S$ (thioacidolyse) ou $H+V+S$ (oxydation par le nitrobenzène)" indique la teneur en monomères libérés suite à la rupture des liaisons non-condensées. Le dénominateur "teneur

en lignines" permet une correction en rapportant la somme à la teneur en lignines présentes dans les échantillons. Cette valeur renseigne sur les proportions de monomères liés par des liaisons non-condensées, plus il est faible plus les lignines sont de type condensé. A partir de ce rapport, la fraction du polymère "Lignine" analysée peut être estimée en considérant un rendement de coupure de 100 % des liaisons non-condensées et une masse molaire moyenne des monolignols de 200 g/mole.

- Les ratios S/G (thioacidolyse) et V/S (oxydation par le nitrobenzène) informent des proportions relatives en monomères diméthoxylés (S) et monométhoxylés (G ou V) libérés par rupture des liaisons non-condensées. Ces facteurs sont les plus couramment employés.

2.2 - CARACTERISATION DES LIGNINES DU LIN PAR THIOACIDOLYSE

La thioacidolyse (Rolando et al., 1992) dérive de l'acidolyse, une méthode de dégradation chimique des lignines générant de nombreux et divers produits difficilement identifiables et assujettie à de nombreux artefacts (Lundquist, 1976). La modification du mélange réactionnel de l'acidolyse (dioxane/eau/HCl) ayant conduit à la thioacidolyse (dioxane / éthanethiol / trifluorure étherate de bore) (Lapierre, 1993) a grandement amélioré le rendement de la réaction de dépolymérisation des lignines tout en limitant la diversité des produits de dégradation.

a - Composition monomérique des lignines dans les tissus internes et externes

L'analyse des monomères à l'issue de la réaction de thioacidolyse ne révèle que des unités gäiacyles (G) et syringyles (S) dans les tissus externes et internes des tiges de lin (figure 60). La teneur en monomères libérés par cette méthode oxydative est fortement dépendante du tissu considéré. Les valeurs S+G obtenues sont comprises entre 4,82 et 12,82 μ moles/gramme de résidus pariétaux secs dans les tissus externes, et varient de 285,46 à 324,89 μ moles/gramme de résidus pariétaux secs dans les tissus internes. Ainsi, selon la nature du tissu, la fraction des lignines analysées est fortement variable : en moyenne 7,9 % de ce polymère dans les tissus externes et 23,6 % dans les tissus internes. Ces résultats peuvent être rapprochés de la composition monomérique des lignines dont les ratios S/G sont toujours inférieurs à 1, les unités G étant préférentiellement impliquées dans des liaisons de type condensé (Sarkanen et Ludwig, 1971b; Monties, 1989).

Tissus externes				Tissus internes			
Floraison		Caps. brunes		Floraison		Caps. brunes	
Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical
12,82	5,68	11,73	4,82	285,46	289,58	324,89	306,12
854,7	176,9	428,1	114,8	1204,5	1129,0	1124,6	1260,3
17,0	3,5	8,6	2,3	24,1	22,5	22,5	25,2

G+S
 G+S/lignines
 % lignine analysée

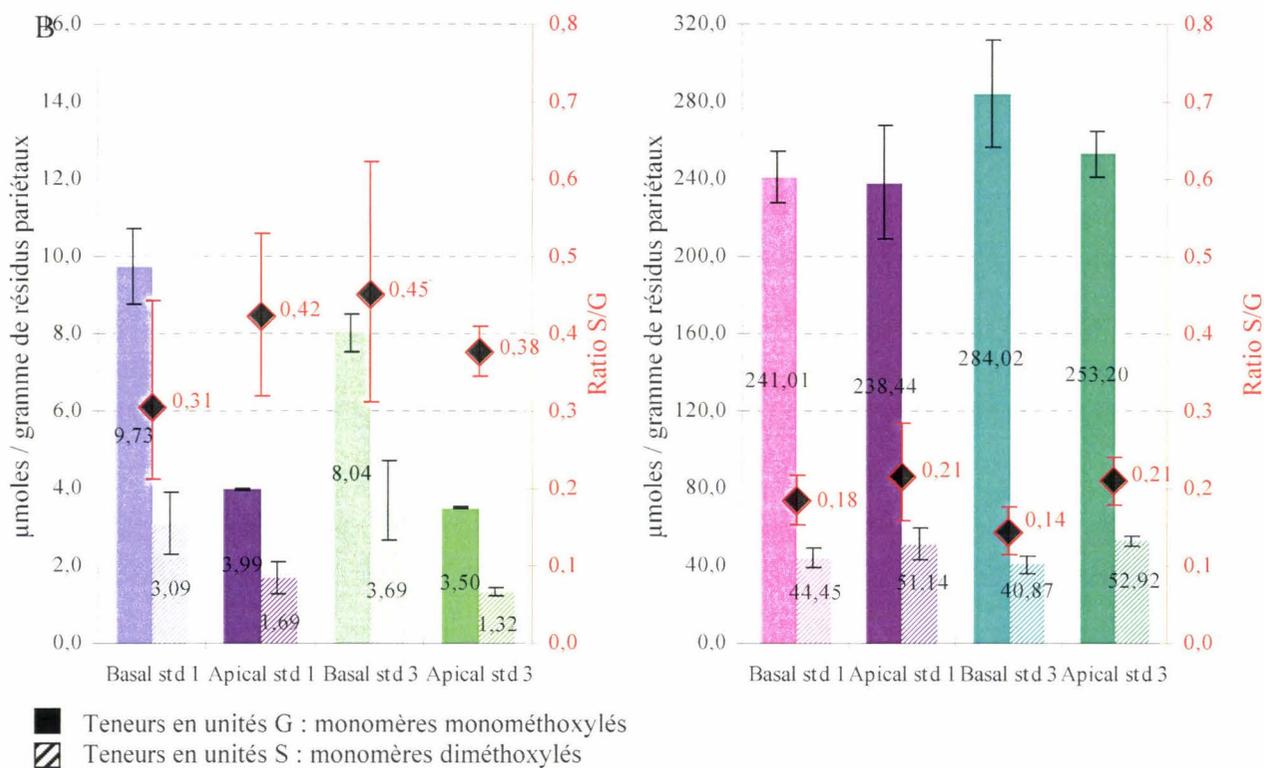


Figure 60 : Composition monomérique, estimée par thioacidolyse, des lignines présentes dans les tissus externes et les tissus internes des tiges de lin aux stades floraison et capsules brunes.

A : La somme S+G est exprimée en µmoles/gramme de résidus pariétaux secs, le rapport S+G/lignines est exprimé en µmoles / gramme de lignines déterminées par la méthode UV/bromure d'acétyle. Le pourcentage de lignine analysée correspond à la fraction du polymère "Lignine" dégradée par thioacidolyse.

B : Les résultats sont la moyenne de trois analyses séparées ; l'écart par rapport à la moyenne est schématisé par une barre. Sur chaque graphe est indiqué en rouge le rapport S/G calculé à partir des résultats obtenus, la barre rouge schématise les variations calculées à partir des écarts par rapport à la moyenne des teneurs en S et en G.

α - Les tissus internes

Les proportions des structures non-condensées analysées représentent en moyenne ~25 % du polymère natif. Quels que soient le stade de développement et le niveau de tige considérés, aucune variation significative n'est détectable dans le bois tant pour les teneurs en sous-unités G que S. Ainsi les rapports S/G varient faiblement autour d'une moyenne de 0,2 soulignant une forte proportion de sous-unités G dans les lignines constitutives du bois du lin. Rapporté aux teneurs en lignines qui évoluent peu entre les différents échantillons de bois, la moyenne du facteur S+G/teneur en lignines reste de ce fait stable, aux environs de 1180 μ moles/gramme de lignines. L'absence de variations majeures de ces deux rapports suggère une faible évolution du processus de lignification des tissus internes à partir du stade floraison.

β - Les tissus externes

Par opposition au bois, les tissus externes fournissent de faibles teneurs en monomères trithioéthylés. De plus, ces valeurs présentent d'importantes variations. L'influence du stade de prélèvement, floraison ou capsules brunes, semble mineure en comparaison des écarts mesurés entre les niveaux de tige, basaux et apicaux. En effet, aux stades floraison (stade 1) et capsules brunes (stade 3), la somme S+G est nettement supérieure dans les parties basales des tiges (12,82 et 11,73 μ moles/gramme de parois respectivement) par rapport aux fragments apicaux (5,68 et 4,82 μ moles/gramme de parois respectivement). Cet écart est retrouvé avec la prise en compte de la teneur en lignines. Toutefois, le calcul de la fraction du polymère analysé étant inférieur à 5 % dans les fragments apicaux contre 8,6 et 17 % dans les fragments basaux suggère de relativiser les écarts constatés entre les niveaux de tiges et de ne considérer que les variations stade 1 / stade 3.

Les teneurs en lignines augmentant significativement durant la maturation des fibres, la valeur du rapport S+G/teneur en lignines reste très informative. Ce dernier rapport est fortement décroissant du stade floraison au stade capsules brunes, de 854,7 à 428,1 μ moles/gramme de lignines respectivement. Ce résultat suggère l'accumulation de lignines plus condensées en fin de maturation des fibres. Ces modifications qualitatives n'ont pu être reliées à une évolution significative du rapport S/G, lequel reste toujours inférieur à 0,5.

γ - Conclusion

La comparaison des données obtenues dans les tissus externes et internes suggère l'existence de fortes variations inter-tissulaires de la composition monomérique des lignines.

- Le ratio S/G est approximativement deux fois plus faible dans le bois en comparaison des tissus externes, en moyenne 0,2 et 0,4 respectivement. Les lignines incrustant les faisceaux fibreux apparaissent donc relativement plus riches en sous-unités S.
- Les rendements S+G/teneur en lignines sont 1,3 à 11 fois plus faibles dans les tissus externes par rapport aux tissus internes suggérant que ces derniers soient beaucoup plus riches en monomères engagés dans des structures non-condensées α -O-4 et/ou β -O-4. De ce fait, les lignines présentes dans les fibres périphloémiennes peuvent être qualifiées de plus condensées que les lignines du bois du lin.

Les unités S, diméthoxylées, favorisent la formation de liaisons intermonomériques non-condensées, les carbones 3 et 5 du cycle aromatique étant substitués par des groupements méthoxyles. Inversement le carbone 5 du cycle aromatique des unités G étant libre, ces sous-unités sont préférentiellement impliquées dans des liaisons condensées de type 5-5, 4-O-5, β -5 (Sakakibara, 1991). Ainsi, en regard de ces remarques, les conclusions présentées ci-dessus paraissent contradictoires. Ces résultats pourraient s'expliquer par une proportion plus importante en sous-unités H dans les lignines des tissus externes. Ces sous-unités, non méthoxylées, sont principalement impliquées dans des liaisons de type condensé non dégradées par la thioacidolyse. Cependant, la fraction en lignines dégradées par la thioacidolyse dans les tissus externes étant faible, ces résultats ne permettent pas d'apprécier les caractéristiques globales des lignines présentes dans les fibres périphloémiennes en fin de maturation.

b - Discussion de la méthode

La principale limitation de la thioacidolyse reste la faible fraction du polymère caractérisé lors de l'analyse de lignines pauvres en structures non-condensées. Dans ce cas, les résultats obtenus ne peuvent être extrapolés sans erreur à l'ensemble du polymère.

Par ailleurs, lors de la réaction de thioacidolyse, la rupture des liaisons non-condensées ne libère pas seulement des monomères mais aussi des dimères comportant une liaison de type condensé (Lapierre, 1993). Toutefois, la proportion de ces dimères reste en général très faible, ils représentent au maximum 10 % des teneurs en monomères (Lapierre et al., 1995). De ce fait, ces dimères n'ont pas été considérés dans cette étude.

Par ailleurs, le principe réactionnel de la thioacidolyse rend cette réaction dépendante des liaisons établies au niveau des carbones alkyles des monomères de la lignine. En effet, la première étape de la réaction de thioacidolyse correspond à la substitution du carbone α de la chaîne propène par un groupement thioéthyle (figure 41, chapitre C, Matériels et Méthodes). La rupture de la liaison β -O-4 survenant au cours de la deuxième étape ne peut s'effectuer si ce carbone α est acétylé ou engagé dans une liaison ester (Rolando et al., 1992; Cathala et al., 2001). Dans les parois, les lignines sont polymérisées après la mise en place de la matrice polysaccharidique (Terashima et al., 1993) et sont susceptibles d'établir des liaisons esters avec ces composés au niveau du carbone α (Iiyama et al., 1994; Helm, 2000). De récents travaux portant sur l'analyse de DHP polymérisés en présence de polysaccharides suggèrent que le couplage de pectines sur le carbone α entraîne une chute des rendements de thioacidolyse de près de 14 % (Cathala et al., 2001).

D'un point de vue général, la thioacidolyse est rapportée comme une méthode très spécifique ayant un taux de reproductibilité très élevé : la marge d'erreur standard varie de 5 à 10 % sur un même échantillon (Lapierre, 1993). Les résultats obtenus à partir de tissus faiblement lignifiés tels que les tissus externes de tiges de lin, confirment globalement ces valeurs. La marge d'erreur moyenne déterminée dans les tissus externes est de 9,6 % contre 5 % dans les tissus internes. Toutefois, ces valeurs ne permettent pas d'apprécier une évolution potentielle du rapport S/G dans les tissus externes entre les stades floraison et capsules brunes.

Ces remarques soulignent les difficultés à analyser l'ensemble du polymère "Lignine" et ce, malgré l'emploi d'une méthode dégradative à haut rendement et très spécifique telle que la thioacidolyse. Considérant ces remarques, la comparaison des résultats de la thioacidolyse des lignines des tiges de lin avec leur analyse par oxydation alcaline au nitrobenzène permettra de vérifier et de préciser les conclusions ci-avancées. Cette dernière méthode, moins spécifique, est susceptible de libérer des teneurs plus importantes en monomères autorisant ainsi une vision plus générale de la composition des lignines dans la tige de lin, notamment dans les tissus externes.

2.3 - CARACTERISATION DES LIGNINES DU LIN PAR OXYDATION ALCALINE PAR LE NITROBENZENE

La nature phénolique des lignines rend ce polymère sensible à diverses réactions d'oxydation. Cette propriété chimique constitue le fondement de différentes méthodes d'analyse des lignines. Selon leur degré et leur localisation, ces réactions d'oxydation se classent en trois catégories (Chang et Allan, 1971) : i. les réactions limitées à des groupements spécifiques greffés sur le

A

Tissus externes				Tissus internes				
Floraison		Caps. brunes		Floraison		Caps. brunes		
Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	
20,13	23,45	7,48	14,47	356,65	362,42	238,94	297,95	
856,6	730,5	273,0	344,5	1504,8	1412,9	827,1	1226,6	
17,1	14,6	5,5	6,9	30,1	28,4	16,5	24,5	
				H+V+S				
				H+V+S/lignine				
				% lignine analysée				

B

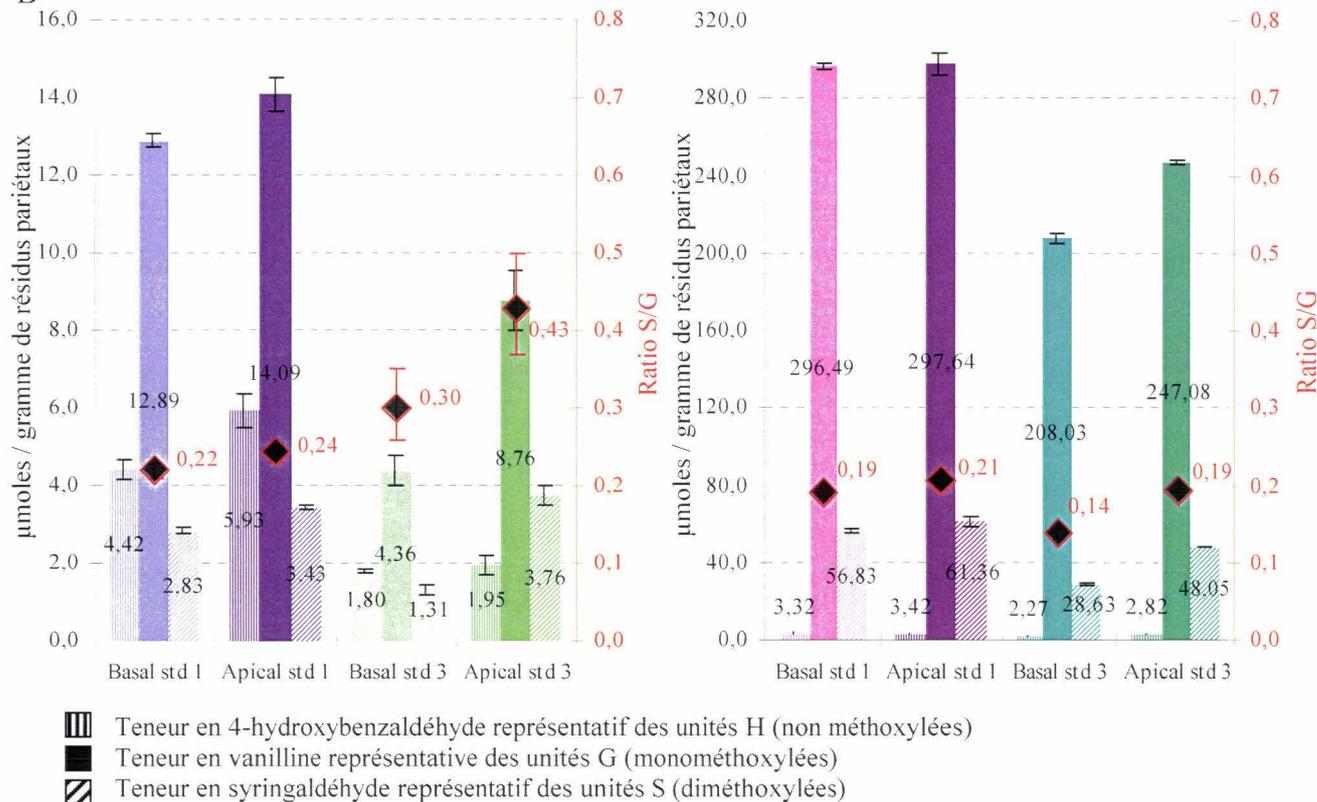


Figure 61 : Composition monomérique, estimée par nitrobenzène, des lignines présentes dans les tissus externes et les tissus internes des tiges de lin aux stades floraison et capsules brunes.

A : La somme H+V+S est exprimée en $\mu\text{moles/gramme}$ de résidus pariétaux, le rapport S+G/lignines est exprimé en $\mu\text{moles / gramme}$ de lignines déterminées par la méthode UV/bromure d'acétyle. Le pourcentage de lignines analysées correspond à la fraction du polymère "Lignine" dégradée par oxydation alcaline par le nitrobenzène.

B : Les résultats sont la moyenne de trois analyses séparées ; l'écart par rapport à la moyenne est schématisé par une barre. Sur chaque graphe est indiqué en rouge le rapport S/G calculé à partir des résultats obtenus, la barre rouge schématise les variations calculées à partir des écarts par rapport à la moyenne des teneurs en syringaldéhyde et en vanilline.

noyau aromatique ; ii. les réactions clivant le cycle aromatique et iii. les réactions dégradant les lignines en composés aromatiques possédant une fonction carbonyle ou acide carboxylique. Cette dernière catégorie permet la caractérisation des lignines (Dershem et al., 1988) et inclut notamment l'oxydation alcaline par le nitrobenzène (Freudenberg et al., 1940). Au cours de cette réaction, la rupture catalysée par la soude des liaisons intermonomériques α - et β -aryle éther libère les monolignols sous leur forme d'anions phénolates. Ces derniers subissent ensuite une hydrolyse oxydative de leur liaison C_{α} - C_{β} donnant majoritairement des aldéhydes aromatiques en C_7 sous leur forme 4-formylphénolate (Chen, 1991).

Des acides phénoliques se forment également à partir de leur aldéhyde respectif suite à une réaction d'oxydoréduction entre deux molécules d'aldéhyde (réaction de Cannizzaro) : l'une est oxydée en acide alors que l'autre est réduite en alcool primaire. Toutefois, cette réaction reste mineure (Chen, 1991), les acides phénoliques représentant au maximum 10 % de la teneur en aldéhyde correspondant (Billa et al., 1996). De ce fait, les acides phénoliques n'ont pas été quantifiés lors des analyses par nitrobenzène.

a - Les monomères constitutifs des lignines des tissus externes et internes

L'analyse des produits résultant de l'oxydation au nitrobenzène des lignines des tiges de lin prélevé aux stades floraison et capsules brunes est illustrée figure 61. A l'issue de cette réaction, 3 produits majoritaires sont détectables et quantifiables dans tous les échantillons, ils correspondent au 4-hydroxybenzaldéhyde (H), à la vanilline (V) et à la syringaldéhyde (S). Ces aldéhydes phénoliques sont représentatifs des sous-unités hydroxyphényle (H), gäiacycle (G), et syringyle (S) respectivement. Ce premier constat contraste avec les résultats obtenus précédemment après thioacidolyse où seules des unités G et S ont été détectées. Excepté le 4-hydroxybenzaldéhyde, les teneurs en aldéhydes phénoliques sont toujours nettement plus importantes (~25 fois) dans les tissus internes par rapport aux tissus externes. L'amplitude de cette augmentation est similaire à celle observée par thioacidolyse.

L'analyse des lignines par le nitrobenzène apparaît plus reproductible, les taux d'erreurs sont inférieurs à ceux calculés lors de la thioacidolyse, avec un maximum égal à 6 % et 4 % dans les tissus externes et internes respectivement.

α - Les tissus internes

Les tissus internes libèrent de faibles quantités de 4-hydroxybenzaldéhyde (maximum de 3,42 μ moles/gramme de résidus pariétaux) par rapport aux taux de vanilline (minimum de 208,03 μ moles/gramme de résidus pariétaux) et de syringaldéhyde (minimum de 28,63 μ moles/gramme de résidus pariétaux). Les proportions de lignines analysées varient de 16 % (fragment basal, stade capsules brunes) à 30 % (fragment basal, stade floraison), la proportion moyenne en structures non-condensées dans le bois est d'environ 25 % et reste semblable à celle obtenue par thioacidolyse. Les teneurs en vanilline, sont toujours nettement plus importantes que les teneurs en syringaldéhyde, se traduisant par des ratios S/V compris entre 0,14 et 0,21. Ces derniers sont identiques à ceux calculés par thioacidolyse pour chacun des échantillons.

Les proportions d'aldéhydes libérés (H+V+S) augmentent significativement des fragments basaux à apicaux au stade 3 (de 238,94 à 297,95 μ moles/gramme de lignines respectivement) mais peu au stade 1 (356,65 à 362,42 μ moles/gramme de lignines respectivement). Une telle évolution en fonction du niveau de tige suggère que les lignines du bois sont plus condensées dans les niveaux basaux des tiges au stade 3. En outre, quel que soit le niveau de tige, les rendements H+V+S/teneur en lignines décroissent faiblement entre les stades floraison et capsules brunes signifiant une modification qualitative de ces lignines. Cette évolution correspond à une augmentation de leur degré de condensation au cours de la maturation du bois associée à une légère baisse du ratio S/V entre les stades 1 et 3.

β - Les tissus externes

Contrairement aux tissus internes, la composition monomérique des lignines des fibres périphloémiennes révélée par oxydation alcaline au nitrobenzène montre de grandes différences par rapport à leur caractérisation par thioacidolyse.

Une première distinction majeure réside dans l'augmentation des teneurs en monomères libérés (somme H+S+V) notamment dans les fragments apicaux où les fractions des lignines analysées sont 3 à 4 fois plus importantes que celles estimées par thioacidolyse. Dans les fragments basaux, les proportions de lignines dégradées restent semblables (stade 1) ou légèrement inférieures (stade 3) aux fractions caractérisées par thioacidolyse.

Une seconde distinction concerne la nature des monomères libérés et notamment la détection de sous-unités H en quantités importantes. En effet, au stade floraison, le 4-hydroxybenzaldéhyde représente 22 % et 25 % des monomères libérés dans les fragments basaux et apicaux respectivement. Au stade capsules brunes, ces proportions sont respectivement égales à 24 % et 13 %. Autre distinction remarquable, les rapports S/V sont totalement dissemblables à ceux

calculés par thioacidolyse. Toutefois, les teneurs en unités monométhoxylées restent majoritaires dans les produits de dégradation, les ratios S/V sont toujours inférieurs à 0,5. Par ailleurs, ce ratio paraît évoluer significativement : il augmente au cours de la maturation des fibres tout en restant plus important dans les fragments apicaux.

Pour un même stade, la fraction en lignines analysées et le ratio S/V ne semblent pas significativement différents en fonction du niveau de tige. Considérant alors la tige entière, la forte baisse des proportions d'aldéhydes phénoliques entre les stades floraison et capsules brunes pour chaque fragment de tige (passant de 856,6 à 273 μ moles/gramme de lignines dans les fragments basaux et de 730,5 à 344,5 μ moles/gramme de lignines dans les fragments apicaux) suggère l'existence d'une lignine plus condensée dans les fibres périphloémiennes en fin de maturation.

γ - Conclusion

Les résultats de l'analyse des lignines par oxydation alcaline au nitrobenzène confirment et précisent les conclusions avancées à l'issue de la thioacidolyse :

- Quel que soit le tissu, en regard des variations des proportions du polymère analysé, les évolutions qualitatives des lignines constatées entre les différents niveaux de tige semblent mineures voir peu significatives.
- Les facteurs H+V+S/teneur en lignines (oxydation par le nitrobenzène) et S+G/teneur en lignines (thioacidolyse) entre les tissus externes et internes montrent des profils de variation similaires. Ces derniers suggèrent que les lignines présentes dans les fibres périphloémiennes renferment moins de structures alkyle-O-4, en comparaison des lignines constitutives du bois et de ce fait apparaissent plus condensées .
- Dans le bois du lin, les rapports S/V identiques aux S/G déterminés par thioacidolyse, révèlent une forte proportion de sous-unités monométhoxylées dans la lignine de ce tissu.
- Dans les tissus externes, le profil décroissant du facteur H+V+S/teneur en lignines entre les stades floraison et capsules brunes est semblable à celui observé lors de la thioacidolyse. En regard de l'évolution de ces rendements et des résultats du dosage au bromure d'acétyle, les lignines inscrustant les fibres périphloémiennes paraissent donc plus condensées au stade capsules brunes. Cette évolution s'oppose à l'augmentation du rapport S/V et à la diminution des teneurs en unités H constatées dans ce tissu entre les stades floraison et capsules brunes. Enfin, compte tenu des faibles proportions de lignines analysées notamment au stade capsules brunes, inférieures à 10 %, les variations de la composition monomérique restent difficilement extrapolables en terme d'évolution qualitative à l'ensemble du polymère.

- Spécifique à l'analyse des lignines par oxydation alcaline au nitrobenzène, la détection de 4-hydroxybenzaldéhyde en proportions non-négligeables dans les tissus externes suggère l'incrustation d'une lignine H-G-S dans les fibres de lin et G-S dans le bois. L'absence de sous-unités H dans les produits de dégradation des lignines par thioacidolyse suggère que l'implication de ces monomères dans des structures non-condensées (Jacquet et al., 1997b) est peu probable dans le lin. De ce fait, l'importante proportion de sous-unités H dans les tissus externes pourrait expliquer le dépôt d'une lignine relativement plus condensée par rapport au bois.

b - Discussion de la méthode

α - L'efficacité et la fiabilité de l'oxydation alcaline par le nitrobenzène

Les teneurs en produits de dégradation sont dépendantes des paramètres réactionnels au cours de la réaction d'oxydation par le nitrobenzène : durée, température, concentrations en soude et en nitrobenzène, quantité d'échantillon (Sun et al., 1995). Les conditions optimales, initialement décrites par Leopold (1950), varient également en fonction de l'origine anatomique des échantillons (Venverloo, 1969) et des tissus analysés (Billa et al., 1996). Ces modifications des paramètres réactionnels ne sont toutefois pas spécifiques au nitrobenzène mais sont également rapportées avec d'autres méthodes d'analyses dégradatives des lignines de procédé similaire (oxydation de la chaîne propène) telle que l'oxydation cuprique ou l'oxydation par le permanganate de potassium (Sakakibara, 1991; Chen, 1992). Mais comparée à ces techniques oxydatives, la réaction d'oxydation par le nitrobenzène génère peu de produits de dégradation lesquels, en plus, demeurent moins complexes (Monties, 1989b; Sakakibara, 1991).

Par ailleurs, la reproductibilité, de l'ordre de 3 à 5 %, et les rendements de la réaction d'oxydation alcaline par le nitrobenzène, restent supérieurs à de nombreuses méthodes d'analyses dégradatives des lignines (Chang et Allan, 1971; Chen, 1992).

β - Le mécanisme réactionnel

L'étude du mécanisme réactionnel de l'oxydation alcaline par le nitrobenzène de divers dilignols différant par leur liaison intermonomérique a révélé la spécificité de clivage de cette réaction (Chang et Allan, 1971). Dans les conditions couramment employées, l'oxydation par le nitrobenzène rompt les liaisons non-condensées, *i.e.* les liaisons α -O-4 et β -O-4, mais aussi certaines structures condensées. Parmi ces dernières les liaisons diarylpropanes (β -1) et plus rarement résinols (β - β) peuvent être oxydées (Chang et Allan, 1971). Ainsi, une fraction des aldéhydes phénoliques peut provenir de ces structures condensées.

Par ailleurs, des travaux portant sur l'oxydation alcaline par le nitrobenzène de divers modèles synthétiques de lignine montrent que les teneurs en acides et aldéhydes benzoïques varient selon la structure de leur noyau aromatique et de leurs chaînes latérales (Chan et al., 1995b). Plus le noyau aromatique est méthoxylé, plus les taux d'oxydation sont élevés; la présence de sous-unités S facilitant la rupture des liaisons β -O-4 (Chiang et Funaoka, 1990). Dans ce sens, les sous-unités H, G et S sont respectivement de réactivité croissante. Ce constat résulte de la capacité du cycle aromatique à fournir des électrons à la chaîne latérale, *i.e.* chaîne propène, les groupements méthoxyles ayant un effet donneur d'électron (Chan et al., 1995a;1995b). De plus, la plus faible réactivité des unités H s'explique également par leur potentiel plus important à former des liaisons intermonomères (Ralph et Helm, 1993). Ce dernier processus impliquant des mécanismes électroniques et/ou stériques; les unités H, non-méthoxylées, sont plus aptes à des réactions de polymérisation et donc moins réactives à l'oxydation (Billa et al., 1996). De ce fait, la composition monomérique des lignines va influencer sur leur réactivité et par conséquent sur les rendements en monomères libérés.

γ - Les protéines et acides phénoliques pariétaux

Interférence des protéines et acides phénoliques pariétaux

Par son mécanisme de rupture oxydative des liaisons, la réaction d'oxydation alcaline par le nitrobenzène (Chang et Allan, 1971) présente divers artefacts potentiels. Des composés autres que des monomères de la lignine, *i.e.* des acides aminés aromatiques, des acides hydroxycinnamiques, peuvent être libérés et oxydés en aldéhydes homologues en C₇ (Monties, 1980; Lapierre et al., 1995). En effet, le 4-hydroxybenzaldéhyde peut provenir de l'oxydation de la tyrosine (Stone et al., 1951; Lam et al., 1990) et/ou de l'oxydation de l'acide *p*-coumarique (Higuchi et al., 1967). En outre, l'acide férulique et l'acide sinapique peuvent s'oxyder en vanilline et en syringaldéhyde respectivement avec un rendement de réaction très élevé (Wacek et Kratzl, 1947; Monties, 1980).

Teneurs en protéines et acides phénoliques pariétaux

L'estimation des teneurs en protéines dans les résidus pariétaux a permis d'évaluer cet artefact potentiel. Les résultats obtenus ont été précédemment présentés (tableau 11). Malgré un profil d'évolution similaire des teneurs en protéines et en 4-hydroxybenzaldéhyde, les facteurs de variations sont totalement dissemblables. Par ailleurs, il semblerait que les teneurs en protéines riches en acides aminés aromatiques soient faibles dans les parois des fibres de lin (Fry, 1988; Girault et al., 2000).

La quantification des acides phénoliques dans les résidus pariétaux par hydrolyse alcaline (figures 58 et 59) ne révèle que de très faibles teneurs. Les profils de variations des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique sont singulièrement différents de l'évolution des proportions de 4-hydroxybenzaldéhyde, vanilline et syringaldéhyde respectivement. De plus, à 160°C (température de consigne de la réaction), les acides phénoliques ne sont que partiellement oxydés en leur aldéhyde respectif (Iiyama et Lam, 1990).

Conclusion

Chez le lin, l'interférence des protéines et acides phénoliques pariétaux dans les proportions d'aldéhydes produits par la réaction d'oxydation au nitrobenzène apparaît mineure. La présence de 4-hydroxybenzaldéhyde dans les tissus externes ne peut être imputée seulement à un phénomène artefactuel dû à la tyrosine et/ou à l'acide *p*-coumarique. Par contre, en regard des teneurs de ces deux composés, l'évolution des proportions de 4-hydroxybenzaldéhyde en fonction des stades et des niveaux de tige, doit être pondérée.

2.4 - DISCUSSION

a - Evaluation comparée des différentes techniques employées

Outre une résolution élevée, la thioacidolyse et l'oxydation alcaline par le nitrobenzène possèdent des rendements réactionnels supérieurs aux méthodes d'oxydation ou solvanolyse des lignines (acidolyse, permanganate de potassium, hydrogénolyse, ozonolyse, pyrolyse analytique) (Monties, 1989b; Rolando et al., 1992; Lapierre, 1993). Par ailleurs, la relative simplicité de mise en œuvre et d'analyse des produits de dégradations du nitrobenzène et de la thioacidolyse contraste avec les diverses techniques développées pour l'étude des lignines (Sakakibara, 1991; Chen, 1992; Rolando et al., 1992). Enfin, ces caractéristiques sont associées à une forte reproductibilité des analyses, les marges d'erreurs restant inférieures à 10 % et ce même dans des tissus hypolignifiés.

Comparativement, la thioacidolyse est affranchie de l'interférence des acides phénoliques et des acides aminés aromatiques contrairement à l'oxydation alcaline par le nitrobenzène. Le mode de rupture des liaisons inter-monomériques rend la réaction de thioacidolyse inefficace vis à vis des résidus tyrosine et phénylalanine. De plus, la rupture des liaisons esters impliquant des acides hydroxycinnamiques est peu fréquente et génère des produits de dégradation distincts de ceux issus de la lignine (Rolando et al., 1992; Lapierre, 1993).

Les rendements en monomères calculés suite à l'oxydation au nitrobenzène restent globalement supérieurs à ceux obtenus suite à la thioacidolyse. Ce constat peut être associé à la spécificité différentielle du clivage des liaisons intermonomériques de chacune de ces deux techniques. La thioacidolyse libère spécifiquement les monomères liés par des structures alkyle-O-aryle ; en revanche le nitrobenzène peut aussi rompre certaines structures condensées, notamment des liaisons diarylpropanes, *i.e.* β -1 (Chang et Allan, 1971; Lapierre et al., 1995). Ces dernières représentent 7 % des liaisons intermonomères et sont les plus fréquentes des structures condensées dans le bois des dicotylédones ligneuses (Monties, 1989a; Boudet et al., 1995). Au total, il a été estimé que 15 à 20 % des monomères de la lignine seraient impliqués dans de telles structures β -1 (Lapierre et al., 1995). Dans ce sens, la thioacidolyse permet une étude plus spécifique des lignines de type non-condensé. De telles différences de rendements entre ces deux techniques dégradatives sont couramment rapportées chez diverses espèces monocotylédones ou dicotylédones (blé (Billa, 1994), peuplier, coton (Rolando et al., 1992; Lapierre et al., 1995)). Comparativement, dans les tissus externes des tiges de lin, la méthode du nitrobenzène permet une meilleure estimation de la composition monomérique des lignines, la fraction du polymère analysée étant supérieure à la thioacidolyse.

Toutefois, quelle que soit la méthode employée, les proportions de lignines caractérisées restent faibles, au maximum 17 % et 30 % dans les tissus externes et internes respectivement. Seule, la mise en œuvre de techniques "plus lourdes" d'un point de vue méthodologique permettrait une estimation plus globale des lignines de la tige de lin *via* la caractérisation partielle de certaines structures condensées. A ce titre, l'oxydation par le permanganate de potassium (Freudenberg et Neish, 1968; Bose et al., 1998) ou l'ozonolyse (Matsumoto et al., 1986) qui permettent d'étudier les structures condensées biphenyls (5-5) et phénylcoumarane (β -5) (Javor et al., 2003) pourraient être employées. Enfin, l'analyse après désulfurisation des dimères libérés par la thioacidolyse pourrait également être envisagée (Lapierre et al., 1995).

b - Comparaison de la composition qualitative des lignines de la tige de lin

α - La lignine constitutive du bois

Les données obtenues par thioacidolyse et oxydation au nitrobenzène sont très similaires et montrent l'incrustation d'une lignine riche en sous-unités G dans le bois du lin se traduisant par des ratios S/G, *i.e.* S/V, égaux à 0,2 en moyenne. Aucune évolution significative de la composition des lignines n'est détectée entre les stades floraison et capsules brunes tant au niveau des ratios S/G que du degré de condensation des lignines. Ces constatations sont en accord avec les teneurs invariables en lignines mesurées par les méthodes UV/bromure d'acétyle et Klason.

Etude comparée avec diverses dicotylédones

La proportion moyenne en unités G dans la fraction non-condensée des lignines du bois de lin (~25 %) est globalement inférieure aux données décrites dans la littérature. Les ratios S/G calculés après oxydation cuprique du bois de lin prélevés au stade préfloraison (deux semaines avant la floraison) varient de 0,2 (Lozovaya et al., 1999) à 0,7 (Gorshkova et al., 2000). Ces auteurs quantifient la vanilline et/ou l'acétovanilline comme produits de dégradation des unités G et la syringaldéhyde et/ou l'acétosyringone comme produits de dégradation des sous-unités S. Or, ce type d'oxydation des lignines génère un mélange complexe de produits de dégradation dont l'identification et la quantification restent difficiles (Chen, 1992). Ainsi, il est possible que ces auteurs n'aient considéré qu'une fraction des produits de dégradation engendrant de ce fait une erreur par sous-estimation des monomères libérés. De même, suite à l'analyse des composés phénoliques présents dans les tissus internes du lin en fin de phase de croissance par hydrolyse alcaline 4 M à 170°C, le ratio S/G calculé est proche de 0,7 (Akin et al., 1996a). Cette dernière méthodologie n'est pas assez sévère pour rompre quantitativement les liaisons β -alkyle-aryle éthers inter-monomériques des lignines. Considérant les artefacts propres à chacune de ces techniques, les valeurs du ratio S/G obtenues par thioacidolyse et oxydation alcaline par le nitrobenzène semblent donner une juste estimation de la composition du bois de lin. En outre, ces deux dernières méthodes étant couramment employées, les valeurs du ratio S/G du xylème de lin peuvent être comparées au bois de diverses angiospermes dont le ratio S/G varie de ~0 à 8 (Whetten et al., 1998).

Les faibles proportions de sous-unités H dans le bois de lin sont en accord avec les données rapportées du processus de lignification des tissus xylémiens d'angiospermes (Terashima et al., 1998). Ces unités non méthoxylées seraient impliquées dans les structures condensées sensibles à l'oxydation au nitrobenzène en accord avec de précédent travaux (Terashima et Fukushima, 1989; Boudet et al., 1995). Ces faibles teneurs en unités H paraissent négligeables en comparaison des teneurs en sous-unités G et S. De ce fait, la plupart des études du bois des dicotylédones ne mentionne pas leur présence et qualifie cette lignine de nature G-S.

La richesse en sous-unités G dans la fraction non-condensée des lignines du bois du lin, *i.e.* S/G ~0,2, contraste avec les données obtenues à partir de diverses dicotylédones ligneuses. L'étude de l'hétérogénéité des lignines dans des espèces pérennes souligne de larges variations avec un S/G compris entre 1,1 (bois de chêne) et 4,2 (bois de cerisier) (Tollier et al., 1986). Dans le peuplier, de faibles variations du rapport S/G (évoluant entre 1,4 et 2,1) sont appréciables entre les espèces (Van Doorsselaere et al., 1995; Franke et al., 2000). Contrairement aux espèces ligneuses, les plantes annuelles présentent des valeurs du ratio S/G approchant plus de celles du lin. Chez le

tabac et *Arabidopsis*, les lignines présentent un ratio S/G, estimé par thioacidolyse, respectivement de ~ 1 (Atanassova et al., 1995) et de 0,3 (Goujon et al., 2003b). Un tel constat est également constatable dans des plantes riches en fibres périphloémiennes (chanvre, luzerne) récoltées à des stades proches de la floraison. Le ratio S/G du bois de chanvre, déterminé par thioacidolyse, avoisine 0,7 et reste relativement constant le long de la tige (Chabbert et al., comm pers). Dans la luzerne, ce rapport, déterminé également par thioacidolyse, est compris entre 0,2 et 0,6 aux niveaux apicaux et basaux des tiges respectivement (Vallet et al., 1996). En revanche, les lignines de bois du jute montrent, par oxydation au nitrobenzène, un ratio S/G voisin de 1,4 (Islam et Sarkanen, 1993). Le ratio S/G du bois de kénaf est très variable selon les cultivars et le degré de maturation des tiges mais possède un minima égale à 1 (Morrison et al., 1999; Nishimura et al., 2002).

Les fortes proportions de sous-unités G dans le bois de dicotylédones annuelles sont à rapprocher du degré de condensation relativement élevé de leurs lignines par rapport aux espèces pérennes. Ce paramètre, illustré par le facteur G+S/teneur en lignines, est plus faible chez le lin (entre 1009 et 1456 $\mu\text{moles/g}$ de lignines) par rapport à la luzerne (~ 1950 $\mu\text{moles/g}$ de lignines (Vallet et al., 1996)). Par contre, chez le peuplier et le chêne dont les lignines sont plus riches en sous-unités S, ce même facteur est d'environ 2400 $\mu\text{moles/g}$ de lignines et 1970 $\mu\text{moles/g}$ de lignines respectivement (Lapierre, 1993). Ces données sont en accord avec la fréquence accrue des unités G à former des liaisons intermonomériques de type condensé (Higuchi, 1981; Monties, 1989a).

Composition monomérique et structure anatomique du bois

Les variations de la composition monomérique des lignines peuvent être reliées à la structure morphologique du xylème. En effet, Saka et Goring (1985 et 1988) ont montré chez le bouleau par microscopie UV couplée à la SEM-EDXA ou la TEM-EDXA (microscopie électronique à balayage (SEM) ou à transmission (TEM) combinée à l'analyse des rayons X émis par le bombardement électronique de l'échantillon) de singulières différences du ratio S/G dans le xylème au niveau des parois secondaires des fibres (S/G $\approx 7,3$), des vaisseaux (S/G $\approx 0,14$) et des rayons parenchymateux (S/G ≈ 1). Bien que ces valeurs puissent varier suivant les genres et espèces, les vaisseaux présentent très généralement les ratios S/G les plus faibles (Donaldson, 2001). L'immunomarquage des lignines a permis de confirmer l'existence de telles variations dans le bois du tabac et de l'eucalyptus (Ruel et al., 1999). Ces variations de la composition monomérique des lignines entre les différentes cellules xylémiennes sont associées à leur cinétique de lignification (Terashima et al., 1993). Par conséquent, les proportions de vaisseaux et fibres dans le xylème influent directement sur le ratio S/G de ce tissu. Dans le lin, la morphologie du xylème, appréciée en microscopie optique (figure 50), apparaît "moins

organisée" par rapport au bois hétéroxylé des dicotylédones où les vaisseaux sont clairement distinguables des fibres et les rayons parenchymateux bien visibles. L'anatomie du bois de lin peut rappeler l'organisation du xylème des gymnospermes lequel inclut principalement des trachéides constituées d'une lignine très riche en unités G (Higuchi, 1990; Baucher et al., 1998). Les angiospermes primitives et plus généralement les bois jeunes présentent une telle organisation du xylème (Carlquist, 1988). Une étude quantitative de la structure anatomique du bois de lin permettrait d'appréhender l'incidence de chaque type cellulaire dans la caractérisation globale des lignines.

β- La lignine incrustant les fibres périphloémiennes

Outre une parfaite illustration de "l'inhomogénéité tissulaire" des lignines de la tige de lin, l'étude comparative de la composition de ce polymère souligne une particularité des fibres périphloémiennes. Des proportions de sous-unités H supérieures aux teneurs en sous-unités S sont très rarement rapportées chez les dicotylédones (Monties, 1984b; Boudet et al., 1995). Cette remarque s'applique également à la présence de lignines plus condensées dans les fibres périphloémiennes à fin de leur maturation et à l'augmentation du ratio S/G, *i.e.* S/V, de 0,2 à 0,4 durant cette même période (Baucher et al., 1998; Dixon et al., 2001).

Une spécificité : la présence de sous-unités H.

Malgré une évolution non significative compte tenu des artefacts potentiels, les proportions de 4-hydroxybenzaldéhyde dans la lignine des fibres périphloémiennes ne peuvent être ignorées. Ces sous-unités H représentent en moyenne 21 % des monomères libérés par l'oxydation des lignines par le nitrobenzène. Leur absence lors de la thioacidolyse suggère leur implication dans des structures condensées de type β -1 et β - β plus minoritairement. En regard de la cinétique de la lignification établie dans le bois des angiospermes, ces unités H pourraient être localisées au niveau des jonctions tricellulaires et, à une concentration moindre, dans la lamelle moyenne des fibres périphloémiennes. Leur dépôt, lors des phases précoces de la lignification, précéderait la polymérisation de sous-unités G conduisant ainsi à la formation d'une lignine de nature H-G de type condensé (Terashima, 1989; Terashima et Fukushima, 1989; Fukushima et Terashima, 1991).

La présence de 4-hydroxybenzaldéhyde en proportions importantes est rarement rapportée ou non prise en compte chez les dicotylédones, les proportions détectées étant considérées comme négligeables ou artefactuelles (Nishimura et al., 2002). Les quelques exceptions concernent la lignine des fibrespériphloémiennes de certaines herbacées. Après oxydation des lignines des tissus externes de luzerne par le nitrobenzène (Jung et al., 1992) et de kénaf par le permanganate de potassium (Neto et al., 1996), du 4-hydroxybenzaldéhyde est détecté lequel représente respectivement 6 % et 10 % des monomères libérés.

Ces proportions de sous-unités H (rapport H:G:S moyen : 21:61:18) restent toutefois faibles par rapport aux monocotylédones. De ce fait, les lignines des tissus externes du lin ne peuvent être qualifiées de nature H-G-S au même titre que les lignines des monocotylédones en accord avec la classification systématique établie par Faix (Faix, 1991). En effet, les lignines constitutives des fibres foliaires d'abaca, une monocotylédone proche du bananier, ont une composition monomérique H :G :S, déterminée par oxydation au nitrobenzène d'environ 65 :13 :22 respectivement (Sun et al., 1999). Pourtant, l'analyse des lignines par thioacidolyse de la paille de riz révèle un rapport H:G:S de 15 : 45 :60 (Lapierre et al., 1995). Enfin, d'une manière générale, les proportions de sous-unité H échappent à la taxonomie "classique" des lignines (Monties et Fukushima, 2001).

Evolution qualitative des lignines durant la maturation des fibres périphloémiennes

Les observations immunocytochimiques révèlent une distribution préférentielle des lignines de nature G de nature condensée au niveau de la zone mitoyenne composite et en périphérie des parois secondaires des fibres périphloémiennes. Toutefois, le faible marquage des lignines par l'anti-Gzl au niveau des jonctions tricellulaires pourrait s'expliquer par le dépôt de lignines riches en sous-unités H, non reconnues par les immunosera.

Au cours de la maturation des fibres périphloémiennes, l'augmentation des teneurs en lignines est corrélée à un accroissement du ratio S/G, *i.e.* S/V, suggérant la polymérisation de lignines enrichies en sous-unités S. Une telle évolution est en accord avec la cinétique de la lignification établie dans le xylème révélant la polymérisation d'alcool sinapylique au cours des phases tardives de ce processus (Fukushima et Terashima, 1991; Terashima et al., 1993). Ces résultats sont à confronter à l'absence d'une évolution visible du marquage par les trois sondes immunologiques anti-Gzl, anti-GSzl et anti-GSzt. Cependant, au cours de la maturation des fibres périphloémiennes, une intense synthèse de polysaccharides pariétaux a lieu parallèlement à leur lignification (fin de formation de S2 et formation de S3). Ce dépôt ligno-polysaccharidique pourrait conduire à un masquage potentiel des épitopes de reconnaissance des lignines synthétisées au cours de la maturation des fibres.

Les résultats des deux méthodes dégradatives suggèrent l'existence d'une lignine plus condensée au stade capsules brunes. Ce constat peut être rapproché d'un remaniement de la matrice pariétale (remplissage des pores entre les microfibrilles de cellulose, contraction des liaisons polysaccharides-lignines) en fin de maturation des fibres permettant l'établissement de nouvelles liaisons condensées biphényles (5-5) entre les monomères des lignines (Terashima et al., 1998). Contrairement aux tissus très lignifiés du xylème où un tel remaniement passerait inaperçu, cette évolution des liaisons intermonomériques serait détectée au niveau des fibres périphloémiennes hypolignifiées.

En conclusion, la lignification des fibres périphloémiennes du lin semble conforme au modèle établi dans le bois de dicotylédones. La quantification et la caractérisation des lignines des fibres périphloémiennes du lin indiquent qu'au stade floraison la lignification a déjà débuté et que ce processus est déjà à moitié achevé. De fortes concentrations en lignines sont décelées dans les zones intercellulaires et en périphérie de S2. La polymérisation de sous-unité S est rapportée au milieu et à la fin du processus de lignification dès la formation de S2 (Terashima et al., 1993; Terashima et al., 1998). Les analyses chimiques mettent en évidence l'incorporation de monomères di-méthoxylés au stade floraison en accord avec la détection immunocytochimique de lignines de nature G-S non-condensée dans la couche S2 des fibres. Ces résultats confirment la datation de l'initiation de la lignification antérieure au stade floraison, en accord avec de précédents travaux (McDougall, 1991;1992). L'augmentation de la teneur en lignines est parallèle à l'accroissement du ratio S/G entre le stade 1 et le stade 3. Ceci indique le dépôt de lignines enrichies en unités S lors de synthèse de la cellulose. Cependant, les faibles teneurs en lignines dans ces fibres suggèrent que cette dernière étape, la plus longue dans le xylème, reste peu intense dans les fibres périphloémiennes. L'apoptose des cellules fibreuses les plus matures durant cette période va dans ce sens. Ces remarques sont en accord avec une relative richesse en unités H et le caractère condensé des lignines de ces fibres extraxylémiennes. La possibilité que des lignines de nature G-S déposées dans l'épaisse paroi secondaire ne puissent être accessibles aux méthodes dégradatives d'analyse des lignines ne peut être écartée.

Comparaison avec des travaux antérieurs sur le lin.

Les rapports S/G, *i.e.* S/V, déterminés dans les fibres de lin restent toujours inférieurs à 0,5 et bien en deçà des valeurs rapportées de précédents travaux. En effet, les ratios S/G rapportés de l'analyse des lignines des tissus externes par oxydation cuprique sont compris entre 2,4 et 3,5 au stade préfloraison (deux semaines avant le stade floraison) puis chutent à 1,6 au stade capsules brunes (Lozovaya et al., 1999; Gorshkova et al., 2000). Par cette technique, ces auteurs ne considèrent cependant qu'une fraction des produits de dégradation. De même, par hydrolyse alcaline 4 M à 170°C, les ratios S/G des tissus externes du lin en fin de phases de croissance varient de 0,5 à 4,5 en fonction du cultivar (Akin et al., 1996a; Akin et al., 1996b). De telles variations, sont à rapprocher de l'incapacité de cette technique à rompre efficacement les liaisons intermonomériques des lignines. L'emploi de cette même technique à partir de fibres périphloémiennes isolées révèle un facteur S/G d'environ 1 pour des lins prélevés à un stade pré-floral et de 0,5 pour des fibres matures (Morrison III et Akin, 2001). Toutefois, ces différentes techniques conduisent à deux constats semblables à ceux observés par thioacidolyse

et oxydation par le nitrobenzène : i. la présence d'une lignine plus condensée dans les fibres périphloémiennes par rapport au bois et ii. une augmentation du degré de condensation de la lignine de ces fibres au cours de leur maturation.

Comparaison avec des dicotylédones herbacées

La comparaison du ratio S/G des lignines des fibres périphloémiennes du chanvre, de la luzerne, du jute, du kénaf et du lin, révèle une étroite association entre les variations interspécifiques de ce facteur et les teneurs en lignines de ces fibres. En effet, plus ces teneurs sont fortes, plus le ratio S/G de la lignine des fibres est élevé. Parmi les différentes espèces citées ci-dessus, le lin possède les fibres périphloémiennes les moins lignifiées (en moyenne 2,9 % de la masse pariétale sèche) et les ratios S/G les plus faibles, ces derniers étant compris entre 0,2 et 0,4 (tableau 13).

La comparaison inter-tissulaire du ratio S/G chez ces différentes dicotylédones montre un profil évolutif similaire du ratio S/G entre les tissus internes et externes, ce ratio restant supérieur dans ces derniers tissus. Cependant, plus les teneurs en lignines sont faibles dans les fibres périphloémiennes, plus le ratio S/G entre les tissus externes et internes est proches. Dans le chanvre, les lignines des fibres périphloémiennes représentent 4 % de la masse pariétale sèche et possèdent un ratio S/G, déterminé par thioacidolyse de 0,8, lequel est semblable à celui détecté dans leur bois. Inversement, les lignines des fibres du kénaf et du jute constituant 9,4 % et 12,7 % de la masse pariétale sèche présentent un ratio S/G de 3,5 et 2,1 respectivement. Ce rapport est proche de 1 dans leurs tissus internes. De récentes études confirment de telles différences chez le kénaf : l'oxydation des lignines des tissus externes et internes des tiges prélevées à maturité révèle des ratios S/V de 5,67 et 1,48 respectivement (Lam et al., 2003).

Le profil de variation croissant du facteur S/G dans les fibres de lin matures, bien que peu significatif entre les niveaux de tige basal et apical, semble similaire à l'évolution constatée chez la luzerne et le kénaf mais contraire à celle enregistrée dans le chanvre.

Espèces	Niveau de tige	Ratio S/G	Facteur S+G*	Techniques utilisées	Auteurs
Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	basal	0,2	273	nitrobenzène	
	apical	0,4	344	nitrobenzène	
Chanvre (<i>Cannabis sativa</i>)	basal	0,9	750	nitrobenzène	Chabbert B., comm pers
	apical	0,4		nitrobenzène	
	entière**	0,8	n.d.	nitrobenzène	Lora, J.H. 2002
Jute (<i>Corchorus capsularis</i>)	entière**	2,1	~1350	nitrobenzène	Islam, A. et al. 1993
Kénaif (<i>Hibiscus cannabinus</i>)	basal	3,9	~450	hydrolyse	Morrison, W.H. et al. 1999
	apical	6,5	~500	hydrolyse	
	entière**	3,5	~1200	nitrobenzène	Nishimura, N. et al. 2002
Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	basal	0,4	645	thioacidolyse	Vallet, C. et al. 1996
	apical***	0,5	894	thioacidolyse	

S+G* : somme des monomères S et G libérés / g de lignine

entière** : analyses effectuées sur toute la hauteur des tiges

apical*** : partie la plus juvénile des tiges

Tableau 13 : ratios S/G calculés suite à l'analyse de la composition monomérique des lignines présentes dans les tissus externes de diverses dicotylédones prélevées à un stade de fibres matures.

Le tableau 13 permet également d'apprécier le "degré" de condensation des lignines constitutives de ces différentes fibres périphloémiennes via le rapport S+G / teneurs en lignines. Ainsi, les lignines des fibres de lin apparaissent comme les plus condensées. Un tel constat peut être relié à leurs faibles ratios S/G et leurs proportions importantes de sous-unités H. La présence d'une lignine plus condensée dans les fibres périphloémiennes par rapport au bois a été également constatée dans le kénaif (Nishimura et al., 2002; Lam et al., 2003) et la luzerne (Vallet et al., 1996) avec toutefois un écart moins accentué par rapport au lin. Par ailleurs, la détection d'une lignine plus condensée lors des phases tardives de la maturation des fibres périphloémiennes n'est pas spécifique au lin. En effet, l'analyse de la composition monomérique des lignines des fibres périphloémiennes du kénaif par hydrolyse alcaline montre une évolution du ratio S/G dans les tissus externes de 5,8 à 9 au cours des 30 jours précédents l'arrachage de ces plantes, i.e. période de maturation des fibres périphloémiennes (Morrison et al., 1999). Ces auteurs constatent, durant les 30 jours suivant la date normale de récolte, une décroissance de ce facteur signifiant l'apparition d'une lignine plus condensée dans les fibres limitant de ce fait sensiblement leur rouissage.

Cette discussion comparative se heurte cependant au mode de séparation des tissus externes riches en fibres périphloémiennes des tissus internes composés essentiellement de bois. En

effet, la plupart des études, effectuées sur le chanvre ou le kénaf après décortication manuelle des tiges, ne mentionnent et/ou ne considèrent pas la présence de fibres périphloémiennes secondaires, i.e. issues du phloème secondaire. Ces dernières, bien que peu développées dans les tiges à maturité, réagissent positivement au test de Weisner (Chabbert B, comm pers). Or, dans ces tissus externes peu lignifiés, de faibles variations quantitatives ou qualitatives des lignines peuvent engendrer des modifications majeures des résultats. Plus généralement, peu d'auteurs vérifient la contamination potentielle des tissus externes par du bois lors de l'étape de décortication notamment lorsque cette dernière est mécanique.

γ- Conclusion

La comparaison de la lignification des fibres périphloémiennes chez ces différentes dicotylédones révèlent deux groupes ayant leurs propres spécificités : teneurs en lignines, ratios S/G, variations spacio-différentielles de la composition monomérique des lignines. Le premier comprend le kénaf et le jute, le second est composé du lin, du chanvre et de la luzerne. Comparé au premier, ce second groupe révèle de plus grandes différences inter-espèces. Cette correspondance s'accorde avec la classification systématique de ces plantes récemment revue par Chase M., et al. (1998). Le kénaf et le jute, dont les fibres périphloémiennes dérivent du phloème secondaire, font partis du même ordre des malvales appartenant au super ordre des rosidées II. Par contre, le lin, le chanvre et la luzerne ne sont réunis qu'au niveau du super ordre des rosidées I. Ce plus grand éloignement d'un point de vue phylogénétique pourrait expliquer les plus grandes différences constatées entre ces trois dernières plantes. L'analyse de la composition monomérique des lignines en rapport avec la classification systématique des plantes suggère que l'Evolution tende à favoriser une lignine riche en sous-unités S (Faix, 1991). Les analyses de la composition monomérique des lignines du kénaf et du jute révèlent de plus fortes proportions de sous-unités S en comparaison des plantes du second groupe. Or, suivant la classification de Chase M. et al. (1998), les plantes appartenant au super ordre des rosidées II sont plus évoluées que celles du super ordre des rosidées I.

Les différences quantitatives et qualitatives des lignines des fibres périphloémiennes du lin, du chanvre et de la luzerne peuvent être rapprochées de leur profil de lignification respectif. D'un point de vue cultural et (micro-)morphologique des fibres, le lin et le chanvre présentent le plus d'analogies (Roelofsen, 1951; Rahman, 1979) lesquelles peuvent être rapprochées des teneurs et de la distribution des lignines dans leur tige plus proches en comparaison avec la luzerne.

Les données chimiques et les observations microscopiques (tableau 14) révèlent l'existence d'une corrélation positive entre les teneurs en lignines dans les tissus externes et l'appréciation de leur lignification par le test de Weisner. En outre, la réactivité de ces lignines au test de Maïle peut être rapprochée de leurs ratios S/G : la coloration rouge-pourpre des lignines des fibres périphloémiennes du chanvre et de la luzerne (Chabbert B., comm pers) se traduit par des ratios S/G supérieurs au lin. Ensemble, ces constatations semblent révéler une étroite relation entre la quantité et la qualité des lignines incrustant les fibres périphloémiennes : plus les teneurs en lignines sont faibles, plus les ratios S/G de ces lignines sont faibles et plus ces dernières sont condensées. Une telle corrélation semblerait s'accorder avec une récente discussion de la lignification à travers le règne végétal (Monties et Fukushima, 2001).

	Lin	Chanvre	Luzerne
Test de Weisner*	+	+	+
Localisation de la coloration rouge dans les faisceaux fibreux	JTC	ZMC	ZMC + périphérie PII
Teneur en lignines **	2,9	4	8,3
Test de Maïle ***	-	+	+
S/G	0,2 - 0,4	0,4 - 0,9	0,4 - 0,5
S+G ****	273 - 344		645 - 894

Test de Weisner * : +, correspond à une réponse positive, *i.e.* une coloration rouge

Test de Maïle *** : - correspond à une coloration brune, + correspond à une coloration rouge-pourpre

Teneur en lignines ** : déterminée par la méthode UV/bromure d'acétyle et exprimée en pourcentage de la masse sèche de résidus pariétaux.

S+G****: somme des monomères S et G libérés / g de lignine

JTC : Jonction tricellulaires, ZMC : Zone mitoyenne composite, PII : Paroi secondaire

Tableau 14 : Comparaison des résultats des analyses chimiques et des observations microscopiques après les tests de Weisner et de Maïle des lignines des tissus externes du lin, du chanvre et de la luzerne.

C – CARACTERISATIONS D'UNE CCoAOMT IMPLIQUEE DANS LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

Les techniques d'immunomarquage et d'analyse dégradative des lignines ont localisé et révélé la présence entre les cellules fibreuses périphloémiennes et dans le xylème d'une lignine riche en sous-unités G (ratios S/G inférieurs à 0,5). Cette caractéristique s'ajoute à l'hypolignification exceptionnelle de ces fibres dans le lin.

L'introduction des techniques de biologie moléculaire dans l'étude de la lignification a permis la mise en évidence des gènes et des enzymes associées contrôlant la composition monomérique des lignines, notamment les réactions d'hydroxylation et de méthylation (Donaldson, 2001; Plomion et al., 2001; Boudet, 2002). Chez les dicotylédones, la formation des sous-unités S et G nécessite l'activité de 2 *O*-méthyltransférases, l'acide caféique *O*-méthyltransférase et la caféoyl coenzyme A *O*-méthyltransférase (Whetten et al., 1998; Boerjan et al., 2003). Le rôle essentiel de la CCoAOMT dans la biosynthèse des sous-unités G mais aussi dans le contrôle des teneurs en lignines ont été de nombreuses fois rapportés dans différents modèles végétaux (Ye, 1997; Martz et al., 1998; Zhong et al., 1998). Ainsi la caractérisation de la CCoAOMT dans les tissus externes et internes des tiges de lin paraît indispensable à la compréhension des mécanismes régissant leur lignification.

Dans ce sens, après avoir vérifié la présence d'activités CCoAOMT dans les tiges de lin et défini un stade d'étude, le profil d'accumulation tissulaire de cette enzyme a été étudié. L'isolement d'un ADNc a ensuite permis d'étudier le profil d'expression du/des gène(s) mais aussi de produire la protéine recombinante. Les activités de cette enzyme vis à vis de différents substrats de la voie des phénylpropanoïdes ont alors été mesurées. Parallèlement, l'organisation génomique du/des gènes *CCoAOMT* chez le lin a été recherchée puis leur inactivation par stratégie antisens a été entreprise.

I - MESURE DES ACTIVITES CCoAOMT DANS LES TIGES DE LIN

Dans cette première approche effectuée sur le cultivar barbara, les activités CCoAOMT ont été recherchées dans des tiges de lin prélevé à différents stades de développement. Puis, aux stades présentant les activités CCoAOMT maximales, l'analyse séparée des tissus externes et des tissus internes dans les niveaux basaux et apicaux de tige de lin hermes a permis de préciser la distribution tissulaire de ces activités.

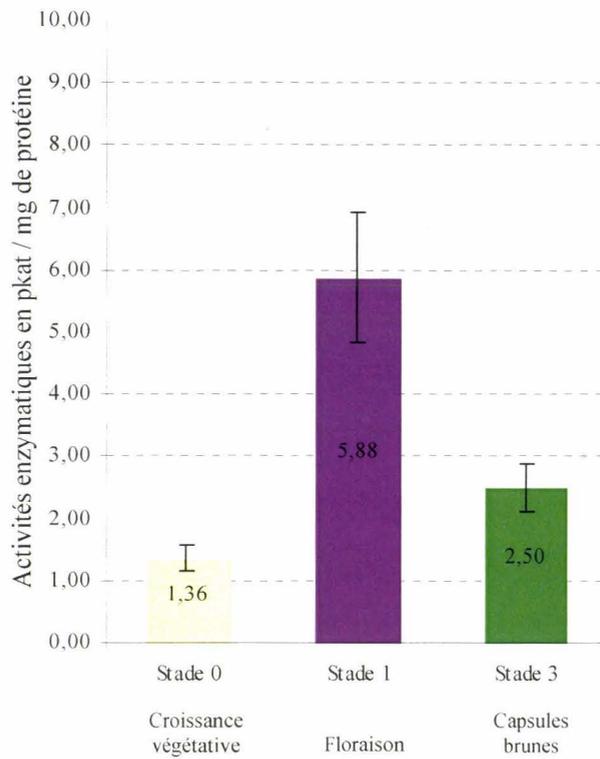


Figure 62 : Activités enzymatiques CCoAOMT vis à vis du caféoyl coenzyme A d'extrait protéique brut de tige de lin barbara prélevé à différents stades de développement. Les activités enzymatiques sont exprimées en pkat / mg de protéines totales. Les résultats sont la moyenne de trois analyses indépendantes. Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne.

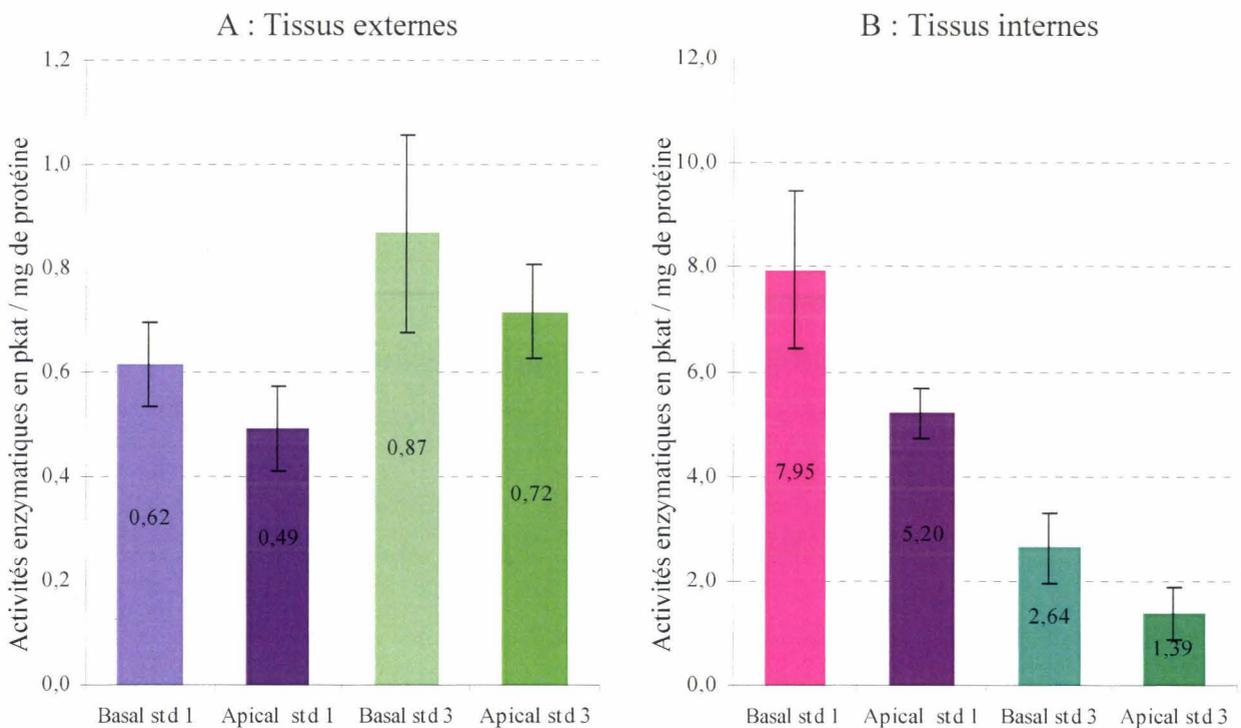


Figure 63 : Activités enzymatiques CCoAOMT vis à vis du caféoyl coenzyme A d'extrait protéique brut des tissus externes (A) et internes (B) de tige de lin hermes prélevé aux stades floraison, *i.e.* stade 1, et capsules brunes, *i.e.* stade 3. Les activités enzymatiques sont exprimées en pkat / mg de protéines totales. Les résultats sont la moyenne de trois analyses indépendantes. Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne.

1.1 - EVOLUTION DES ACTIVITES CCoAOMT AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES LINS

Les stades croissance végétative (stade 0), floraison (stade 1) et capsules brunes (stade 3) ont été sélectionnés pour suivre l'évolution des activités CCoAOMT dans les tiges de lin au cours de leur développement. Ces stades correspondent à des étapes remarquables de leur croissance et de leur maturation. Afin de refléter les activités CCoAOMT dans l'ensemble de la tige, cette première série de dosages enzymatiques a été effectuée à partir de tiges entières effeuillées.

Les activités mesurées, présentées figure 62, montrent d'importantes différences significatives entre les trois stades. Les activités CCoAOMT sont minimales au stade croissance végétative (1,36 pkat / mg de protéines). Elles augmentent ensuite brusquement pour atteindre un maximum au stade floraison (5,88 pkat / mg de protéines) puis diminuent dans les tiges de lins prélevés au stade capsules brunes (2,50 pkat / mg de protéines).

Ces analyses préliminaires montrent d'une part l'existence d'activités CCoAOMT dans les tiges de lin et d'autre part que les activités CCoAOMT, très variables selon le stade de développement des lins, sont maximales à partir du stade floraison. Ce stade correspond au début du remplissage des fibres périphloémiennes et coïncide avec un fort ralentissement de la croissance des tiges (Morvan et al., 1989b; McDougall, 1991; Roland et al., 1995). Ces résultats ont conduit à effectuer les analyses enzymatiques sur le cultivar à fibre hermes aux stades floraison et capsules brunes.

1.2 - ACTIVITES CCoAOMT DANS LES TISSUS EXTERNES ET INTERNES AU COURS DE LA MATURATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

Après isolement des fragments apicaux et basaux des tiges de lin hermes, les tissus externes riches en fibres périphloémiennes ont été séparés des tissus internes essentiellement composés de bois. Les activités enzymatiques CCoAOMT mesurées dans ces échantillons sont représentées dans la figure 63.

Il apparaît clairement que les activités CCoAOMT sont nettement supérieures dans les tissus internes en comparaison avec les tissus externes. Cependant ces différences ne sont pas constantes. Le calcul d'un ratio, pour un même niveau de tige, activités dans les tissus internes / tissus externes révèle de singuliers écarts en fonction du stade considéré. Au stade floraison, l'activité enzymatique CCoAOMT des tissus internes est 12,8 fois (fragment basal) et 10,6 fois (fragment apical) supérieures aux tissus externes. Ces valeurs sont respectivement de 3 et 1,9 au stade capsules brunes.

Dans les tissus externes, l'écart à la moyenne calculé pour chaque échantillon, ne permet pas d'affirmer l'existence de différences significatives entre les niveaux de tige. Par contre, ces valeurs semblent montrer que les activités CCoAOMT sont plus importantes dans les tissus externes prélevés au stade capsules brunes.

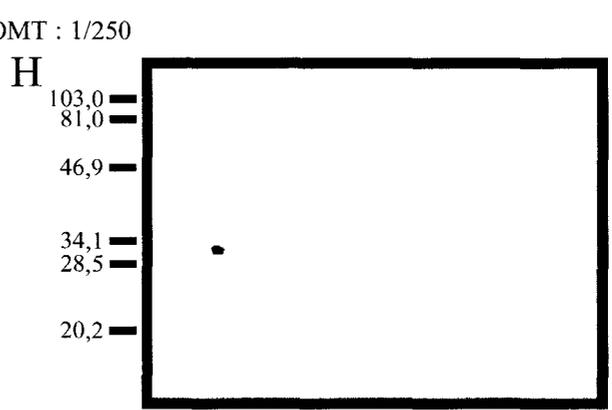
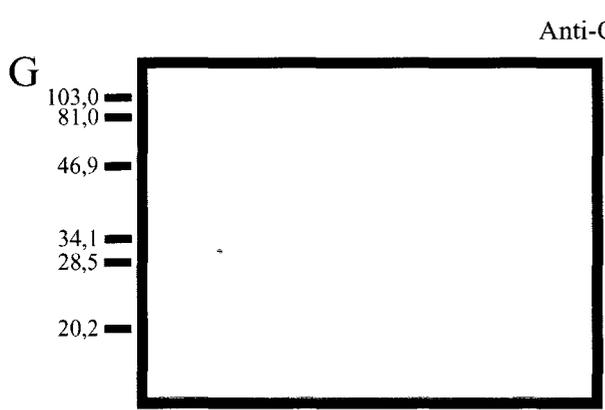
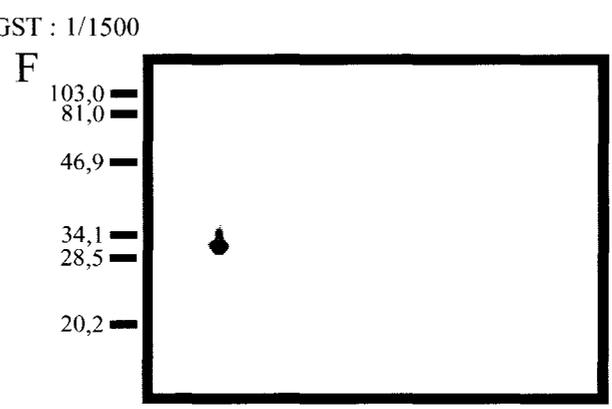
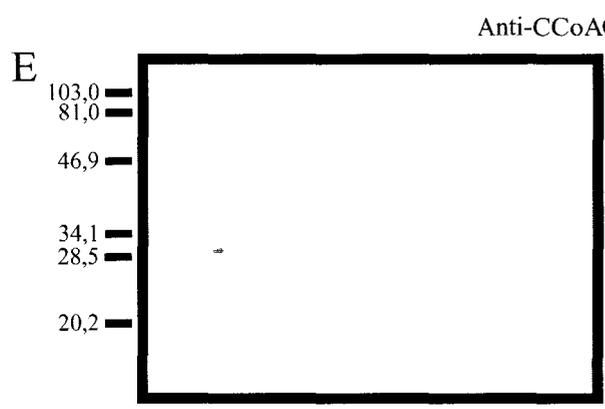
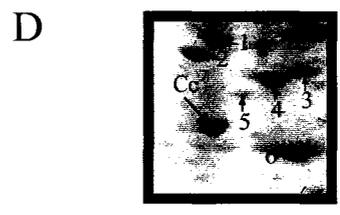
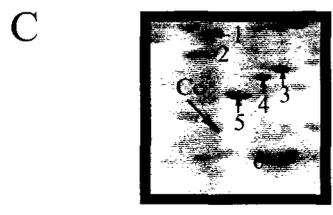
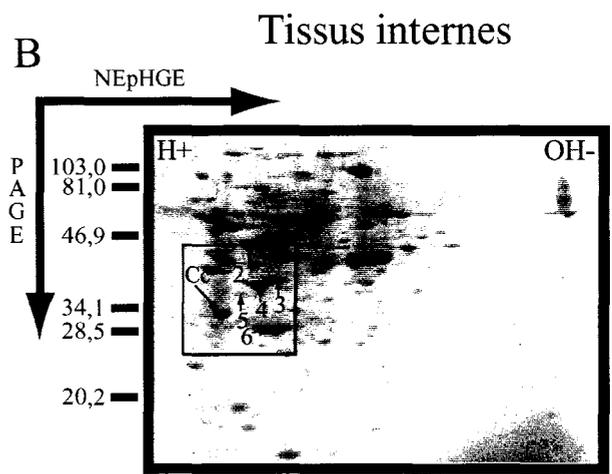
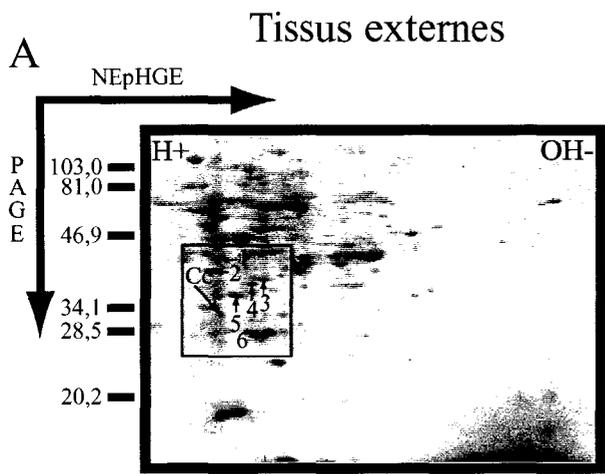
Dans les tissus internes, ce profil de variation est inversé : les activités CCoAOMT mesurées au stade floraison sont supérieures à celles enregistrées au stade capsules brunes. Dans le bois, quel que soit le stade considéré les fragments basaux présentent les activités enzymatiques les plus fortes : 7,95 *versus* 5,2 pkat / mg de protéines au stade floraison et 2,64 *versus* 1,29 pkat / mg de protéines au stade capsules brunes.

Ces résultats attestent la présence d'activités CCoAOMT dans les tissus externes dans lesquels les valeurs mesurées restent très inférieures en comparaison de celles relevées dans les tissus internes. Les écarts constatés entre ces deux tissus sont tels que les résultats du dosage sans "pelage préalable" (figure 62) ne reflètent que les variations des activités CCoAOMT dans les tissus internes. Cette distribution des activités CCoAOMT confirme la nécessité d'une analyse séparée des tissus externes et internes. En outre, les faibles variations enregistrées entre les stades floraison et capsules brunes dans les tissus externes et la baisse des activités CCoAOMT dans les tissus internes issus de lins prélevés à ce dernier stade conduisent à privilégier le stade floraison lors de nos analyses ultérieures.

II - ANALYSES ELECTROPHORETIQUES DE LA CCoAOMT DES TIGES DE LIN AU STADE FLORAISON

Afin d'établir une éventuelle corrélation entre les variations tissus spécifiques des activités CCoAOMT et le profil d'accumulation de ou des CCoAOMT présentés dans les tiges de lin, des électrophorèses bidimensionnelles suivies d'immunodétections ont été réalisées. Comme précédemment, des lins de variétés barbara (figure 64) et hermes (figure 65) ont été successivement analysés.

Les protéines totales des tissus externes et internes ont été extraites séparément à partir de tige de lin prélevé au stade floraison puis elles ont été analysées par la technique NEpHGE-PAGE. Pour chaque échantillon, au minimum 3 gels ont été réalisés afin d'effectuer une coloration des protéines totales au bleu de coomassie (figures 64 A, 64 B, 65 A, 65 B), et 2 immunodétections après transfert sur membrane (figures 64 E, 64 F, 64 G, 64 H et 65 E, 65 F). Pour chacune des sondes immunologiques employées un témoin sans anticorps primaire a été réalisé lequel est toujours resté négatif (non montré). Les 2 immunosera employés reconnaissent une CCoAOMT de peuplier et



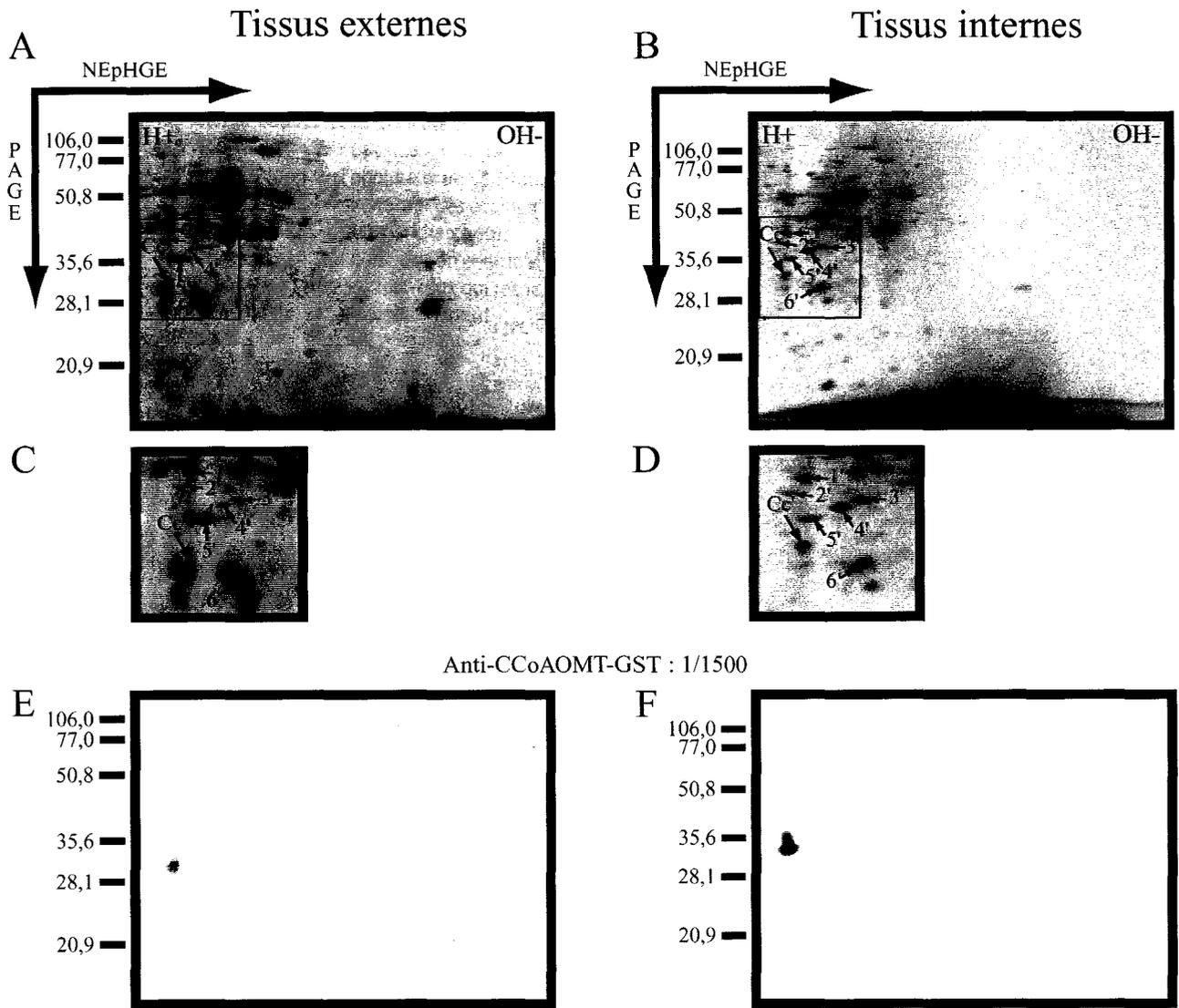


Figure 64 (ci-contre) et Figure 65 (ci dessus): Analyses électrophorétiques NEpHGE-PAGE et immunodétections de la CCoAOMT dans des extraits protéiques bruts de tissus interne et externe de tige de lin barbara (Figure 64) ou hermes (Figure 65) prélevé au stade floraison, *i.e.* stade 1.

A et B : Détection des protéines totales par coloration au bleu de coomassie. C et D : Agrandissement de la zone encadrée sur les gels A et B respectivement. Les polypeptides potentiellement similaires entre les différents échantillons possèdent des numéros identiques suivis d'un apostrophe pour les lins hermes. Spots Cc et Cc' : Polypeptide identifié, par immunodétection, comme une CCoAOMT .

E et F : Immunodétection d'une CCoAOMT à l'aide de l'immunsérum spécifique d'une protéine de fusion CCoAOMT-GST recombinante de peuplier employé à une dilution de 1/1500. G et H : immunodétection d'une CCoAOMT avec l'immunsérum reconnaissant une CCoAOMT recombinante de peuplier utilisé à une dilution de 1/250.

contiennent soit des anticorps anti-CCoAOMT-GST, soit des anticorps anti-CCoAOMT. Chacune des analyses électrophorétiques et immunologiques a été répétée au minimum deux fois.

La coloration des protéines présentes dans l'ensemble du gel révèle un profil électrophorétique global similaire quel que soit le cultivar de lin utilisé. Dans les deux cas, une forte accumulation de polypeptides du côté acide des gels est visible et ce, dans les tissus externes et internes. En outre, la majorité des spots détectés paraissent très groupés, ils se situent approximativement entre 35 kDa et 80 kDa. Une analyse plus détaillée des gels des tissus externes et internes révèle certaines différences et notamment des variations de l'intensité entre les spots. Or, la charge de protéines totales étant semblable pour chacun des gels, cette différence indique une accumulation différentielle, par exemple entre les spots 1, 2, 3, 4 et 5 (figure 64) et 1', 2', 3', 4' et 5' (figure 65).

Après transfert sur membrane de nitrocellulose et immunodétection avec deux ou une sondes immunologiques (figures 64 et 65 respectivement), un seul polypeptide possédant une masse moléculaire apparente d'environ 32-33 kDa et un pI acide est mis en évidence. Lors des études préliminaires effectuées à partir des lins barbara, l'emploi des deux immunosera a permis de vérifier leur spécificité respective. En effet, la colocalisation des signaux sur empreinte avec les deux sondes suggère fortement que le polypeptide détecté est une CCoAOMT. L'immunsérum contenant les anticorps dirigés contre la protéine de fusion, utilisée à une dilution au 1/1500^{ème} (figures 64 E, 64 F), semble plus sensible vis à vis de la CCoAOMT de lin comparé à celui produit contre la CCoAOMT seule et employé au 1/250^{ème} (figures 64 G, 64 H). Ainsi, seul l'immunsérum dirigé contre la CCoAOMT-GST a été exploité lors des analyses effectuées sur les lins hermes (figures 65 E, 65 F).

La comparaison des membranes et des profils électrophorétiques a permis de situer la CCoAOMT sur les gels colorés au bleu de coomassie. Cette localisation a été précisée et confirmée par la coloration au naphthol blue black de l'ensemble des protéines présentes sur les membranes ayant servi aux immunodétections (non montrée). Des agrandissements des régions contenant le spot identifié comme étant une CCoAOMT (spots Cc et Cc' figures 64 et 65 respectivement) révèle que ce polypeptide est identique dans chacun des échantillons. Quels que soient la variété et/ou le tissu, une seule CCoAOMT a été identifiée avec les sondes immunologiques employées. Du point de vue tissulaire, cette observation suggère que la CCoAOMT identifiée dans les tissus externes et internes est semblable. Son profil d'accumulation dans les différentes zones tissulaires a été analysé :

- Dans les deux cultivars, la CCoAOMT est nettement visible dans les gels contenant les extraits protéiques des tissus internes (figures 64 B, 64 D et 65 B, 65 D). Son profil d'accumulation relativement important en regard de l'intensité moyenne des spots détectés dans les gels suggère que cette enzyme soit abondamment exprimée dans les tissus xylémiens.

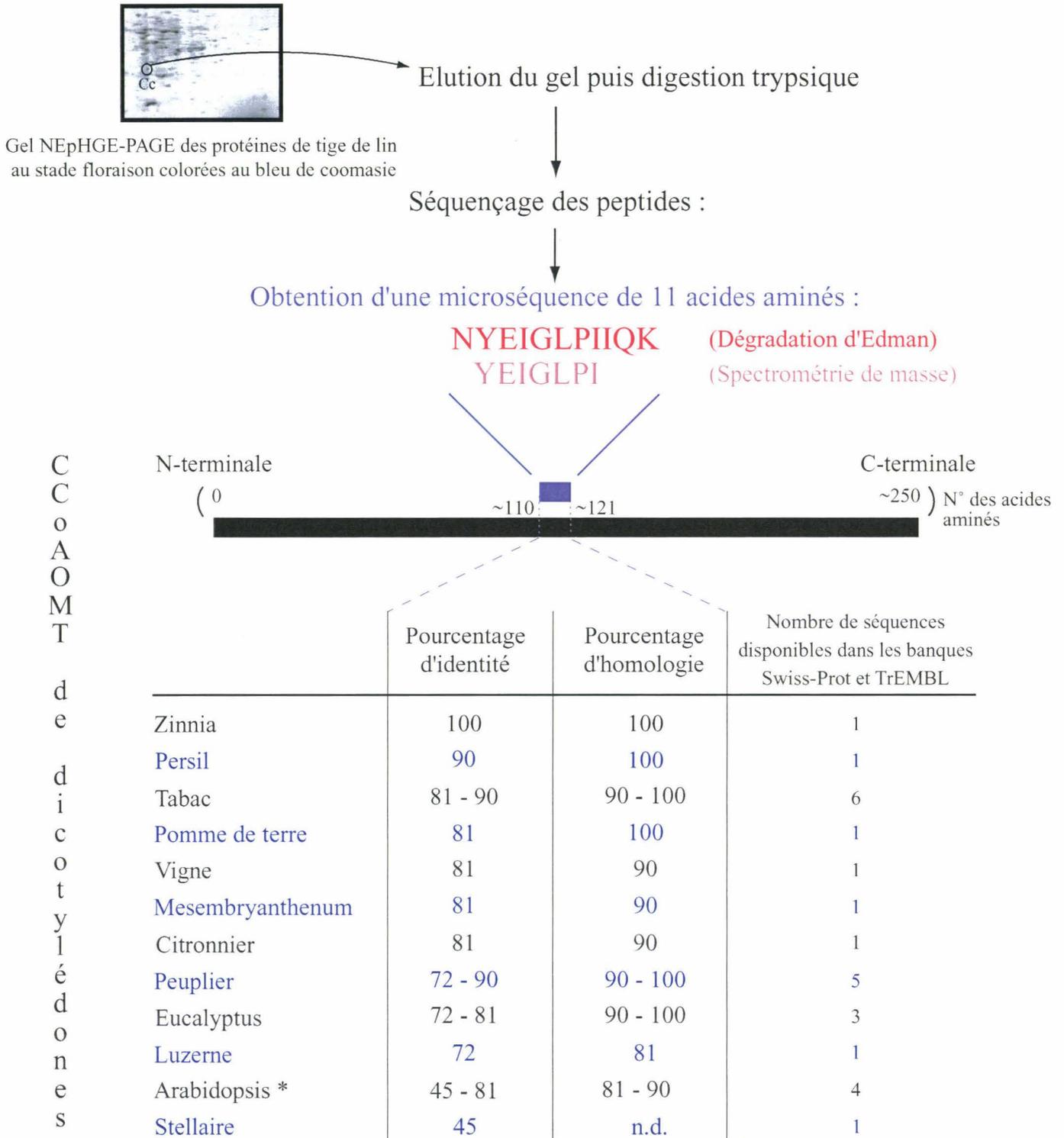


Figure 66 : Degré de conservation du peptide de 11 acides aminés obtenu après digestion trypsique puis séquençage du spot Cc.

Les pourcentages d'identité et d'homologie ont été déterminés par le service en ligne "SIB BLAST" à l'adresse : <http://us.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>. Ces données se réfèrent à l'ensemble des séquences accessibles dans les banques de données non redondantes Swiss-Prot et TrEMBL exceptées 2 des 4 séquences d'*Arabidopsis* * présentant les pourcentages d'identité les plus faibles. n.d. : non déterminé.

- Dans les tissus externes de lin barbara ou hermes (figures 64 A et 65 C, respectivement), la CCoAOMT est également détectée, avec toutefois une intensité plus faible. En outre dans ces tissus, une analyse comparative entre les deux cultivars de lin révèle, pour une même charge en protéines, une intensité différentielle du signal après immunodétection. Dans les lins à fibres hermes, le signal obtenu est plus soutenu (figure 65 E *versus* figure 64 E) et correspond à une accumulation plus importante de la CCoAOMT (figure 65 C *versus* figure 64 C). D'un point de vue constitutif, seul un nombre plus important de fibres périphloémiennes semble différencier les tissus externes du cultivar à fibres hermes du cultivar oléagineux barbara. L'existence d'une éventuelle relation entre le nombre de fibres périphloémiennes et l'accumulation de la CCoAOMT pourrait être envisagée suite à ces résultats.

Cette accumulation différentielle d'une CCoAOMT entre les tissus externes et les tissus internes rappelle les profils des activités enzymatiques CCoAOMT mesurées à partir de ces mêmes tissus. Ainsi, il semblerait exister une corrélation positive entre les activités enzymatiques CCoAOMT et l'accumulation d'un polypeptide de 32-33 kDa ayant un pI acide, nommé Cc (barbara) ou Cc' (hermes). La localisation semblable de ce polypeptide dans les tissus internes et externes suggère la détection d'une même isoforme. Bien que ce polypeptide ait été reconnu par les deux immunosera reconnaissant une CCoAOMT, seule son analyse par protéomique permettra de confirmer sans ambiguïté son identité.

III - ANALYSE D'UNE MICROSEQUENCE PEPTIDIQUE DE CCoAOMT DE LIN

Le polypeptide Cc (figures 64 A et C) a été excisé des gels d'électrophorèse NEpHGE-PAGE puis soumis à deux techniques de séquençage : i. la dégradation d'Edmann et ii. la spectrométrie de masse. Les études immunologiques suggérant que la CCoAOMT détectée est semblable dans les tissus externes et internes, les extraits protéiques utilisés pour ces électrophorèses NEpHGE-PAGE proviennent de tige entière non décortiquée de lin barbara prélevés au stade floraison.

Dans un premier temps, la technique de dégradation d'Edmann fut employée afin d'obtenir une séquence N-terminale. Malheureusement, les diverses tentatives n'ont donné aucun résultat informatif ; l'acide aminé N-terminal étant bloqué, la réaction de séquençage est rapidement stoppée. Des modifications post-traductionnelles à l'extrémité N-terminale de cette protéine (acétylation, présence d'acide pyroglutamique, formylation, pour exemples) peuvent expliquer ces échecs. Ainsi, dans un deuxième temps, la stratégie employée fut d'identifier une ou des séquences internes après protéolyse du spot Cc. Après digestion trypsique puis séparation par

HPLC, chaque peptide ainsi purifié a été microséquence par dégradation d'Edmann et par spectrométrie de masse. Une seule séquence de 11 acides aminés (NYEIGLPPIQK), confirmée par les deux techniques de séquençage, a été obtenue puis identifiée étant un fragment de CCoAOMT (figure 66). Cette microséquence présente 72 à 100 % d'identité (pourcentage d'acides aminés identiques) et 81 à 100 % d'homologie (pourcentage d'acides aminés ayant les mêmes propriétés physico-chimiques) avec la majorité des séquences protéiques de CCoAOMT de dicotylédones disponibles dans les banques de données. En effet, seules trois séquences de CCoAOMT, une de stellaire et deux d'*Arabidopsis*, montrent un faible pourcentage d'identité (45 %) avec la microséquence obtenue chez le lin.

IV - STRATEGIE EMPLOYEE POUR LA CARACTERISATION MOLECULAIRE D'UNE CCoAOMT DE TIGES DE LIN

L'obtention d'une microséquence peptidique de CCoAOMT de tige de lin a permis la poursuite d'une stratégie moléculaire. Les tentatives d'amplification d'un fragment nucléotidique de CCoAOMT de lin par PCR à partir d'ADNc ou d'ADN génomique avec des amorces dégénérées issues de l'alignement des acides aminés des diverses CCoAOMT de dicotylédones ont toutes échouées. Cette microséquence autorise la désignation d'amorces moins dégénérées et des conditions de manipulation plus spécifiques afin de caractériser à terme une CCoAOMT spécifique des tissus externes du lin.

Cette étude s'architecture en deux parties employant respectivement deux matériaux génétiques distincts: le transcriptome et le génome (figures 67, A et B respectivement). Leur développement parallèle a permis l'établissement de nombreuses connexions *via* l'utilisation de résultats et/ou d'outils obtenus dans chacune de ces parties.

4.1 - AMPLIFICATION DE FRAGMENTS GENOMIQUES PAR PCR

a - Nested-PCR sur l'ADN génomique

La microséquence peptidique précédemment identifiée a permis la désignation de deux amorces dégénérées chevauchantes, dPI et dP1 (figure 67 B). Afin d'effectuer deux amplifications par nested-PCR successives, quatre autres amorces dégénérées ont été désignées après l'alignement des acides aminés des séquences N-terminales (dP2 et dPII, figure 67 B) et C-terminales (dP3 et dPIII, figure 67 B) connues de CCoAOMT de dicotylédones.

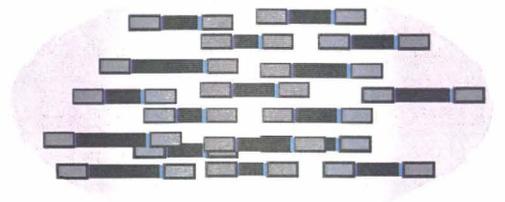
A - ADN complémentaire :

Analyse moléculaire de la lignification des fibres périphloémiennes par l'étude d'une CCoAOMT

Prélèvement de tiges de lin au stade floraison



Banque d'ADNc des tissus externes des tiges



Criblage par PCR et dilutions successives

1 seul clone partiel CCoAOMT :

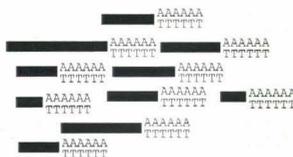
ORF : 726 pb 3'UTR : 293 pb



Synthèse de sondes radiomarquées



ADNc des tissus externes des tiges



PCR

Clone CCoAOMT entier :

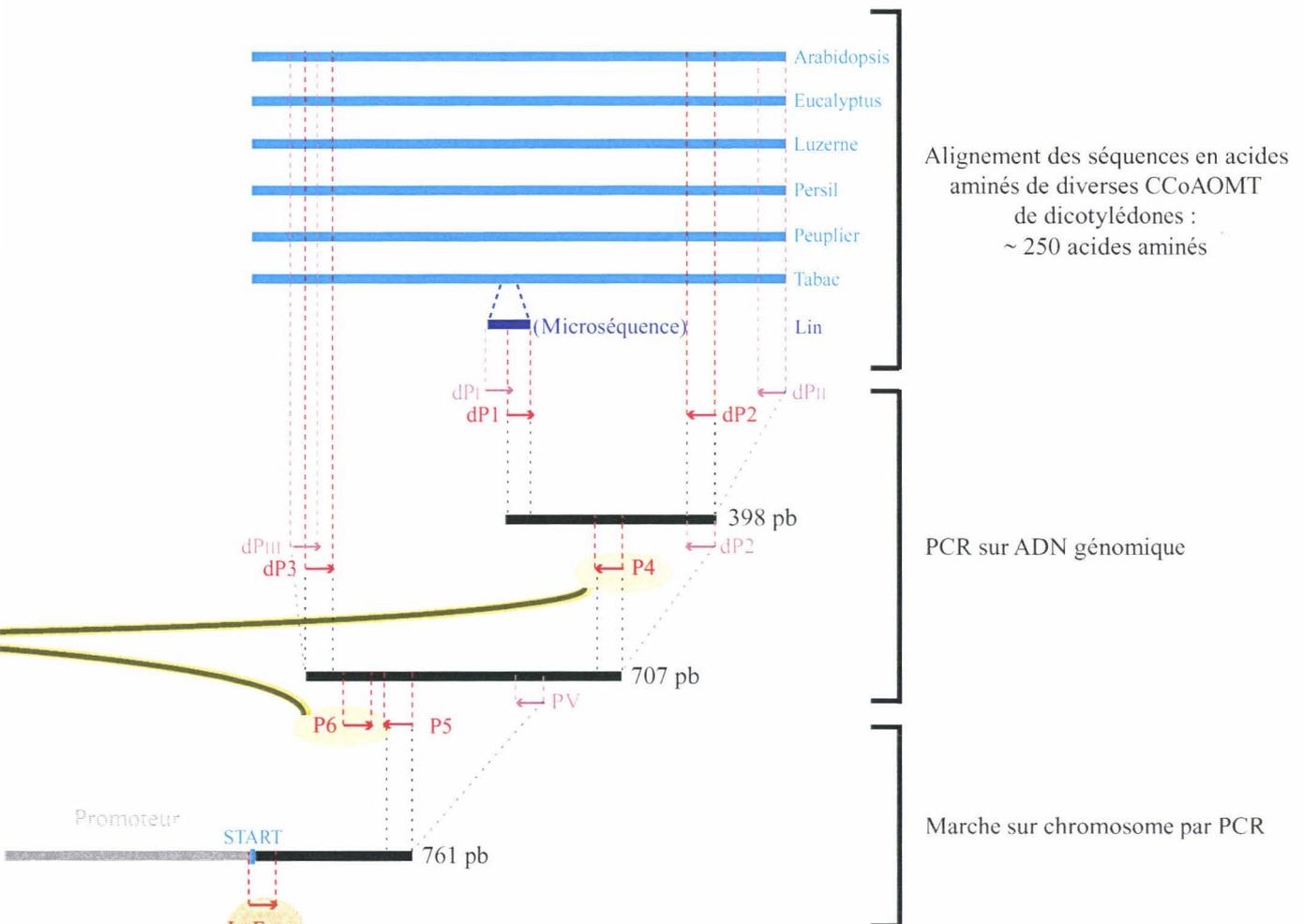
START STOP

ORF : 738 pb

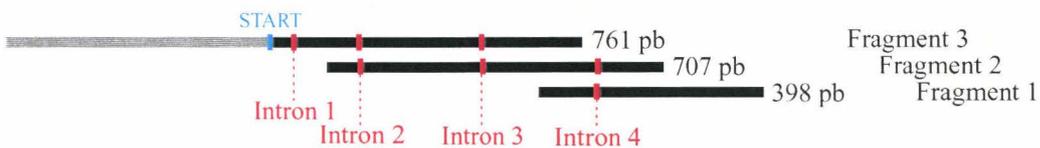
- ▶ Analyse de la séquence
- ▶ Production de la protéine et mesure de l'activité enzymatique
- ▶ Expression de ce transcript dans différents organes du lin au cours de la maturation des fibres

Figure 67 : Schéma résumant la stratégie employée pour la caractérisation moléculaire d'une CCoAOMT spécifique des tissus externes de lin (A) et du (ou des) gène(s) CCoAOMT chez le lin (B). dPx : amorces dégénérées, Px : amorces non-dégénérées.

B - ADN génomique : Caractérisation d'un / des gène(s) candidat(s) *CCoAOMT*



Séquence génomique partielle de gène(s) *CCoAOMT* :



➤ Structure et organisation génomiques

➤ Southern

La première nested-PCR, effectuée avec les amorces dPI et dPII puis dP1 et dP2, a permis d'obtenir un fragment génomique de 398 pb. Après séquençage et confirmation de son identité, ce fragment a servi de matrice pour la désignation d'une amorce homologue, P4 (figure 67, B).

La seconde nested-PCR, effectuée avec les amorces dPIII et dP2 puis dP3 et P4, a permis d'amplifier un autre fragment génomique de *CCoAOMT* de 707 pb utilisé à son tour pour désigner trois nouvelles amorces homologues : P6, P5 et PV (figure 67, B).

b - Marche sur le chromosome par PCR

La caractérisation du ou des gènes *CCoAOMT* s'est poursuivie par le développement de la technique de marche sur le chromosome par PCR avec les amorces P5 et PV (Devic et al., 1997). Cette méthode a permis d'isoler une séquence génomique de *CCoAOMT* de 761 pb localisée à l'extrémité 5' d'un gène *CCoAOMT*. Cette séquence comprend une région promotrice, le site d'initiation de la traduction et une séquence codante interrompue par trois introns (figure 67 B).

A terme, le regroupement des 3 fragments génomiques a permis d'analyser, chez le lin, la structure et l'organisation génomiques du ou des gènes *CCoAOMT* dont le nombre de copie fut déterminé par hybridation de type Southern (paragraphe 7.2).

4.2 - CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADNc

Afin d'étudier le rôle du gène *CCoAOMT* et de l'enzyme correspondante dans le processus de lignification des fibres de lin, une banque d'ADNc a été construite à partir de tissus externes de tige de lin hermes prélevés au stade floraison. Après vérification de leur présence dans la banque, les clones contenant un ADNc codant pour une *CCoAOMT* ont été isolés suite au criblage de cette banque.

a - Contrôle de la présence de clones *CCoAOMT*

A partir d'une aliquote de la banque comme source d'ADN, une réaction de PCR avec les amorces P4 et P6 a amplifié un fragment de 350 pb correspondant à la taille attendue déduite des séquences génomiques de *CCoAOMT* de dicotylédones après soustraction des introns. Son séquençage a confirmé son identité permettant ainsi d'attester la présence de clones *CCoAOMT* dans la banque.

Ce fragment a été utilisé comme matrice ADN pour la synthèse de sondes nucléotidiques radiomarquées employées lors des analyses d'hybridation ultérieures : criblage de la banque, northern-blot et Southern-blot.

b - Criblage à l'aide d'une sonde nucléotidique

A l'aide de la sonde précédemment décrite, deux criblages successifs de 600 000 plages de lyse de la banque ont été réalisés par la technique de double-empreintes. Malgré les faibles conditions de stringence du 2^{ème} criblage, aucun résultat positif n'a été obtenu. La très faible représentativité des clones *CCoAOMT* dans la banque pourrait expliquer ces échecs.

c - Criblage par PCR

Du fait de l'échec du criblage avec une sonde nucléotidique, une stratégie plus spécifique permettant de cribler un nombre plus élevé de plage de lyse a été développée. Cette nouvelle technique nommée "criblage par PCR" combine des techniques de PCR et de culture de phages à des dilutions données. Elle nécessite deux amorces non dégénérées spécifiques de gènes *CCoAOMT* : les amorces P4 et P6 ont été choisies. La visualisation par électrophorèse de cette bande dans le produit PCR révèle la présence de clones *CCoAOMT*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15.

Une seule boîte positive a été identifiée lors des deux premiers criblages. Or, la probabilité d'obtenir plusieurs clones différents portant des ADNc de *CCoAOMT* dans la même boîte à chaque série de criblage est si faible qu'il est plus crédible de conclure à la multiplication initiale d'un seul clone *CCoAOMT*. Cette très faible représentativité des clones *CCoAOMT* dans la banque tendrait à expliquer l'absence de résultats positifs suite au criblage classique. Après son isolement lors de la 5^{ème} série de criblage, ce clone *CCoAOMT* a été séquencé. L'analyse bioinformatique de ce dernier confirme son identité et révèle son organisation: cet ADNc, de 1019 pb, codant une *CCoAOMT*, est composé d'une séquence 3'UTR de 290 pb incluant la queue polyA et d'une séquence codante de 729 pb. La comparaison de cette dernière avec divers ADNc codant une *CCoAOMT* de dicotylédones dévoile la délétion de l'extrémité 5' incluant le codon "start" ATG de l'ADNc du clone *CCoAOMT* isolé (Figure 67 A).

Séries de criblage	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	5 ^{ème}
Nombre de boîtes	30	30	30	10	2
Nombre de pfu / boîte	30 000	3 000	300	30	100
Nombre total de pfu criblées	900 000	90 000	9 000	300	200
Nombre de boîtes positives*	1	1	2	7	2

Tableau 15 : Résultats du criblage par PCR d'une *CCoAOMT* de la banque d'ADNc de tissus externes de lin prélevé au stade floraison. *: signifie la présence, dans le ou les produits PCR avec les amorces P4 et P6, d'une bande de 350 pb environ (taille conforme à celle attendue de l'amplification d'un ADNc codant une *CCoAOMT*).

4.3 - OBTENTION D'UN ADNc PLEIN LONGUEUR *CCoAOMT*

Afin de disposer d'une séquence codante pleine longueur d'une *CCoAOMT*, deux amorces non dégénérées ont été désignées au niveau des codons start ATG (LuForw) et stop (LuBack) à partir du fragment génomique de 761 pb issu de la marche sur le chromosome par PCR (*c.f.* 4.1-b) et du clone partiel *CCoAOMT* (*c.f.* 4.2-c) respectivement. Ces amorces ont été employées lors d'une réaction de PCR en utilisant comme matrice des ADNc synthétisés à partir d'ARNm provenant des mêmes tissus que ceux employés pour la banque. Après séquençage et analyse bioinformatique, le fragment obtenu de 741 pb, identifié comme un ADNc plein longueur de *CCoAOMT*, a été cloné dans un vecteur d'expression afin de produire la protéine recombinante.

V - CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES ET ENZYMATIQUES D'UNE *CCoAOMT* ISOLEE DES TISSUS EXTERNES DE TIGE DE LIN

5.1 - ETUDE SEQUENTIELLE DE L'ADNc PLEIN LONGUEUR

a - Analyse de la séquence nucléotidique

La séquence de l'ADNc pleine longueur codant une *CCoAOMT* obtenu précédemment est présentée figure 68 A. Les trois premiers nucléotides, numérotés 1 à 3, de cette séquence de 741 pb correspond à un codon ATG. La présence d'un C en position + 5 est caractéristique du début d'une séquence codante chez les végétaux (Lütcke et al., 1987) confirmant ainsi que cet ATG est le codon start de la *CCoAOMT*. Considérant ce cadre de lecture, le premier codon stop rencontré par la machinerie de traduction se situe à la position 739-741 correspondant à l'extrémité 3' de l'ADNc. La traduction de cet ADNc révèle une séquence protéique de 246 acides aminés; la correspondance entre les séquences nucléotidique et protéique de cet ADNc est présentée figure 68 A.

La comparaison des séquences de cet ADNc *CCoAOMT* plein longueur et de l'ADNc *CCoAOMT* isolé de la banque révéla 98 % d'identité entre ces deux séquences nucléotidiques (non montré). Les 16 pb différentes ne modifient pas la séquence en acides aminés conduisant à 100 % d'identité entre les séquences protéiques déduites de ces deux ADNc. Des erreurs de lecture du spectre de séquençage seraient très probablement à l'origine de telles dissemblances. Par ailleurs, cet alignement a permis de constater que la délétion à l'extrémité 5' du clone partiel *CCoAOMT* issu de la banque concernait seulement 12 pb de la séquence codante.

A

```

5' 1/1      31/11      61/21
ATG GCT GAG CAA CAG CAA TCA GGG GAG AAT GTC AGC AGG CAT CAG GAA GTC GGC CAC AAG AGT CTC CTC CAG AGC GAT GAT CTT TAC CAG
M   A   E   Q   Q   Q   S   G   E   N   V   S   R   H   Q   E   V   G   H   K   S   L   L   Q   S   D   D   L   Y   Q
91/31     121/41     151/51
TAT ATT CTC GAG ACG AGC GTT TAC CCG AGG GAG CCG GAG TCC ATG AAG GAA CTC CGA GAG GTC ACC GCC AAA CAC CCC TGG AAT ATC ATG
Y   I   L   E   T   S   V   Y   P   R   E   P   E   S   M   K   E   L   R   E   V   T   A   K   H   P   W   N   I   M
181/61     211/71     241/81
ACC ACG TCT GCC GAC GAA GGA CAG TTC CTC AAC ATG CTA CTG AAG CTC ATC AAT GCT AAG AAC ACA ATG GAG ATC GGC GTC TAC ACT GGC
T   T   S   A   D   E   G   Q   F   L   N   M   L   L   K   L   I   N   A   K   N   T   M   E   I   G   V   Y   T   G
271/91     301/101     331/111
TAC TCC CTT CTC GCC ACC GCC CTC GCT CTC CCC GAC GAC GGA AAG ATC TTG GCA ATG GAT ATC AAC AGA GAG AAC TAC GAA ATC GGC CTG
Y   S   L   L   A   T   A   L   A   L   P   D   D   G   K   I   L   A   M   D   I   N   R   E   N   Y   E   I   G   L
361/121     391/131     421/141
CCA ATC ATC GAG AAA GCC GGA CTT GCT CAC AAG ATC GAG TTC AAA GAA GGC CCA GCA CTG CCC GCT CTT GAC AAG ATG GTC GAA GAC AAA
P   I   I   E   K   A   G   L   A   H   K   I   E   F   K   E   G   P   A   L   P   A   L   D   K   M   V   E   D   K
451/151     481/161     511/171
GCC AAC CAC GGA GCG TAC GAC TTC ATA TTT GTC GAC GCG GAC AAG GAC AAC TAC ATC AAC TAC CAC AAG AGG CTG ATC GAC TTG GTG AAG
A   N   H   G   A   Y   D   F   I   F   V   D   A   D   K   D   N   Y   I   N   Y   H   K   R   L   I   D   L   V   K
541/181     571/191     601/201
ATC GGT GGA GTC ATC GGG TAC GAC AAC ACC CTA TGG AAC GGG TCC GTA GTC GCG CCT CCT GAT GCG CCG TTG AGG AAG TAC GTT AGG TAC
I   G   G   V   I   G   Y   D   N   T   L   W   N   G   S   V   V   A   P   P   D   A   P   L   R   K   Y   V   R   Y
631/211     661/221     691/231
TAC AGG GAC TTC GTT TTG GAG CTC AAC AAG GCG CTT GCT GCT GAC CCG AGG ATC GAG ATC TGC ATG CTC CCC GTT GGA GAC GGA ATC ACT
Y   R   D   F   V   L   E   L   N   K   A   L   A   A   D   P   R   I   E   I   C   M   L   P   V   G   D   G   I   T
721/241
CTC TGC CGC CGG ATC AGC TAA 3'
L   C   R   R   I   S   *

```

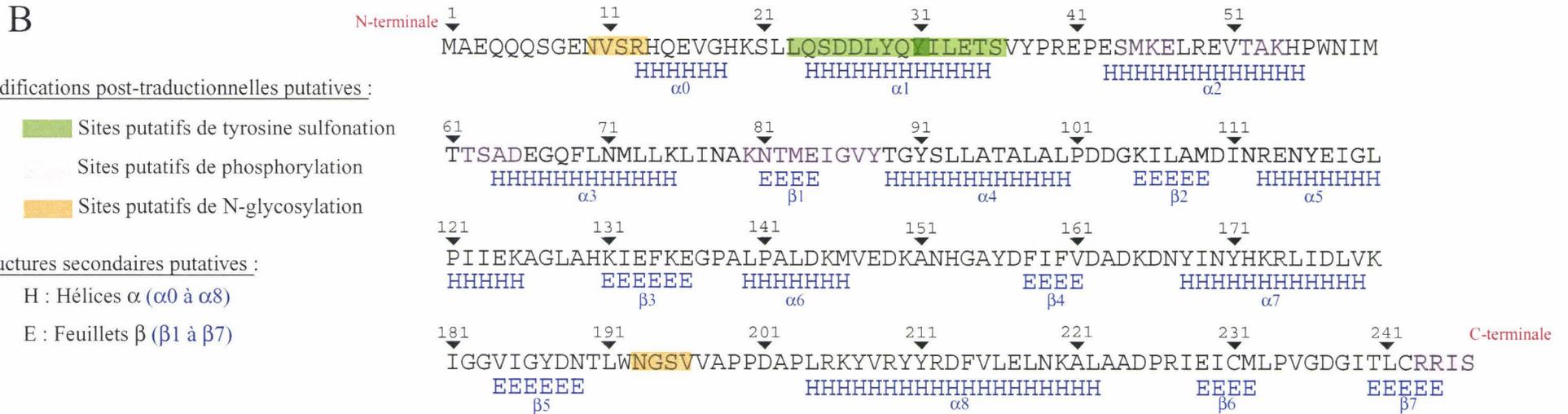


Figure 68 : Caractéristiques des séquences nucléotidique (A) et protéique (B) de la CCoAOMT isolée des tissus externes de tige de lin prélevé au stade floraison, *i.e.* stade 1.

A : Séquences nucléotidique et protéique déduite de l'ADNc codant la CCoAOMT cloné dans le vecteur d'expression. Les nucléotides et les acides aminés sont numérotés au-dessus de chaque ligne. B : Analyse bioinformatique de la séquence protéique déduite de l'ADNc, les sites putatifs de modification post-traductionnelle sont surlignés selon le code couleur indiqué ci dessus.

b - Analyse de la séquence protéique déduite de l'ADNc plein longueur

La séquence protéique de 246 acides aminés déduite de l'ADNc plein longueur est présentée figure 68 B. Son analyse bioinformatique indique que ce polypeptide posséderait théoriquement une masse moléculaire de 27,9 kDa et un pI de 5,30. Comparé à la localisation de la CCoAOMT identifiée sur les gels d'électrophorèse NEpHGE-PAGE, ce pI théorique est conforme aux données expérimentales mais la masse théorique est en deçà. En effet, les analyses 2-D révèlent une masse moléculaire d'environ 32-33 kDa. Des modifications post-traductionnelles pourraient en partie expliquer cette différence. En outre, la prédiction des structures secondaire et tertiaire et l'alignement comparatif de cette séquence protéique ont été étudiés afin d'apprécier son degré d'homologie avec diverses CCoAOMT de dicotylédones.

α - Recherche des modifications post-traductionnelles putatives

Les sites potentiels de modifications post-traductionnelles ont été recherchés à l'aide de divers outils d'analyse bioinformatique ; les résultats obtenus sont présentés figure 68 B. Au total, huit sites putatifs ont été détectés correspondant à trois catégories de modifications post-traductionnelles :

- Un site de tyrosine sulfonation, *i.e.* addition d'un résidu sulfonyl provenant du 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate au niveau de Y₃₁, nécessitant un site de reconnaissance s'étendant du L₂₃ au S₃₆
- Deux sites putatifs de N-glycosylations, *i.e.* addition de chaînes polysaccharidiques au niveau de l'azote de la chaîne latérale de l'asparagine, au niveau de N₁₀ et N₁₉₃
- Cinq sites de phosphorylations, *i.e.* transfert d'un groupement phosphate de l'ATP au groupement hydroxyle de la chaîne latérale des sérines, S₄₃ et S₂₄₆, ou des thréonines T₅₂, T₆₂, T₈₂.

La CCoAOMT étant cytosolique (Kersey et al., 1999; Chen et al., 2000; Takeuchi et al., 2001), la sulfonation du résidu tyrosine et les N-glycosylations sont improbables, ces modifications affectant principalement les protéines membranaires ou sécrétées. Par contre, la phosphorylation de la CCoAOMT pourrait être envisagée comme actrice de sa régulation enzymatique mais ne peut toutefois pas expliquer la différence de masse constatée.

β - Prédiction des structures secondaire et tertiaire

La structure secondaire de la CCoAOMT recombinante a été recherchée par analyse bioinformatique : 9 hélices α , numérotées α_0 à α_8 et 7 feuilletts β , numérotés β_1 à β_7 , ont été prédits avec un indice de confiance moyen de 7/9, excepté l'hélice α_0 affichant un indice de confiance de 4/9 (figure 68 B). La comparaison de ces structures secondaires avec celles

identifiées chez diverses CCoAOMT de dicotylédones (tabac, persil, peuplier, vigne, *Arabidopsis*) révèle une grande conservation de tous ces motifs sauf de l'hélice $\alpha 0$ qui n'est jamais retrouvée. Cette homologie concernant à la fois la position et la longueur des séquences en acides aminés impliquées dans ces structures secondaires peut être reliée au rôle essentiel de ces dernières dans l'activité enzymatique de la CCoAOMT (Hoffmann et al., 2001).

De ce fait, la structure tertiaire de cette CCoAOMT de lin paraît semblable à celle d'une CCoAOMT de tabac révélée par cristallographie. Les feuillets $\beta 1$ à $\beta 5$ seraient parallèles entre eux tandis que les feuillets $\beta 6$ et $\beta 7$ seraient antiparallèles. Les hélices $\alpha 4$ à $\alpha 8$ et les feuillets $\beta 1$ à $\beta 6$ formeraient un motif tridimensionnel semblable au domaine de Rossmann identifié dans les alcools déshydrogénases et impliqué dans la fixation du NAD^+ (Skinner et al., 2000). La S- adénosyl méthionine se fixerait entre les feuillets $\beta 1$ et $\beta 4$ (Hoffmann et al., 2001).

De telles structures secondaire et tertiaire ne sont pas spécifiques aux CCoAOMT de dicotylédones mais sont retrouvées dans toutes les *O*-méthyltransférases de structures connues tant chez les végétaux : CCoAOMT de maïs (monocotylédone), de pin (gymnosperme), que chez les animaux : catéchol-*O*-méthyltransférase de rat (Hoffmann et al., 2001).

γ - Comparaison de sa séquence protéique et identification des sites actifs

La séquence en acides aminés de la CCoAOMT clonée a été alignée avec différentes séquences de CCoAOMT de dicotylédones (figure 69). Ces dernières ont été classées en deux groupes en fonction du degré d'homologie de leur séquence. Ainsi différentes CCoAOMT isolées d'une même plante (*Arabidopsis*, peuplier) peuvent se retrouver dans des groupes différents.

La CCoAOMT isolée des tissus externes de lin présente 72,8 % d'identité avec les CCoAOMT du premier groupe dans lequel sont classées la majorité des CCoAOMT caractérisées chez les dicotylédones (*Zinnia*, persil, tabac, luzerne). Par contre, la CCoAOMT de lin ne présente que 43,5 % d'identité par rapport aux CCoAOMT du second groupe.

Une analyse détaillée de ces alignements protéiques révèle que le dodécapeptide situé à l'extrémité N-terminale des CCoAOMT n'est conservé chez aucune des dicotylédones. Par contre, le degré d'homologie de la CCoAOMT de lin avec les CCoAOMT du premier groupe est très importante au niveau des domaines conservés caractéristiques des enzymes de la superfamille des OMT (motifs I à III) et plus spécialement des CCoAOMT (motif A à E) (Ye et al., 1994; Li et al., 1997; Joshi et Chiang, 1998). En outre, cette CCoAOMT de lin présente 100 % d'identité avec les acides aminés intervenant dans la fixation du cofacteur Mg^{2+} , de la SAM et du substrat (Hoffmann et al., 2001). Selon ces mêmes auteurs, la présence d'une arginine (R) en

position 227 induit la préférence de substrat des CCoAOMT pour le caféoyl CoA. Le groupement coenzyme A joue un rôle prépondérant dans ce choix en établissant des interactions électrostatiques via son groupement phosphodiester avec cet acide aminé.

Les résultats de ces alignements confirment que l'ADNc isolé des tissus externes de lin par PCR avec le couple d'amorce LuForw et LuBack, code pour une CCoAOMT.

5.2 - ANALYSE DE SA SPECIFICITE DE SUBSTRAT

La méthylation des monolignols étant toujours débattue, aucune des diverses voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes proposées dans la littérature ne prétend distinguer formellement le rôle exact des deux *O*-méthyltransférases (Meyermans et al., 2000; Guo et al., 2001). Proposé initialement comme agissant au niveau des esters CoA (Pakusch et al., 1989), la CCoAOMT est supposée maintenant avoir une action méthylante au niveau des aldéhydes et des alcools (Chen et al., 1999). Par ailleurs, Meyermans et al. (2000) ont récemment remis en cause le point commun à l'ensemble des travaux précédents qui suggère que seule la COMT catalyse la méthylation des acides hydroxycinnamiques. En effet, ces auteurs sous-entendent l'implication d'une autre *O*-méthyltransférase à ce niveau.

Dans ce contexte très incertain, la spécificité de substrat de la CCoAOMT clonée a été recherchée afin de comprendre son rôle dans la lignification des fibres périphloémiennes du lin. Après avoir produit et purifiée la CCoAOMT recombinante, cinq substrats différents de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et spécifiques des différents niveaux de cette voie ont été testés.

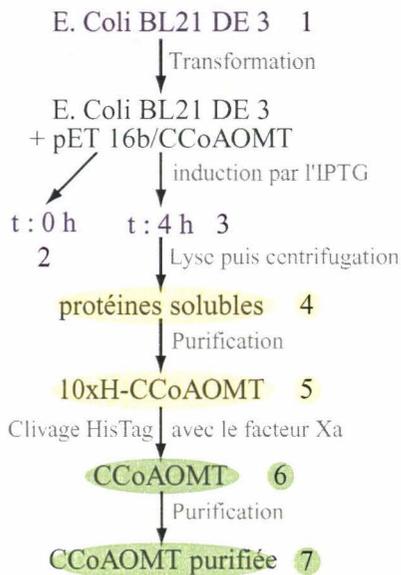
a - Production et purification de la protéine recombinante CCoAOMT

α - Principe et provenance des extraits protéiques

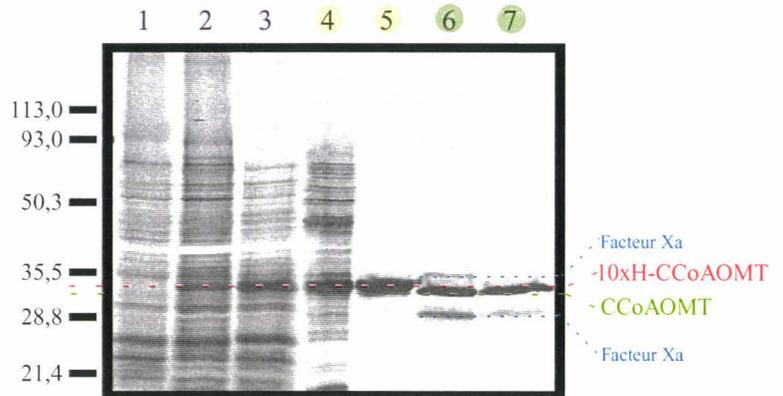
Les différentes étapes survenant de la production à la purification finale de la CCoAOMT recombinante sont présentées dans la figure 70 A. Ces nombreuses étapes, qui ont individuellement fait l'objet d'un contrôle par le prélèvement d'aliqotes, peuvent être regroupées en 3 phases distinctes :

- La première phase inclut la transformation des bactéries par le vecteur pET 16b/CCoAOMT (1) suivie de la culture des bactéries transformées après 4 h d'induction par l'IPTG (3). Une aliquote prélevée avant l'ajout de l'inducteur (2) permet de vérifier cette étape de production.
- Au cours de la deuxième phase, les protéines solubles contenues dans le lysat des cellules bactériennes induites (4) sont incubées avec une matrice solide sur laquelle sont fixés des ions Ni²⁺. L'affinité des résidus histidines (H) pour les ions Ni²⁺ (Porath et al., 1975; Yip et al.,

A - Légende des échantillons



B - Révélation des protéines par coloration au nitrate d'argent



C - Immunolocalisation de la CCoAOMT

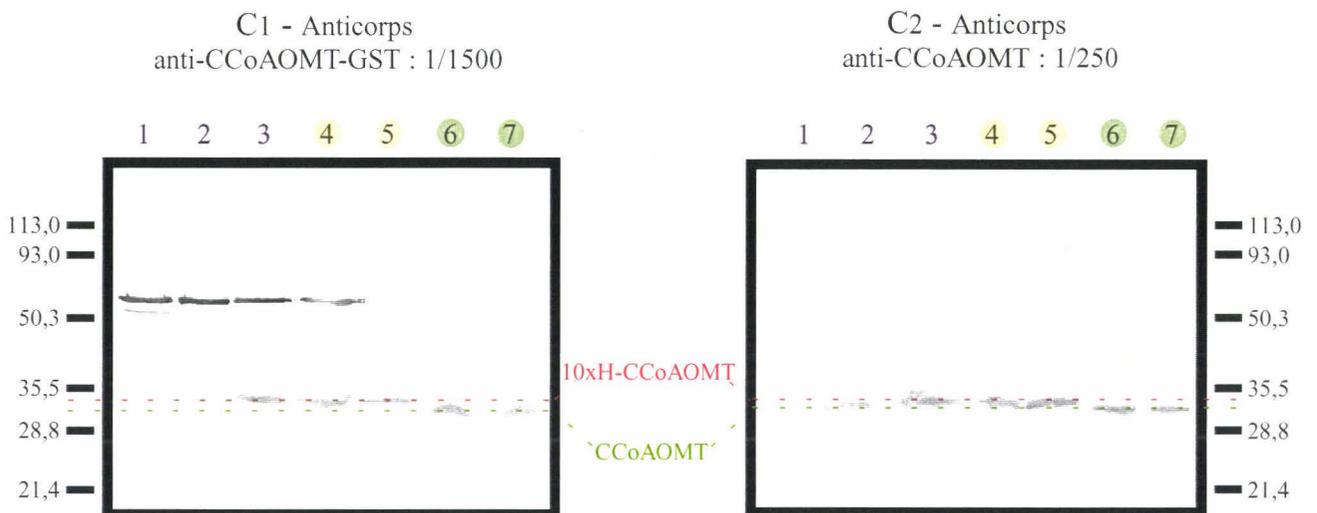


Figure 70 : Expression et purification de la CCoAOMT recombinante chez *E. Coli* (BL 21 Gold, DE 3[®]).

A : Diagramme récapitulatif des différentes étapes de production et de purification de la CCoAOMT recombinante

B : Révélation par le nitrate d'argent des protéines présentes dans le gel après électrophorèse SDS-PAGE.

C : Immunodétections de la CCoAOMT, après électrophorèses SDS-PAGE puis transferts sur membrane de nitrocellulose, à l'aide de l'immunosérum dirigés contre la protéine de fusion recombinante CCoAOMT-GST à une dilution au 1/1500^{ème} (C1) ou de l'immunosérum anti-CCoAOMT recombinante à une dilution de 1/250^{ème} (C2). 6 µg de protéines ont été chargés dans chaque puit. La légende des extraits protéiques déposés dans chaque puit indiqué au dessus des pistes figure sur le diagramme A.

1989) permet la rétention de la protéine recombinante. Cette dernière étant la seule à posséder le peptide tag contenant 10 H, elle n'est pas éliminée lors des diverses étapes de rinçage et peut être finalement éluée seule (5).

- La dernière phase correspond à la séparation du peptide tag 10xH de la protéine recombinante par le facteur Xa puis à l'élimination de ce dernier afin d'éviter une éventuelle protéolyse aspécifique. Le peptide tag pouvant potentiellement interférer dans l'activité enzymatique de la CCoAOMT recombinante a ensuite été retiré. Les aliquotes 6 et 7 permettent le contrôle de ces deux étapes respectivement.

β- Contrôles électrophorétiques et immunologiques

Les protéines contenues dans chaque aliquote sont séparées par électrophorèses mono-dimensionnelles SDS-PAGE avant d'être révélées par coloration au nitrate d'argent (figure 70, B) ou soumises à des détections immunologiques sur empreinte (figure 70, C). Dans ce dernier cas, les deux sondes immunologiques employées sont identiques à celles utilisées lors des analyses électrophorétiques 2D. Les titrations d'emploi de ces deux immunosera reconnaissant une CCoAOMT recombinante de peuplier sont également similaires à ces analyses préalables.

Les profils électrophorétiques des aliquotes 1, 2 et 3, correspondant à la première phase, montre clairement l'apparition d'une bande de 34 kDa dans les extraits protéiques issus de bactéries cultivées pendant 4 h en présence d'IPTG. Cette même bande est absente dans les bactéries non transformées et d'intensité très faible dans les bactéries transformées non induites (figure 70 B). Les immunolocalisations confirment que cette bande de 34 kDa est une CCoAOMT : quel que soit l'immunosérum utilisé, cette bande apparaît uniquement dans les extraits protéiques des bactéries transformées induites (figures 70, C1 et C2). La masse apparente de la CCoAOMT recombinante (10xH-CCoAOMT) est cependant supérieure à sa masse théorique de 30,3 kDa déterminée par analyse bio-informatique. L'intense signal localisé aux environs de 60 kDa lors de l'utilisation de l'immunosérum anti-CCoAOMT-GST (figure 70 C1) étant absent lors de l'emploi de l'immunosérum anti-CCoAOMT (figure 70 C2) correspond très probablement à une GST bactérienne.

Les aliquotes 4 et 5, encadrant à la deuxième phase, attestent de la purification de la CCoAOMT recombinante : la bande de 34 kDa, présente dans le lysat bactérien, est la seule détectée après l'étape de purification (figure 70 B). Les immunolocalisations révèlent également la disparition du signal pouvant correspondre à une GST bactérienne dans l'aliquote 5 (figure 70 C1) et montrent ainsi la pureté de l'extrait contenant la CCoAOMT recombinante purifiée.

Au cours de la dernière phase, l'élimination du peptide tag se traduit par une perte de masse de la CCoAOMT recombinante d'environ 2400 Da. La comparaison des bandes présentes dans les

aliquotes 5 et 6 en SDS-PAGE et/ou suite aux immunolocalisations reflète cette différence de masse. La masse moléculaire apparente de la CCoAOMT recombinante débarrassée de son peptide tag 10xH, 32 kDa, reste supérieure à sa masse théorique de 27,9 kDa (paragraphe 5.1 - b) mais est conforme à la taille de la CCoAOMT identifiée par immunolocalisation après électrophorèse 2-D. Le facteur Xa migrant en SDS-PAGE sous forme de 2 bandes de 34 kDa et de 29 kDa, son élimination est aisément visualisable (aliquotes 6 et 7, figure 70 B). Ainsi débarrassée de son peptide tag, puis purifiée, la CCoAOMT recombinante peut être utilisée pour des tests d'activités enzymatiques.

c - Caractéristiques enzymatiques de la CCoAOMT recombinante

α - Substrats testés et méthodologie employée

Outre une relative spécificité de substrat, ces tests enzymatiques ont permis de vérifier que l'ADNc *CCoAOMT* cloné dans pET 16b code une enzyme fonctionnelle. L'activité méthylante de la CCoAOMT recombinante a été recherchée vis à vis de cinq substrats de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes : l'acide caféique, l'acide 5-hydroxyféruilique, le caféoyl coenzyme A, le 5-hydroxyconiféraldéhyde et l'alcool 5-hydroxyconiférylique (figure 71 A).

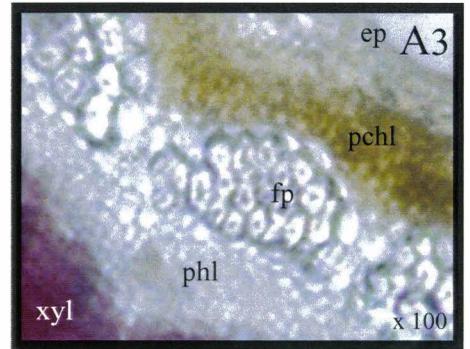
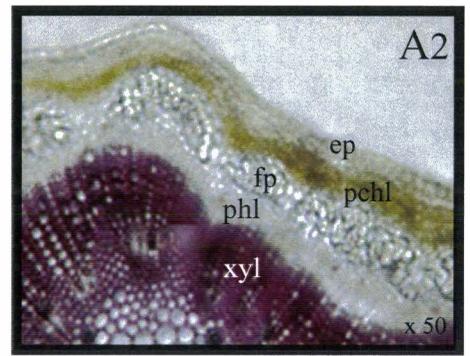
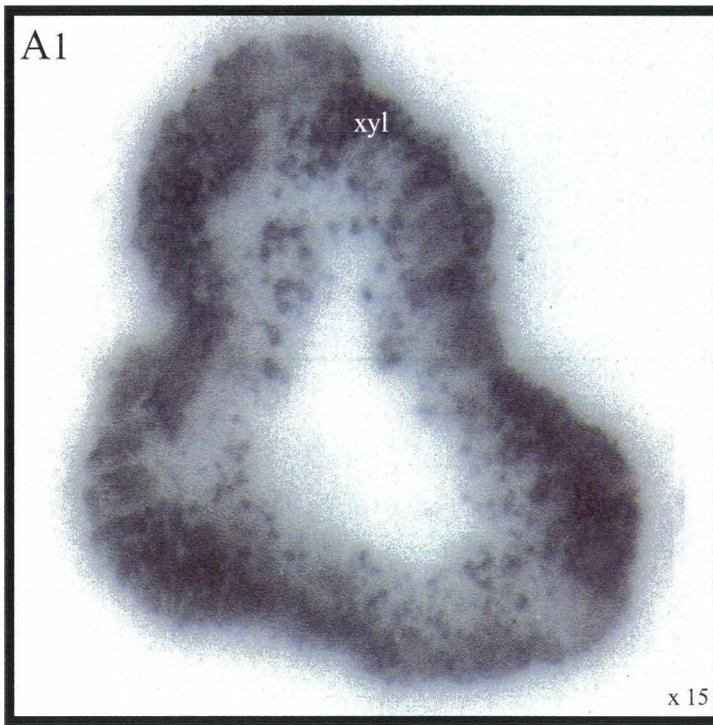
Les paramètres de cinétiques enzymatiques K_m (constante de Michaelis) et V_m (vitesse maximale) ont été calculés pour chacun des substrats selon la méthode de Eadie-Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1952). Le calcul du rapport V_m / K_m informe de la véritable efficacité catalytique de l'enzyme pour un substrat donné. Les valeurs obtenues sont présentées figure 71, B.

β - Détermination des constantes enzymatiques pour chaque substrat

Parmi les 5 substrats testés, la CCoAOMT recombinante possède un V_m le plus important vis à vis du caféoyl CoA (38 $\mu\text{kat} / \text{mg}$ de protéine) et une affinité maximale, *i.e.* un K_m minimal, pour le 5-hydroxyconiféraldéhyde (0,25 μM). Les valeurs de V_m et de K_m pour ces deux substrats se démarquent nettement des mesures obtenues avec les deux acides et l'alcool suggérant que le caféoyl CoA et le 5-hydroxyconiféraldéhyde soient les substrats préférentiels de la CCoAOMT recombinante. Cette dernière hypothèse est confirmée par le calcul du rapport V_m/K_m . L'efficacité enzymatique de la CCoAOMT est de 25,3 et de 5,8 vis à vis du caféoyl CoA et du 5-hydroxyconiféraldéhyde respectivement. Ce rapport V_m/K_m chute en dessous de 0,01 pour les 3 autres substrats testés parmi lesquels l'alcool 5-hydroxyconiférylique est préférentiellement méthylé : V_m/K_m alcool = 0,007; V_m/K_m acide = 0,004 et 0,005 (figure 71, B).

En conclusion, ces dosages enzymatiques révèlent la grande spécificité de substrats de la CCoAOMT recombinante isolée des tissus externes de tiges de lin au stade floraison qui méthyle préférentiellement le caféoyl CoA et avec une efficacité 4 fois moindre, le 5-hydroxyconiféraldéhyde.

A
P
I
C
A
L



B
A
S
A
L

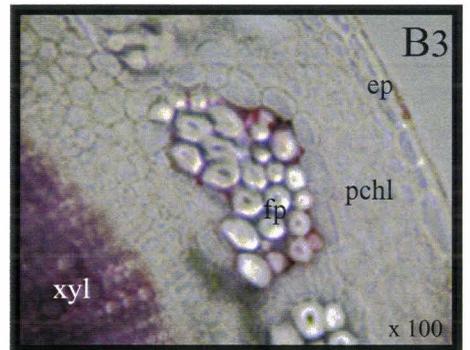
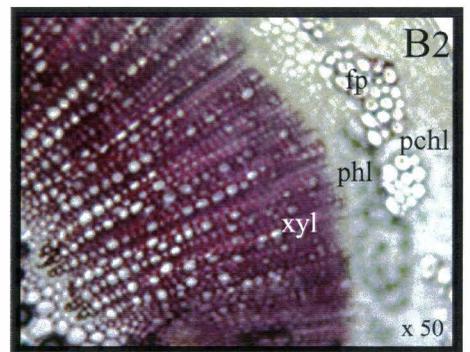
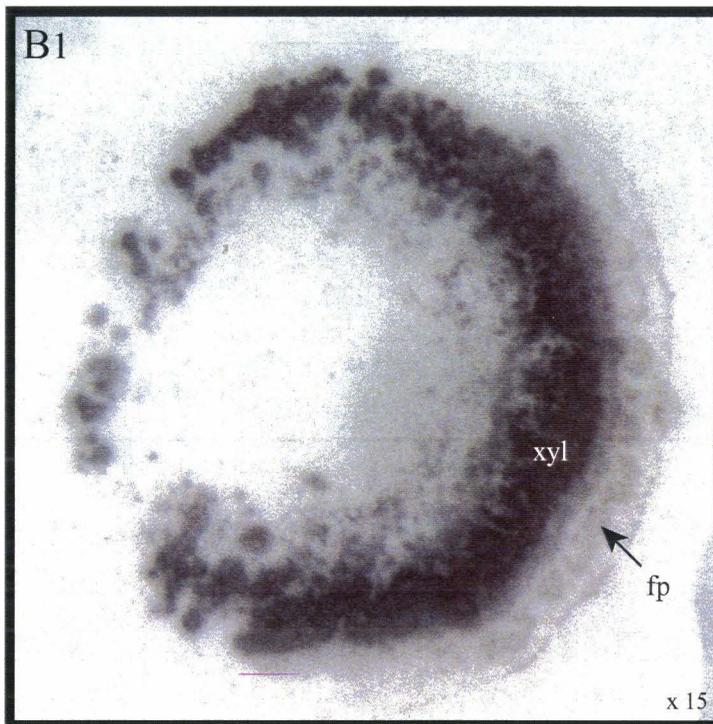


Figure 72 : Localisation différentielle de la CCoAOMT révélée par empreinte tissulaire des fragments apicaux (A) et basaux (B) de tige de lin prélevé au stade floraison, *i.e.* stade 1.

N°1 : Immunodétection de la CCoAOMT à l'aide de l'immunoserum anti-CCoAOMT-GST utilisé à une dilution de 1/200^{ème}. Sections transversales de la tige au niveau des empreintes protéiques permettant d'identifier les tissus où la CCoAOMT a été immunodéTECTÉE. Les lignines de ces coupes, mises en évidence par le test de Weisner, apparaissent en rouge et semblent colocalisées avec la CCoAOMT. N°3 : Agrandissement des faisceaux fibreux visibles en n° 2. ep : épiderme; pchl : parenchyme chlorophyllien; fp: fibres périphloémiennes; phl : phloème secondaire; xyl : xylème secondaire.

VI - EXPRESSION DU/DES GENES *CCoAOMT* DANS LE LIN AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT

Suivant une logique similaire à celle employée lors des dosages des activités *CCoAOMT* dans les tiges de lin et des analyses électrophorétiques 2D, l'expression du/des gènes *CCoAOMT* a été préalablement recherchée dans des tiges de lin barbara prélevé au stade floraison. Une analyse plus fine a ensuite été effectuée dans différents organes et tissus de lin hermes prélevé aux stades croissance végétative (stade 0), floraison (stade 1) et capsules brunes (stade 3).

6.1 - LOCALISATION TISSULAIRE DE LA *CCoAOMT* DANS LES TIGES DE LIN AU STADE FLORAISON

a - La technique d'empreinte tissulaire

La technique d'empreinte tissulaire employée a permis i. d'analyser l'expression de gène(s) *CCoAOMT* dans les différents tissus de la tige de lin *via* l'étude de l'accumulation des *CCoAOMT* par immunodétection et ii. de localiser cette enzyme dans la tige. Pour chaque empreinte de tige réalisée sur une membrane de nitrocellulose, une coupe à main levée a été effectuée. Cette dernière a été soumise au test de Weisner afin de visualiser les lignines et ainsi de comparer leur localisation avec celle de la *CCoAOMT*.

Parmi les deux sondes immunologiques reconnaissant une *CCoAOMT*, l'immunsérum contenant des anticorps anti-*CCoAOMT*-GST à été choisi pour sa plus grande sensibilité de reconnaissance de la *CCoAOMT* de lin. Son utilisation à une dilution au 1/200^{ème} et l'emploi d'anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline lors de l'immunodétection se justifient par la nécessité d'augmenter la sensibilité de détection.

b - Appréciation de la localisation tissulaire de la *CCoAOMT* en relation avec la lignification des tiges

La distribution spatiale de la *CCoAOMT* a été recherchée dans les fragments apicaux et basaux des tiges. Les résultats obtenus sont présentés figure 72, les photos numérotées 1 correspondent aux immunodétections et celles numérotées 2, à la coloration par le phloroglucinol-HCl de la deuxième coupe. Un agrandissement, numéroté 3, permet d'apprécier plus distinctement la structure des tissus externes.

Un profil différentiel d'accumulation de la CCoAOMT entre les fragments apicaux et basaux est nettement observable. Au niveau basal, un intense signal est détecté dans la zone interne mais aussi, avec une intensité plus faible, dans une zone plus externe (figure 72 B1). La réaction de Weisner effectuée à ce niveau permet de comparer ces signaux à la lignification des tiges. Le fort marquage interne correspond au xylème, intensément coloré en rouge, et le signal externe plus discret coïncide parfaitement avec la localisation des fibres périphloémiennes (figure 72 B2). Une coloration rouge est effectivement visible autour des cellules fibreuses (figure 72 B3). Par contre, dans les fragments apicaux, la CCoAOMT est uniquement localisée dans une zone interne intensément marquée (figure 72 A1). L'observation de la section de tige soumise au test de Weisner indique que le signal d'immunodétection obtenu dans les fragments apicaux se situe exclusivement dans le xylème (figure 72 A2). Aucune coloration rouge révélant la présence de lignines n'est visible dans les faisceaux fibreux (figure 72 A3).

Aucun signal n'a été détecté sur les membranes lors des contrôles réalisés sans anticorps primaires. En outre, la coloration au naphthol-blue-black des protéines totales fixées sur les membranes (non montrée) montre que les signaux d'immunodétection et les variations d'intensité du marquage sont bien spécifiques.

Ces résultats révèlent un profil d'expression de la CCoAOMT spatio-différentiel comparable aux données obtenues lors des dosages des activités CCoAOMT et des analyses électrophorétiques 2D suivies d'immunodétections. Il semblerait donc exister une forte corrélation entre les activités enzymatiques CCoAOMT, les profils d'accumulation de la CCoAOMT et la lignification des différents tissus de la tige.

6.2 - ANALYSE DE L'EXPRESSION DU/DES GENES *CCoAOMT* DANS LES DIFFERENTS ORGANES DU LIN AU COURS DE LEUR DEVELOPPEMENT

a - Qualité des ARN extraits en fonction du stade de développement

Des hybridations de type northern ont été réalisées à partir d'ARN totaux extraits des différents organes de lins hermes prélevés aux stades croissance végétative (stade 0), floraison (stade 1) et capsules brunes (stade 3). La sonde nucléotidique employée, d'environ 350 pb, provient de l'amplification par PCR, avec les amorces P4 et P6, de l'ADNc CCoAOMT isolé de la banque.

La qualité des ARN extraits et les quantités d'ARN déposées dans chaque piste étant deux paramètres conditionnant l'hybridation, leur contrôle (figure 73, A) est un prérequis indispensable. Contrairement aux stades 0 et 1, les ARN extraits des tissus internes et des

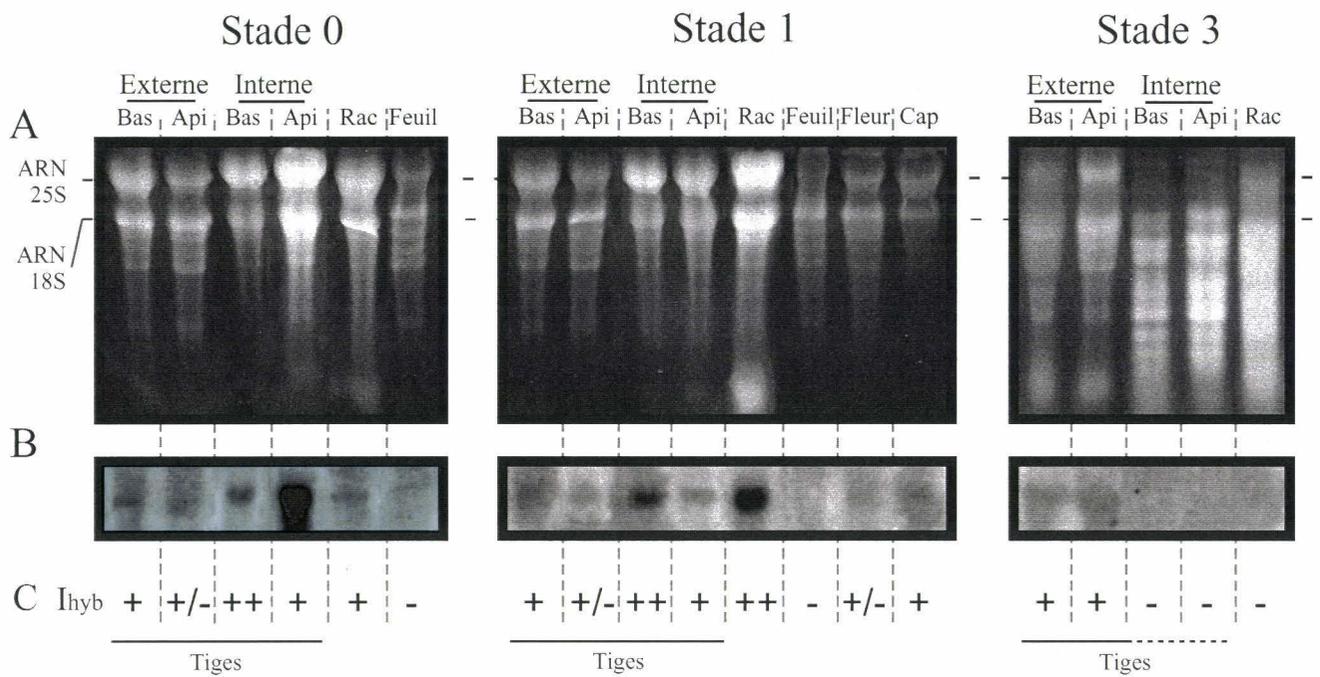


Figure 73 : Analyse de l'expression de gène(s) *CCoAOMT* dans différents organes de lin prélevé aux stades croissance végétative, *i.e.* stade 0, floraison, *i.e.* stade 1 et capsules brunes, *i.e.* stade 3.

Les ARN ont été hybridés avec une sonde provenant de l'amplification par PCR de l'ADNc *CCoAOMT* isolé de la banque. Les membranes ont été révélées par le système PhosphorImager. La faible intensité des signaux n'ayant pas permis leur quantification par ce système, l'expression du (des) gène(s) *CCoAOMT* est estimé par comparaison de l'intensité du signal (B) avec la charge en ARN de la piste correspondante (A). La codification employée est hiérarchisée sous forme d'un code + / - à 4 niveaux (C), dans un ordre décroissant d'intensité : ++, +, +/- et - signifiant l'absence de signal d'hybridation.

racines des lins prélevés au stade 3 sont dégradés et/ou fortement contaminés malgré de bons rapports spectrophotométriques (DO_{260}/DO_{230} et DO_{260}/DO_{280}). L'emploi de quatre méthodes différentes confirme que cette dégradation n'est pas un phénomène artefactuel due à la manipulation. Le stade 3 correspond à un stade très avancé du développement des plantes. A ce stade, les tiges de couleur brune ont totalement perdu leurs feuilles et contiennent des teneurs en eau inférieures aux stades précédents (en moyenne 72 % d'eau dans les tiges au stade 1 contre 58 % au stade 3). Ces différents critères révèlent un stade de sénescence des plantes correspondant probablement à un ralentissement de leur métabolisme cellulaire.

b - Intensité du signal d'hybridation

A l'exception des feuilles, un signal d'hybridation est détectable dans chaque piste (figure 73 B). Cependant, l'intensité de ces signaux est généralement trop faible pour être quantifiée à l'aide du système PhosphorImager. De ce fait, la quantification des signaux d'hybridation (figure 73 C) s'est effectuée d'une façon subjective : par comparaison de l'intensité du signal obtenu (figure 73 B) et de la charge en ARN pour chaque échantillon (figure 73 A).

Dans les tiges, l'expression du/des gènes CCoAOMT ne semble pas évoluer entre les stades 0 et 1. Les fragments basaux présentent un signal d'hybridation plus important comparés aux fragments apicaux. Comme attendu, l'expression du/des gènes CCoAOMT est plus importante dans les tissus internes par rapport aux tissus externes. Cependant, l'intensité du signal associé aux fragments basaux dans les tissus externes est semblable à celui détecté au niveau des fragments apicaux dans les tissus internes. Cette similitude est surprenante en considérant les tissus internes essentiellement composés de bois et les tissus externes non lignifiés à l'exception des fibres périphloémiennes.

La qualité très médiocre des ARN extraits des lins prélevés au stade 3 n'a permis d'obtenir un signal d'hybridation seulement dans les tissus externes. Ce dernier est comparable à celui obtenu dans les tissus externes des fragments basaux aux stades 0 et 1 mais, contrairement à ces deux prélèvements, son intensité reste semblable dans toute la hauteur de tige. Cette observation suggère une évolution de l'expression du/des gènes CCoAOMT au cours de la maturation des fibres périphloémiennes.

La sensibilité accrue de la technique d'hybridation de type northern en comparaison de l'immunomarquage après empreinte tissulaire pourrait expliquer la détection d'ARNm codant une CCoAOMT dans les tissus apicaux externes au stade 1 dans lesquels la protéine n'a pu être localisée. En outre, l'emploi de deux cultivars dont la richesse en fibre diffèrent peut également favoriser cette divergence.

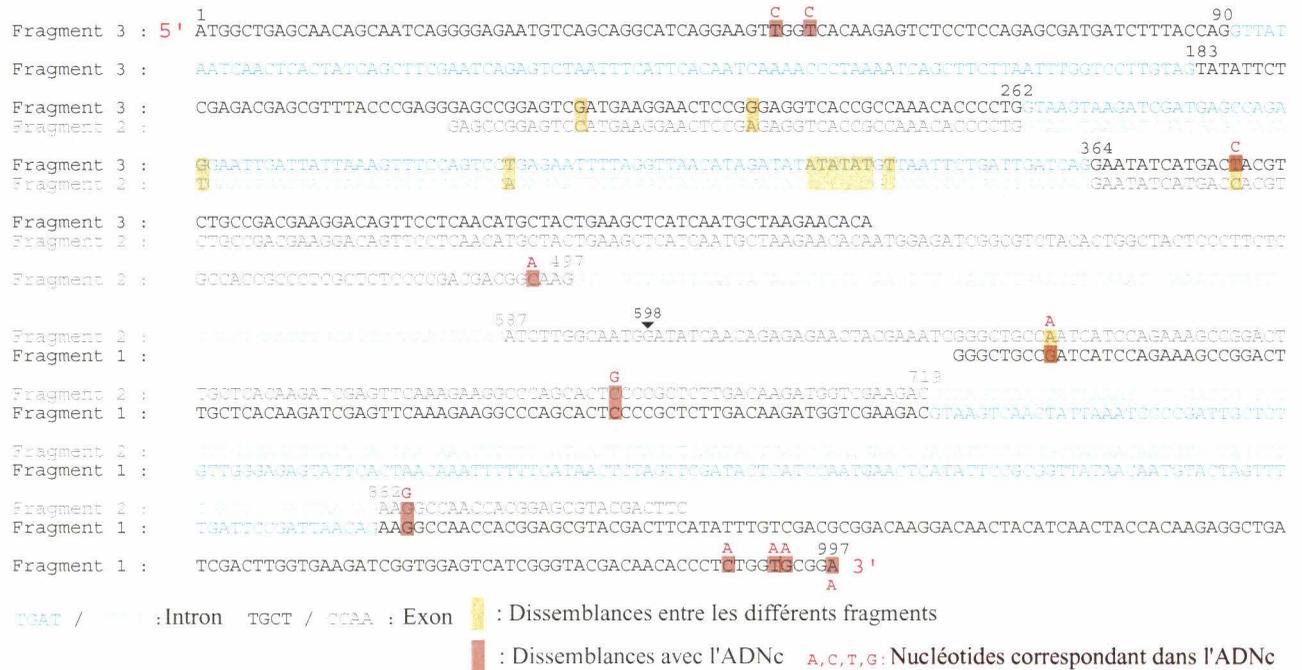
c - Relation entre l'expression de gène(s) *CCoAOMT* et le développement des lins

L'expression soutenue du/des gènes *CCoAOMT* dans les racines des lins peut être reliée à leur structure anatomique riche xylème. L'intensification du signal entre les stades 0 et 1 peut refléter un développement du système racinaire lié à la croissance des plantes. Un tel profil a également été rapporté chez la luzerne et le persil (Schmitt et al., 1991; Inoue et al., 1998).

Le stade 1 se distingue des autres prélèvements par le grand nombre d'organes de reproduction distincts sur une plante. Des ARN ont été extraits de fleurs et de capsules vertes de lin prélevé à ce stade. Un faible signal d'hybridation est distinguable dans les fleurs ; par contre, le signal détecté dans les capsules vertes est comparable à celui obtenu dans les tissus externes de tige. Ces signaux d'hybridation, observés dans des organes généralement peu ou pas lignifiés, peuvent être associés au large spectre d'activité des composés phénoliques dont la synthèse est initiée par la voie des phénylpropanoïdes (Van Sumere, 1989). Dans ce sens, l'expression du/des gènes *CCoAOMT* dans les fleurs pourrait résulter de l'implication de la *CCoAOMT* dans la synthèse de précurseurs de pigments floraux (flavonoïdes, anthocyanes). Une telle association a été précédemment mentionnée (Eckardt, 2002). Par ailleurs, le signal d'hybridation obtenu dans les capsules peut être rapproché des fortes teneurs en lignanes des graines de lin (Charlet et al., 2002; Sicilia et al., 2003). Il a été montré chez le peuplier que la *CCoAOMT* pouvait être impliquée dans la synthèse de lignanes (VanderMijnsbrugge et al., 2000a). D'une manière plus générale, l'expression de la *CCoAOMT* dans des organes reproducteurs a été rapportée chez diverses dicotylédones dont le tabac (Martz et al., 1998) et la luzerne (Inoue et al., 1998).

En conclusion, ces résultats démontrent l'existence de variations interdépendantes, tant à un niveau tissulaire que temporel, entre l'expression du/des gènes *CCoAOMT*, l'accumulation de l'enzyme correspondante et la lignification différentielle des tiges de lin. Cette corrélation positive suggère une régulation transcriptionnelle du/des gènes *CCoAOMT* chez le lin.

A : Alignement des séquences génomiques de *CCoAOMT* du lin



B : Comparaison de l'organisation génomique de gènes *CCoAOMT*

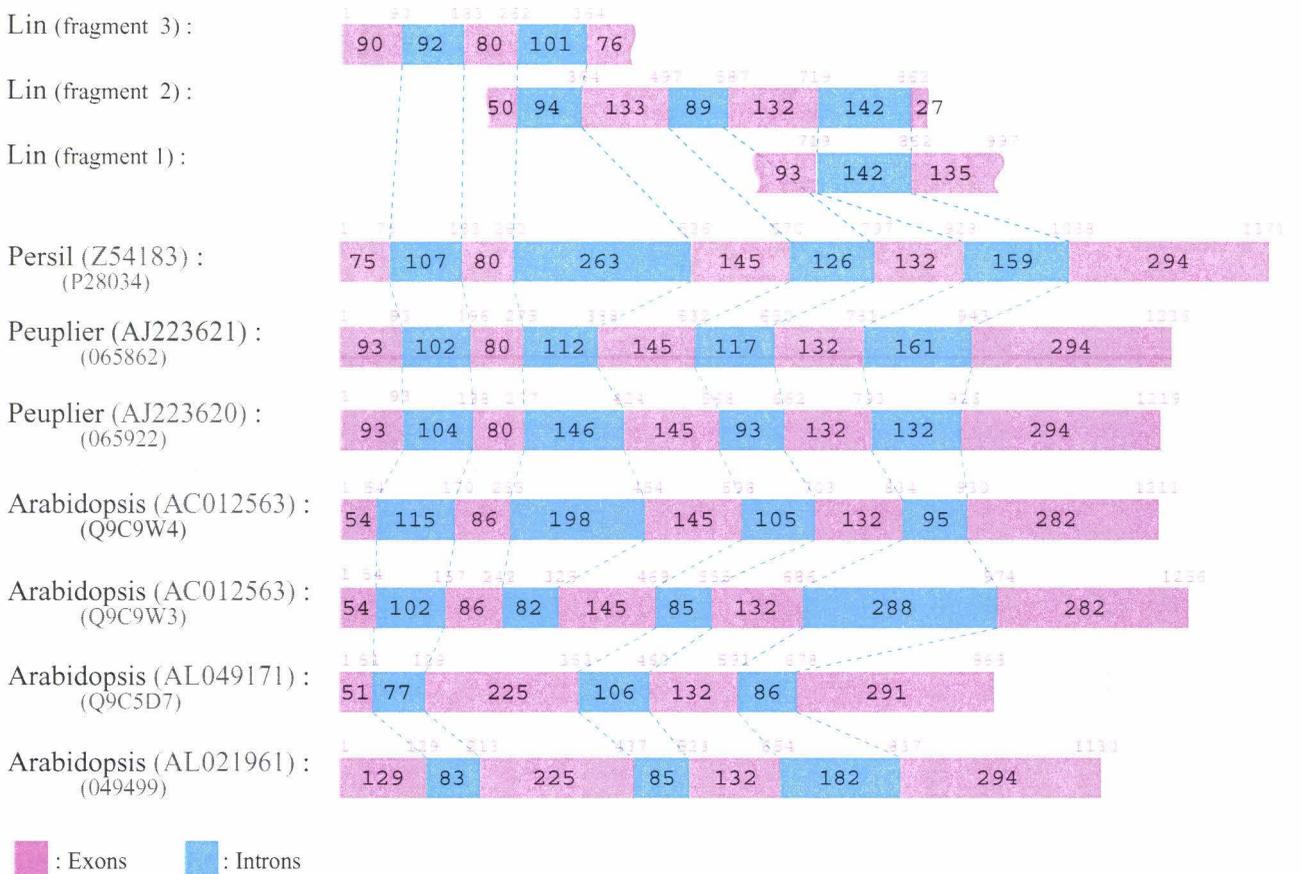


Figure 74 : Organisation comparée de gène(s) *CCoAOMT* chez le lin et diverses dicotylédones.

A : Alignement nucléotidique des différents fragments génomiques *CCoAOMT* obtenus par PCR chez le lin. B: Structure génomique exon - intron de gènes *CCoAOMT* chez le lin comparée à celle décrite chez diverses dicotylédones. A droite du nom de la plante, le chiffre grisé indique le numéro d'accèsion du gène, le chiffre en dessous le numéro d'accèsion de la protéine correspondante.

VII - CARACTERISATION DE GENE(S) *CCoAOMT*

Les profils d'activités enzymatiques, d'accumulation et d'expression du/des gènes *CCoAOMT* révèlent d'importantes différences entre les tissus externes et internes des tiges de lin. Parallèlement à ces études, l'organisation génomique du/des gènes *CCoAOMT* du lin a été analysée afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base de ces fortes variations spatio-différentielles. En effet, de nombreux travaux ont révélé que la *CCoAOMT* était une enzyme très régulée *in vivo* car elle contrôlerait le flux des acides hydroxycinnamiques dans les esters pariétaux et dans la lignine (Pakusch et Matern, 1991; Schmitt et al., 1991). S'inspirant de travaux antérieurs (Grimmig et Matern, 1997; Martz et al., 1998), des séquences codantes de gène(s) *CCoAOMT* ont été isolées et analysées chez le lin, puis le nombre de copie de gène(s) *CCoAOMT* a été recherché. Enfin une séquence promotrice d'un gène *CCoAOMT* a été étudiée.

7.1 - STRUCTURE GENOMIQUE

L'analyse comparative des trois fragments génomiques obtenus suite au développement de la stratégie par PCR décrite précédemment (*c.f.* paragraphe 4.1) révèle l'existence de zones chevauchantes. L'alignement de ces trois fragments de 398 pb, 707 pb et 761 pb, dénommés respectivement fragment 1, 2 et 3, est présenté dans la figure 74 A. Ces séquences possèdent une homologie moyenne de 98,6 % au niveau des zones chevauchantes autorisant ainsi la comparaison de ce "regroupement génomique de gène(s) *CCoAOMT* de lin" avec d'autres séquences de gènes *CCoAOMT* de dicotylédones.

L'analyse de ces séquences révèle une organisation introns-exons du/des gène(s) *CCoAOMT* chez le lin. Cinq exons sont séparés par quatre introns de 92 pb, 94 pb ou 101 pb (fragment 3 ou 2 respectivement), 89 pb et 142 pb situés respectivement aux positions +90, +262, +497 et +719 en numérotant le codon start +1.

Les séquences des exons ont été comparées à la séquence codante de l'ADNc cloné ayant servi à la production de la *CCoAOMT* recombinante. Seul 11 pb sont différentes entre les deux séquences, *i.e.* 98,1 % d'identité. Ces dissemblances n'induisent qu'un changement en acide aminé lequel provient très probablement d'un artefact de lecture du spectre au niveau des bases +992 et +993. Ces différences pourraient suggérer l'existence de plusieurs gènes *CCoAOMT* chez le lin. En outre, cette comparaison révèle la délétion à l'extrémité 3' du fragment génomique 1 de 159 pb de séquence exonique pour atteindre la fin de la séquence codante identifiée dans l'ADNc.

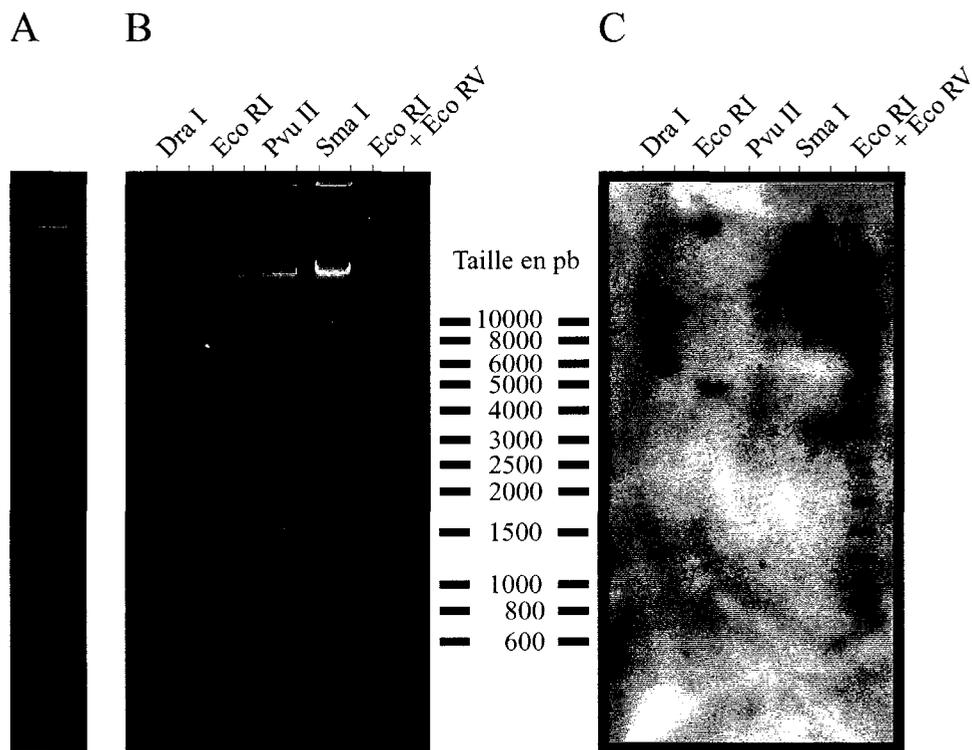


Figure 75 : Estimation du nombre de copie de gène(s) *CCoAOMT* chez le lin par hybridation de type Southern (Southern, 1975).

A : Profil électrophorétique de l'ADN génomique extrait. B: Profil électrophorétique de l'ADN génomique digéré (20 µg / piste) par différentes enzymes de restriction dont le nom figure au-dessus de chaque piste. Après transfert sur une membrane de nylon, cette dernière a été employée pour l'étape d'hybridation réalisée en condition de fortes stringences. C : Hybridation avec la sonde provenant de l'amplification par PCR de l'ADNc *CCoAOMT* de la banque.

La comparaison de cette organisation introns-exons de gène(s) *CCoAOMT* du lin avec d'autres séquences génomiques de dicotylédones est présentée figure 74 B. La structure 5 exons séparés par 4 introns caractérisée dans le lin est conservée dans tous les gènes *CCoAOMT* excepté pour 2 séquences génomiques d'*Arabidopsis* qui comportent 4 exons séparés par 3 introns, l'intron 2 étant absent. Globalement la taille des exons identifiés chez le lin est relativement constante entre les diverses espèces. Par contre, la longueur des introns varie fortement. Ces résultats suggèrent l'absence d'intron surnuméraire dans la région 3' manquante de la séquence génomique *CCoAOMT* du lin.

7.2 - DETERMINATION DU NOMBRE DE GENE(S) *CCoAOMT* CHEZ LE LIN

a - Principe

Le nombre de gènes *CCoAOMT* présents dans le génome du lin a été recherché par la technique de Southern (Southern, 1975). La sonde de 350 pb utilisée a été préparée à partir de fragments nucléotidiques provenant de l'amplification par PCR, avec les amorces P4 et P6, de l'ADNc codant une *CCoAOMT* contenu dans les phages isolés de la banque. Connaissant la carte de restriction de cet ADNc et des fragments génomiques de *CCoAOMT*, 4 enzymes de restriction ont été choisies ne coupant pas dans ces séquences : Dra I, Eco RI, Pvu II et Sma I. Un contrôle a été effectué par la digestion de l'ADN génomique avec un mélange Eco RI et Eco RV. Cette dernière enzyme possédant un site de digestion au milieu de ces séquences (entre les nucléotides 598 et 599 des fragments génomiques présentés figure 74, A), le profil d'hybridation obtenu avec digestion Eco RI et Eco RV doit présenter théoriquement un nombre de bandes (*i.e.* de signaux d'hybridation) doubles par rapport à la digestion avec Eco RI seul.

b - Résultats de l'hybridation de type Southern

La comparaison des profils électrophorétique de l'ADN avant (figure 75, A) et après incubation avec les différentes enzymes de restriction (figure 75, B) renseigne sur la qualité des digestions enzymatiques, paramètre essentiel du Southern. Ainsi, la présence de longues traînées dans les pistes Dra I, Eco RI et Eco RI + Eco RV atteste d'une digestion totale de l'ADN par ces enzymes. Inversement, les pistes correspondant à l'ADN coupé par Pvu II et Sma I montrent de courtes traînées et une bande très fluorescente dans le haut du gel ; deux indices témoignant d'une digestion incomplète.

Les résultats de l'hybridation réalisée en condition de fortes stringences sont présentés figure 75 C. Suite à la digestion de l'ADN par Dra I ou Eco RI, deux fragments de restriction d'environ 5,5

kb et 10 kb ou 5 kb et 15 kb respectivement sont révélés par la sonde. Le contrôle effectué avec Eco RI et Eco RV permet de distinguer 4 bandes de 1,25 kb, 1,5 kb, 2 kb et 10 kb approximativement. Les digestions de l'ADN génomique avec Pvu II et plus particulièrement avec Sma I étant partielle, les résultats de l'hybridation sont à considérer avec précaution. En effet, il semble que les bandes de très grandes tailles révélées dans ces deux pistes correspondent à de l'ADN génomique non digéré. Considérant ce paramètre, deux fragments de restriction de 10 et 14 kb environ sont détectés dans l'ADN coupé partiellement par Pvu II et une bande de 11 kb approximativement est visible après digestion incomplète de l'ADN par Sma I.

Le nombre de fragments de restriction mis en évidence par la sonde CCoAOMT semble indiquer que deux gènes *CCoAOMT* seraient présents dans le génome du lin.

7.3 - ANALYSE D'UNE SEQUENCE PROMOTRICE D'UN GENE *CCoAOMT* DE LIN

a - Méthodologie employée

Le développement de la technique de marche sur le chromosome par PCR (paragraphe 4.1 - b) a permis d'isoler un fragment nucléotidique de 761 pb incluant d'une part l'extrémité 5' de la région codante d'un gène *CCoAOMT* dont l'analyse a été présentée ci-dessus (fragment 3, figure 74 A) et d'autre part un fragment de la région promotrice de ce gène de 318 pb.

La compréhension de l'expression des gènes *CCoAOMT* suppose l'analyse de leur séquence régulatrice et notamment la liaison potentielle de facteurs de transcription, *i.e.* éléments *trans*, à de courtes séquences d'ADN spécifiques situées dans cette région promotrice, *i.e.* éléments *cis*. L'identification de ces éléments *cis* a été réalisée en soumettant le fragment du promoteur *CCoAOMT* isolé du lin à une analyse bioinformatique à partir des outils TESS utilisant la base de donnée TRANSFAC disponible en ligne à l'adresse : <http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/databases/transfac>. Les résultats obtenus sont décrits dans la figure 76.

b - Analyse bioinformatique de la séquence promotrice isolée

α - Détermination du site d'initiation de la transcription

Le codon start ATG, numéroté 1, correspond à celui présenté sur le fragment 3, figure 74 A. L'analyse bioinformatique de la région régulatrice de 318 pb située en amont de ce codon permet la localisation du site putatif d'initiation de la transcription au nucléotide -94 identifiant ainsi le 5'UTR de l'ARNm *CCoAOMT*. Le contexte environnant de ce site ne correspond pas à la séquence consensus d'initiation de la transcription PyXPy A PyPyPy (Py : base pyrimidique)

Fragment 3: AACAAAAAACTCAAA^{5'}TTGACCACTGAACTAATAAAAATAAAGAGTCAAC -269

Fragment 3: ACGAATAAGAA^{boîte E}AAAGAGAGGAACTATCCCAACTCGGTGGGGGCGACCTGC -219

Fragment 3: AGTCCACATGGCTT^{boîte L}CACCAAGCCCAAACCGGAACAGAATCCGGTCCCAAC -169

Fragment 3: TACCA^{boîte E}TCCACCGGTTCAAACATCATCCGCCTCTGTTCCGCGCTCACAT -119

Fragment 3: ATATCTGCCTT⁻⁹⁴CACTTTC[→]CCAAAAATTTC[→]CAAACCACATTT[→]CACCAA[→]ACT -69

Fragment 3: TCCATTTCCAGAAAATTGCGCAGACGAAAGATCTATCCTTAAAGACTTTA -19

Fragment 3: TCCAACCAATCAA¹AAATCAATGGCTGAG...^{3'}

Sites putatifs de fixation des facteurs de transcription :

- | | | | |
|---|--|--|---------------------------|
|  | de la famille DOF : dof 1, dof 2, dof 3, PBF |  | de la famille bZIP : RF2a |
|  | de la famille tryptophan cluster : GAMyb 01 |  | de la famille WRKY |
|  | de la famille tryptophan cluster : c-Myb |  | CG-1 |
|  | de la famille zinc-finger : ZPT2-2 | | |
|  | Site présent sur le brin antisens | | |
|  | Motifs conservés du promoteur de <i>PAL 1</i> | | |
|  | Motifs conservés du promoteur d'une <i>CCoAOMT</i> | | |
|  | Boîte TATA putative | | |
|  | Site putatif d'initiation de la transcription | | |
|  | 5' UTR putatif | | |
|  | Site putatif d'initiation de la traduction | | |

Figure 76 : Analyse bio-informatique d'une région promotrice d'un gène *CCoAOMT* de lin : éléments *cis* régulateurs et 3'UTR putatifs.

Ce fragment correspond à la séquence située en amont du site d'initiation de la traduction du fragment 3 obtenu par la technique de marche sur le chromosome par PCR et dont la séquence codante a été analysée figure 74 A.

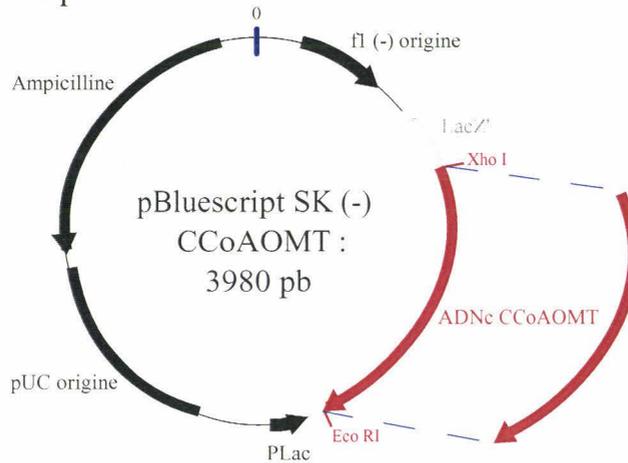
définie par Breathnach et al. (1981). Malgré la conservation du G consensus en position +4, un T en position -3 remplace le A communément décrit (Joshi, 1987) (figure 76). Toutefois, de telles dissemblances ont déjà été observées dans un gène de *CCoAOMT* de persil (Grimmig et Matern, 1997). En amont de ce site, outre la boîte TATA putative (-117 à -123) plusieurs éléments *cis* putatifs ont été déterminés incluant des motifs riches en AC conservés dans les gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

β- Détermination des facteurs *cis* régulateurs putatifs

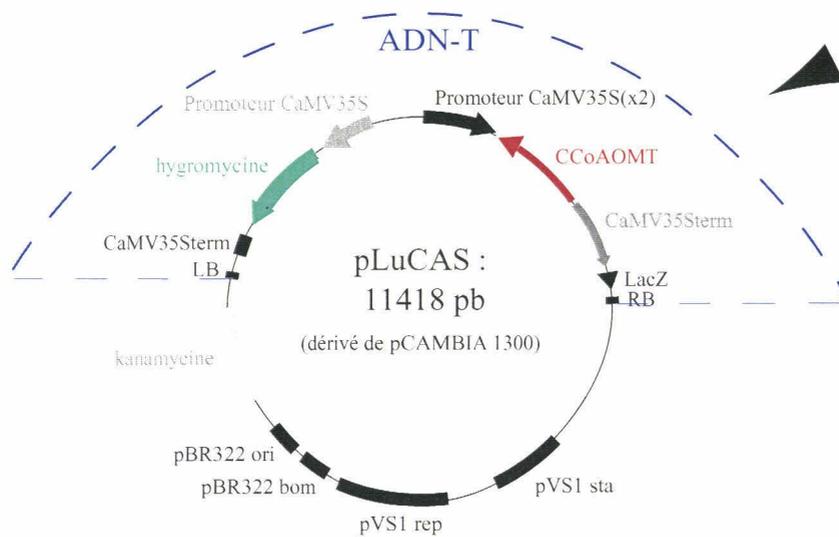
Trois sites de fixation de facteurs de transcription de la famille Dof ont été localisés : deux sur le brin sens présenté et un sur le brin antisens. Ces facteurs d'activation sembleraient jouer un rôle dans les mécanismes de défense et de stress chez les plantes (Yanagisawa, 2002). L'étude de la régulation de la chalcone synthase (CHS), une enzyme clef de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes contrôlant la production des flavonoïdes à partir du 4-coumaroyl CoA, révèle l'implication des facteurs de transcription CG-1 (Staiger et al., 1989), des facteurs de transcription de la famille tryptophan cluster (facteurs Myb) et de la famille b-ZIP. La combinaison des facteurs Myb et bZIP pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation de la voie des phénylpropanoïdes et donc des gènes associés (Weisshaar et Jenkins, 1998). Or, plusieurs sites de reconnaissance de ces différents facteurs de transcription sont présents dans le promoteur de la *CCoAOMT* de lin. Les éléments *cis* Myb-like ont été identifiés comme des éléments cruciaux de la régulation des gènes de la *PAL* et de la *CHS* chez le haricot (Sablowski et al., 1994). Les facteurs Myb agissant en tant qu'éléments activateurs ou répresseurs joueraient également un rôle déterminant dans l'expression tissu-spécifique des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (Borevitz et al., 2000; Heinekamp et al., 2002). Les facteurs de transcription de la famille WRKY, dont un site de reconnaissance est présent dans la séquence promotrice *CCoAOMT* du lin, ont été identifiés comme des éléments activateurs précoces dans les mécanismes de défense des plantes (Endt et al., 2002). Enfin, un site de reconnaissance et de fixation du facteur de transcription ZPT2-2, facteur activateur intervenant dans le contrôle et le développement des organes, est retrouvé à la position -309 à -294 (Takatsuji, 1996).

En outre, ce fragment de promoteur de *CCoAOMT* contient deux régions de 10 pb (-243 à -234) et 12 pb (-207 à -196) nommées respectivement boîte E et boîte L dont les séquences et les positions semblent conservées dans un gène de *CCoAOMT* de persil (Grimmig et Matern, 1997) et plus généralement dans des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (Ohl et al., 1990). Deux motifs conservés dans le promoteur de gènes *PAL* sont également retrouvés, l'un d'eux est inclus dans la région de 10 pb décrite ci dessus (figure 76).

Clone isolé de la banque d'ADNc



Vecteur employé pour la transformation



Digestions enzymatiques
Ligations

Transformation d'hypocotyles de lin ayant poussés en conditions axéniques

Régénération de plantes *in vitro*
Multiplication des vitroplants transgéniques

Sorti en serre des vitroplants

Figure 77 : Schéma des vecteurs pBluescript/CCoAOMT (A1) et pLuCAS (A2) employés lors de la transformation du lin par stratégie antisens et méthodologie générale suivie pour l'obtention des lins transgéniques.

Ces deux vecteurs ont été utilisés respectivement comme source génétique initiale de l'ADNc CCoAOMT (provient du clone isolé de la banque), et comme vecteur de transformation. De pLuCAS, seul l'ADN-T encadré par les séquences LB et RB et contenant l'ADNc CCoAOMT en position antisens sous le contrôle d'un double promoteur fort *CaMV 35S* et le gène de résistance à l'hygromycine est inséré dans le génome des cellules transformées.

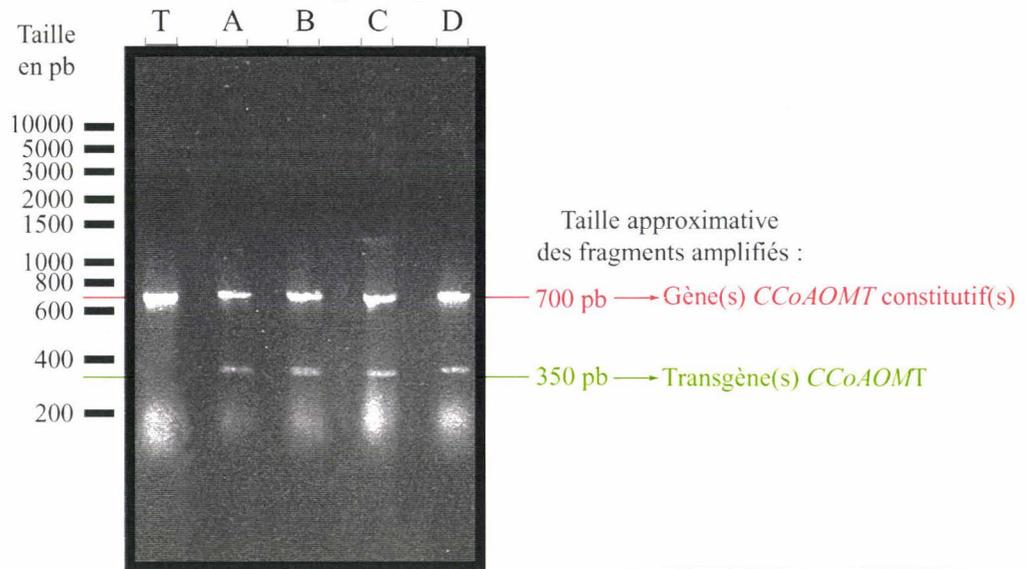
VIII – ETUDES DE LINS TRANSGENIQUES "CCoAOMT ANTISENS"

S'inspirant de nombreux travaux étudiant les modifications de la biosynthèse des lignines dans des plantes où l'expression de gènes *CCoAOMT* était altérée (Meyermans et al., 2000; Zhong et al., 2000; Pincon et al., 2001), une approche par transgénèse utilisant la stratégie antisens a été développée chez le lin. Ainsi, des lins transgéniques, ayant incorporé une construction "CCoAOMT antisens", ont été régénérés puis analysés afin de préciser la fonction de cette enzyme.

a - Stratégie employée pour l'obtention de lins transgéniques

Réalisé par Wanhui Kim (2002), l'ensemble des travaux de transgénèse ont été effectués à partir de lin barbara. Le choix de ce cultivar s'explique par sa très bonne capacité de régénération de bourgeons contrairement aux variétés de lins à fibres (Lamblin, 1999). L'ADNc *CCoAOMT* employé dans ces travaux est celui contenu dans le clone isolé de la banque d'ADNc (figure 77). Avant d'être introduit dans la plante, cet ADNc a été cloné en position antisens (*CCoAOMTas*) sous le contrôle d'un double promoteur fort permettant son expression de manière constitutive dans les plantes transformées. Lors de cette étape, la séquence *CCoAOMT* a été encadrée, en amont, par un double promoteur *CaMV 35S* et, en aval, par un terminateur *CaMV 35S*. Cet ensemble promoteur-*CCoAOMTas*-terminateur, a ensuite été cloné dans l'ADN de transfert du vecteur pCAMBIA 1300 créant ainsi le vecteur pLuCAS (figure 77). Ce dernier a alors été utilisé pour transformer des bactéries *Agrobacterium tumefaciens*. Ces bactéries ont ensuite été co-cultivées avec des fragments d'hypocotyle de lin sur un milieu enrichi en kanamycine. Le vecteur pLuCAS contenant un gène de résistance à cet antibiotique, seules les bactéries transformées ont pu infecter les fragments végétaux et transférer ainsi leur l'ADN-T dans l'ADN des cellules végétales. La présence d'un gène de résistance à l'hygromycine, également sous le contrôle d'un promoteur *CAMV 35S* dans l'ADN-T, permet alors la sélection des cals puis des bourgeons et enfin des vitroplants transgéniques sur un milieu de culture contenant cet antibiotique. Au total 4 clones provenant d'un événement de transformation indépendant, ont été obtenus et nommés "A", "B", "C" et "D". Parallèlement à ces manipulations, des témoins barbara non transformés, notés "T", ont été régénérés en suivant le même protocole de culture que les lins transgéniques. Après multiplications de ces différents clones, les vitroplants ont été transférés en serre.

A - Confirmation de l'état transgénique



B - Phénotype des transformants

B1



B2



B3

Clones	Nombre de transformant	Taille en cm
T	4	26 - 26 - 29* - 30
A	2	20 - 22*
B	2	35 - 40*
C	3	19 - 20* - 22
D	2	22* - 25

C - Caractérisation enzymatique des transformants

Clones	T	A	B	C	D
Activités enzymatiques CCoAOMT résiduelles	100	58,7 ± 13,2	88 ± 2,3	83,5 ± 8,6	45,8 ± 13,7

Figure 78 : Analyses des lins transformés par stratégie antisens avec le vecteur pLuCAS (figure 77). A : Confirmation de la présence du transgène *CCoAOMT* par PCR, la bande de ~350 pb indique la présence du transgène, celle de ~700 pb correspond aux gènes *CCoAOMT* endogènes. B: Phénotype des 4 clones (nommés A, B, C, D) et du témoin barbara (T) obtenus après 11 semaines de culture en serre. B1 et B2 : Photos d'une plante représentative de chaque clone. B3 : Taille des plantes, l'astérisque indique la plante photographiée. C : Mesure des activités enzymatiques CCoAOMT vis à vis du caféoyl CoA dans les 4 clones transgéniques. Les activités enzymatiques, exprimées en pourcentage relatif par rapport au témoin, résultent de la moyenne de trois dosages indépendants.

b - Analyse des lins transgéniques

Après 11 semaines de culture en serre, les différents clones ont été photographiés avant d'être échantillonnés et analysés. Ces résultats sont présentés figure 78.

α - Confirmation de l'état transgénique

Outre l'emploi d'hygromycine pour la sélection des transformants, l'état transgénique des clones A, B, C et D a été vérifié par PCR à l'aide du couple d'amorces P4 et P6. La figure 78 A présente les résultats de ces amplifications. Contrairement aux témoins, deux bandes de 350 pb et 700 pb sont visibles pour les clones A, B, C et D. La première correspond à l'amplification du transgène, *i.e.* l'ADNc *CCoAOMT* et la seconde aux gènes *CCoAOMT* endogènes (les introns 2, 3 et 4 étant présents entre les amorces P4 et P6, cette taille de 700 pb est conforme avec celle attendue). Ces résultats confirment l'état transgénique des clones A, B, C et D.

β - Etude morphologique

Les clones A, C, et D présentent une croissance ralentie : leur taille est en moyenne 20 à 30 % inférieure comparée aux témoins (figure 78 B). Par contre, le clone B a un développement plus rapide que les témoins et présente, après 11 semaines de culture, une taille 30 % supérieure. Hormis, ces différences de taille, les clones transformés montrent dans l'ensemble aucune altération phénotypique.

*γ - Mesure des activités *CCoAOMT**

Les activités *CCoAOMT* vis à vis du caféoyl CoA ont été mesurées à partir d'extraits protéiques bruts issus des tiges effeuillées des différents clones. Les résultats obtenus, présentés figure 78 C, sont exprimés en pourcentage d'activités résiduelles par rapport aux témoins. Afin de vérifier que les variations des activités enregistrées ne sont pas dues à des artefacts, un test positif a été réalisé pour chaque dosage à partir des protéines totales extraites de tige de lin barbara au stade floraison. Les activités mesurées dans ce dernier échantillon "test" ont toujours été semblables à celles présentées précédemment (paragraphe 1.1 - I).

Les quatre clones transgéniques montrent une réduction significative des activités *CCoAOMT* dont l'importance varie selon les clones dans un rapport maximal d'environ 3. En effet, les clones A et D présentent respectivement des activités résiduelles *CCoAOMT* de 58,7 % et 45,8 % par rapport aux témoins (T) tandis que dans les clones B et C, ces mêmes activités résiduelles sont respectivement de 88 % et 83,5 %.

IX - DISCUSSION

Parmi l'ensemble des données sur les composés phénoliques présents dans les tiges de lin (Akin et al., 1996a; Gorshkova et al., 2000; Morrison et al., 2003), aucune information n'est disponible sur les enzymes impliquées dans leur biosynthèse. Or, par leur hypolignification, les fibres périphloémiennes du lin sont particulières. En effet, les études traitant des fibres extraxylémiennes chez les angiospermes ont démontré que leur fonction de soutien est généralement associée à une intense lignification (McDougall et al., 1993; Zhong et al., 1997).

Dans les tiges de lin, d'importantes variations intertissulaires tant quantitatives que qualitatives des lignines ont été révélées par leurs marquages par (immuno-)cytochimie (chapitre A, Résultats-Discussion) et par leurs analyses chimiques (chapitre B, Résultats-Discussion). La formation des unités G et S implique l'activité de deux *O*-méthyltransférases : la COMT et la CCoAOMT (Ye et al., 1994; Meyermans et al., 2000). Les divers travaux de transgénèse visant à modifier la constitution des lignines par inhibition d'une ou de ces deux enzymes méthylantes ont conclu au rôle majeur de la CCoAOMT (Pakusch et al., 1989; Martz et al., 1998; Zhong et al., 2000). Contrairement à la COMT, la modulation des activités CCoAOMT permet à la fois des modifications qualitatives et quantitatives des lignines. Ainsi l'étude du processus de lignification des tiges de lin et plus particulièrement de leurs fibres périphloémiennes au niveau moléculaire a été abordée par la caractérisation de la CCoAOMT.

9.1 - COLOCALISATION DE LA CCoAOMT ET DES LIGNINES DES TIGES DE LIN

a - Distribution tissulaire de la CCoAOMT en relation avec la lignification des tiges

La distribution spatiale de la CCoAOMT a été déterminée par la technique d'empreintes tissulaires. Les signaux d'immunolocalisation de la CCoAOMT se superposent exactement à la localisation des lignines révélée par histochimie et suivent le même profil de variation d'intensité. La CCoAOMT détectée intensément au niveau du xylème est présente plus discrètement dans les tissus externes uniquement au niveau des fibres périphloémiennes. Cette accumulation différentielle de la CCoAOMT est semblable aux résultats obtenus lors des analyses électrophorétiques 2D suivies de l'immunodétection de la CCoAOMT. Par ailleurs, l'intense marquage visualisé au niveau des tissus internes est corroboré par de précédents travaux identifiant la CCoAOMT comme une protéine préférentiellement accumulée dans le xylème (VanderMijnsbrugge et al., 2000b).

b - L'étude de la CCoAOMT comme marqueur de la lignification

Cette colocalisation de la CCoAOMT et des lignines a déjà été rapportée dans les tiges de *Zinnia* (Ye et al., 1994; Ye et Varner, 1995) et de luzerne (Inoue et al., 1998) à l'aide d'une technique homologue permettant l'étude de l'accumulation des ARNm *CCoAOMT*. Le profil de distribution de la CCoAOMT dans les tiges de lin est similaire à celui observé dans ces deux modèles. Des transcripts *CCoAOMT* sont uniquement détectés dans le xylème au niveau des entrenœuds les plus jeunes et sont présents dans le bois et le phloème (incluant les fibres phloémiennes) dans les parties basales des plantes. Ces résultats ont été corroborés par l'immunolocalisation de la CCoAOMT dans ces mêmes tissus (Ye et Varner, 1995; Kersey et al., 1999). Par ailleurs, la distribution de cette enzyme dans le phloème de nombreuses dicotylédones herbacées (haricot, tomate, forsythia) et pérennes (peuplier) suit un profil de variation similaire à celui visualisé dans les fibres périphloémiennes du lin, *i.e.* le marquage est détecté au niveau des fragments de tige plus âgés et les plus lignifiées (Ye, 1997; Chen et al., 2000; Zhong et al., 2000). La distribution spatiale de la CCoAOMT dans les tiges de ces différentes plantes incluant le lin semble ainsi conservée et toujours corrélée à la présence de lignines.

Ces résultats contrastent avec la localisation de la COMT également étudiée dans les tiges de *Zinnia* et de la luzerne. Dans les tiges de *Zinnia*, la COMT est détectée dans le phloème et le xylème sur toute la hauteur des tiges (Ye et Varner, 1995). Dans la luzerne, la COMT est colocalisée avec la CCoAOMT (Inoue et al., 1998; Kersey et al., 1999). En comparaison à la COMT, la CCoAOMT apparaît être un marqueur plus précis de la lignification des fibres phloémiennes et plus généralement du phloème.

9.2 - LES ACTIVITES CCoAOMT EN RELATION AVEC LA LIGNIFICATION DES TIGES

Considérant les limites des méthodes employées, les activités CCoAOMT peuvent être corrélées aux teneurs en lignines estimées par la technique du bromure d'acétyle. En effet, les profils de variations des activités enzymatiques CCoAOMT et des teneurs en lignines sont semblables entre les tissus externes et les tissus internes, en moyenne 10 fois plus importantes dans ces derniers. Par ailleurs, le maintien des activités CCoAOMT dans les tissus externes correspond à une forte augmentation des teneurs en lignines ; et la baisse des activités CCoAOMT dans les tissus internes se traduit par une absence d'évolution des teneurs en lignines. De telles analogies entre activités CCoAOMT et teneurs en lignines sont également retrouvées dans les tiges de luzerne avec un profil de variation identique (Inoue et al., 1998; Parvathi et al., 2001). D'autre

part, ces variations inter-tissulaires des activités CCoAOMT peuvent également être corrélées aux intensités différentielles du marquage(immuno-)cytochimique des lignines dans les tiges de lin.

La brusque augmentation des activités CCoAOMT au stade floraison peut être rapprochée de l'évolution croissante des activités peroxidasiques dans des tiges de lin au cours de leur développement (McDougall, 1992). Or, l'implication des peroxydases dans le processus de lignification a été confirmée (Christensen et al., 1998; TalasOgras et al., 2001) et précisée chez le lin (McDougall, 1991). L'immunolocalisation des peroxydases chez le peuplier ont montré que ces enzymes sont présentes dans des structures pariétales en cours de lignification (Takeuchi et al., 2001; Kim et al., 2002b).

9.3 - LA REGULATION DE LA CCoAOMT DE LIN EST TRANSCRIPTIONNELLE

a - Relation entre activités enzymatiques et expression de la CCoAOMT

Les activités enzymatiques CCoAOMT vis à vis du caféoyl CoA, le profil d'accumulation de la CCoAOMT et de ses transcripts dans les tiges de lin présentent d'importantes variations selon le niveau de tige et la zone tissulaire. Quels que soient le stade et/ou le tissu, les résultats enregistrés dans les fragments basaux sont plus élevés par rapport aux fragments apicaux. Les tissus internes possèdent les activités ou les intensités de marquages nettement supérieures aux tissus externes. Une telle corrélation entre activités enzymatiques, taux de transcripts et accumulation de la CCoAOMT a été rapportée chez diverses dicotylédones (tabac (Maury et al., 1999), *Zinnia* (Ye et al., 1994), persil (Schmitt et al., 1991), vigne (Busam et al., 1997), luzerne (Inoue et al., 1998)) sans toutefois présenter des profils de variations semblables au lin. L'étude de l'élicitations de cultures cellulaires de persil, de vigne ou de *Zinnia* a confirmé l'existence d'une étroite association entre l'activation de gènes *CCoAOMT* et la lignification (Pakusch et Matern, 1991; Schmitt et al., 1991; Ye et al., 1994; Busam et al., 1997). Ces travaux suggèrent unanimement l'existence d'une régulation transcriptionnelle des gènes *CCoAOMT*. Un tel mode de régulation des gènes *CCoAOMT* a également été rapporté chez des espèces pérennes comme le peuplier (Meng et Campbell, 1998; Chen et al., 2000) et le pin (Li et al., 1999).

La comparaison des résultats obtenus chez ces divers modèles et les données recueillies chez le lin confirment que la CCoAOMT est un bon marqueur de la lignification et que cette enzyme est régulée de façon transcriptionnelle.

b - Le cas particulier des lins aux stades capsules brunes

L'étroite corrélation existant entre accumulation de transcripts *CCoAOMT* et activité enzymatique est cependant nettement moins appréciable au stade capsules brunes. En effet, à ce stade, des activités *CCoAOMT* sont mesurées dans les tissus internes mais aucun transcripts *CCoAOMT* n'est détecté. La présence de contaminants, spécifiques à ce stade, affectant la séparation des ARN pourrait expliquer de tels résultats. Néanmoins, un renouvellement plus rapide des ARNm par rapport à la protéine peut également être envisagé. Dans ce cas, la *CCoAOMT* synthétisée avant la phase de ralentissement du métabolisme cellulaire associé à la sénescence des plantes (stade capsules brunes) pourrait toujours être présente dans les tissus. Sa concentration serait plus faible mais l'enzyme serait toujours active. L'importante baisse des activités *CCoAOMT* dans les tissus internes au stade capsules brunes par rapport au stade floraison corrobore cette hypothèse.

De tels résultats ont été constatés suite à l'étude de l'accumulation de la *CCoAOMT* et du taux de transcripts de ses gènes dans des suspensions cellulaires de dicotylédones herbacées : persil, carotte, l'œillet (Schmitt et al., 1991). De plus, la faible stabilité des ARNm codant une *CCoAOMT* a été envisagée en conclusion de travaux d'élicitation de suspensions cellulaires de luzerne dans lesquelles l'induction de l'expression de gènes *CCoAOMT* ne correspond pas à une augmentation des activités *CCoAOMT* (Ni et al., 1996).

9.4 - CARACTERISTIQUES D'UNE CCoAOMT ISOLEE DES TISSUS EXTERNES DES TIGES DE LIN AU STADE FLORAISON

a - Caractéristiques structurales

α - Comparaison de sa séquence protéique

L'alignement des séquences protéiques des diverses *CCoAOMT* de dicotylédones a révélé l'existence de deux groupes de *CCoAOMT* présentant des disparités au niveau de leur structure primaire. Toutefois, la plupart des *CCoAOMT* identifiées sont réunies dans un même groupe avec lequel la *CCoAOMT* obtenue à partir des ADNc isolés des tissus externes du lin présente de fortes homologies : plus de 72 % d'identité de séquence.

Les motifs conservés entre les différentes OMT de plantes sont également retrouvés dans la séquence de la *CCoAOMT* de lin (Joshi et Chiang, 1998). En outre, cette dernière contient, avec une très forte homologie, les motifs conservés spécifiques des *CCoAOMT* et les différents acides aminés indispensables aux fonctions catalytiques des *CCoAOMT* (Hoffmann et al., 2001).

β - Comparaison de ses propriétés physico-chimiques

En gel dénaturant, la CCoAOMT recombinante produite possède une masse moléculaire apparente d'environ 32-33 kDa. Les analyses électrophorétiques NEpHGE-PAGE des extraits protéiques des tissus externes et internes des tiges de lin confirment cette masse moléculaire. Comparé à la masse déduite de sa séquence protéique, 28 kDa, la CCoAOMT de lin semble subir des modifications post-traductionnelles. L'analyse bioinformatique de la séquence de la protéine déduite de l'ADNc *CCoAOMT* révèle 4 sites putatifs de phosphorylation. Cependant, l'ajout de 4 résidus phosphorylés n'explique pas une telle différence de masse.

Comparée à diverses CCoAOMT de dicotylédones, la CCoAOMT recombinante de lin possède la masse la plus élevée : 27 kDa pour une CCoAOMT recombinante de vigne (Busam et al., 1997), 28 kDa pour les deux CCoAOMT de peuplier (VanderMijnsbrugge et al., 2000b), 27 et 32 kDa les CCoAOMT recombinantes de tabac (Maury et al., 1999), 30 kDa pour une CCoAOMT recombinante de luzerne (Parvathi et al., 2001). Néanmoins, une isoforme de la CCoAOMT de 35 kDa chez le forsythia a été identifiée (Ye, 1997). Contrairement aux conclusions de ces derniers auteurs, l'ensemble de ces résultats atteste d'une disparité des masses moléculaires des CCoAOMT et ce, malgré une forte homologie de leur séquence protéique. Ce constat pourrait s'expliquer par la présence de modifications post-traductionnelles non identifiées. Ces dernières pourraient être en cause lors du blocage de la réaction de séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine, un phénomène couramment rapporté dans l'étude des CCoAOMT (Pakusch et al., 1991; VanderMijnsbrugge et al., 2000b).

Les conditions d'électrophorèse employées lors de ces analyses étant dénaturantes la masse moléculaire native et par extension la structure quaternaire des CCoAOMT ne peuvent être connues. La CCoAOMT fut initialement décrite chez le persil comme une enzyme homodimérique de 48 kDa ayant un pI de 5,7 (Pakusch et al., 1989; Pakusch et Matern, 1991). Ainsi, il est probable que, *in planta*, la CCoAOMT du lin soit une enzyme homodimérique de 64-66 kDa.

Par ailleurs, les électrophorèses 2D ont également révélé que la CCoAOMT de lin possédait un pI acide. Ce dernier est comparable à celui rapporté pour diverses CCoAOMT de dicotylédones; ce qui atteste d'une conservation de cette caractéristique physico-chimique entre les espèces.

b - Caractéristiques enzymatiques

α - Spécificité de substrat

Les fonctions catalytiques des OMT de plantes étant très dépendantes de la formation de l'homodimère (Frick et al., 2001), les mesures d'activités méthylantes de la CCoAOMT recombinante de lin se sont effectuées dans un tampon défini et identique pour chacun des 5 substrats testés. Rarement rapportées, les valeurs V_m/K_m reflètent l'efficacité enzymatique de l'enzyme pour chaque substrat et ont de ce fait été calculés.

Le caféoyl CoA et le 5-hydroxyconiféraldéhyde sont les deux substrats vis à vis desquels la CCoAOMT de lin exprimée dans les tissus externes possède les activités méthylantes les plus élevées. Toutefois, l'efficacité enzymatique de cette CCoAOMT est nettement supérieure (plus de 4 fois) avec le caféoyl CoA en comparaison du 5-hydroxyconiféraldéhyde. Les dosages effectués à partir des acides caféique et 5-hydroxyfêrulique et de l'alcool 5-hydroxyconiférylique révèlent des efficacités enzymatiques insignifiantes. Cette préférence pour le caféoyl CoA, attendu au vue de sa séquence protéique, est retrouvée avec toutes les autres CCoAOMT de dicotylédones caractérisées (Pakusch et al., 1989; Ye et al., 1994; Busam et al., 1997; Martz et al., 1998; Parvathi et al., 2001). De même, les très faibles activités de la CCoAOMT enregistrées vis à vis des acides sont couramment rapportées chez les dicotylédones. Toutefois, l'efficacité enzymatique de la CCoAOMT recombinante de lin vis à vis du caféoyl CoA est similaire à celle estimée pour une CCoAOMT de classe 1 de tabac mais reste 8 fois inférieure à celle calculée pour une CCoAOMT de luzerne (Parvathi et al., 2001) et de persil (Pakusch et al., 1989).

β - Rôle putatif dans la biosynthèse des monolignols

Rarement testée, l'activité de la CCoAOMT vis à vis du 5-hydroxyconiférylaldéhyde suggère, chez le lin, l'existence d'une nouvelle voie de méthylation des sous-unités S n'impliquant que cette enzyme. En effet, différents travaux de transgénése visant à inhiber la COMT et/ou la CCoAOMT ont conduit à l'acceptation du concept général que la COMT était seulement responsable de la biosynthèse des sous-unités S par son activité 5-*O*-méthylante et la CCoAOMT était la 3-*O*-méthyltransférerase conduisant aux sous-unités S et G (Atanassova et al., 1995; Van Doorselaere et al., 1995; Zhong et al., 1998; Zhong et al., 2000; Guo et al., 2001). De plus, l'étude de la spécificité de substrat de ces deux enzymes a conforté cette hypothèse : seule la COMT méthylait efficacement les acides hydroxycinnamiques (Inoue et al., 1998; Chen et al., 2001b; Parvathi et al., 2001). Ensemble, ces travaux ont conclu au rôle peu probable des activités 5-*O*-méthyltransférases de la CCoAOMT dans la voie de biosynthèse des monolignols (Dixon et al., 2001; Anterola et Lewis, 2002; Boerjan et al., 2003). Les activités *in vitro* de la CCoAOMT

recombinante du lin révèle que cette enzyme est douée d'activités catalytiques 3-*O*-méthyltransférase au niveau des esters CoA et 5-*O*-méthyltransférase au niveau des aldéhydes. Cette CCoAOMT de lin pourrait être ainsi responsable à la fois de la biosynthèse des sous-unités G et des sous-unités S contrairement au concept général de la biosynthèse des monolignols et des voies séparées proposées chez la luzerne (Guo et al., 2001; Parvathi et al., 2001).

Le suivi de l'incorporation de précurseurs marqués au deutérium (alcools coniférylique, caféique et 5-hydroxyconiférylique) dans des sous-unités S a montré l'existence de nouvelles voies d'hydroxylation et de *O*-méthylation aux niveaux des alcools et aldéhydes hydroxycinnamiques (Chen et al., 1999; Matsui et al., 2000). Les enzymes responsables de ces réactions enzymatiques ne sont toujours pas connues, excepté la COMT/aldéhyde OMT (Osakabe et al., 1999; Guo et al., 2002). La très faible efficacité enzymatique de la CCoAOMT de lin vis à vis de l'alcool 5-hydroxyconiférylique suggère un rôle mineur de cette enzyme à ce niveau. Par contre, la CCoAOMT de lin semblerait intervenir efficacement au niveau des aldéhydes, le 5-hydroxyconiféraldéhyde étant le deuxième substrat préféré de l'enzyme parmi les 5 testés. Ainsi, les données rapportées chez le lin apportent de nouveaux indices à l'élucidation des mécanismes responsables de la biosynthèse des monolignols.

γ- Les difficultés à généraliser le modèle établi chez le lin

La sous-expression de la *COMT/aldéhyde OMT* dans différents modèles végétaux a conduit à l'accumulation d'alcool 5-hydroxyconiférylique, une sous-unité rare, dans leur lignine (Atanassova et al., 1995; Tsai et al., 1998; Goujon et al., 2003b; Marita et al., 2003). Ces résultats démontrent l'absence d'activités 5-*O*-méthylantes de la CCoAOMT vis à vis du 5-hydroxyconiféraldéhyde dans ces plantes. De ce fait, l'existence d'une spécificité de substrats propre à la CCoAOMT de lin ne peut être exclue.

Par radiotraçage, il a été montré que parmi les dicotylédones, la biosynthèse des sous-unités S s'effectue selon de multiples voies, spécifiques de chaque espèce (Fukushima, 2001; Yamauchi et al., 2003). Seul le test d'autres substrats tel que le 5-hydroxyféruloyl CoA permettrait de définir avec plus de précision les trajets métaboliques menant aux sous-unités S et G chez le lin. En outre, l'absence lors des tests *in vitro* de facteurs cellulaires qui interagiraient *in planta* avec l'enzyme et modifieraient sa préférence de substrats doit être considérée dans cette étude chez le lin. La mise en évidence de complexes multi-enzymatiques intracellulaires dans la biosynthèse des monolignols (WinkelShirley, 1999) corrobore cette dernière hypothèse.

9.5 - ETUDE GENOMIQUE DE LA *CCoAOMT* CHEZ LE LIN

a - Organisation génomique

Dans le lin, la *CCoAOMT* semblerait être codée par deux gènes. Les travaux réalisés à partir de divers modèles de dicotylédones montrent que le nombre de gènes *CCoAOMT* n'est pas conservé entre les espèces. Toutefois, un faible nombre de gènes *CCoAOMT* (un ou deux) est généralement retrouvé par hybridation Southern : pour exemple, chez le persil (Grimmig et Matern, 1997), la luzerne (Inoue et al., 1998), le peuplier (Meng et Campbell, 1998) la vigne (Busam et al., 1997). Contrairement à ces modèles, le nombre de gènes *CCoAOMT* peut correspondre chez d'autres espèces à une famille multigénique dont le nombre exact de membre n'est pas toujours identifié. Ainsi, dans le tabac, 3 classes de *CCoAOMT*, peu conservées entre elles, ont été mises en évidence. La classe 1, la plus étudiée, serait codée par une famille multigénique de 4 membres (Martz et al., 1998). Chez *Zinnia*, une famille multigénique de 5 à 10 membres a été identifiée (Ye et al., 1994). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a révélé 4 gènes *CCoAOMT* contrairement à l'hybridation Southern révélant une seule copie (Zou et Taylor, 1994) et suggère de ce fait de modérer les résultats des analyses d'hybridation.

Par contre, la comparaison de la structure génomique des gènes *CCoAOMT* du lin avec diverses dicotylédones révèle une importante conservation. Excepté chez *Arabidopsis*, les gènes *CCoAOMT* caractérisés chez diverses dicotylédones dont le lin possèdent une structure avec 5 exons séparés par 4 introns (de taille non constante entre les espèces).

b - Approche de la régulation de gènes *CCoAOMT* chez le lin

*α - La faible conservation des séquences promotrices des gènes *CCoAOMT**

Par la technique de marche sur le chromosome par PCR, une séquence de 319 pb située en amont du site d'initiation de la traduction d'un gène *CCoAOMT* de lin a été isolée. Son analyse bioinformatique révèle la présence d'un 5'UTR de 94 pb sur l'ARNm codant cette *CCoAOMT*, les 225 pb restantes faisant parties de la séquence promotrice de ce gène. La longueur du 5'UTR des diverses *CCoAOMT* précédemment caractérisées n'est pas conservée parmi les espèces. Ainsi, cette région d'une longueur de 59 pb chez la vigne (Busam et al., 1997) peut atteindre 370 pb chez le persil (Schmitt et al., 1991) et même contenir un intron intervenant potentiellement dans la régulation de ce gène chez le pin (Li et al., 1999). Toutefois, la comparaison des séquences 5'UTR d'ADNc et d'ADN génomique révèle parfois de grandes différences (Grimmig et Matern, 1997). Les séquences consensus encadrant les sites d'initiation de la traduction décrites chez les plantes supérieures (Breathnach et Chambon, 1981; Joshi, 1987) sont retrouvées

avec une faible homologie dans la *CCoAOMT* de lin. Une telle situation est également décrite dans l'analyse de la structure génomique d'une *CCoAOMT* chez le persil. Cette absence de conservation des sites consensus chez le lin semble plus générale puisque : i. les boîtes CAAT n'ont pu être déterminées dans la région promotrice du gène *CCoAOMT* et ii. les signaux de polyadénylation dans le 3'UTR communément décrits chez les végétaux (Newins, 1983) sont également absents.

β - Élément de régulation des gènes *CCoAOMT*

La région promotrice d'un gène *CCoAOMT* de lin présente de nombreux éléments putatifs de régulation *cis* caractéristiques des gènes de la voie des phénylpropanoïdes. Des analyses de retard sur gel et de Dnase I footprinting ont permis d'identifier ces régions spécifiques dans un gène de *CCoAOMT* chez le persil (Grimmig et Matern, 1997). Certains de ces éléments *cis* sont également retrouvés dans la séquence promotrice du lin, notamment la boîte E impliquée dans les phénomènes d'élicitation et la boîte L interagissant avec la boîte E et intervenant dans une structure secondaire indispensable à l'activation du gène (Ohl et al., 1990; Grimmig et Matern, 1997). Parmi les différents facteurs *trans* potentiellement capables de se fixer à la zone promotrice du gène *CCoAOMT* de lin, des facteurs Myb-like dont des sites de reconnaissance ont été identifiés, semblent intervenir. De récents travaux ont démontré le rôle majeur de ces derniers facteurs dans le contrôle de l'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (Tamagnone et al., 1998; Borevitz et al., 2000; Lauvergeat et al., 2002).

La caractérisation de l'expression des différents gènes *CCoAOMT* dans divers modèles indique une spécificité propre à chaque gène dans le processus de lignification. Les travaux effectués chez le tabac concluent que chacune des 3 classes de gènes *CCoAOMT* seraient impliquées différemment dans la lignification tant d'un point de vue spatial que temporel (Maury et al., 1999). Par transgénèse, il a été montré dans le peuplier que les deux gènes *CCoAOMT* possèdent une expression tissu-spécifique propre à chacun (Chen et al., 2000). Ces auteurs en concluent, en regard des variations de la composition monomérique des lignines entre ces différents tissus, que la voie de biosynthèse des lignines serait spécifique à chaque type cellulaire. Ensemble ces résultats suggèrent la possibilité d'une spécificité tissulaire propre à chacun des deux gènes *CCoAOMT* chez le lin; dont l'un des membres serait préférentiellement exprimé dans l'environnement des fibres périphloémiennes.

9.6 - EFFET DE LA TRANSGENESE *CCoAOMT* ANTISENS CHEZ LE LIN

La transformation du lin par stratégie antisens avec un ADNc codant une *CCoAOMT* sous le contrôle d'un double promoteur fort CaMV 35S a conduit à la régénération de 4 lignées de plantes ayant une croissance modifiée par rapport aux témoins. La réduction des activités *CCoAOMT* vis à vis du caféoyl CoA notamment pour deux de ces lignées suggère une modification du métabolisme des lignines chez ces transformants.

a - Altération de la croissance des plantes

La modification du développement des lins transgéniques ne peut être imputée avec certitude à la sous-expression de la *CCoAOMT*. En effet, les conditions de sortie d'*in vitro* des plantes et les paramètres de culture peuvent également influencer sur la croissance des transformants. Les effets phénotypiques de la sous-expression de la *CCoAOMT* chez le tabac sont opposés : certains travaux rapportent une altération importante du phénotype des plantes transformées (Pinçon et al., 2001c), d'autres ne conduisent à aucune modification de leur développement (Zhong et al., 1998; Zhao et al., 2002). Globalement une modification du phénotype des plantes transgéniques dont les activités *CCoAOMT* sont réprimées est rarement rapportée chez les dicotylédones (luzerne (Guo et al., 2001), peuplier (Zhong et al., 2000) *Arabidopsis* (Dwivedi et al., 1994; Goujon et al., 2003b)).

b - Réduction des activités *CCoAOMT*

L'inactivation par transgène de gène(s) *CCoAOMT* se traduit très généralement par une réduction des activités *CCoAOMT* vis à vis du caféoyl CoA. Dans les tiges de lin transgéniques, une baisse de 12 à 55 % des activités *CCoAOMT* a été mesurée par rapport aux témoins. Ces valeurs sont dans la moyenne des réductions des activités *CCoAOMT* mesurées dans d'autres dicotylédones régénérées suite à une stratégie de transformation similaire : de 23 à 60 % chez le tabac (Zhong et al., 1998; Pinçon et al., 2001c), 30 % chez le peuplier (Zhong et al., 2000). Néanmoins, l'expression du transgène *CCoAOMT* sous le contrôle d'un promoteur *PAL2* de haricot a permis la régénération de luzernes transgéniques possédant des activités *CCoAOMT* réduites de 80 % (Guo et al., 2001). L'emploi de ce promoteur, caractéristique de la voie des phénylpropanoïdes, a orienté l'inactivation de la *CCoAOMT* dans les tissus xylémiens uniquement. L'étude de l'expression de ce promoteur (Guo et al., 2001) corrobore ces résultats mais montre que le promoteur *PAL2* n'est pas actif dans l'environnement des fibres périphloémiennes de luzerne lesquelles présentent pourtant des incrustations de lignines (Vallet et al., 1998). Cette dernière étude souligne l'importance d'une connaissance approfondie des éléments de régulation *cis* et *trans* des gènes de la voie des phénylpropanoïdes afin de optimiser l'inactivation de ces gènes par transgène.

CONCLUSION

ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Les propriétés exceptionnelles des fibres périphloémiennes du lin (finesse, résistances aux tensions et à l'usure, nervosité (Kernaghan, 1992; McDougall et al., 1993; Astley et Donald, 2003)) expliquent leurs emplois par les industries textiles (Soton et Sata, 1986; Roland et al., 1995) et chimiques dans le secteur des bio-polymères (Van de Velde et Baetens, 2001; Baley, 2002). Outre l'organisation structurale des microfibrilles de cellulose qui est le constituant majeur de la paroi de ces fibres (65 à 70 % de leur masse sèche), leurs caractéristiques intrinsèques résultent également de la quantité et de la qualité des composés pariétaux incrustant non cellulosiques (Akin et al., 1996a; Girault et al., 1997). Parmi ces derniers, les lignines, dont la présence est actuellement débattue, constitueraient un dénominateur commun affectant l'ensemble des propriétés des fibres périphloémiennes (Rihouey et Mesnage, 2001; Stamboulis et al., 2001; Bergander et Salmen, 2002).

Dans ce contexte, l'étude la lignification des fibres périphloémiennes du lin a été abordée par une démarche pluridisciplinaire afin d'apprécier le plus justement ce processus *via* l'établissement de corrélations entre les résultats obtenus. Les travaux présentés dans ce mémoire visaient à :

- Confirmer et localiser la présence de lignines au sein des faisceaux fibreux périphloémiens.
- Caractériser quantitativement et qualitativement ces lignines au cours de la maturation des fibres périphloémiennes.
- Préciser nos connaissances des mécanismes moléculaires régissant cette lignification *via* l'étude de la CCoAOMT.

L'observation microscopique d'une coupe transversale de tige de lin permet la localisation de ces fibres dans le parenchyme cortical entre l'épiderme et le phloème. L'étude de la phénologie des lins révèle que la maturation des fibres périphloémiennes s'établit à partir de la floraison des plantes (environ 10 semaines après la germination) et dure 4 semaines en moyenne, *i.e.* jusqu'au stade capsules brunes (Morvan et al., 1989b; Roland et al., 1995). Cette phase de développement correspond à une intense apposition de composés polysaccharidiques au niveau de la paroi secondaire des fibres périphloémiennes conduisant à leur remplissage. A maturité, ces cellules fibreuses ont une taille variant de 9 à 70 μm et un diamètre moyen d'environ 18 μm dont 90 % correspondent à leur paroi secondaire. Compte tenu de l'importance de la période de maturation dans la qualité et les propriétés des fibres périphloémiennes, cette étude relative à leur lignification a principalement concerné des lins à fibres prélevés au début (stade floraison) et à la fin (stade capsules brunes) de cette phase de développement.

I - MISE EN EVIDENCE DES LIGNINES INCRUSTANT LES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

L'utilisation de différentes méthodes de détection et de caractérisation des lignines en microscopie optique (tests de Weisner et de Maüle) et électronique (marquage au permanganate de potassium) a révélé leur existence au sein des faisceaux fibreux périphloémiens notamment dans la zone mitoyenne composite et dans S1. Les résultats du dosage des lignines par la méthode UV/bromure d'acétyle ont confirmé ces observations microscopiques et peuvent être corrélés à la détection d'activité CCoAOMT dans ces mêmes tissus. De plus, la localisation tissulaire de cette enzyme se superpose parfaitement aux marquages des lignines dans les tiges de lin confirmant conjointement la lignification des fibres périphloémiennes et son utilisation comme marqueur de la lignification.

Ces résultats confirment et précisent les observations précédemment rapportées (Tammes, 1907; Lewin, 1958; McDougall, 1991) et rejettent, de ce fait, les récentes hypothèses décrivant les composés phénoliques des tissus externes comme artefactuels (Morrison et al., 2003) ou "extractibles" (Love et al., 1994).

II - LES CARACTERISTIQUES DE CETTE LIGNIFICATION

2.1 - D'UN POINT DE VUE QUANTITATIF

Les teneurs en lignines dans les tissus externes apparaissent comme très faibles : ce polymère représentant au maximum 3 % de leur masse pariétale sèche. Ces faibles teneurs traduisant une hypolignification des fibres périphloémiennes sont en accord avec le discret marquage cytochimique des lignines dans ces tissus en comparaison avec le bois. En outre, le dosage des activités CCoAOMT, l'analyse de l'expression des gènes correspondants et du profil d'accumulation de cette enzyme suggèrent effectivement un processus de lignification peu intense dans les fibres périphloémiennes du lin. Ces dernières se distinguent des fibres caulinaires caractérisées dans diverses dicotylédones herbacées par leur très faibles teneurs en lignines ; seules les fibres de ramie sont moins lignifiées.

Ces résultats contrastent avec les observations et les données chimiques et moléculaires associées aux bois. Dans ce dernier tissu, les teneurs en lignines, comprises entre 22,3 % et 25,6 % de la masse de résidus pariétaux secs, sont caractéristiques des dicotylédones (Higuchi, 1981;

Tollier et al., 1986). L'intense marquage du xylème par (immuno-)cytochimie est lié à de fortes activités CCoAOMT et une abondance de protéines et transcripts *CCoAOMT*.

De telles corrélations entre les données moléculaires, biochimiques et microscopiques sont en accord avec de nombreux travaux concluant à l'implication de la CCoAOMT dans le processus de lignification et ceci chez les dicotylédones ligneuses et herbacées (Ye, 1997; Zhong et al., 1998; Chen et al., 2000; Baucher et al., 2003).

2.2 - D'UN POINT DE VUE QUALITATIF

Les lignines inscrustant les fibres périphloémiennes sont de nature G-S de type condensé. Les fortes proportions en sous-unités H et les faibles ratios S/G (inférieurs à 0,5) sont concordants avec les faibles proportions en structures non-condensées accessibles aux réactions dégradatives (au maximum 17 % du polymère). L'immunomarquage des lignines des fibres périphloémiennes révèle, en effet, que la zone mitoyenne composite est constituée de lignines condensées riches en G au niveau de la lamelle moyenne et à un degré moindre dans les jonctions tricellulaires et S1. Des lignines de nature G-S ont été détectées, moins intensément, dans l'ensemble de la paroi secondaire mais leur nature n'a pu être identifiée avec certitude. La zone mitoyenne composite et la S1 constituant les zones les plus intensément marquées par les réactifs histochimiques et cytochimiques (phloroglucinol-HCl, permanganate de potassium), les résultats obtenus à l'aide des sondes immunologiques semblent corrélés aux données chimiques d'analyses dégradatives des lignines. De si faibles valeurs des ratios S/G associées à la présence d'une lignine très condensée sont rarement rapportées chez les dicotylédones excepté au niveau des fibres périphloémiennes du chanvre et de la luzerne.

Dans le bois de lin, les ratios S/G atteignent des valeurs maximales (~0,2) inférieures à celles estimées dans les fibres. Cette relative abondance en sous-unités G dans la fraction "non-condensée" de la lignine du bois de lin (25 % du polymère), est peu courante chez les dicotylédones ligneuses ou herbacées (Lapierre, 1993; Baucher et al., 1998). Cette particularité pourrait s'expliquer par l'anatomie du bois des linacées chez lesquels la présence de vaisseaux mais aussi de trachéïdes et fibres-trachéïdes a été rapportée (Carlquist, 1988). Toutefois, les variations qualitatives des lignines entre les différentes assises pariétales des fibres xylémiennes, révélées par immunomarquage, sont semblables au modèle établi dans le bois des dicotylédones (Terashima et al., 1993; Fukushima et al., 1996).

2.3 - D'UN POINT DE VUE EVOLUTIF

Différentes données indiquent que la lignification des fibres périphloémiennes est antérieure au stade floraison : détection d'activité enzymatique CCoAOMT, quantification et mise en évidence des lignines et détection de sous-unités S dès le stade floraison. Ainsi, contrairement aux conclusions rapportées par Roland et al. (1995), ce processus semblerait intervenir précocement et peut être dès le début de la formation de la paroi secondaire des fibres (McDougall, 1991;1992).

L'accroissement des teneurs en lignines entre les stades floraison et capsules brunes témoigne de la lignification des fibres périphloémiennes durant leur maturation. Les augmentations du ratio S/G et du degré de condensation de la lignine durant cette période suggèrent : i. la polymérisation d'une proportion plus importante en unités S lesquelles seraient préférentiellement impliquées dans des structures non-condensées et ii. la synthèse d'unités G (et H ?) engagées dans des structures condensées. Ces résultats sont corrélés à l'absence d'une évolution visible, au cours de la maturation des fibres, de l'immunomarquage des lignines avec les trois sondes immunologiques employées reconnaissant des lignines G condensées, G-S condensées et G-S non-condensées.

Les données microscopiques et chimiques suggèrent que le processus de lignification dans les fibres présente de nombreuses similitudes avec le modèle établi dans le bois des dicotylédones (Fukushima et Terashima, 1990;1991; Terashima et al., 1993). Dès la formation de la sous-couche S2 des cellules fibreuses, avant le stade floraison, la première phase de la lignification s'initierait au niveau des lamelles moyennes composites (jonctions tricellulaires, lamelle moyenne et paroi primaire) avec la polymérisation de sous-unités H puis G. Ce processus s'étendrait ensuite dans la périphérie de la paroi secondaire et conduirait à une lignine de nature G puis G-S; la fin de cette seconde étape correspondrait au stade floraison. L'extension de la lignification à l'ensemble de la paroi secondaire des fibres se traduirait par la hausse des teneurs en lignines enregistrées au cours de la maturation des fibres. Cette troisième étape, associée à une augmentation des proportions en sous-unités S, expliquerait l'augmentation du ratio S/G constatée. Toutefois, dans les fibres de lin, cette dernière étape du processus de lignification est peu intense conduisant à de faibles teneurs en lignines et à des proportions en sous-unités H importantes.

Cette évolution de la lignification des fibres de lin est à rapprocher du corollaire existant entre la plus grande difficulté du traitement de ces fibres (rouissage, teillage, filage) et les dates tardives d'arrachage (Rihouey et Mesnage, 2001). Par ailleurs, la qualité du rouissage, influant directement sur la qualité intrinsèque des fibres (Faughey et Sharma, 2000; Van de Weyenberg et al., 2003) serait limitée par leur lignification (Meijer et al., 1995).

III - LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES VIA LA CARACTERISATION D'UNE CCoAOMT

Chez le lin, la CCoAOMT semble être codée par deux gènes et soumise une régulation transcriptionnelle : les variations des activités enzymatiques, des teneurs en protéines et en transcripts sont en effet semblables. De tels résultats sont conformes aux données relatives à la caractérisation de cette enzyme chez diverses dicotylédones (Anterola et Lewis, 2002). L'hypolignification des fibres périphloémiennes est en accord avec le niveau d'expression très réduit de la CCoAOMT dans ce tissu confirmant l'étroite association, rapportée dans de nombreux travaux, entre l'expression de cette enzyme et le processus lignification (Zhong et al., 1998; Meyermans et al., 2000; Zhong et al., 2000; Guo et al., 2001).

La caractérisation d'une CCoAOMT recombinante codée par un ADNc synthétisé à partir d'ARNm de tissus externes indique que sa séquence protéique possède près de 73 % d'identité avec la plupart des CCoAOMT de dicotylédones et que les motifs conservés spécifiques aux OMT et aux CCoAOMT y sont retrouvés. Par contre, l'étude des constantes enzymatiques, K_m et V_m , de cette CCoAOMT recombinante vis à vis de divers substrats de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes révèle une spécificité jamais rapportée. Cette enzyme possède une importante efficacité enzymatique (V_m/K_m) pour le caféoyl coenzyme A (substrat préférentiel) et le 5-hydroxyconiféraldéhyde. Les trois autres substrats testés, l'acide caféique, l'acide 5-hydroxyférulique et l'alcool 5-hydroxyconiférylique sont très faiblement méthylés par cette CCoAOMT recombinante. Ces données enzymatiques suggèrent que la CCoAOMT de lin pourrait être impliquée dans la biosynthèse des sous-unités G mais aussi des sous-unités S contrairement au concept général proposant des voies séparées (Guo et al., 2001; Anterola et Lewis, 2002; Boerjan et al., 2003). Ainsi, le maintien des activités CCoAOMT dans les tissus externes durant la maturation des fibres pourrait être rapproché de l'augmentation du ratio S/G des lignines synthétisées durant cette même période.

PERSPECTIVES

Les travaux effectués au cours de cette thèse s'intègrent dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires régissant la formation des fibres périphloémiennes du lin. La lignification de ces fibres représente un aspect de leur morphogenèse dont l'étude devrait s'élargir à la prise en compte des autres constituants pariétaux. En regard des résultats recueillis et de la complémentarité des différentes approches employées, l'étude de la biosynthèse des différents constituants et des mécanismes régissant l'architecture (des parois) des fibres périphloémiennes sera à envisager dans une même logique multidisciplinaire. Les perspectives inspirées par ce travail de recherche s'établissent à la fois sur un plan fondamental et dans un objectif appliqué et concernent :

I - LA LIGNIFICATION DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

- Les travaux de transgénèse antisens de la *CCoAOMT* seront complétés par des analyses chimiques et microscopiques des lignines constitutives des tissus externes et internes des tiges de lin transgénique. Ces résultats permettront : i. d'estimer l'importance du rôle de la *CCoAOMT* dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes chez le lin et ii. d'accepter ou de rejeter l'hypothèse que la *CCoAOMT* intervient à la fois dans la 3- et la 5-*O*-méthylation des sous-unités G et S ; hypothèse déduite du dosage des activités *in vitro* de l'enzyme recombinante.
- Dans ce sens, la compréhension des voies de méthylations des précurseurs des lignines nécessitera l'analyse également des activités COMT puis la caractérisation de cette enzyme.
- En regard de l'évolution du processus de lignification des tiges de lin (dans les tissus internes : intense mais très ralenti ou achevé au stade floraison; dans les faisceaux fibreux périphloémiens : très faible mais continue jusqu'à la sénescence des plantes), la régulation des deux gènes *CCoAOMT* devra être étudiée. Cette analyse implique l'isolement de leur région promotrice respective puis la caractérisation des facteurs *cis* et *trans* affectant leur régulation. Il a été montré, notamment chez le peuplier et le tabac, que l'expression des différents gènes *CCoAOMT* est respectivement spatio- et tempo- différentielle (Hertzberg et Olsson, 1998; Martz et al., 1998; Chen et al., 2000). Une telle régulation peut également être envisagée chez le lin. Des constructions "promoteur *CCoAOMT*-gène rapporteur (*GUS*)" pourraient être utilisées pour transformer des lins afin de visualiser à terme le profil d'expression de ce/ces gènes. En outre, l'étude de ces régions promotrices aidera à la compréhension de la régulation des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. En effet, de nombreux facteurs *cis* et *trans* précédemment

identifiés chez divers modèles végétaux sont également retrouvés chez le lin mais leurs rôles demeurent très imprécis. L'effet de délétions en 5' du promoteur pourra être recherchée ; de même que des études de retard sur gel pourraient permettre d'identifier des éléments régulateurs dans le promoteur (éléments AC par exemple).

- Les résultats ci présentés montre la présence de lignines dans les fibres périphloémiennes dès le stade floraison. L'emploi de sondes immunologiques dirigées contre des lignines de type condensé de nature H et G permettrait de discuter les phases précoces de la lignification dans ce tissu. De plus, la caractérisation chimique des lignines à des stades plus jeunes conforterait ces observations.

II - LA MORPHOGENESE DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

La lignine représentant moins de 5 % de la masse sèche des tissus externes, l'étude de la morphogenèse des fibres périphloémiennes nécessite la caractérisation d'autres gènes impliqués dans la formation des parois. Chez *Arabidopsis*, environ 420 gènes ont été assignés à un rôle putatif dans la synthèse et la modification des polymères pariétaux (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). L'emploi d'une approche globale génomique par le séquençage d'EST est prouvé comme extrêmement utile pour obtenir une vision générale du profil d'expression d'un tissu et à un stade précis (Sterky et al., 1998; Carson et al., 2002). Dans ce sens, environ un millier d'EST ont été séquencées à partir de la banque d'ADNc de tissus externes de tige de lin. 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 des protéines retrouvées chez *Arabidopsis* mais de fonctions inconnues (22 %).

Le regroupement fonctionnel des EST identifiées a conduit à établir 14 catégories. Ces dernières sont présentées dans la figure 79. La proportion de chaque catégorie reflétant la fonction physiologique du tissu dont est issue la banque. Dans les tissus externes du lin au stade floraison, 3,8 % des gènes exprimés (*i.e.* 36) sont impliqués dans la biosynthèse de composés pariétaux. Cette proportion est semblable chez un conifère, *Cryptomeria japonica*, 3 % (Ujino-Ihara et al., 2000), mais beaucoup plus faible que celle observée chez le peuplier, 7 % (Sterky et al., 1998). Parmi ces 36 gènes, 29 correspondent à des gènes associés à la synthèse de composants polysaccharidiques et 6 à des peroxydases. Le nombre d'EST associé à des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes représente 0,2 %, soit 2 gènes dont 1 code pour une COMT. Cette proportion est nettement inférieure à celle obtenue dans le peuplier à partir d'EST de

cambium (10,8 %) et de xylème en développement (21,5 %) (Sterky et al., 1998). Ce faible pourcentage est en accord avec l'hypolignification marquée des fibres périphloémiennes. Inversement, le groupe d'EST le plus exprimé dans la banque correspond à des gènes de β -xylosidases (13 séquences) qui sont des enzymes impliquées dans la biosynthèse des hémicelluloses. Or ces composés polysaccharidiques jouent un rôle essentiel dans l'organisation de la structure pariétale en interagissant à la fois avec la cellulose et les lignines (Reis et al., 1994).

- L'étude morphogénétique de la biogenèse des parois des cellules fibreuses périphloémiennes pourrait se poursuivre par la caractérisation des β -xylosidases exprimées dans les tissus externes en complémentarité des analyses des lignines. La caractérisation biochimique des hémicelluloses des fibres périphloémiennes de lin est rapportée dans divers travaux (McDougall, 1993; Van Hazendonk et al., 1996; Jacobs et al., 2003) mais leur biosynthèse n'a pas été étudiée dans cet environnement.

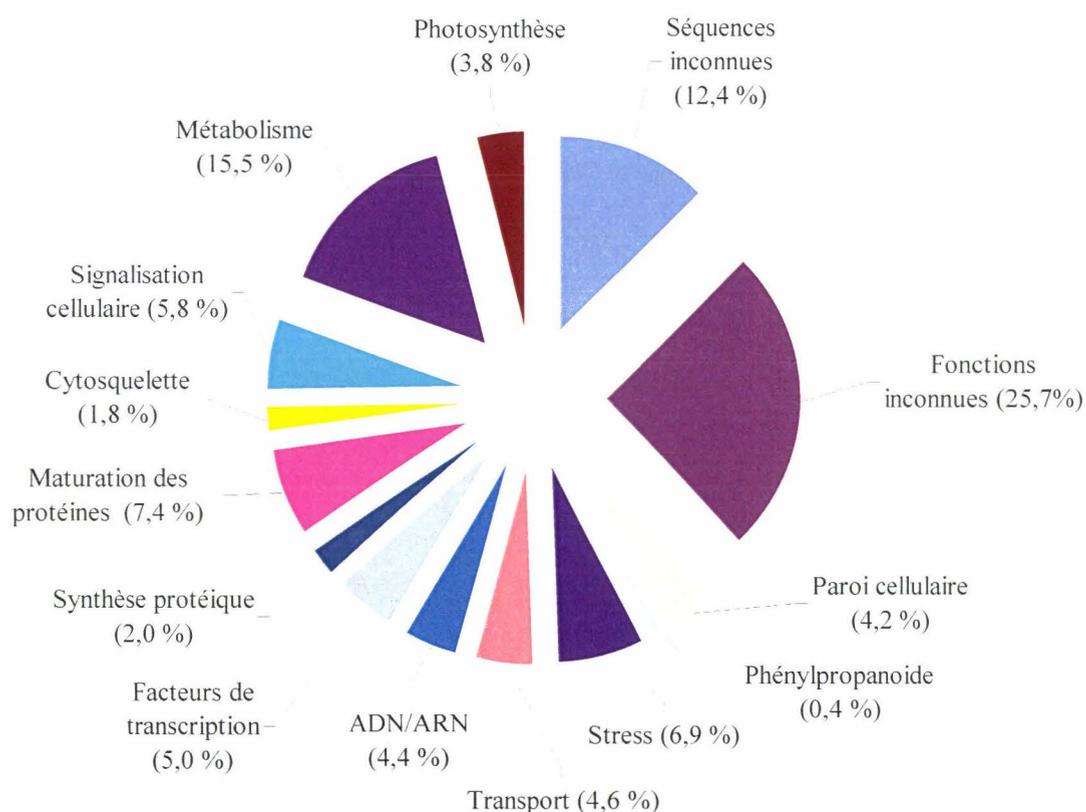


Figure 79 : Distribution des 937 EST séquencées de la banque d'ADNc de tissus externes de tiges de lin au stade floraison.

- L'élargissement de cette approche génomique globale à un plus grand nombre d'EST pourra être envisagé afin de relier, selon les termes d'une récente revue (Ebskamp, 2002), "la qualité des fibres aux gènes". Dans ce sens, ces EST pourront servir à la construction de "microarrays" afin d'identifier et d'étudier l'expression de gènes impliqués dans la morphogénèse/architecture de ces fibres d'intérêt.
- Cette étude génomique pourra être associée à une approche protéomique afin d'identifier et d'analyser les protéines dans ces mêmes tissus externes. La complémentarité de ces deux démarches globales apparaît indispensable pour une juste appréciation des mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation des fibres de lin. En effet, cette association permet i. de s'assujettir de potentiels processus de régulation post-traductionnelle non détectés par les EST et ii. une analyse fonctionnelle (VanderMijnsbrugge et al., 2000a; Patel et al., 2002; Thiellement et al., 2002).

III - LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FIBRES PERIPHLOEMIENNES

L'utilisation industrielle des fibres périphloémiennes du lin repose sur leurs qualités intrinsèques lesquelles dépendent notamment de leur morphologie mais aussi de leur composition chimique (Smeder et Liljedahl, 1996). La proportion de chacun des constituants pariétaux et de leurs comportements lors du traitement des fibres apparaissent essentiels. En effet, les propriétés physico-chimiques des fibres natives évoluent sensiblement au cours des différentes étapes permettant l'obtention de fibres techniques (Sharma et al., 1999a; Van de Weyenberg et al., 2003). Les propriétés mécaniques des fibres dépendent également de l'organisation des différents polymères et de leurs interactions dans la paroi cellulaire (Salmen et Olsson, 1998). Ainsi, l'analyse des propriétés mécaniques des fibres périphloémiennes et le rôle des interactions entre les différents polymères pariétaux pourront être recherchés en complémentarité de l'analyse de leur lignification. Différentes approches sont envisageables :

- Les "composants inscrustants" (lignines, hémicelluloses, pectines) sont définis comme une matrice amorphe remplissant les espaces entre les microfibrilles de cellulose et semblent jouer un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques des parois (Salmen et Olsson, 1998). Le rôle des lignines dans l'environnement des faisceaux fibreux peut être abordé en considérant ce polymère seul mais aussi en association avec les pectines et les hémicelluloses par le biais d'études de modèles. Différentes approches sont envisageables afin de préciser les propriétés viscoélastiques des polymères amorphes (essentiellement non-cellulosiques) au

sein des fibres. Les diverses déclinaisons de l'analyse thermique combinée à une sollicitation mécanique permettent d'appréhender la relation entre un état organisationnel et un comportement mécanique. D'autres investigations comme l'analyse en RMN sur phase solide pourraient fournir des éléments sur la mobilité des polymères au sein des structures organisées (Ha et al., 1997; Jarvis et McCann, 2000). La contribution des pectines dans la résistance mécanique des fibres a notamment été proposée par cette approche (Girault et al., 1997). L'étude de lins à différents stades de développement, avant, pendant et après la floraison pourrait permettre de mieux appréhender l'interférence des lignines dans la divisibilité de leurs fibres.

- Composant majoritaire des fibres périphloémiennes comme armature fibrillaire, la cellulose, est un élément déterminant dans leurs propriétés mécaniques. L'influence de l'orientation des microfibrilles de cellulose dans la dureté des fibres xylémiennes a été bien établies (Reiterer et al., 1999). Par ailleurs, les paramètres structuraux de la cellulose (index de cristallinité, degré de polymérisation, formes allomorphes) contribuent aux propriétés physiques des fibres périphloémiennes du lin, de la ramie, du bois (Hulleman et al., 1994; Jähn et al., 2002). Dans le bois de compression, une relation entre teneur en lignines, proportions des sous-unités H et angle des microfibrilles de cellulose a été mise en évidence (Gindl, 2002). En regard des conclusions de ces derniers travaux, l'étude des variations de l'architecture cellulosique en fonction de l'âge des lins et de la lignification de leurs fibres périphloémiennes pourrait être envisagée par spectroscopie FT de Ramman ou par microscopie confocal à polarisation.
- Les lins transgéniques pourront être employés pour vérifier d'éventuelles modifications de la résistance mécanique des fibres afin de préciser l'impact des lignines sur ces dernières propriétés. La comparaison de ces résultats avec les fibres périphloémiennes de la ramie (Angelini et al., 2000) et du chanvre (Sankari, 2000), respectivement moins et plus lignifiées que celles du lin, conforterait cette étude.

IV - L'INFLUENCE DES PARAMETRES CULTURAUX

La qualité des fibres périphloémiennes du lin est dépendante du cultivar mais aussi des méthodes et conditions environnementales de la culture des plantes (Leitch et Kurt, 1999; Easson et Molloy, 2000; Easson et Cooper, 2002; Goodman et al., 2002). Ces facteurs externes agissent non seulement les teneurs en fibres, leur longueur, leur diamètre mais leur composition, *i.e.* le rapport composants cellulosiques / non-cellulosiques (Archibald, 1992;

Sharma et Faughey, 1999). La pulvérisation d'herbicides sur des lins avant leur arrachage semble modifier le degré de lignification de leurs fibres périphloémiennes (Sharma, 1986a). Par ailleurs, le rôle de certaines hormones végétales (auxines, gibbérélines, cytokinines) sur le développement de ces fibres a été montré (El-Shourbagy et al., 1995).

- L'effet potentiel des entrants dans la culture, *i.e.* apports minéraux et organiques, traitements phytosanitaires (raccourcisseurs, *i.e.* hormones de synthèse), sur le développement des fibres périphloémiennes du lin en relation avec leur lignification et leur qualité pourra être recherchée.

"Si la science intervient pour améliorer les techniques traditionnelles et classiques de transformation du lin, elle s'est paradoxalement imposée pour contrôler ce qui ne semble pas devoir se mesurer, mais qui caractérise ce textile : la beauté, la permanence et l'agrément"

(Lourd, 1964).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adler, E., Björkqvist, K. J. and Häggroth, S. (1948). Über die ursache der Farbreaktionen des holzes. **Acta Chem Scand**, 2: 93-94.
- Adler, E. (1977). Lignin chemistry - Past, present and future. **Wood Sci Techno**, 11: 169 - 218.
- Akin, D. E., Gamble, G. R., Morrison, W. H., Rigsby, L. L. and Dodd, R. B. (1996a). Chemical and structural analysis of fibre and core tissues from flax. **J Sci Food Agr**, 72 (2): 155-165.
- Akin, D. E., Morrison, W. H., Gamble, G. R., Rigsby, L. L. and Dodd, R. B. (1996b). Chemical, spectroscopic, and microscopic characterization of fiber and core fractions of flax. The 4TH European Regional Workshop on Flax, Rouen, France.
- Akin, D. E. and Rigsby, L. L. (1998). Structural effects on flax stems of three potential retting fungi. **Text Res J**, 68 (7): 515 - 519.
- Akin, D. E., Dodd, R. B., Perkins, W., Henriksson, G. and Eriksson, K. E. (2000). Spray enzymatic retting: a new method for processing flax fibers. **Text Res J**, 70 (6): 486-494.
- Akin, D. E., Foulk, J. A. and Dodd, R. B. (2002). Influence on flax fibers of components in enzyme retting formulations. **Text Res J**, 72 (6): 510-514.
- Akin, D. E., Morrison, W. H., Rigsby, L. L., Evans, J. D. and Foulk, J. A. (2003). Influence of water presoak on enzyme-retting of flax. **Ind Crops Products**, 17 (3): 149-159.
- Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M., Guillen, R., Ham, K., Hahn, M., Huang, J., O'Neill, M., Whitcombe, A., Williams, M. V., York, W. S. and Darvill, A. (1994). Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. **Biochem Soc Trans**, 22: 374-378.
- Aldington, S. and Fry, S. C. (1993). Oligosaccharins. **Adv Bot Res**, 19: 1-101.
- Alibert, G., Ranjeva, R. and Boudet, A. M. (1972). Recherches sur les enzymes catalysant la biosynthèse des acides phénoliques chez *Quercus pedunculata*. III. Formation séquentielle, à partir de la phénylalanine, des acides cinnamiques, *p*-coumarique et caféique, par des organites cellulaires isolés. **Physiol Plant**, 27: 240-243.
- Allina, S. M., Prihadash, A., Theilmann, D. A., Ellis, B. E. and Douglas, C. J. (1998). 4-coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar - Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. **Plant Physiol**, 116 (2): 743-754.
- Andeme-Onzighi, C., Girault, R., His, I., Morvan, C. and Driouich, A. (2000). Immunocytochemical characterization of early-developing flax fiber cell walls. **Protoplasma**, 213 (3-4): 235-245.
- Andème-Onzighi, C. (2003). Implication des parois dans la morphogénèse et différenciation cellulaire chez *Arabinopsis thaliana* et *Linum usitatissimum* L. Thèse de Doctorat, Université de Rouen, 160 pages.
- Anderson, D. (1927). A microchemical study of the structure and development of flax fibers. **Am J Bot**, 14: 187 - 210.
- Angelini, L. G., Lazzeri, A., Levita, G., Fontanelli, D. and Bozzi, C. (2000). Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) and spanish broom (*Spartium junceum* L.) fibres for composite materials: agronomical aspects, morphology and mechanical properties. **Ind Crops Products**, 11: 145-161.
- Anterola, A. M. and Lewis, N. G. (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochem**, 61 (3): 221-294.
- Anthony, W. S. (2002). Separation of fiber from seed flax straw. **Applied Engineering in Agriculture**, 18 (2): 227-233.
- Archibald, L. B. (1992). Quality in flax fibre. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), *Belfast*, pp: 297-309.

- Argyropoulos, D. S. and Menachem, S. B. (1997). Lignin. *In: Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Springer-Verlag (eds), Berlin Heidelberg, pp: 128-158.
- Astley, O. M. and Donald, A. M. (2001). A small-angle X-ray scattering study of the effect of hydration on the microstructure of flax fibers. *Biomacromolecules*, 2 (3): 672-680.
- Astley, O. M. and Donald, A. M. (2003). The tensile deformation of flax fibres as studied by X-ray scattering. *J Mater Sci*, 38 (1): 165-171.
- Atalla, R. H. (1984). Polymorphy native in cellulose : recent developments. *In: Function and biosynthesis of plant cell wall*, Dugger V. M. and Bartnicki-Garcia S. (eds), Rockville, pp: 381-387.
- Atalla, R. H. and Agarwal, U. P. (1985). Raman microprobe evidence for lignin orientation in cell walls of native woody tissue. *Science*, 227: 636-638.
- Atalla, R. H., Agarwal, U. P. and Bond, J. S. (1992). Raman spectroscopy. *In: Methods in lignin chemistry*, Lin S. Y. and Dence C. W. (eds), Berlin, Heidelberg, pp: 162-176.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M. T., Monties, B., Fritig, B. and Legrand, M. (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J*, 8 (4): 465-477.
- B**
- Bagby, M. O., Cunningham, R. B. and Maloney, R. L. (1973). Ultraviolet spectral determination of lignin. *Tappi J*, 56 (4): 162-163.
- 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.
- Barber, M. S., McConnell, V. S. and DeCaux, B. S. (2000). Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochem*, 54 (1): 53-56.
- Barcelo, A. R. and AznarAsensio, G. J. (1999). Coniferyl alcohol oxidase activity of a cell-wall-located class III peroxidase. *Aust J Plant Physiol*, 26 (5): 411-419.
- Barnoud, F. (1980). La cellulose. *In: Les polymères végétaux*, Monties B. (eds), Paris, pp: 66-86.
- Basic, A., Chums, S. C., Stephen, A. M., Cohen, P. B. and Fincher, G. B. (1987). Fine structure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*. *Carbohydr Res*, 162: 85-93.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J. and Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (16): 7608-7612.
- Bate-Smith, E. C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *Journal of the Linnean Society*, 58: 95-173.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M. T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inzé, D., Jouanin, L. and Boerjan, W. (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol*, 112: 1479-1490.
- Baucher, M., Monties, B., Vanmontagu, M. and Boerjan, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci*, 17 (2): 125-197.
- Baucher, M., Bernard-Vailhe, M. A., Chabbert, B., Besle, J. M., Opsomer, C., Van Montagu, M. and Botterman, J. (1999). Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Mol Biol*, 39 (3): 437-447.
- 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.

- Becker-André, M., Schulze-Lefert, P. and Hahlbrock, K. (1991). Structural comparison, modes of expression, and putative cis-acting elements of two 4-coumarate:CoA ligase genes in potato. **J Biol Chem**, 266 (8551-8559).
- Bell Lelong, D. A., Cusumano, J. C., Meyer, K. and Chapple, C. (1997). Cinnamate-4-hydroxylase expression in Arabidopsis - Regulation in response to development and the environment. **Plant Physiol**, 113 (3): 729-738.
- Bergander, A. and Salmen, L. (2000). Variations in transverse fibre wall properties: Relations between elastic properties and structure. **Holzforschung**, 54 (6): 654-660.
- Bergander, A. and Salmen, L. (2002). Cell wall properties and their effects on the mechanical properties of fibers. **J Mat Sci**, 37 (1): 151-156.
- Bernard Vaillhé, M. A., Cornu, A., Robert, D., Maillot, M. P. and Besle, J. M. (1996). Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality. **J. Agr. Food Chem.**, 44 (4): 1164-1169.
- Billa, E. (1994). Présence, structure et réactivité des lignines, des acides phénoliques et de la silice de la paille de blé et des pâtes à papier a haut rendement correspondantes. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 197 pages.
- Billa, E., Tollier, M. T. and Monties, B. (1996). Characterisation of the monomeric composition of in situ wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. **J Sci Food Agr**, 72 (2): 250-256.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl Acids Res**, 7: 1513-1522.
- Bismarck, A., Aranberri Askargorta, I., Springer, J., Lampke, T., Wielage, B., Stamboulis, A., Shenderovich, I. and Limbach, H. H. (2002). Surface characterization of flax, hemp and cellulose fibers; surface properties and the water uptake behavior. **Polym Composites**, 23 (5): 872-894.
- Bland, D. E., Foster, R. C. and Logan, A. F. (1971). The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and the distribution of lignin in cell wall of *Pinus radiata*. **Holzforschung**, 25: 137.
- Bledzki, A. K., Reihmane, S. and Gassan, J. (1996). Properties and modification methods for vegetable fibers for natural fiber composites. **J Appl Polym Sci**, 59 (8): 1329-1336.
- Blee, K., Choi, J. W., O'Connell, A. P., Jupe, S. C., Schuch, W., Lewis, N. G. and Bolwell, G. P. (2001). Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. **Phytochem**, 57: 107-116.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C. and Dixon, R. A. (2000). Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. **Plant Physiol**, 122 (1): 107-116.
- Blount, J. W., Masoud, S., Sumner, L. W., Huhman, D. and Dixon, R. A. (2002). Over-expression of cinnamate 4-hydroxylase leads to increased accumulation of acetosyringone in elicited tobacco cell-suspension cultures. **Planta**, 214 (6): 902-910.
- Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. **Annu Rev Plant Biol**, 54: 519-546.
- Bolwell, G. P. (1988). Synthesis of cell wall components: aspects of control. **Phytochem**, 27: 1235-1253.
- Borevitz, J. O., Xia, Y. J., Blount, J., Dixon, R. A. and Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Cell**, 12 (12): 2383-2393.
- Bos, H. L., Van den Oever, M. J. A. and Peters, O. (2002). Tensile and compressive properties of flax fibres for natural fibre reinforced composites. **J Mater Sci**, 37 (8): 1683-1692.
- Bose, S. K., Wilson, K. L., Francis, R. C. and Aoyama, M. (1998). Lignin analysis by permanganate oxidation. I. Native spruce lignin. **Holzforschung**, 52 (3): 297-303.

- Bossuyt, V. (1941). Etude de la structure et des propriétés mécaniques de la fibre de lin. Thèse d'Etat, Faculté des Sciences de Lille, 145 pages.
- Boudet, A. M., Lapierre, C. and Grima-Pettenati, J. (1995). Biochemistry and molecular biology lignification. **New Phytol**, *129*: 203-236.
- Boudet, A. M. (2002). Lignin genetic engineering: A way to better understand lignification beyond applied objectives. **Plant Biotechnology and Transgenic Plants**: 477-495.
- 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.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. **Annu Rev Biochem**, *50*: 349-383.
- Brett, C. and Waldron, K. (1996). **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London, Chapman and Hall, 255 pp.
- Brinkmann, K., Blaschke, L. and Polle, A. (2002). Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. **J Chem Ecol**, *28* (12): 2483-2501.
- Brown, S. A. (1961). Chemistry of lignification. Biochemical research on lignins is yielding clues to the structure and formation of these complex polymers. **Science**, *134*: 305-313.
- Bucciarelli, B., Jung, H. J., Ostry, M. E., Anderson, N. A. and Vance, C. P. (1998). Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). **Can J Bot**, *76* (7): 1282-1289.
- Bugos, R. C., Chiang, V. L. and Campbell, W. H. (1991). cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase of aspen. **Plant Mol Biol**, *17* (6): 1203-1215.
- Bugos, R. C., Chiang, V. L. and Campbell, W. H. (1992). Characterization of bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase from aspen. **Phytochem**, *31* (5): 1495-1498.
- Burlat, V. (1997). Etude immunocytochimique de la distribution ultrastructurale des lignines dans la paille de blé et de son influence sur le mode d'action des champignons ligninolytiques - Application aux pâtes à papier. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier-Genoble I, 222 pages.
- Burlat, V., Joseleau, J. P. and Ruel, K. (2000). Topochemistry and microdiversity of lignin in plant cell walls. In: **New Horizons in Wood Anatomy**, Kim Y. S. (eds), Kwangju, pp: 181-188.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal Biochem**, *112*: 195-203.
- Busam, G., Junghanns, K. T., Kneusel, R. E., Kassemeyer, H. H. and Matern, U. (1997). Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiol**, *115* (3): 1039-1048.

C

- Campbell, M. M. and Sederoff, R. R. (1996). Variation in lignin content and composition - Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. **Plant Physiol**, *110* (1): 3-13.
- Carlquist, S. (1988). **Comparative wood anatomy**. Berlin, Springer-Verlag, 436 pp.
- 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 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. 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 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.
- Casa, R., Russell, G., LoCascio, B. and Rossini, F. (1999). Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) yield and growth of flax at different stand densities. **Eur J Agron**, 11 (3-4): 267-278.
- Cassab, G. I. and Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. **Annu Rev Plant Physiol**, 39: 321-353.
- Cassab, G. I. (1998). Plant cell wall proteins. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 49: 281-309.
- Cathala, B., Saake, B., Faix, O. and Monties, B. (1998). Evaluation of the reproducibility of the synthesis of dehydrogenation polymer models of lignin. **Polymer Degrad Stab**, 59 (1-3 Sp. Iss.): 65-69.
- Cathala, B., Chabbert, B., Joly, C., Dole, P. and Monties, B. (2001). Synthesis, characterisation and water sorption properties of pectin-dehydrogenation polymer (lignin model compound) complex. **Phytochem**, 56: 195-202.
- Catling, D. and Grayson, J. (1982). **Identification of vegetable fibres**. Arrowsmith, J.W. Ltd, Bristol, London, Chapman and Hall Ltd, 89 pp.
- Chabannes, M., Ruel, K., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J. P. and Boudet, A. M. (2001). *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. **Plant J**, 28: 271-282.
- Chabbert, B., Tollier, M. T., Monties, B., Barrière, Y. and Argillier, O. (1994). Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm2 mutation. **J Sci Food Agric**, 64 (455-460).
- Chafe, S. C. (1974). On the lamellate structure of the S2 layer. **Protoplasma**, 79: 145-158.
- Chafe, S. C. and Chauret, G. (1992). Cell wall structure in the xylem parenchyma of trembling aspen. **Protoplasma**, 80: 129-147.
- Chan, F. D., Nguyen, K. L. and Wallis, A. F. A. (1995a). Estimation of the aromatic units in lignin by nucleus exchange - A reassessment of the method. **J Wood Chem Technol**, 15 (4): 473-491.
- Chan, F. D., Nguyen, K. L. and Wallis, A. F. A. (1995b). Contribution of lignin sub-structures to nitrobenzene oxidation products. **J Wood Chem Technol**, 15 (3): 329 - 347.
- Chang, H. M. and Allan, G. G. (1971). Oxidation. *In: Lignins : occurrence, formation, structure and reactions*, Sarkanen K. V. and Ludwig C. H. (eds), New York-London-Sydney-Toronto, pp: 433-485.
- Chapple, C. (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 49: 311-343.
- Chapple, C. C. S., Vogt, T., Ellis, B. E. and Somerville, C. R. (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. **Plant Cell**, 4: 1413-1424.
- Charlet, S., Bensaddek, L., Raynaud, S., Gillet, F., Mesnard, F. and Fliniaux, M. A. (2002). An HPLC procedure for the quantification of anhydrosecoisolaricresinol. Application to the evaluation of flax lignan content. **Plant Physiol Biochem**, 40 (3): 225-229.

- Chase, M. and The Angiosperm Phylogeny Group (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals Missouri Botanical Garden**, 85: 531-553.
- Chen, C., Baucher, M., Christensen, J. H. and Boerjan, W. (2001a). Biotechnology in trees: Towards improved paper pulping by lignin engineering. **Euphytica**, 118 (2): 185-195.
- Chen, C. L. (1991). Lignins: occurrence in woody tissues, isolation, reactions, and structure. In: **Wood structure and composition**, Lewin M. and Goldstein I. S. (eds), New-York, pp: 183 - 261.
- Chen, C. L. (1992). Nitrobenzene and cupric oxide oxidations. In: **Methods in lignin chemistry**, Lin S. Y. and Dence C. W. (eds), Berlin, Heidelberg, pp: 301-321.
- Chen, C. Y., Meyermans, H., Burggraefe, B., DeRycke, R. M., Inoue, K., DeVleeschauwer, V., Steenackers, M., VanMontagu, M. C., Engler, G. J. and Boerjan, W. A. (2000). Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase in poplar. **Plant Physiol**, 123 (3): 853-867.
- Chen, F., Yasuda, S. and Fukushima, K. (1999). Evidence for a novel biosynthetic pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC. **Planta**, 207 (4): 597-603.
- Chen, F., Kota, P., Blount, J. W. and Dixon, R. A. (2001b). Chemical syntheses of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin O-methyltransferase activities in dicot and monocot species. **Phytochem**, 58 (7): 1035-1042.
- Chen, H. B. and Vierling, R. A. (2000). Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families. **Plant Sci**, 150 (2): 129-137.
- Chen, J. A. and Varner, J. E. (1985). Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin end a proline rich 33-kDa protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, 82 (13): 4399-4403.
- Chiang, V. L. and Funaoka, M. (1990). The difference between guaiacyl and guaiacyl-syringyl lignins in their responses to kraft delignification. **Holzforshung**, 44 (4): 309-313.
- Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., Van Montagu, M. and Boerjan, W. (1998). Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Plant Physiol**, 118 (1): 125-135.
- Christensen, J. H., Overney, S., Rohde, A., Diaz, W. A., Bauw, G., Simon, P., VanMontagu, M. and Boerjan, W. (2001). The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. **Plant Mol Biol**, 47 (5): 581-593.
- Christensen, J. H., Baucher, M., O'Connell, A., Van Montagu, M. and Boerjan, W. (2003). Control of lignin biosynthesis. **under press**.
- Clifford, M. N. (1974). Specificity of acidic phloroglucinol reagents. **J Chromatogr**, 94: 321-324.
- Collendavello, J., Legrand, M., Geoffroy, P., Barthelemy, J. and Fritig, B. (1981). Purification and properties of the three o-diphenol-O-methyltransferases of tobacco leaves. **Phytochem**, 20: 611-620.
- Condit, C. M. and Maegher, R. B. (1986). A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. **Nature**, 323: 178-181.
- Condit, C. M. and Maegher, R. B. (1987). Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. **Mol Cell Biol**, 7: 4273-4279.
- Cooper, J. B., Chen, J. A., Van Holst, G. J. and J.E., V. (1987). Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. **Trends Biochem Sci**, 12 (24-27).
- Cosgrove, D. J. (1997a). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 13: 171-201.
- Cosgrove, D. J. (1997b). Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **Plant Cell**, 9 (7): 1031-1041.

- Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 50: 391-417.
- Cosgrove, D. J., Li, L. C., Cho, H. T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R. C. and Blecker, D. (2002). The growing world of expansins. **Plant Cell Physiol**, 43 (12): 1436-1444.
- Crocker, E. C. (1921). An experimental study of the significance of "lignin" color reactions. **Ind Eng Chem**, 13: 625-627.
- Crozier, M. N. (1950). Microscopic examination of the sectioned stem of linen flax (*Linum usitatissimum*). **N Z J Sci Technol**, 6: 17-30.
- Cukovic, D., Ehrling, J., VanZiffle, J. A. and Douglas, C. J. (2001). Structure and evolution of 4-coumarate : coenzyme A ligase (4CL) gene families. **Biol Chem**, 382 (4): 645-654.
- Czaninski, Y., Sachot, R. M. and Catesson, A. M. (1993). Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. **Ann Bot**, 72: 547-550.

D

- Danschger, G. and Norgaard, J. O. (1983). Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. **J Histochem Cytochem**, 31: 1394-1398.
- Davin, L., Wang, H., Crowell, A., Bedgar, D., Martin, D., Sarkanen, S. and Lewis, N. (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. **Science**, 275 (5298): 362-366.
- Davin, L. B. and Lewis, N. G. (1991). Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In: **Phenolic metabolism in plants**, Stafford H. A. and Ibrahim R. K. (eds), *New York*, pp: 325-375.
- Davin, L. B. and Lewis, N. G. (2000). Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. **Plant Physiol**, 123 (2): 453-461.
- De Oliveira, D. E., Seurinck, J., Inzé, D., Van Montagu, M. and Botterman, J. (1990). Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. **Plant Cell**, 2: 427-436.
- Dean, J. F. D. and Eriksson, K. E. L. (1994). Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. **Holzforschung**, 48: S21-33.
- Delmer, D. P. (1987). Cellulose biosynthesis. **Annu Rev Plant Physiol**, 38: 259-290.
- Delmer, D. P. and Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. **Plant Cell**, 7 (7): 987-1000.
- Dence, C. W. (1992). The determination of lignin. In: **Methods in lignin chemistry**, Lin S. Y. and Dence C. W. (eds), *Berlin, Heidelberg*, pp: 33-61.
- Dershem, S. M., Fisher, T. H., Johnson, S. and Schultz, T. P. (1988). Substituent effects in the nitrobenzene and copper (II) oxidation of some hydroxystibene lignin model compounds. **Holzforschung**, 42: 163-167.
- Devic, M., Albert, S., Delseny, M. and Roscoe, T. J. (1997). Efficient PCR walking on plant genomic DNA. **Plant Physiol Biochem**, 65 (4): 331-339.
- Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E. and Carlson, J. E. (1995). A beta-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. **Plant Physiol**, 107 (2): 331-339.
- Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E. and Carlson, J. E. (1999). cDNA cloning and heterologous expression of coniferin beta-glucosidase. **Plant Mol Biol**, 40 (2): 365-372.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoids in plants. **Plant Cell**, 7: 1085-1097.
- 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.

- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S. and Wang, L. J. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. **Mol Plant Pathology**, 3 (5): 371-390.
- Donaldson, L., Hague, J. and Snell, R. (2001). Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. **Holzforschung**, 55 (4): 379-385.
- Donaldson, L. A. (1994). Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. **Wood Sci Technol**, 28: 111-118.
- Donaldson, L. A. (2001). Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochem**, 57: 859 - 873.
- Douglas, C. J. (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **Trends Plant Sci**, 1: 171-178.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.
- Driouich, A., Lainé, A. C., Vian, B. and Faye, L. (1992). Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. **Plant J**, 2: 13-24.
- Dumas, J. B. A. (1831). Lettre de M. Dumas à M. Gay-Lussac sur les procédés de l'analyse organique. **Ann Chim Phys**, 47: 198-213.
- Dunford, H. B. (1991). Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: **Peroxidases in chemistry and biology**, Everse J., Everse K. E. and Grisham M. B. (eds), Boston, pp: 2-17.
- Durbeej, B. and Eriksson, L. A. (2003a). A density functional theory study of coniferyl alcohol intermonomeric cross linkages in lignin - Three-dimensional structures, stabilities and the thermodynamic control hypothesis. **Holzforschung**, 57 (2): 150-164.
- Durbeej, B. and Eriksson, L. A. (2003b). Spin distribution in dehydrogenated coniferyl alcohol and associated dilignol radicals. **Holzforschung**, 57 (1): 59-61.
- Durbeej, B. and Eriksson, L. A. (2003c). Formation of β -O-4 lignin models. A theoretical study. **Holzforschung**, 57: 466-478.
- Dwivedi, U. N., Campbell, W. H., Yu, J., Datla, R. S., Bugos, R. C., Chiang, V. L. and Podila, G. K. (1994). Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense *O*-methyltransferase gene from *Populus*. **Plant Mol Biol**, 26 (1): 61-71.
- E**
- Eadie, G. S. (1942). The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. **J Biol Chem**, 146: 85-93.
- Easson, D. L., Molloy, R., Anderson, R. and Sharma, H. S. S. (1998). The retting of flax after preservation with sulphur dioxide. **Ann Appl Biol**, 133 (3): 467-481.
- Easson, D. L. and Molloy, R. M. (2000). A study of the plant, fibre and seed development in flax and linseed (*Linum usitatissimum*) grown at a range of seed rates. **J Agr Sci**, 135: 361-369.
- Easson, D. L. and Cooper, K. (2002). A study of the use of the trimesium salt of glyphosate to desiccate and ret flax and linseed (*Linum usitatissimum*) and of its effects on the yield of straw, seed and fibre. **J Agr Sci**, 138 (Part 1): 29-37.
- Ebskamp, M. J. M. (2002). Engineering flax and hemp for an alternative to cotton. **Trends Biotech**, 20 (6): 229-230.
- Eckardt, N. A. (2002). Probing the mysteries of lignin biosynthesis: The crystal structure of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase provides new insights. **Plant Cell**, 14 (6): 1185-1189.
- Ecker, J. R. and Davis, R. W. (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. **Proc Natl Acad Sci USA**, 84: 5202-5206.

- Edwards, R. and Dixon, R. A. (1991). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-O-methyltransferase from suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Arch Biochem Biophys**, 287 (2): 372-379.
- Effland, M. (1977). Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. **Tappi J.**, 60: 143-144.
- Ehltling, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C. J., Somssich, I. E. and Kombrink, E. (1999). Three 4-coumarate : coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. **Plant J**, 19 (1): 9-20.
- Eichhorn, S. J., Baillie, C. A., Zafeiropoulos, N., Mwaikambo, L. Y., Ansell, M. P., Dufresne, A., Entwistle, K. M., Herrera-Franco, P. J., Escamilla, G. C., Groom, L., Hughes, M., Hill, C., Rials, T. G. and Wild, P. M. (2001). Current international research into cellulosic fibres and composites. **J Mat Sci**, 36: 2107 - 2131.
- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Santiago-Domenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V. and Quesada, M. A. (1999). Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. **Physiol Plant**, 106: 355-362.
- Elfstrand, M., Sitbon, F., Lapierre, C., Bottin, A. and Von Arnold, S. (2002). Altered lignin structure and resistance to pathogens in *spi 2*-expressing tobacco plants. **Planta**, 214: 708-716.
- Elkind, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S. A., Ribak, O., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1990). Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87: 9057-9061.
- El-Shourbagy, M. N., Abdel-Ghaffar, B. A. and El-Naggar, R. A. (1995). effect of IAA and GA₃ on the anatomical characteristics, straw and fiber yield and quality of flax. **J Agro Crop Sci**, 174: 21-26.
- Endt, D. V., Kijne, J. W. and Memelink, J. (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? **Phytochem**, 61 (2): 107-114.
- Engels, F. M. and Jung, H. J. (1998). Alfalfa stem tissues: cell-wall development and lignification. **Ann Bot**, 82: 561-568.
- Epps, H. H., Akin, D. E., Foulk, J. A. and Dodd, R. B. (2001). Color of enzyme-retted flax fibers affected by processing, cleaning, and cottonizing. **Text Res J**, 71 (10): 916-921.
- Epstein, L. and Lamport, D. T. A. (1984). An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin. **Phytochem**, 23: 1241-1246.
- Eriksson, O. and Lindgren, B. O. (1977). About the linkage between lignin and hemicelluloses in wood. **Svensk Papperstid**, 2: 59-63.
- Esau, K. (1942). Vascular differentiation in the vegetative shoot of *Linum* I. The procambium. **Amer J Bot**, 29: 738-747.
- Esau, K. (1943). Vascular differentiation in the vegetative shoot of *Linum*. III. The origin of the bast fibers. **Amer J Bot**, 30: 579-586.
- Esquerré-Tugayé, M. T., Lafitte, C., Mazau, D., Toppan, A. and Touze, A. (1979). Cell surfaces in plant-microorganism interactions II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. **Plant Physiol**, 64: 320-326.
- Evans, J. D., Akin, D. E., Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S. and Foulk, J. A. (2002). Modifying dew-retted flax fibers by means of an air-atomized enzyme treatment. **Text Res J**, 72 (7): 579-585.

F

- Faix, O. (1986). Investigation of lignin polymer models (DHP's) by FTIR spectroscopy. **Holzforschung**, 40: 273 - 280.
- Faix, O. (1991). Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. **Holzforschung**, 45: 21-27.
- Faughey, G. J. and Sharma, H. S. S. (2000). A preliminary evaluation of near infrared spectroscopy for assessing physical and chemical characteristics of flax fibre. **J Near Infrared Spectrosc**, 8 (1): 61-69.
- Fengel, D. and Wegener, G. (1984). **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin, New York, Walter de Gruyter, 613 pp.
- Fergus, B. J. and Goring, D. A. I. (1970). The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. **Holzforschung**, 24: 113-117.
- Feuillet, C., Lauvergeat, V., Deswarte, C., Pilate, G., Boudet, A. and Grima-Pettenati, J. (1995). Tissue and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. **Plant Mol Biol**, 27: 651-667.
- Fincher, G. B., Stone, B. A. and Clarke, A. E. (1983). Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 34: 47-70.
- Focher, B. (1992). Physical characteristics of flax fibre. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 11-32.
- Focher, B., Marzetti, A. and Sharma, H. S. S. (1992). Changes in the structure and properties of flax fibre during processing. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 329-342.
- Focher, B., Palma, M. T., Canetti, M., Torri, G., Cosentino, C. and Gastaldi, G. (2001). Structural differences between non-wood plant celluloses: evidence from solid-state NMR, vibrational spectroscopy, and X-ray diffractometry. **Ind Crops Products**, 13: 193-208.
- Foster, T. J., Ablett, S., Mccann, M. C. and Gidley, M. J. (1996). Mobility-resolved C-13-NMR spectroscopy of primary plant cell walls. **Biopolymers**, 39 (1): 51-66.
- Foulk, J. A., Akin, D. E. and Dodd, R. B. (2001). Processing techniques for improving enzyme-retting of flax. **Ind Crops Products**, 13 (3): 239-248.
- Franke, R., McMichael, C., Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C. and Chapple, C. (2000a). Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. **The Plant Journal**, 22 (3): 223-234.
- Franke, R., McMichael, C. M., Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C. and Chapple, C. (2000b). Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. **Plant J**, 22 (3): 223-234.
- Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C. and Chapple, C. (2002). The *Arabidopsis REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. **Plant J**, 30: 33-45.
- Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. and Neto, C. P. (2002). Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. **Holzforschung**, 56 (2): 143-149.
- Freudenberg, K. (1939). Über lignin. **Angew Chem**, 52: 362-363.
- Freudenberg, K. and Lautsch, W. (1939). Zur konstitution des fichtenlignins. **Naturwissenschaften**, 27: 227-228.
- Freudenberg, K., Lautsch, W. and Engler, K. (1940). Die bildung von vanillin aus fichtenlignin. **Berichte der deutschen chemischen gesellschaft**, 73 (3): 167-173.
- Freudenberg, K., Harkin, J. M., Rechert, M. and Fukuzumi, T. (1958). Die an der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des subaoinalkohols. **Chem Ber**, 91: 581-590.

- Freudenberg, K. (1959). Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature**, *183*: 1152-1155.
- Freudenberg, K. and Harkin, J. M. (1963). The glucosides of cambial sap of spruce. **Phytochem**, *2*: 189-193.
- Freudenberg, K., Maercker, G. and Nimz, H. (1964). Die polymerisation des coniferylalkohols durch Säure. **Chem Ber**, *97*: 903-908.
- Freudenberg, K. (1965). Lignin: its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols. **Science**, *148*: 595-600.
- Freudenberg, K. and Neish, A. C. (1968). Constitution and biosynthesis of lignin. In Freudenberg K. and Neish A. C. (eds), *Berlin, Heidelberg, New York*, pp: 78-122.
- Frick, S., Ounarooon, A. and Kutchan, T. M. (2001). Combinatorial biochemistry in plants: the case of *O*-methyltransferases. **Phytochem**, *56 (1)*: 1-4.
- Fry, S. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Rev Plant Physiol**, *46*: 497 - 520.
- Fry, S. C. (1982). Phenolic components of the primary cell wall: feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. **Biochem J**, *203*: 493-504.
- Fry, S. C. (1988). **The growing plant cell wall : Chemical and metabolic analysis**. Harlow, Essex, Longman Scientific and Technical, 333 pp.
- Fujita, M. and Harada, H. (1991). Ultrastructure and formation of wood cell wall. In: **Wood and cellulosic chemistry**, Hon D. N. S. and Shiraiishi N. (eds), *New York, Basel*, pp: 3-57.
- Fukushima, K. and Terashima, N. (1990). Heterogeneity in formation of lignin. XIII. Formation of *p*-hydroxyphenyl lignin in various hardwoods visualized by microautoradiography. **J Wood Chem Technol**, *10*: 413-433.
- Fukushima, K. and Terashima, N. (1991). Heterogeneity in formation of lignin. XIV. Formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Ginkgo biloba*. **Holzforschung**, *45*: 87-94.
- Fukushima, K., Taguchi, S., Matsui, N. and Yasuda, S. (1996). Heterogeneous distribution of monolignol glucosides in the stems of *Magnolia kobus*. **Mokuzai Gakkaishi**, *42 (10)*: 1029-1031.
- Fukushima, K. (2001). Regulation of syringyl to guaiacyl ratio in lignin biosynthesis. **J Plant Res**, *114 (1116)*: 499-508.
- Fukushima, R. S. and Hatfield, R. D. (2001). Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **J Agr Food Chem**, *49 (7)*: 3133-3139.

G

- Gamble, G. R., Snook, M. E., Henriksson, G. and Akin, D. E. (2000). Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. **Biotechnol Lett**, *22 (9)*: 741-746.
- Gang, D. R., Costa, M. A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A. T., Wang, H. B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L. B. and Lewis, N. G. (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. **Chem Biol**, *6 (3)*: 143-151.
- Gavnholt, B. and Larsen, K. (2002). Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. **Physiol Plant**, *116 (3)*: 273-280.
- Geiger, H. and Fuggerer, H. (1979). Über den Chemismus der Wiesner-Reaktion auf Lignin. **Naturforschung**, *34B*: 1471-1472.
- Gibeaut, D. and Carpita, N. (1994). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB J.**, *8*: 904-915.
- Gindl, W. (2002). Comparing mechanical properties of normal and compression wood in norway spruce: the role of lignin in compression parallel to the grain. **Holzforschung**, *56*: 395-401.

- 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. **Int J Biol Macromol**, 21 (1-2): 179-188.
- 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.
- Glasser, W. G. (1980). Lignin. In: **Pulp and paper: chemistry and chemical technology**, Casey J. P. (eds), pp: 44-51.
- Goffner, D., Joffroy, I., Grima-Pettenati, J., Halpin, C., Knight, M. E., Schuch, W. and Boudet, A. M. (1992). Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. **Planta**, 188: 48-53.
- Goffner, D., Campbell, M. 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.
- Goffner, D., Van Doorselaere, J., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A. M. (1998). A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. **Plant Mol Biol**, 36 (5): 755-765.
- Gomez, J., Sanchez-Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech, P. and Pages, M. (1988). A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. **Nature**, 334: 262-264.
- Goodman, A. M., Ennos, A. R. and Booth, I. (2002). A mechanical study of retting in glyphosate treated flax stems (*Linum usitatissimum*). **Ind Crops Products**, 15 (2): 169-177.
- 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.
- Gordon, A. H., Lomax, J. A., Dalgarno, K. and Chesson, A. (1985). Preparation and composition of mesophyll, epidermis and fibre cell walls from leaves of Perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **J Sci Food Agric**, 36: 509-519.
- 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 (3): 721-729.
- Gorshkova, T. A., Salnikov, V. V., Pogodina, N. M., Chemikosova, S. B., Yablokova, E. V., Ulanov, A. V., Ageeva, M. V., VanDam, J. E. G. and Lozovaya, V. V. (2000). Composition and distribution of cell wall phenolic compounds in flax (*Linum usitatissimum* L.) stem tissues. **Ann Bot**, 85 (4): 477-486.
- Goubet, F. (1995). Structural features of galactans from flax fibres. **Carbohydr Polym**, 27: 221-227.
- Goujon, T., Ferret, V., Mila, I., Pollet, B., Ruel, K., Burlat, V., Joseleau, J. P., Barriere, Y., Lapierre, C. and Jouanin, L. (2003a). Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. **Planta**, 217 (2): 218-228.
- Goujon, T., Sibout, R., Pollet, B., Maba, B., Nussaume, L., Bechtold, N., Lu, F. C., Ralph, J., Mila, I., Barriere, Y., Lapierre, C. and Jouanin, L. (2003b). A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of *O*-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. **Plant Mol Biol**, 51 (6): 973-989.
- Gowri, G., Bugos, R. C., Campbell, W. H., Maxwell, C. A. and Dixon, R. A. (1991). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) X. Molecular cloning and expression of S-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. **Plant Physiol**, 97: 7-14.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D., Ralph, J., Zon, J. and Amrhein, N. (1995). Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. **Phytochem**, 40 (4): 1077-1082.

- Grabber, J. H., Panciera, M. T. and Hatfield, R. D. (2002). Chemical composition and enzymatic degradability of xylem and nonxylem walls isolated from alfalfa internodes. **J Agric Food Chem**, *50* (9): 2595-2600.
- Grand, C., Boudet, A. and Boudet, A. M. (1983). Isoenzymes of hydroxycinnamate:CoA ligase from poplar stems: properties and tissue distribution. **Planta**, *158*: 225-229.
- Grand, C. (1984). Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P450-dependant enzyme from higher plant micosomes involved in lignin synthesis. **Fed Eur Biochem Soc Lett**, *169*: 7-11.
- Grand, C., Parmentier, P., Boudet, A. and Boudet, A. M. (1985). Comparison of lignins and of enzymes involved in lignification in normal and brown-midrib (*bm3*) mutant corn seedlings. **Physiol Végét**, *23*: 905-911.
- Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G. and Boudet, A. M. (1993). Molecular cloning and expressin of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Plant Mol Biol**, *21*: 1085-1095.
- Grimmig, B. and Matern, U. (1997). Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive cis-acting element. **Plant Mol Biol**, *33* (2): 323-341.
- Grisebach, H. (1981). Lignins. In: **The biochemistry of plants**, Conn E. E. (eds), *New York*, pp: 457-478.
- 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.
- Gross, G. G. and Kreiten, W. (1975). Reduction of coenzyme A thioesters of cinnamic acids with an enzyme preparation from lignifying tissues of *Forthysia*. **FEBS Lett**, *54*: 259-262.
- Gross, G. G. (1981). In: **Biochemistry of plants : a comparative treatise. Secondary plant products**, Conn E. E. (eds), *London, New York*, pp.
- Grünwald, C., Ruel, K., Kim, Y. S. and Schmitt, U. (2002). On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. **Plant Biol**, *4*: 13-21.
- Guan, S., Mlynar, J. and Sarkanen, S. (1997). Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol on macromolecular lignin templates. **Phytochem**, *45* (5): 911-918.
- Guo, D. J., Chen, F., Inoue, K., Blount, J. W. and Dixon, R. A. (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. **Plant Cell**, *13* (1): 73-88.
- Guo, D. J., Chen, F. and Dixon, R. A. (2002). Monolignol biosynthesis in microsomal preparations from lignifying stems of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Phytochem**, *61* (6): 657-667.
- Gürbüz, B. (1999). Determination of cross-pollination in flax (*Linum usitatissimum*) using different experimental designs. **J Agr Sci**, *133*: 31-35.

H

- Ha, M. A., Apperley, D. C. and Jarvis, M. C. (1997). Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. **Plant Physiol**, *115* (2): 593-598.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoïd metabolism. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, *40*: 347-369.
- Halpin, C., Knight, M. E., Grima-Pettenati, J., Goffner, D., Boudet, A. and Schuch, W. (1992). Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco stems. **Plant Physiol**, *98*: 12-16.
- Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A. M., Tollier, M. T. and Schuch, W. (1994). Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Plant J**, *6* (3): 339-350.
- Harborne, J. B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In: **Methods in plant biochemistry**, Harborne J. B. (eds), *San Diego*, pp: 1-28.

- Harris, P. J. and Hartley, R. D. (1976). Detection of bound ferulic acid in cell wall of Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. **Nature**, 259: 508-510.
- Hartley, B. S. (1970). Strategy and tactics in protein chemistry. **Biochem J**, 119: 805-822.
- Hartley, R. D. and Keene, A. S. (1984). Aromatic aldehyde constituents of graminaceous cell walls. **Phytochem**, 23 (6): 1305 - 1307.
- Hartley, R. D. and Ford, C. W. (1989). Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. In: **Plant cell wall polymers**, (eds), Washington D.C., pp: 137 - 145.
- Hassan, F. U. and Leitch, M. H. (2000). Influence of seeding density on contents and uptake of N, P and K in linseed (*Linum usitatissimum* L.). **J Agron Crop Sci**, 185 (3): 193-199.
- Hatfield, R. D., Grabber, J., Ralph, J. and Brei, K. (1999). Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes. **J Agric Food Chem**, 47 (2): 628-632.
- Hawkins, S. and Boudet, A. M. (1994). Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* hook. **Plant Physiol**, 104: 75-84.
- Hawkins, S. and Boudet, A. (1996). Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunnii* Hook): Histochemistry of early changes in young plants. **Protoplasma**, 191 (1-2): 96-104.
- Hawkins, S., Samaj, J., Lauvergeat, V., Boudet, A. and Grima-Pettenati, J. (1997). Cinnamyl alcohol dehydrogenase: identification of new sites of promoter activity in transgenic poplar. **Plant Physiol**, 113 (2): 321-325.
- Hawkins, S., Boudet, A. and Grima-Pettenati, J. (2003). Characterisation of caffeic acid *O*-methyltransferase and cinnamyl alcohol dehydrogenase gene expression patterns by in situ hybridisation in *Eucalyptus gunnii* Hook. plantlets. **Plant Sci**, 164 (2): 165-173.
- Hayat, M. A. (1981). Permanganates. In: **Fixation for electron microscopy**, Hayat M. A. (eds), New York, pp: 183-193.
- He, L. F. and Terashima, N. (1989). Formation and structure of lignin in monocotyledons. II. Deposition and distribution of phenolic acids and their association with cell wall polymers in rice plants (*Oriza sativa*). **Mokuzai Gakkaishi**, 35: 123-129.
- He, L. F. and Terashima, N. (1991). Formation and structure of lignin in monocotyledons: IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. **Holzforschung**, 45: 191-198.
- Hearle, J. W. S. (1963). The fine structure of fibers and crystalline polymers. III. Interpretation of the mechanical properties of fibers. **J Appl Polym Sci**, 7: 1207-1223.
- Heath, R., Huxley, H., Stone, B. and Spangenberg, G. (1998). cDNA cloning and differential expression of three caffeic acid *O*-methyltransferase homologues from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **J Plant Physiol**, 153: 649-657.
- Heath, R., McInnes, R., Lidgett, A., Huxley, H., Lynch, D., Jones, E., Mahoney, N. and Spangenberg, G. (2002). Isolation and characterisation of three 4-coumarate: CoA-ligase homologue cDNAs from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **J Plant Physiol**, 159 (7): 773-779.
- Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A. and Droge Laser, W. (2002). The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. **Molecular Genetics and Genomics**, 267 (1): 16-26.
- Helm, F. R. (2000). **Lignin-Polysaccharide interactions in woody plants**. American Chemical Society, Washington, DC, Oxford University Press, 161-171 pp.

- Henriksson, G., Akin, D. E., Hanlin, R. T., Rodriguez, C., Archibald, D. D., Rigsby, L. L. and Eriksson, K. E. L. (1997). Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the united states and europe. **Appl Environ Microbiol**, 63 (10): 3950 - 3956.
- Henriksson, G. and Eriksson, K. (1998). Chemical / physical retting of flax using detergent and oxalic acid at high pH. **Text Res J**, 68 (12): 942 - 947.
- Hepler, P. K., Fosket, D. E. and Newcomb, E. H. (1970). Lignification during secondary wall formation in *Coleus*: an electron microscope study. **Amer J Bot**, 57 (1): 85-96.
- Hermann, C., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987). Enzymatic synthesis of lignin: purification to homogeneity of the three *O*-methyltransferases of tobacco and production of specific antibodies. **Arch Biochem Biophys**, 241: 453-460.
- Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell**, 7 (7): 907-919.
- Hertzberg, M. and Olsson, O. (1998). Molecular characterisation of a novel plant homeobox gene expressed in the maturing xylem zone of *Populus tremula* X *tremuloides*. **Plant J**, 16 (3): 285-295.
- Hervé du Penhoat, C., Gey, C., Pellerin, P. and Peres, S. (1999). An NMR solution study of the megaoligosaccharide, rhamnogalacturonan II. **J Biomol NMR**, 14: 253-271.
- Heude, M. (1961). Relations entre la composition chimique des constituants non-cellulosiques des filasses de lin et la filabilité de ce textile. Thèse d'Etat, Faculté des Sciences de l'Université de Lille, 63 pages.
- Higuchi, T., Ito, Y. and Kawamura, I. (1967). *p*-hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine-ammonia lyase in its formation. **Phytochem**, 6: 875-881.
- Higuchi, T. (1981). Biosynthesis of lignin. In: **Plant Carbohydrates. II. Extracellular carbohydrates**, Tanner W. and Loewus F. A. (eds), Berlin, pp: 194-224.
- Higuchi, T. (1985). Biosynthesis of Lignin. In: **Biosynthesis and biodegradation of wood components**, Higuchi T. (eds), Orlando, pp: 141-160.
- Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Sci Technol**, 24: 23-63.
- Higuchi, T., Ito, T., Umezawa, T. and Shibata, D. (1994). Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisens CAD gene: wine-red lignin from coniferyl aldehyde. **J Biotechnol**, 37: 151-158.
- Higuchi, T. (1998). The discoveries of lignin. In: **Discoveries in plant biologie**, Kung D. S. and Yang S. F. (eds), Singapore, pp: 233-269.
- Himmelsbach, D. S. and Akin, D. E. (1998). Near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems. **J Agri Food Chem**, 46 (3): 991-998.
- Himmelsbach, D. S., Khalili, S. and Akin, D. E. (1998). FT-IR microspectroscopic imaging of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems. **Cell Mol Bio**, 44 (1): 99-108.
- His, I., Andème-Onzighi, C., Morvan, C. and Driouich, A. (2001). Microscopic studies on mature flax fibers embedded in LR white: Immunogold localization of cell wall matrix polysaccharicles. **J Histochem Cytochem**, 49 (12): 1525-1535.
- Hoffmann, L., Maury, S., Bergdoll, M., Thion, L., Erard, M. and Legrand, M. (2001). Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase by site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, 276 (39): 36831-36838.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P. and Legrand, M. (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. **J Biol Chem**, 278 (1): 95-103.
- Hoffmann, P. and Parameswaran, N. (1976). On the ultrastructural localization of hemicelluloses within delignified tracheids of spruce. **Holzforschung**, 30: 62-72.

- Hofstee, B. H. (1952). On the evaluation of the constants V_m and K_M in enzyme reactions. **Science**, *116* (3013): 329-331.
- Holgate, C. S., Jackson, P., Cowen, P. N. and Bird, C. C. (1983). Immunogold-silver staining. New method immunostaining with enhanced sensitivity. **J Histochem Cytochem**, *31*: 938-994.
- Holton, T. A. and Cornish, E. C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell**, *7* (7): 1071-1083.
- Hong, J. C., Nagao, R. T. and Key, J. L. (1987). Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein isolated from soybean. **J Biol Chem**, *262*: 8367-8376.
- Hong, J. C., Nagao, R. T. and Key, J. L. (1989). Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. **Plant Cell**, *1*: 937-943.
- Hornsby, P. R., Hinrichsen, E. and Tarverdi, K. (1997). Preparation and properties of polypropylene composites reinforced with wheat and flax straw fibres .Part II Analysis of composite microstructure and mechanical properties. **J Mat Sci**, *32* (4): 1009-1015.
- Houtman, C. J. and Atalla, R. H. (1995). Cellulose-lignin interactions. **Plant Physiol**, *107*: 977 - 984.
- Hu, W. J., Kawaoka, A., Tsai, C. J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H. and Chiang, V. L. (1998). Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, *95* (9): 5407-5412.
- Hu, W. J., Harding, S. A., Lung, J., Popko, J. L., Ralph, J., Stokke, D. D., Tsai, C. J. and Chiang, V. L. (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nat Biotechnol**, *17* (8): 808-812.
- Hulleman, S. H. D., Van Hazendonk, J. M. and Van Dam, J. E. G. (1994). Determination of crystallinity in native cellulose from higher plants with diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. **Carbohydr Res**, *261*: 163-172.
- I**
- 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.
- Ibrahim, R. K. (1977). Glucosylation of lignin precursors by uridine phosphate glucose: coniferyl alcohol glucosyltransferase in higher plants. **Z Pflanzenphysiol**, *85*: 253-262.
- Ibrahim, R. K. and Barron, D. (1989). Phenylpropanoids. In: **Methods in plant biochemistry**, Harborne J. B. (eds), *San Diego*, pp: 75-111.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A. and Bantignies, B. (1998). Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. **Plant Mol Biol**, *36*: 1-10.
- Iiyama, K. and Pant, R. (1988). The mechanism of the Maüle color reaction. Introduction of methylated syringyl nuclei into softwood lignin. **Wood Sci Technol**, *22*: 167-175.
- Iiyama, K. and Wallis, A. F. A. (1988). An improved acetyl bromide procedure to determining lignin in woods and wood pulps. **Wood Sci Technol**, *22*: 271-280.
- Iiyama, K. and Wallis, A. F. A. (1989). Effect of acetyl bromide treatment on the ultraviolet spectra of lignin compounds. **Holzforschung**, *43* (5): 309-316.
- Iiyama, K. and Lam, T. B. T. (1990). Lignin in wheat internodes. Part I: The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation. **J Sci Food Agric**, *51*: 481-491.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. and Stone, B. A. (1990). Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. **Phytochem**, *29* (3): 733-737.
- Iiyama, K. and Wallis, A. F. A. (1990). Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. **J Sci Food Agr**, *51*: 145-161.

- Iiyama, K., Bach-Tuyet Lam, T. and Stone, B. (1994). Covalent cross-links in the cell walls. **Plant Physiol**, *104*: 315 - 320.
- Inoue, K., Sewalt, V. J., Murray, G. B., Ni, W., Sturzer, C. and Dixon, R. A. (1998). Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. **Plant Physiol**, *117* (3): 761-770.
- Inoue, K., Parvathi, K. and Dixon, R. A. (2000). Substrate preferences of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferases in developing stems of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Arch Biochem Biophys**, *375* (1): 175-182.
- Ishii, T. (1994). Feruloyl oligosaccharides from cell walls of suspension-cultured spinach cells and sugar beet pulp. **Plant Cell Physiol**, *35*: 701-704.
- Ishii, T. (1997a). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Sci**, *127* (2): 111-127.
- Ishii, T. (1997b). *O*-Acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. **Plant Physiol**, *113*: 1265 - 1272.
- Islam, A. and Sarkanen, K. (1993). The isolation and characterization of lignins of jute (*Corchorus capsularis*). **Holzforschung**, *47*: 123 - 132.
- J**
- Jacobs, A., Palm, M., Zacchi, G. and Dahlman, O. (2003). Isolation and characterization of water-soluble hemicelluloses from flax shive. **Carbohydr Res**, *338*: 1869-1876.
- Jacquemart, J. and Fourcroy, M. (1961). Origine histologique des premières fibres de la tige de lin. **C R Acad Sci Paris**, *252*: 2753-2755.
- Jacquet, G., Pollet, B. and Lapiere, C. (1995). New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. **J Agric Food Chem**, *43* (10): 2746-2751.
- Jacquet, G., Matthews, S., Deprez, S., Pollet, B., Mila, I., Lapiere, C. and Scalbert, A. (1997a). Thiolysis and thioacidolysis: recent progress in the characterisation of phenolic polymers. **Analisis**, *25* (8): M26-M29.
- Jacquet, G., Pollet, B., Lapiere, C., Francesch, C., Rolando, C. and Faix, O. (1997b). Thioacidolysis of enzymatic dehydrogenation polymers from *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl precursors. **Holzforschung** *51*: 4: 349-354.
- Jaeck, E., Dumas, B., Geoffroy, P., Favet, N., Inze, D., Van Montagu, M., Fritig, B. and Legrand, M. (1992). Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of *O*-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Mol Plant Microbe Interact**, *5* (4): 294-300.
- Jähn, A., Schröder, M. W., Fütting, M., Schenzel, K. and Diepenbrock, W. (2002). Characterization of alkali treated flax fibres by means of FT Raman spectroscopy and environmental scanning electron microscopy. **Spectrochim Acta Pt A-Mol and Bio**, *58* (10): 2271-2279.
- 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.
- Jarvis, M. C. (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell wall. **Plant Cell Envir**, *7*: 153-164.
- Jarvis, M. C. and McCann, M. C. (2000). Macromolecular biophysics of the plant cell wall: Concepts and methodology. **Plant Physiol Biochem**, *38*: 1-13.
- Jauneau, A., Morvan, C., Lefebvre, F., Demarty, M., Ripoll, C. and Thellier, M. (1992). Differential extractability of calcium and pectic substances in different wall regions of epicotyl cells in young flax plants. **J Histochem Cytochem**, *40* (8): 1183-1189.
- Javor, T. A., Buchberger, W. and Faix, O. (2003). Capillary electrophoretic determination of lignin degradation products obtained by permanganate oxidation. **Anal Chim Acta**, *484* (2): 181-187.

- Johnson, D. B., Moore, W. E. and Zank, L. C. (1961). The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **Tappi J**, 44 (11): 793-798.
- 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.
- Jorriin, J., Lopez-Valbuena, R. and Tena, M. (1988). Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. **BBA**, 964: 73-82.
- Jorriin, J. and Dixon, R. A. (1990). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) II. Purification, characterization, and induction of phenylalanine ammonia-lyase isoforms from elicitor-treated cell suspension cultures. **Plant Physiol**, 92: 447-455.
- Joseleau, J. P. (1980). Les hémicelluloses. In: **Les polymères végétaux**, Monties B. (eds), Paris, pp: 87-121.
- Joseleau, J. P. and Ruel, K. (1997). Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. An investigation by Fourier transform infrared cross-polarization-magic angle spinning ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and immunocytochemical transmission electron microscopy. **Plant Physiol**, 114 (3): 1123-1133.
- Joshi, C. P. (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. **Nucl Acids Res**, 15: 6643-6653.
- Joshi, C. P. and Chiang, V. L. (1998). Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. **Plant Mol Biol**, 37 (4): 663-674.
- Jouanin, L., Goujon, T., deNadai, V., Martin, M. T., Mila, I., Vallet, C., Pollet, B., Yoshinaga, A., Chabbert, B., PetitConil, M. and Lapierre, C. (2000). Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. **Plant Physiol**, 123 (4): 1363-1373.
- Jung, H., Valdez, F., Hatfield, R. and Blanchette, R. (1992). Cell wall composition and degradability of forage stems following chemical and biological delignification. **J Sci Food Agric**, 58: 347-355.
- Jung, H. (1997). Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants.
- Jung, H., Mertens, D. and Payne, A. (1997). Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. **J Dairy Sci**, 80 (8): 1622-1628.

K

- Kajita, S., Katayama, Y. and Omori, S. (1996). Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase. **Plant Cell Physiol**, 37 (7): 957-965.
- Kajita, S., Hishiyama, S., Tomimura, Y., Katayama, Y. and Omori, S. (1997). Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate:coenzyme A ligase is depressed. **Plant Physiol**, 114: 871-879.
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D. and Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls. III: A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiol**, 51: 188-196.
- Keijzer, P. and Metz, P. (1992). Breeding of flax fibre production in western europe. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 33-66.
- Keller, A., Leupin, M., Mediavilla, V. and Wintermantel, E. (2001). Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres. **Ind Crops Products**, 13 (1): 35-48.
- Keller, B. (1993). Structural cell wall proteins. **Plant Physiol**, 101: 1127 - 1130.
- Kernaghan, K. (1992). Physical properties of linen and their influence on finishing. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 475-500.

- Kerr, A. I. and Goring, D. A. I. (1975). The ultrastructural arrangement of wood cell wall. **Cell Chem Technol**, 9: 563-573.
- Kersey, R., Inoue, K., Schubert, K. R. and Dixon, R. A. (1999). Immunolocalization of two lignin *O*-methyltransferases in stems of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Protoplasma**, 209 (1-2): 46-57.
- Khalili, S., Akin, D. E., Pettersson, B. and Henriksson, G. (2002). Fibernodes in flax and other bast fibers. **J Appl Bot -Angew Bot**, 76 (5-6): 133-138.
- Kim, H., Ralph, J., Lu, F. C., Ralph, S. A., Boudet, A. M., MacKay, J. J., Sederoff, R. R., Ito, T., Kawai, S., Ohashi, H. and Higuchi, T. (2003). NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxycinnamaldehydes and hydroxybenzaldehydes into lignins. **Org Biomol Chem**, 1 (2): 268-281.
- Kim, M. K., Jeon, J. H., Fujita, M., Davin, L. B. and Lewis, N. G. (2002a). The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8 ' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. **Plant Mol Biol**, 49 (2): 199-214.
- Kim, W. (2002). Transformation génétique du lin (*Linum usitatissimum*) : modulation de l'expression d'un gène *CCoAOMT*. Mémoire de DEA, 53 pages.
- Kim, Y. S., Wi, S. G., Grunwald, C. and Schmitt, U. (2002b). Immuno electron microscopic localization of peroxidases in the differentiating xylem of *Populus* spp. **Holzforschung**, 56 (4): 355-359.
- Klason, P. (1908). Bericht über die hauptversammlung des vereins der zellstoff- und papierchemiker. 52.
- Kneusel, R. E., Matern, U. and Nicolay, K. (1989). Formation of trans-caffeoyl-CoA by Zn²⁺-dependant enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. **Arch Biochem Biophys**, 269: 455-462.
- Knight, M. E., Halpin, C. and Schuch, W. (1992). Identification and characterization of cDNA clones encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco. **Plant Mol Biol**, 19: 793-801.
- Knobloch, K. H. and Hahlbrock, K. (1975). Isoenzymes of *p*-coumarate CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. **Eur J Biochem**, 52: 311-320.
- Kobayashi, M., Nakagawa, H., Asaka, T. and Matoh, T. (1999). Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. **Plant Physiol**, 119 (1): 199-203.
- Kojima, K. and Takeuchi, M. (1989). Detection and characterization of *p*-coumaric acid hydroxylase in mung bean, *Vigna mungo*, seedlings. **J Biochem**, 105: 265-270.
- Koopmann, E., Logemann, E. and Hahlbrock, K. (1999). Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. **Plant Physiol**, 119 (1): 49-55.
- Korth, K. L., Blount, J. W., Chen, F., Rasmussen, S., Lamb, C. and Dixon, R. A. (2001). Changes in phenylpropanoid metabolites associated with homology-dependent silencing of phenylalanine ammonia-lyase and its somatic reversion in tobacco. **Physiol Plant**, 111 (2): 137-143.
- Kotelnikova, N. E., Panarin, E. F., Serimaa, R., Paakkari, T., Sukhanova, T. E. and Griбанov, A. V. (2000). Study of flax fibre structure by Waxes, IR and ¹³C NMR spectroscopy, and SEM. In: **Cellulosic pulps, fibres and materials**, Kennedy J., Phillips G. O. and Williams P. A. (eds), Cambridge, pp: 169 - 179.
- Kuga, S. and Brown, R. M. (1991). Physical structure of celluloses microfibrils: Implications for biogenesis. In: **Biosynthesis and biodegradation of cellulose**, Haigler C. H. and Weimer P. J. (eds), New York, pp: 125-142.
- Kühnl, T., Koch, U., Heller, W. and Wellmann, E. (1989). Elicitor induced S-adenosyl-L-methionine: caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. **Plant Sci**, 60: 21-25.
- Kumar, A. and Ellis, B. E. (2001). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. **Plant Physiol**, 127 (1): 230-239.

- Kumar, A. and Ellis, B. E. (2003). 4-Coumarate : CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. **Plant Mol Biol**, 51 (3): 327-340.
- Kundu, B. (1942). The anatomy of two indian fibre plants, *Cannabis* and *Corchorus* with special reference to fibre distribution and development. **J Indian Bot Soc**, 21: 93 - 128.
- Kutscha, N. P. and Gray, J. R. (1972). The suitability of certain stains for studying lignification in balsam fir, *Abies balsamea* (L) Mill. **Life Sci Agric Expt Station, Technical bulletin**, 53: 5-50.
- Kutsushi, H., Shimada, M. and Higuchi, T. (1982). Distribution and roles of *p*-hydroxycinnamate: CoA ligase in lignin biosynthesis. **Phytochem**, 21: 267-271.

L

- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, A. M. and Grima-Pettenati, J. (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. **Plant J**, 11 (3): 429-441.
- Lacoux, J. (2002). Etude de la régulation et du rôle du gène *Lupme3* codant pour une pectine méthylestérase de lin (*Linum usitatissimum*) par transgénèse. Thèse de Doctorat, Université Picardie Jules Verne, 151 pages.
- Lacoux, J., Klein, D., Domon, J. M., Burel, C., Lamblin, F., Alexandre, F., Sihachakr, D., Roger, D., Balange, A. P., David, A., Morvan, C. and Laine, E. (2003). Antisense transgenesis of *Linum usitatissimum* with a pectin methylesterase cDNA. **Plant Physiol Biochem**, 41 (3): 241-249.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- LaFayette, P. R., Eriksson, K. E. and Dean, J. F. (1999). Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). **Plant Mol Biol**, 40 (1): 23-35.
- Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M. and Rothstein, S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissues-specific expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, 84: 7542-7546.
- Lagrimini, L. M., Gingas, V., Finger, F., Rothstein, S. and Liu, T. T. Y. (1997). Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. **Plant Physiol**, 114 (4): 1187-1196.
- Lai, Y. Z. and Sarkanen, K. V. (1971). Isolation and structural studies. In: **Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions**, Sarkanen K. V. and Ludwig C. H. (eds), *New York*, pp: 165-240.
- Lam, T. B. T., Iiyama, K. and Stone, B. A. (1990). Lignin in wheat internodes. Part 2: Alkaline nitrobenzene oxidation by wheat straw lignin and its fractions. **J Sci Food Agric**, 51: 493-506.
- Lam, T. B. T., Hori, K. and Iiyama, K. (2003). Structural characteristics of cell walls of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and fixation of carbon dioxide. **J Wood Sci**, 49: 255-261.
- 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.
- 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. and 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 (2): 223-232.
- Lampport, D. T. (1986). The primary cell wall: a new model. In: **Cellulose, Structure, Modification and Hydrolysis**, Young A. and Rowell M. (eds), *New York*, pp.

- Lamy, B. and Pomel, C. (2002). Influence of fiber defects on the stiffness properties of flax fibers-epoxy composite materials. **J Mat Sci Lett**, 21 (15): 1211-1213.
- Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, R. (1986). Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. **Holzforschung**, 40: 113-119.
- Lapierre, C., Tollier, M. T. and Monties, B. (1988). Mise en évidence d'un nouveau type d'unité constitutive dans les lignines d'un mutant de maïs bm3. **C R Acad Sci Paris**, 307: 723-728.
- Lapierre, C. (1993). Application of new methods for the investigation of lignin structure. *In: Forage cell wall structure and digestibility*, Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D. and Ralph J. (eds), Madison, pp: 133-166.
- Lapierre, C., Pollet, B. and Rolando, C. (1995). New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. **Res Chem Intermediates**, 21 (3-5): 397-412.
- Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leple, J. C., Boerjan, W., Ferret, V. V., De Nadai, V. and Jouanin, L. (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid *O*-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. **Plant Physiol**, 119 (1): 153-164.
- Larsson, S. and Miksche, G. E. (1971). Gas-chromatographische analyse von ligninoxydationprodukten. V. Zwei trimere Abbauprodukte aus fichtenlignin. **Acta Chem Scand**, 25: 673-679.
- Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D. and Grima-Pettenati, J. (2001). Two cinnamyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. **Phytochem**, 57: 1187-1195.
- Lauvergeat, V., Rech, P., Jauneau, A., Guez, C., Coutos Thevenot, P. and Grima Pettenati, J. (2002). The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. **Plant Mol Biol**, 50 (3): 497-509.
- Lawton, M. A., Dixon, R. A., Hahlbrock, K. and Lamb, C. (1983). Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. **Eur J Biochem**, 129 (3): 593-601.
- Le Goff, A., Renard, C. M. G. C., Bonnin, E. and Thibault, J. F. (2000). Extraction, purification and chemical characterization of xylogalacturonans from pea hulls. **Carbohydr Polym**, 45 (325-334).
- Leary, G. J., Newman, R. H. and Morgan, K. R. (1986). A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chemical processes involved in the isolation of Klason lignin. **Holzforschung**, 40 (5): 267-277.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C. and Douglas, C. J. (1997). Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition. **Plant Cell**, 9 (11): 1985-1998.
- Leitch, M. H. and Kurt, O. (1999). Effects of plant growth regulators on stem extension and yield components of linseed (*Linum usitatissimum*). **J Agri Sci**, 132: 189-199.
- Lempereur, I., Rouau, X. and Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* l.) grain and its milling fractions. **J Cereal Sci**, 25: 1 - 8.
- Lenholm, H., Larsson, T. and Iversen, T. (1994). Determination of cellulose I alpha and I beta in lignocellulosic materials. **Carbohydr Res**, 261: 119-131.
- Leopold, B. (1950). Aromatic keto- and hydroxy-polyethers as lignin models. **Acta Chem Scand**, 4: 1523-1537.

- 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.
- Lewin, M. (1958). The middle lamella of the bast fibers. **Tappi J**, *41 (8)*: 403 - 415.
- Lewis, N. G. and Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annu Rev Plant Physiol**, *41*: 455-496.
- Lewis, N. G., Davin, L. B. and Sarkanen, S. (1999). The nature and function of lignin. In: **Comprehensive natural products chemistry**, Barton D., Nakanishi K., Meth-Cohn O. and Pinto B. M. (eds), *Simon Fraser University, Canada*, pp: 617 - 745.
- Li, L., Popko, J. L., Zhang, X. H., Osakabe, K., Tsai, C. J., Joshi, C. P. and Chiang, V. L. (1997). A novel multifunctional *O*-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, *94 (10)*: 5461-5466.
- Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T. and Chiang, V. L. (2000). 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. **J Biol Chem**, *275 (9)*: 6537-6545.
- Li, L., Cheng, X. F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S. A. and Chiang, V. L. (2001). The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. **Plant Cell**, *13 (7)*: 1567-1586.
- Li, L., Zhou, Y. H., Cheng, X. F., Sun, J. Y., Marita, J. M., Ralph, J. and Chiang, V. L. (2003). Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, *100 (8)*: 4939-4944.
- Li, L. G., Osakabe, Y., Joshi, C. P. and Chiang, V. L. (1999). Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. **Plant Mol Biol**, *40 (4)*: 555-565.
- Lindeberg, G. and Lange, P. (1948). Studies on the middle lamella of the flax fibre. **Acta Polytech Chem**, *1 (5)*: 1 - 41.
- Lindermayr, C., Mollers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H. and Ebel, J. (2002). Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate : coenzyme A ligase gene family - Primary structures, catalytic properties, and differential expression. **Eur J Biochem**, *269 (4)*: 1304-1315.
- Lisson, S. N. and Mendham, N. J. (2000). Agronomic studies of flax (*Linum usitatissimum* L.) in south-eastern Australia. **Aust J Exp Agr**, *40 (8)*: 1101-1112.
- Lourd, J. (1964). **Le lin et l'industrie linière**. Paris, Presses universitaires de France, 85 pages pp.
- Love, G. D., Snape, C. E., Jarvis, M. C. and Morrison, I. M. (1994). Determination of phenolic structures in flax fibre by solid-state ¹³C NMR. **Phytochem**, *35 (2)*: 489 - 491.
- Lozovaya, V. V., Gorshkova, T. A., Yablokova, E. V., Rumyantseva, N. I., Valieva, A., Ulanov, A. and Widholm, J. M. (1999). Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (Buckwheat, soybean and flax). **Phytochem**, *50 (3)*: 395-400.
- Lozoya, E., Hoffmann, H., Douglas, C., Schulz, C., Scheel, D. and Hahlbrock, K. (1988). Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. **Eur J Biochem**, *176*: 661-667.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Lilley, T. H. and Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. **Phytochem**, *37 (2)*: 357-371.
- Lüderitz, T. and Grisebach, H. (1981). Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol: NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **Eur J Biochem**, *123*: 583-586.

- Lundquist, K. (1976). Low-molecular weight lignin hydrolysis products. **Appl Polym Symp**, 28: 1393-1407.
- Lütcke, H., Chow, K., Mickel, F., Moss, K., Kern, H. and Scheele, G. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. **EMBO J**, 6: 43-48.
- M**
- MacKay, J., Presnell, T., Jameel, H., Taneda, H., O'Malley, D. and Sederoff, R. (1999). Modified lignin and delignification with a CAD-deficient loblolly pine. **Holzforschung**, 53 (4): 403-410.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91: 7802-7806.
- Mansell, R. L., Gross, G. G., Stöckigt, J., Franke, H. and Zenk, M. H. (1974). Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis. **Phytochem**, 13: 2427-2435.
- Marita, J. M., Ralph, J., Hatfield, R. D. and Chapple, C. (1999). NMR characterization of lignins in Arabidopsis altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 96 (22): 12328-12332.
- Marita, J. M., Ralph, J., Lapierre, C., Jouanin, L. and Boerjan, W. (2001). NMR characterization of lignins from transgenic poplars with suppressed caffeic acid *O*-methyltransferase activity. **J Chem Soc, Perkin Trans, 1**: 2939-2945.
- Marita, J. M., Ralph, J., Hatfield, R. D., Guo, D. J., Chen, F. and Dixon, R. A. (2003). Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase. **Phytochem**, 62 (1): 53-65.
- Martz, F., Maury, S., Pinçon, G. and Legrand, M. (1998). cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. **Plant Mol Biol**, 36 (3): 427-437.
- Matsui, N., Fukushima, K., Kamada, H., Nishikawa, Y., Yasuda, S. and Terashima, N. (1994). On the behavior of monolignol glucosides in lignin biosynthesis. I. Synthesis of monolignol glucosides labeled with ²H at the hydroxymethyl group of side chain, and polymerization of the labeled monolignols in vitro. **Holzforschung**, 48: 215-221.
- Matsui, N., Chen, F., Yasuda, S. and Fukushima, K. (2000). Conversion of guaiacyl to syringyl moieties on the cinnamyl alcohol pathway during the biosynthesis of lignin in angiosperms. **Planta**, 210 (5): 831-835.
- Matsumoto, Y., Ishizu, A. and Nakano, J. (1986). Studies on chemical structure of lignin by ozonation. **Holzforschung**, 40: suppl 81-85.
- Mau, S. L., Chen, C. G., Pu, Z. Y., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Bacic, A. and Clarke, A. E. (1995). Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan-proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotiana glauca*. **Plant J**, 8 (2): 269-281.
- Mäule, C. (1901). Das Verhalten verholzter Membranen gegen Kaliumpermanganat, ein Holzreaktionen neuer Art. **Beitr Wiss Botanik**, 4: 166-185.
- Maury, S., Geoffroy, P. and Legrand, M. (1999). Tobacco *O*-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-*O*-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-*O*-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. **Plant Physiol**, 121 (1): 215-223.
- McDougall, G. J. (1991). Cell-wall-associated peroxidases and lignification during growth of flax fibres. **J Plant Physiol**, 139: 182-186.

- McDougall, G. J. (1992a). Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. **Phytochemistry**, 31 (10): 3385 - 3389.
- McDougall, G. J. (1992b). Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. **Phytochem**, 31 (10): 3385-3389.
- 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.
- McNeil, M., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1980). The structure of plant cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol**, 66: 1128-1134.
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C. and Albersheim, P. (1984). Structure and functions of the primary cell walls of plants. **Annu Rev Biochem**, 53: 625-663.
- McQueen-Mason, S. J. (1995). Expansins and cell wall expansion. **J Exp Bot**, 46 (292): 1639-1650.
- 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.
- Meier, D. and Faix, O. (1992). Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. In: **Methods in lignin chemistry**, Lin S. Y. and Dence C. W. (eds), Berlin, Heidelberg, pp: 177-199.
- Meijer, W. J. M., Vertregt, N., Rutgers, B. and Vandewaart, M. (1995). The pectin content as a measure of the retting and rettability of flax. **Ind Crops Products**, 4 (4): 273-284.
- 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.
- Meng, H. and Campbell, W. H. (1998). Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid *O*-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development. **Plant Mol Biol**, 38 (4): 513-520.
- Meshitsuka, G. and Nakano, J. (1978). Studies on the mechanism of lignin color reaction (XII): Maïle color reaction (8). **Mokuzai Gakkaishi**, 24: 563-568.
- Meshitsuka, G. and Nakano, J. (1979). Studies on the mechanism of lignin color reaction (XIII): Maïle color reaction (9). **Mokuzai Gakkaishi**, 25 (9): 588-594.
- Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C., Bell-Lelong, D. A. and Chapple, C. (1998). Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 95 (12): 6619-6623.
- Meyermans, H., Morreel, K., Lapiere, C., Pollet, B., DeBruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Devreese, B., VanBeeumen, J., Marita, J. M., Ralph, J., Chen, C. Y., Burggraefe, B., VanMontagu, M., Messens, E. and Boerjan, W. (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. **J Biol Chem**, 275 (47): 36899-36909.
- 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.
- Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: **Comprehensive natural products chemistry**, Barton D., Nakanishi K. and Meth-Cohn O. (eds), Amsterdam, pp: 497-527.
- Mollenhauer, H. (1959). Permanganate fixation of plant cells. **J Biophys Biochem Cytol**, 6: 431.
- Monties, B. (1980). Les lignines. In: **Les Polymères Végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés**, Monties B. (eds), Paris, pp: 122-155.
- Monties, B. (1984a). Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. **Agronomie**, 4 (4): 387-392.

- Monties, B. (1984b). Recent advances on lignin inhomogeneity. The Biochemistry of plant phenolics, *Gent*.
- Monties, B. (1985). Recent advances on lignin inhomogeneity. The Biochemistry of plant phenolics, *Gent*.
- Monties, B. (1989a). Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation to possible self-organization of lignin networks. **Ann Sci For**, 46 suppl.: 848s-855s.
- Monties, B. (1989b). Lignins. *In: Methods in plant biochemistry*, Dey P. M. and Harborne J. B. (eds), *New York*, pp: 113 - 157.
- Monties, B. (1991). Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. **Anim Feed Sci Tech**, 32: 159-175.
- Monties, B. and Fukushima, K. (2001). Occurrence, function and biosynthesis of lignins. *In: Biopolymers*, Steinbuohel A. (eds), *Weinheim*, pp: 1-64.
- 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.
- Moore, A. and Staehelin, L. A. (1988). Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L. : implication for secretory pathways. **Planta**, 174: 433-445.
- Morel, G. and Wetmore, R. H. (1951). Fern callus tissue culture. **Am J Bot**, 38: 141-143.
- Morrison III, W. H. and Akin, D. E. (2001). Chemical components comprising bast tissue in flax. **J Agric Food Chem**, 49: 2333 - 2338.
- Morrison, I. M. (1972). A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **J Sci Food Agric**, 23: 455-463.
- Morrison, I. M. (1976). New laboratory methods for predicting the nutritive value of forage crops. **World Review of Animal Production**, XII (3): 75-82.
- Morrison, W. H., Akin, D. E., Archibald, D. D., Dodd, R. B. and Raymer, P. L. (1999). Chemical and instrumental characterization of maturing kenaf core and bast. **Ind Crops Products**, 10 (1): 21-34.
- Morrison, W. H. and Akin, D. E. (2001). Chemical composition of components comprising bast tissue in flax. **J Agr Food Chem**, 49 (5): 2333-2338.
- Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S., Akin, D. E. and Evans, J. D. (2003). Chemical and spectroscopic analysis of lignin in isolated flax fibers. **J Agri Food Chem**, 51 (9): 2565-2568.
- 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, 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.
- Moustacas, A. M., Nari, J., Borel, M., Noat, G. and Ricard, J. (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension: The role of metals ions in plant cell wall extension. **Biochem J**, 279 (121-129).
- Mukherjee, A. C., Mukhopadhyay, A. K. and Mukhopadhyay, U. (1986). Surface characteristics of jute fibers at different stages of growth. **Text Res J**, 86: 562-566.
- Müller, M., Cyihak, C., Vogl, G., Fratzl, P., Schober, H. and Riekkel, C. (1998). Direct observation of microfibril arrangement in a single native cellulose fiber by microbeam small-angle X-ray scattering. **Macromolecules**, 31: 3953-3957.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 51 (1): 263-273.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, 15: 473-497.
- Musel, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V. and Schopfer, P. (1997). Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. **Planta**, 201 (2): 146-159.
- Musha, Y. and Goring, D. A. I. (1974). Klason and acid soluble lignin content of hardwoods. **Wood Sci**, 7: 133-134.
- Musha, Y. and Goring, D. A. I. (1985). Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. **Wood Sci Technol**, 9: 45-58.
- Mustata (1994). Superficial delignification of flax fibers separated from undecayed stems. **Cell Chem Technol**, 28: 65-69.

N

- Nakamura, Y., Fushiki, H. and Higuchi, M. (1974). Metabolic differences between gymnosperms and angiosperms in the formation of syringyl lignin. **Phytochem**, 13: 1777-1784.
- Nakano, J., Ishizu, A. and Migita, N. (1958). Ester groups in various woods. **J Japan Wood Res Soc**, 4 (1): 1-4.
- Neish, A. C. (1968). Monomeric intermediates in the biosynthesis of lignin. In: **Constitution and biochemistry of lignin**, Freudenberg K. and Neish A. C. (eds), *New York*, pp: 1 - 43.
- Neto, C. P., Seca, A., Fradinho, D., Coimbra, M. A., Domingues, F., Evtuguin, D., Silvestre, A. and Cavaleiro, J. A. S. (1996). Chemical composition and structural features of the macromolecular components of *Hibiscus cannabinus* grown in Portugal. **Ind Crops Products**, 5 (3): 189-196.
- Nettelstroth, K. M. (1968). Zur morphologie der leinenfaser. **Melliand Textilberichte**, 49: 565-572.
- Newins, J. R. (1983). The pathway of eucaryotic mRNA formation. **Annu Rev Biochem**, 52: 441-466.
- Newman, G. R., Jasani, B. and Williams, E. D. (1983). A simple post-embedding system for rapid demonstration of tissue antigens under electron microscope. **Histochem J**, 15: 543-555.
- Ni, W. T., Sewalt, V. J. H., Korth, K. L., Blount, J. W., Ballance, G. M. and Dixon, R. A. (1996). Stress responses in alfalfa .XXI. Activation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase genes does not contribute to changes in metabolite accumulation in elicitor-treated cell-suspension cultures. **Plant Physiol**, 112 (2): 717-726.
- Nimz, H. (1974). Beech lignin: proposal of a constitutional scheme. **Angew Chem Int Ed**, 13 (5): 313-321.
- Nishimura, N., Izumi, A. and K, K. (2002). Structural characterization of kenaf lignin: differences among kenaf varieties. **Ind Crops Products**, 15: 115-122.
- Norman, A. G. and Jenkins, S. H. (1934a). The determination of lignin. II. Errors introduced by the presence of proteins. **Biochem J**, 28: 2160-2168.
- Norman, A. G. and Jenkins, S. H. (1934b). The determination of lignin. I. Errors introduced by the presence of certain carbohydrate. **Biochem J**, 28: 2147-2159.
- Northcote, D. H., Davey, R. and Lay, J. (1989). Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. **Planta**, 178: 353-366.
- Nothnagel, E. A. (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. **Int Rev Cyt**, 174: 195-291.

O

- Obokata, J., Ohme, M. and Hayashida, N. (1991). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a putative glycine-rich protein of 19.7 kDa in *Nicotiana sylvestris*. **Plant Mol Biol**, *19*: 953-955.
- O'Connell, A., Holt, K., Piquemal, J., Grima-Pettenati, J., Boudet, A., Pollet, B., Lapierre, C., Petit-Conil, M., Schulch, W. and Halpin, C. (2002). Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Transgenic Res**, *11*: 495-503.
- O'Farrel, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, *250* (10): 4007-4021.
- O'Farrel, P. Z., Goodman, H. and P.H., O. F. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, *12*: 1133-1142.
- Ohl, L., Hedrick, S. A., Chory, J. and Lamb, C. J. (1990). Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. **Plant Cell**, *2*: 837-848.
- O'Malley, D. M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.-L. and Sederoff, R. R. (1993). The role of laccase in lignification. **Plant J**, *4* (5): 751-757.
- 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.
- O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. **J Biol Chem**, *271*: 22923-22930.
- Onnerud, H., Zhang, L. M., Gellerstedt, G. and Henriksson, G. (2002). Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: A new model in lignin biosynthesis I. **Plant Cell**, *14* (8): 1953-1962.
- Oomah, B. D. (2001). Flaxseed as a functional food source. **J Sci Food Agr**, *81* (9): 889-894.
- Osakabe, K., Tsao, C. C., Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T., Carraway, D. T., Smeltzer, R. H., Joshi, C. P. and Chiang, V. L. (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, *96* (16): 8955-8960.
- Ostergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K. G., Mundy, J., Gajhede, M. and Henriksen, A. (2000). Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. **Plant Mol Biol**, *44* (2): 231-243.

P

- Pakusch, A. and Matern, U. (1991). Kinetic characterization of caffeoyl-coenzyme A-specific-3-O-methyltransferase from elicited parsley cell suspensions. **Plant Physiol**, *96*: 327-330.
- Pakusch, A., Matern, U. and Schiltz, E. (1991). Elicitor-inducible caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from *Petroselinum crispum* cell suspensions. **Plant Physiol**, *95*: 137-143.
- Pakusch, A. E., Kneusel, R. E. and Matern, U. (1989). S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. **Arch Biochem Biophys**, *271* (2): 488-494.
- Palmiter, R. D. (1974). Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes: expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. **Biochemistry**, *13*: 3606-3615.
- Papadopoulos, A. N. and Hague, J. R. B. (2003). The potential for using flax (*Linum usitatissimum* L.) shiv as a lignocellulosic raw material for particleboard. **Ind Crops Products**, *17* (2): 143-147.
- Pappas, C., Tarantilis, P. A. and Polissiou, M. (1998). Determination of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) lignin in crude plant material using diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy. **Appl Spectrosc**, *52* (11): 1399-1402.

- Parameswaran, N. and Liese, W. (1982). Ultrastructural localization of wall components in wood cells. **Holz als Roh- und Werkstoff**, 40: 145-155.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D. J., Blount, J. W. and Dixon, R. A. (2001). Substrate preferences of *O*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-*O*-methylation of monolignols. **Plant J**, 25 (2): 193-202.
- Patel, K., Stein, R., Benvenuti, S. and Zvelebil, M. J. (2002). Combinatorial use of mRNA and two-dimensional electrophoresis expression data to choose relevant features for mass spectrometric identification. **Proteomics**, 2 (10): 1464-1473.
- Pauly, M. and Scheller, H. V. (2000). *O*-acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of rhamnogalacturonan *O*-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. **Planta**, 210: 659-667.
- Pellegrini, L., Geoffroy, P., Fritig, B. and Legrand, M. (1993). Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-*O*-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. **Plant Physiol**, 103 (2): 509-517.
- Petersen, M. and Alfermann, A. W. (2001). The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. **Appl Microbiol Biotechnol**, 55 (2): 135-142.
- Pichon, M., Courbou, I., Beckert, M., Boudet, A. M. and Grima-Pettenati, J. (1998). Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. **Plant Mol Biol**, 38 (4): 671-676.
- Pilat, O. (2002). Lin textile : la Chine dope le marché. In: **Réussir céréales/grandes cultures**, 151, p: 64-66.
- Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M. (2001). Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. **Phytochemistry**, 57 (7): 1167-1176.
- Pinçon, G., Chabannes, M., Lapierre, C., Pollet, B., Ruel, K., Joseleau, J. P., Boudet, A. M. and Legrand, M. (2001a). Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxy ferulic acid-*O*-methyltransferase I and cinnamoyl-coenzyme a reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. **Plant Physiol**, 126 (1): 145-155.
- Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M. (2001b). Repression of *O*-methyl transferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. **Phytochemistry**, 57: 1167-1176.
- Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M. (2001c). Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. **Phytochem**, 57 (7): 1167-1176.
- Piontek, K. (2002). New insights into lignin peroxidase. **0376-4710**, 41 (1): 46-53.
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A. M. (1998). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. **Plant J**, 13 (1): 71-83.
- Piquemal, J., Chamayou, S., Nadaud, I., Beckert, M., Barriere, Y., Mila, I., Lapierre, C., Rigau, J., Puigdomenech, P., Jauneau, A., Digonnet, C., Boudet, A. M., Goffner, D. and Pichon, M. (2002). Down-regulation of caffeic acid *O*-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. **Plant Physiol**, 130 (4): 1675-1685.
- Plomion, C., Bahrman, N., Durel, C. E. and O'Malley, D. (1995). Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. **Heredity**, 74: 661-668.
- Plomion, C., Leprovost, G. and Stokes, A. (2001). Wood formation in trees. **Plant Physiol**, 127 (4): 1513-1523.

- Plonka, F. and Anselme, C. L. (1956). **Les variétés de lin et leurs principales maladies cryptogamiques**. INRA, Versailles, Paris, 190 pages pp.
- Pomar, F., Merino, F. and Barcelo, A. R. (2002). O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. **Protoplasma**, 220 (1-2): 17-28.
- Porath, J., Carlsson, L. A., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, 258: 598-599.
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J. and Rees, D. A. (1982). Conformation and interactions of pectins II. INfluence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. **J Mol Biol**, 155: 517-531.
- Preston, R. D. (1986). Natural cellulose. *In: Cellulose: structure, modification and hydrolysis*, Young R. A. and Rowell R. M. (eds), pp: 3-27.
- Puvanesarajah, V., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1991). Structural characterization of two oligosaccharides fragments formed by the selective cleavage of rhamnogalacturonan II: evidence for the anomeric configuration and attachment sites of apiose and 2-deoxy-2-heptulosaric acid. **Carbohyd Res**, 218: 211-222.

Q

- Qi, X. Y., Behrens, B. X., West, P. R. and Mort, A. J. (1995). Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures - Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. **Plant Physiol**, 108 (4): 1691-1701.

R

- Radotic, K., Simic-Krstic, J., Jeremic, M. and Trifunovic, M. (1994). A study of lignin formation at the molecular level by scanning tunneling microscopy. **Biophys J**, 66: 1763-1767.
- Rahman, M. M. M. (1978). A Study of scanning electron microscopy of the progressive delignification of jute fibres. **Text Res J**, 69: 287-293.
- Rahman, M. M. M. (1979). Morphology of the fibres of jute, flax, and hemp as seen under a scanning electron microscope. **Indian J Agric Sci**, 49: 483-487.
- Ralph, J. and Helm, R. F. (1993). Lignin/hydroxycinnamic acid/polysaccharide complexes: synthetic models for regiochemical characterization. *In: Forage cell wall structure and digestibility*, Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D. and Ralph J. (eds), *Madison*, pp: 201-246.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. and Hatfield, R. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. **J Chem Soc Perkin Trans**, 1: 3485 - 3498.
- Ralph, J., Grabber, J. H. and Hatfield, R. D. (1995). Lignin-ferulate cross-links in grasses: Active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. **Carbohyd Res**, 275 (1): 167-178.
- Ralph, J., MacKay, J. J., Hatfield, R. D., O'Malley, D. M., Whetten, R. W. and Sederoff, R. R. (1997). Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. **Science**, 277 (5323): 235-239.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Grabber, J. H., Jung, H. J. G., Quideau, S. and Helm, J. (1998a). Cell wall cross linking in grasses by ferulates and diferulates. *In: Lignin and lignan biosynthesis*, Lewis N. G. and Sarkanen S. (eds), pp.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapiere, C. and Boudet, A. M. (1998b). NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95 (22): 12803-12808.
- Ralph, J., Peng, J., Lu, F., Hatfield, R. D. and Helm, R. F. (1999). Are lignins optically active? **J Agric Food Chem**, 47: 2991-2996.

- Ralph, J., Lapierre, C., Lu, F. C., Marita, J. M., Pilate, G., VanDoorselaere, J., Boerjan, W. and Jouanin, L. (2001a). NMR evidence for benzodioxane structures resulting from incorporation of 5-hydroxyconiferyl alcohol into lignins of *O*-methyltransferase-deficient poplars. **J Agr Food Chem**, *49* (1): 86-91.
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J. M., Kim, H., Lu, F., Hatfield, R. D., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M. R., Van Doorselaere, J., Sederoff, R. R., O'Malley, D. M., Scott, J. T., MacKay, J. J., Yahiaoui, N., Boudet, A., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L. and Boerjan, W. (2001b). Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. **Phytochem**, *57* (6): 993-1003.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M. and Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. **Eur J Biochem**, *259* (1-2): 485-495.
- Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A. M. and Goffner, D. (2002). Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiol**, *129* (1): 145-155.
- Regnier, T. and Macheix, J. J. (1994). Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in relation with bound ferulic and *p*-coumaric acids during durum wheat grain development. **Polyphenols**, *69*: 327 - 328.
- Regnier, T. and Macheix, J. J. (1996). Changes in wall-bound phenolics acids, phenylalanine and tyrosine ammonia-lyases, and peroxidases in developing durum wheat grains (*Triticum turgidum* l. var. durum). **J Agri Food Chem**, *44*: 1727 - 1730.
- Reis, D. and Roland, J. C. (1974). Mise en évidence de l'organisation des parois de cellules végétales en croissance par extractions ménagées des polysaccharides associés à la cytochimie ultrastructurale. **J Microsc-Oxford**, *20*: 271-284.
- Reis, D., Vian, B. and Roland, J. C. (1994). Cellulose-glucuronoxylans and plant cell wall structure. **Micron**, *25* (2): 171-187.
- Reiterer, A., Lichtenegger, H., Tschegg, S. and Fratzl, P. (1999). Experimental evidence for a mechanical function of the cellulose microfibril angle in wood cell walls. **Phil Mag A**, *79*: 2173-2184.
- Rennebaum, H., Grimm, E., Warnstorff, K. and Diepenbrock, W. (2002). Fibre quality of linseed (*Linum usitatissimum* L.) and the assessment of genotypes for use of fibres as a by-product. **Ind Crops Products**, *16* (3): 201-215.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A. and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochem**, *57*: 929-967.
- Rihouey, C. and Mesnage, P. (2001). Production de fibre de lin à haute valeur ajoutée. 32 pages.
- Ro, D. K., Mah, N., Ellis, B. E. and Douglas, C. J. (2001). Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiol**, *126* (1): 317-329.
- Roelofsen, P. A. (1951). Contradictory data on spiral structures in the secondary cell wall of fibers of flax, hemp, ramie. **Text Res J**, *21*: 412-418.
- Roger, D., Lacoux, J., Lamblin, F., Gaillet, D., Dauchel, H., Klein, D., Balange, A. P., David, A. and Laine, E. (2001). Isolation of a flax pectin methylesterase promoter and its expression in transgenic tobacco. **Plant Sci**, *160* (4): 713-721.
- Rognes, H., Gellerstedt, G. and Henriksson, G. (2000). Optimization of flax fiber separation by leaching. **Cell Chem Technol**, *34*: 331 - 340.
- Roland, D. and Mosiniak, M. (1996). Biogénèse et recyclage de la cellulose, première biomasse renouvelable du globe. **La vie des sciences, Académie des Sciences**, *13* (3): 193-202.
- 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.
- Rolando, C., Monties, B. and Lapierre, C. (1992). Thioacidolysis. In: **Methods in lignin chemistry**, Lin S. Y. and Dence C. W. (eds), Berlin, Heidelberg, pp: 334-349.
- Ros Barcelo, A. (1997). Lignification in plant cell walls. **Intl Rev Cyt**, 176: 87-132.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N. and Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. **Plant Physiol**, 113 (1): 175-179.
- Ross, T. (1992). Preparation and spinning of flax fibre. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 275-296.
- Rouilly, A. and Rigal, L. (2002). Agro-materials: A bibliographic review. **J Macromol Sci Polym Rev**, C42 (4): 441-479.
- Rubery, P. H. and Fosket, D. E. (1969). Changes in phenylalanine ammonia lyase activity during xylem differentiation in *Coleus* and soybean. **Planta**, 87: 54-62.
- Ruel, K., Barnoud, F. and Goring, D. A. I. (1978). Lamellation in the S2 layer of softwood tracheids as demonstrated by scanning transmission electron microscopy. **Wood Sci Technol**, 12: 287-291.
- Ruel, K., Faix, O. and Joseleau, J. (1994). New immunogold probes for studying the distribution of the different lignin types during plant cell wall biogenesis. **J Trace Microprobe Tech**, 12 (4): 247-265.
- Ruel, K., Burlat, V. and Joseleau, J. P. (1999). Relationship between ultrastructural topochemistry of lignin and wood properties. **Iawa Journal**, 20 (2): 203-211.
- Ruel, K., Montiel, M. D., Goujon, T., Jouanin, L., Burlat, V. and Joseleau, J. P. (2002). Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. **Plant Biol**, 4 (1): 2-8.
- Ruelland, E., Campalans, A., Selman-Housein, G., Puigdomenech, P. and Rigau, J. (2003). Cellular and subcellular localization of the lignin biosynthetic enzymes caffeic acid-*O*-methyltransferase, cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-coenzyme A reductase in two monocots, sugarcane and maize. **Physiol Plant**, 117 (1): 93-99.
- Runge, F. E. (1834). Über einige produkte der steinkohlendestillation. **J Prakt Chem**, 1: 24-32.

S

- Saake, B., Argyropoulos, D. S., Beinhoff, O. and Faix, O. (1996). A comparison of lignin polymer models (DHPs) and lignins by P-31 NMR spectroscopy. **Phytochem**, 43 (2): 499-507.
- Sablowski, R. W., Maoyano, E., Culianez-Macia, F. A., Schuch, W., Martin, C. and M., B. (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthesis genes. **EMBO J**, 3: 128-137.
- Saka, S. and Thomas, R. J. (1982). A study of lignification in loblolly pine tracheids by the SEM-EDXA technique. **Wood Sci Techno**, 16: 167-179.
- Saka, S. and Goring, D. A. I. (1983). The distribution of inorganic constituents in black spruce wood as determined by TEM-EDXA. **Mokuzai Gakkaishi**, 29 (10): 648-656.
- Saka, S. and Goring, D. A. I. (1985). Localization of lignins in wood cell walls. In: **Biosynthesis and biodegradation of wood components**, Higuchi T. (eds), Orlando, pp: 51-62.
- Saka, S. and Goring, D. A. I. (1988). The distribution of lignin in white birch wood as determined by bromination with TEM-EDXA. **Holzforschung**, 42: 149-153.
- Saka, S., Hosoya, S., St-Germain, F. G. T. and Goring, D. A. I. (1988). A comparison of the bromination of syringyl and gaiacyl-type lignins. **Holzforschung**, 42 (2): 79-83.

- Sakakibara, A. (1983). Chemical structure of lignin related mainly to degradation products. *In: Recent advances in lignin biodegradation research*, Higuchi T., Chang H. M. and Kirk T. K. (eds), Tokyo, pp: 12-33.
- Sakakibara, A. (1991). Chemistry of lignin. *In: Wood and cellulosic chemistry*, Hon D. N. S. and Shiraishi N. (eds), New York, Basel, pp: 113-175.
- Salmen, L. and Olsson, A. (1998). Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: Structure-property relationships. *Journal Pulp Pap Sci*, 24 (3): 99-103.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Cold Spring Harbor, pp.
- Sankari, H. S. (2000). Comparison of bast fibre yield and mechanical fibre properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars. *Ind Crops Products*, 11: 73-84.
- Sarkanen, K. V. (1971). Precursors and their polymerization. *In: Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*, Sarkanen K. V. and Ludwig C. H. (eds), New York, pp: 95-163.
- Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971a). Definition and nomenclature. *In: Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*, Sarkanen K. V. and Ludwig C. H. (eds), New York, pp: 1-18.
- Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971b). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York, Wiley Interscience, 916 pp.
- Sarni, F., Grand, C. and Boudet, A. M. (1984). Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*). *Eur J Biochem*, 139: 259-265.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J. Y., Guittet, E. and Rolando, C. (1985). Ether linkages between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochem*, 24: 1359-1362.
- Schmitt, D., Pakusch, A. E. and Matern, U. (1991). Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *J Biol Chem*, 266 (26): 17416-17423.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P. and Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem*, 276 (39): 36566-36574.
- Schoch-Bodmer, H. and Huber, P. (1951). Das spitzenwachstum der bast fasern bei *Linum usitatissimum* und *Linum perenne*. *Ber Schweiz Bot Ges*, 61: 371-404.
- 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.
- Schuler, M. A. (1996). Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci*, 15: 235-284.
- Schultz, P. and Templeton Curry, M. (1986). Proposed mechanism for nitrobenzene oxidation of lignin. *Holzforschung*, 40: 93-97.
- Seca, A. M. L., Cavaleiro, J. A. S., Domingues, F. M. J., Silvestre, A. J. D., Evtuguin, D. and Neto, C. P. (1998). Structural characterization of the bark and core lignins from kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *J Agric Food Chem*, 46 (8): 3100-3108.
- Sewalt, V. J. H., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Acharya, S. and Baron, V. S. (1997a). Lignin impact on fiber degradation .IV. Enzymatic saccharification and in vitro digestibility of alfalfa and grasses following selective solvent delignification. *Bioresource Technol*, 61 (3): 199-206.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. J. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997b). Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol*, 115: 41-50.

- Sharma, H. S. S. (1986a). Effect of glyphosate treatment on lignification of fibres of some flax cultivars. **Ann Appl Biol**, 108 (7): 114 - 115.
- Sharma, H. S. S. (1986b). The role of bacteria in retting desiccated flax during damp weather. **Appl Microbiol Biotechnol**, 24: 463-467.
- Sharma, H. S. S., Lefevre, J. and Boucaud, J. (1992). Role of microbial enzymes during retting and their effect on fibre characteristics. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 199-212.
- Sharma, H. S. S. and Faughey, G. (1999). Comparison of subjective and objective methods to assess flax straw cultivars and fibre quality after dew-retting. **Ann Appl Biol**, 135 (2): 495-501.
- Sharma, H. S. S., Faughey, G. and Lyons, G. (1999a). Comparison of physical, chemical, and thermal characteristics of water-, dew-, and enzyme-retted flax fibers. **J Appl Polym Sci**, 74: 139-143.
- Sharma, H. S. S., McCall, R. D., Faughey, G. and Lyons, G. (1999b). Effects of sulphur dioxide preservation of flax straw on fibre components and microbial colonisation during dew-retting. **Ann Appl Biol**, 134 (2): 215-223.
- Shimada, M., Fushiki, H. and Higuchi, M. (1973). Mechanism of biochemical formation of the methoxyl groups in softwood and hardwood lignins. **Mokuzai Gakkashi**, 19 (1): 13-21.
- 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.
- Sibout, R., Baucher, M., Gatineau, M., Van Doorselaere, J., Mila, I., Pollet, B., Maba, B., Pilate, G., Lapiere, C., Boerjan, W. and Jouanin, L. (2002). Expression of a poplar cDNA encoding a ferulate-5-hydroxylase/coniferaldehyde 5-hydroxylase increases S lignin deposition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol Biochem**, 40 (12): 1087-1096.
- Sicilia, T., Niemeyer, H. B., Honig, D. M. and Metzler, M. (2003). Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. **J Agric Food Chem**, 51 (5): 1181-1188.
- Siegel, S. (1957). Non-enzymatic macromolecules as matrices in biological synthesis: the role of polysaccharides in peroxidase catalysed lignin polymer from eugenol. **J Am Chem Soc**, 79: 1628-1632.
- Silva, J. C. E., Nielsen, B. H., Rodrigues, J., Pereira, H. and Wellendorf, H. (1999). Rapid determination of the lignin content in sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) wood by Fourier transform infrared spectrometry. **Holzforschung**, 53 (6): 597-602.
- Skinner, M. M., Puvathingal, J. M., Walter, R. L. and Friedman, A. M. (2000). Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair. **Structure Fold Des**, 8 (11): 1189-1201.
- Smeder, B. and Liljedahl, S. (1996). Market oriented identification of important properties in developing flax fibres for technical uses. **Ind Crops Products**, 5: 149 - 162.
- Smith, B. G. and Harris, P. J. (2001). Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. **Phytochem**, 56: 513 - 519.
- Smith, C. G., Rodgers, M. W., Zimmerlin, A., Ferdinando, D. and Bolwell, G. P. (1994). Tissues and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta**, 192: 155-164.
- Soton, M. and Sata, A. (1986). Le lin et le coton : leur similitude et leurs différences. Le lin, sa transformation, sa structure, Lyon.
- Soton, M. (1989). Le lin et ses applications textiles. Textiles a usages techniques - Apres TechTextil 89, Lyon.
- Sotton, M. and Monroq, R. (1977). Evolution de la structure et des propriétés des fibres de lin en mèches au cours des traitements de dégommeage et d'ennoblissement. 21-43.

- Sotton, M. and Sata, A. (1986). Le lin et le coton : leur similitude et leurs différences. Le lin, sa transformation, sa structure, Lyon.
- Sotton, M. (1989). Le lin et ses applications textiles. Textiles à usages techniques - TechTextil 89, Lyon.
- Sotton, M. and Ferrari, M. (1989). Le lin ultre-affiné par le traitement hydrolyse flash. In: **L'industrie textile**, 1197, p: 58-60.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, (98): 503-517.
- Staiger, D., Kaulen, H. and Schell, J. (1989). A CACGTG motif of the *Antirrhinum majus* chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionarily conserved nuclear protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 86: 6930-6934.
- Stamboulis, A., Baillie, C. A. and Peijs, T. (2001). Effect of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. **Compos Part A-Appl Sci Manuf**, 32: 1105-1115.
- Sterjiades, R., Dean, J. F. D. and Ericksson, K. E. L. (1992). Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. **Plant Physiol**, 99: 1162-1168.
- 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 Lundberg, 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.
- Stevenson, T. T., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1988). 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. **Carbohydr Res**, 179: 269-288.
- Stewart, D., McDougall, G. J. and Baty, A. (1995). Fourier-transform infrared microspectroscopy of anatomically different cells of flax (*Linum usitatissimum*) stems during development. **J Agr Food Chem**, 43: 1853-1858.
- Stewart, D., Yahiaoui, N., McDougall, G. J., Myton, K., Marque, C., Boudet, A. M. and 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.
- Stone, J. E., Blundell, M. J. and Tanner, K. G. (1951). The formation of lignin in plants. **Can J Chem**, 29: 734-745.
- Strack, D. and Mock, H. P. (1993). Hydroxycinnamic acids and lignins. In: **Enzymes of secondary metabolisms - Methods in plant biochemistry**, Lea P. J. (eds), London, pp: 45-97.
- Sultana, C. (1992a). Growing and harvesting of flax. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 83-109.
- Sultana, C. (1992b). Scutching of retted-flax straw. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), Belfast, pp: 261-274.
- Sun, R., Lawther, J. M. and Banks, W. B. (1995). The effect of alkaline nitrobenzene oxidation conditions on the yield and components of phenolic monomers in wheat straw lignin and compared to cupric (II) oxidation. **Ind Crops Products**, 4: 241-254.
- Sun, R. C., Fang, J. M. and Rowlands, P. (1998). Physico-chemical and thermal characterization of alkali-soluble lignins from wheat straw. **Polymer Journal**, 30 (4): 289-294.
- Sun, R. C., Fang, J. M., Goodwin, A., Lawther, J. M. and Bolton, A. J. (1999). Fractionation and characterization of ball-milled and enzyme lignins from abaca fibre. **J Sci Food Agric**, 79 (8): 1091-1098.

T

- Takatsuji, H. (1996). A single amino acid determines the specificity for the target sequence of two zinc-finger proteins in plants. **Biochem Biophys Res Commun**, 224: 219-223.
- Takeuchi, M., Takabe, K. and Fujita, M. (2001). Immunolocalization of *O*-methyltransferase and peroxidase in differentiating xylem of poplar. **Holzforschung**, 55 (2): 146-150.
- TalasOgras, T., Kazan, K. and Gozukirmizi, N. (2001). Decreased peroxidase activity in transgenic tobacco and its effect on lignification. **Biotechnol Lett**, 23 (4): 267-273.
- Talmadge, K. W., Keegstra, K., Bauer, W. D. and Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls. I: The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol**, 51: 158-173.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., MacKay, S., Culiandezmacia, F., Roberts, K. and Martin, C. (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. **Plant Cell**, 10 (2): 135-154.
- Tammes, T. (1907). **Der flachsstengel. Eine statistisch-anatomische monographie**. Wetenschappen, Haarlem, Hollandsche Maatsch, 285 pp.
- Tanahashi, M., Aoki, T. and Higuchi, T. (1981). Dehydrogenative polymerisation of monolignols by peroxidase and hydrogen peroxide in a dialysis tube. III. Formation of lignin-carbohydrate complexes. **Mokuzai Gakkaishi**, 27: 116-124.
- Tanaka, A. and Kojima, M. (1991). Purification and characterization of *p*-coumaroyl-D-glucose hydroxylase of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. **Arch Biochem Biophys**, 284: 151-157.
- Taylor, I. E. P., Wallace, J. C., McKay, A. L. and Volke, F. (1990). Use of the chemical fractionation and proton nuclear magnetic resonance to probe the physical structure of the primary plant cell wall. **Plant Physiol**, 94: 174-178.
- Terashima, N., Fukushima, K. and Takabe, K. (1986a). Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. **Holzforschung**, 40 (suppl): 101-105.
- Terashima, N., Fukushima, K. and Tsuchiya, S. (1986b). Heterogeneity in formation of lignin. VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. **J Wood Chem Technol**, 6: 495-504.
- Terashima, N. (1989). An improved radiotracer method for studying formation and structure of lignin. In: **Plant cell wall polymers :biogenesis et biodegradation**, N.G. L. and Paice M. G. (eds), Washington D.C., pp: 148 - 159.
- Terashima, N. and Fukushima, K. (1989). Biogenesis and structure of macromolecular lignin in the cell wall of tree xylem as studies by microautoradiography. In: **Plant cell wall polymers :biogenesis et biodegradation.**, N.G. L. and Paice M. G. (eds), Washington D.C., pp: 160 - 168.
- Terashima, N. (1990). A new mechanism for formation of a structurally ordered protolignin macromolecule in the cell wall of tree xylem. **J Pulp Pap Sci**, 16: 150-155.
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L.-F. and Takabe, K. (1993). Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: **Forage cell wall structure and digestibility**, Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D. and Ralph J. (eds), Madison, pp: 247-270.
- Terashima, N., Nakashima, J. and Takabe, K. (1998). Proposed structure for protolignin in plant cell walls. In: **Lignin and lignan biosynthesis**, Lewis N. G. and Sarkanen S. (eds), Washington, D.C., pp: 180-193.
- Teutsch, H. G., Hasenfratz, M. P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J. M., Jeltsch, J. M., Durst, F. and Werck-Reichhart, D. (1993). Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 4102-4106.

- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, 408 (6814): 796-815.
- Thibault, J. F. (1980). Les substances pectiques. In: **Les Polymères Végétaux**, Monties B. (eds), Paris, pp: 232-251.
- Thibault, J. F., Renard, C. M. G. C., Alexos, M. A. V., Roger, P. and Crepeau, M. J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic region in pectins by acid hydrolysis. **Carbohydr Res**, 238: 271-286.
- Thielemans, W., Can, E., Morye, S. S. and Wool, R. P. (2002). Novel applications of lignin in composite materials. **J Appl Polym Sci**, 83: 323-331.
- Thiellement, H., Zivy, M. and Plomion, C. (2002). Combining proteomic and genetic studies in plants. **J Chromatogr B**, 782 (1-2): 137-149.
- Thiery, J. P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. **J Microscopie**, 6: 987-1018.
- Tiré, C., De Rycke, R., De Loose, M., Inzé, D., Van Montagu, M. and Engler, G. (1994). Extensin gene expression is induced by mechanical stimuli leading to local cell wall strengthening in *Nicotiana glumbaginifolia*. **Planta**, 195: 175-181.
- Tiver, N. S. (1942). Studies of the flax plant. 1. Physiology of growth, stem anatomy and fibre development in fibre flax. **Aust J Exp Biol Med Sci**, 19: 149-160.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H. and Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, 288 (1-2): 129-138.
- Tolivia, D. and Tolivia, J. (1987). Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. **J Microsc-Oxford**, 148: 113-117.
- Tollier, M., Monties, B. and Lapiere, C. (1986). Inhomogeneity of angiosperm lignin: comparison of the monomeric composition of lignin fractions isolated from different wood species. **Holzforschung**, 40: 75 - 79.
- Trenck, T. and Sandermann, H. (1981). Incorporation of benzo[α]pyrene quinones into lignin. **FEBS Lett**, 125: 72-76.
- Tsai, C. J., Popko, J. L., Mielke, M. R., Hu, W. J., Podila, G. K. and Chiang, V. L. (1998). Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. **Plant Physiol**, 117 (1): 101-112.

U

- Uhlmann, A. and Ebel, J. (1993). Molecular cloning and expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance of soybean (*Glycine max*) against pathogen infection. **Plant Physiol**, 102: 1147-1156.
- 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.
- Ullman, A., Jacob, F. and Monod, J. (1967). Characterisation by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. **J Mol Biol**, 24: 339-343.

V

- Vallet, C., Chabbert, B., Czaninski, Y. and Monties, B. (1996). Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. **Ann Bot**, 78 (5): 625-632.
- Vallet, C., Lemaire, G., Monties, B. and Chabbert, B. (1998). Cell wall fractionation of alfalfa stem in relation to internode development: biochemistry aspect. **J Agr Food Chem**, 46: 3458-3467.
- Van de Velde, K. and Baetens, E. (2001). Thermal and mechanical properties of flax fibres as potential composite reinforcement. **Macromol Mater Eng**, 286 (6): 342 - 349.

- Van de Velde, K. and Kiekens, P. (2002). Thermal degradation of flax: The determination of kinetic parameters with thermogravimetric analysis. **J App Polym Sci**, 83 (12): 2634-2643.
- Van de Weyenberg, I., Ivens, J., De Coster, A., Kino, B., Baetens, E. and Verpoest, I. (2003). Influence of processing and chemical treatment of flax fibres on their composites. **Compos Sci Technol**, 63: 1241-1246.
- Van Der Werf, H. M. G., Van Der Veen, J. E. H., Bouma, A. T. M. and Ten Cate, M. (1994). Quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) stems as a raw material for paper. **Ind Crops Products**, 2: 219 - 227.
- Van Doorselaere, J., Dumas, B., Baucher, M., Fritig, B., Legrand, M., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1991). One-step purification and characterization of a lignin-specific *O*-methyltransferase from poplar. **Gene**, 133: 213-217.
- Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M. T., Petit-Conil, M., Leple, J. C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inzé, D., Boerjan, W. and Jouanin, L. (1995a). A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase activity. **Plant J**, 8 (6): 855-864.
- Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M. T., Petitconil, M., Leple, J. C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Vanmontagu, M., Inze, D., Boerjan, W. and Jouanin, L. (1995b). A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase activity. **Plant J**, 8 (6): 855-864.
- Van Hazendonk, J. M., Reinerink, E. J. M., Dewaard, P. and Vandam, J. E. G. (1996). Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L). **Carbohydr Res**, 291: 141-154.
- Van Langenhove, L. and Briuggeman, J. P. (1992). Methods of fibre analysis. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), *Belfast*, pp: 311-327.
- Van Sumere, C. F. (1989). Phenols and phenolic acids. In: **Methods in plant biochemistry**, Harborne J. B. (eds), *San Diego*, pp: 29-73.
- Van Sumere, C. F. (1992). Retting of flax with special reference to enzyme-retting. In: **The biology and processing of flax**, Sharma H. S. S. (eds), *Belfast*, pp: 157-198.
- Van Zyl, J. D. (1978). Notes on the spectrophotometric determination of lignin in wood samples. **Wood Sci Technol**, 12: 251-259.
- VanderMijnsbrugge, K., Beeckman, H., DeRycke, R., VanMontagu, M., Engler, G. and Boerjan, W. (2000a). Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. **Planta**, 211 (4): 502-509.
- VanderMijnsbrugge, K., Meyermans, H., VanMontagu, M., Bauw, G. and Boerjan, W. (2000b). Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. **Planta**, 210 (4): 589-598.
- Vanhazendonk, J. M., Reinerink, E. J. M., Dewaard, P. and Vandam, J. E. G. (1996). Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L). **Carbohydr Res**, 291: 141-154.
- Varner, J. E. and Lin, L. S. (1989). Plant cell wall architecture. **Cell**, 56: 231-239.
- Vasquez-Cooz, I. and Meyer, R. W. (2002). A differential staining method to identify lignified and unligified tissues. **Biotech Histochem**, 77 (5&6): 277-282.
- Venverloo, C. J. (1969). The lignin of *Populus Nigra* L. CV. 'Italica'. A comparative study of the lignified structures in tissue cultures and the tissues of the tree. **Acta Bota Neerl**, 18 (2): 241 - 314.
- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W. S. and O'Neill, M. A. (2000). Structural characterisation rhamnogalacturonan II: evidence for back-bone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydr Res**, 326: 277-294.

- Vignols, F., Rigau, J., Torres, M. A., Capellades, M. and Puigdomènech, P. (1995). The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid *O*-methyltransferase. **Plant Cell**, 7: 407-416.
- Vignon, M., Dupeyre, D. and Garciajaldon, C. (1995). Steam explosion of woody hemp chènevotte. **Int J Biol Macromol**, 17: 395-404.
- Vogt, T. and Jones, P. (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. **Trends Plant Sci**, 5 (9): 380-386.
- Voragen, A., Schols, H. and Pilnik, W. (1986). Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by HPLC. **Food Hydrocolloid**, 1 (1): 65 - 70.
- W**
- Wacek, A. V. and Kratzl, K. (1947). Modellversuche zum ligninproblem. **Osterreichische Chemie Zeitschrift**, 48: 36-40.
- Wagner, G. J. and Hrazdina, G. (1984). Endoplasmic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *Hippeastrum*. **Plant Physiol**, 74: 901-906.
- Wallace, G. and Fry, S. C. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. **Int Rev Cyt**, 151: 229 - 267.
- Wallis, P. J. and Rhodes, M. C. J. (1977). Multiple forms of hydroxy-cinnamate:CoA ligase in etiolated pea seedlings. **Phytochem**, 16: 1891-1894.
- Walter, M. (1992). Regulation of lignification in defense. In: **Genes involved in plant defense**, Boller T. and Meins F. (eds), *Vienna*, pp: 327-352.
- Wang, H. H., Drummond, J. G., Reath, S. M., Hunt, K. and Watson, P. A. (2001). An improved fibril angle measurement method for wood fibres. **Wood Sci Techno**, 34: 493-503.
- Ward, G., Hadar, Y., Bilkis, I., Konstantinovskiy, L. and Dosoretz, C. G. (2001). Initial step of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. **J Biol Chem**, 276 (22): 18734-18741.
- Wardrop, A. B. and Bland, D. E. (1959). The process of lignification in woody plants. In: **Biochemistry of wood**, Kratzl K. and Billek G. (eds), *New York*, pp: 92-114.
- Wardrop, A. B. (1976). Lignification of plant cell wall. **Appl Polym Symp**, 28: 1041-1063.
- Weisner, J. (1878). Das Verhalten des phloroglucins und einiger verwandter Körper zur verholzten Zellmembran. **Sitzber Akad Wiss Wien Abt I**, 77: 60-66.
- Weisshaar, B. and Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Curr Opin Plant Biol**, 1 (3): 251-257.
- Wengenmayer, H., Ebel, J. and Grisebach, H. (1976). Enzymic synthesis of lignin precursors: purification and properties of cinnamoyl-CoA : NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). **Eur J Biochem**, 65: 529-536.
- Westermarck, U., Hardell, H. and Iversen, T. (1986). The content of protein and pectic in the lignified middle lamella/primary wall from spruce fiber. **Holzforchung**, 40: 65-68.
- Whetten, R. and Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, 7 (7): 1001-1013.
- Whetten, R. W. and Sederoff, R. R. (1992). Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine. Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. **Plant Physiol**, 98: 380-386.
- Whetten, R. W., MacKay, J. J. and Sederoff, R. R. (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 49: 585-609.
- Willats, W. G. T., McCarney, L., Mackie, W. and Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Mol Biol**, 47: 9-27.
- Williamson, R. E., Burn, J. E. and Hocart, C. H. (2001). Cellulose synthesis: mutational analysis and genomic perspectives using *Arabidopsis thaliana*. **Cell Mol Life Sci**, 58 (10): 1475-1490.

- Wilson, R. H., Smith, A. C., Kacurakova, M., Saunders, P. K., Wellner, N. and Waldron, K. W. (2000). The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Plant Physiol**, *124* (1): 397-405.
- WinkelShirley, B. (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. **Physiol Plant**, *107* (1): 142-149.
- Wodzicki, T. J. (2001). Natural factors affecting wood structure. **Wood Sci Technol**, *35* (1-2): 5-26.
- Wu, J., Fukazawa, K. and Ohtani, J. (1992). Distribution of syringyl and guaiacyl lignins in hardwoods in relation to habitat and porosity form in wood. **Holzforschung**, *46*: 181-185.
- Wyrambik, D. and Grisebach, H. (1975). Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. **Eur J Biochem**, *59*: 9-15.

Y

- Yahiaoui, N., Marque, C., Myton, K. E., Negrel, J. and Boudet, A. M. (1998). Impact of different levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants. **Planta**, *204*: 8-15.
- Yamamoto, E., Bokelman, G. H. and Lewis, N. G. (1989). Phenylpropanoid metabolism in cell walls. *In: Plant cell wall polymers : Biogenesis and biodegradation*, Lewis N. G. and Paice M. G. (eds), Washington DC, pp: 68-88.
- Yamauchi, K., Yasuda, S., Hamada, K., Tsutsumi, Y. and Fukushima, K. (2003). Multifunctional biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. **Planta**, *216* (3): 496-501.
- Yanagisawa, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. **Trends Plant Sci**, *7* (12): 555-560.
- Yang, J. G. and Uchiyama, T. (2000). Hydroxycinnamic acids and their dimers involved in the cessation of cell elongation in *Mentha* suspension culture. **Biosci Biotechnol Biochem**, *64* (8): 1572-1579.
- Ye, Z. H., Song, Y. R., Marcus, A. and Varner, J. E. (1991). Comparative localization of three classes of cell wall proteins. **Plant J**, *1* (2): 175-183.
- Ye, Z. H. and Varner, J. E. (1993). Gene expression patterns associated with in vitro tracheary element formation in isolated single mesophyll cells of *Zinnia elegans*. **Plant Physiol**, *103* (3): 805-813.
- Ye, Z. H., Kneusel, R. E., Matern, U. and Varner, J. E. (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. **Plant Cell**, *6*: 1427-1439.
- Ye, Z. H. and Varner, J. E. (1995). Differential expression of two *O*-methyltransferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. **Plant Physiol**, *108* (2): 459-467.
- Ye, Z. H. (1997). Association of caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. **Plant Physiol**, *115* (4): 1341-1350.
- Yip, T. T., Nakagawa, Y. and Porath, J. (1989). Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography. **Anal Biochem**, *183*: 159-171.
- Yokoyama, T., Kadla, J. F. and Chang, H. M. (2002). Microanalytical method for the characterization of fiber components and morphology of woody plants. **J Agr Food Chem**, *50* (5): 1040-1044.
- York, W. S., Darvill, M., McNeil, M. and Albersheim, P. (1985). 3-deoxy-manno-2-octulosonic (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary plant cell walls of plants. **Carbohydr Res**, *138*: 109-126.

Z

- Zacchino, S. A., Lopez, S. N., Pezzenati, G. D., Furlan, R. L., Santecchia, C. B., Munoz, L., Giannini, F. A., Rodriguez, A. M. and Enriz, R. D. (1999). *In vitro* evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids and related compounds acting against dermatophytes. **J Nat Prod**, 62 (10): 1353-1357.
- Zhao, H. Y., Wei, J. H., Zhang, J. Y., Liu, H. R., Wang, T. and Song, Y. R. (2002). Lignin biosynthesis by suppression of two *O*-methyltransferases. **Chin Sci Bull**, 47 (13): 1092-1095.
- Zhong, R., Taylor, J. J. and Ye, Z. H. (1997). Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. **Plant Cell**, 9: 2159-2170.
- Zhong, R., Morrison, W. H., Negrel, J. and Ye, Z. H. (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. **Plant Cell**, 10: 2033-2045.
- Zhong, R., Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S., Poole, F. L. and Ye, Z. H. (2000). Essential role of caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. **Plant Physiol**, 124 (2): 563-577.
- Zhu, Q., Dabi, T., Beeche, A., Yamamoto, R., Lawton, M. A. and Lamb, C. (1995). Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Mol Biol**, 29 (3): 535-550.
- Zini, E., Scandola, M. and Gatenholm, P. (2003). Heterogeneous acylation of flax fibers. Reaction kinetics and surface properties. **Biomacromolecules**, 4 (3): 821-827.
- Zou, J. and Taylor, C. T. (1994). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologous to parsley (*Petroselinum crispum*) *S*-adenosyl-L-methionine: *trans*-caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. **Plant Physiol Biochem**, 32 (3): 423-427.

DIFFUSION DES TRAVAUX

LISTE DES

COMMUNICATIONS

DIFFUSION DES TRAVAUX : LISTE DES COMMUNICATIONS

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont fait l'objet d'une diffusion sous forme d'articles scientifiques dans des revues à comité de lecture, de communications orales et d'affiches dans différents congrès. Outre la liste ci-dessous présentée, un article de vulgarisation en partenariat avec l'I.T.L. est en préparation. De même, les travaux concernant la caractérisation d'une CCoAOMT chez le lin seront très prochainement l'objet d'un article scientifique, les analyses chimiques et moléculaires des plantes transgéniques étant en cours.

ARTICLES DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE :

Day, A., Addi, M., Kim, W., David, H., Bert, F., Mesnage, P., Chabbert, B., Rolando, C., Neutelings, G. and Hawkins, S. Expression analysis of ESTs in the fiber-bearing stem tissues of flax *Linum usitatissimum* (cv. hermes) plants. *Plant Biology*. *Sous presse*.

Day, A., Ruel, K., Neutelings, G., Crônier, D., David, H., Hawkins, S. and Chabbert, B. "Wonder wood" for fitter fibers? Evidence for an unusual lignin in flax bast fibers. *Planta*. *Soumis*.

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*) during stem development. *Physiologia Plantarum*, 113 (2) : 275-284.

COMMUNICATIONS ORALES :

Day, A., Neutelings, G., Dehorter, B., Ruel, K., Chabbert, B. and David, H. (2002). Expression chez le lin d'une Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-méthyltransférase spécifique des tissus externes riches en fibres en relation avec leur (hypo)lignification : approches moléculaire, cytologique et structurale. Journées du Réseau Français des Parois. *Reims, France*.

Tokarski, C., Day, A., David, H. and Rolando C. (2002). Differential proteomics the fiber-bearing tissues in flax. Journées du Réseau Français des Parois. *Reims, France*.

Neutelings, G., Day, A., Kim, W., Chabbert, C., Rolando, C., Hawkins, S. and David H. (2002). Expression analysis of ESTs in the fiber-bearing tissues of *Linum usitatissimum* (cv. hermes). Workshop COST Action E20. Wood Fibre Cell Wall Structure : "Cell wall and stress". *Reims, France*.

Day, A., Dehorter, B., Belingheri, L., Neutelings, G., Meyermans, H. and David, H. (2000). Lignification des fibres périphloémiennes du lin : Caractérisation d'une Caffeoyle-Coenzyme A 3-O-Méthyltransférase. Journées du Réseau Français des Parois. Versailles, France.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE :

- Day, A., Ruel, K., Crônier, D., Neutelings, G., David, H., Hawkins S. and Chabbert B. (2004). Characterization of flax fibre lignin by chemical and immunocytological analyses. 10th International Cell Wall meeting. Sorrento, Italie.
- Day, A., Neutelings, G., Dehorter, B., Crônier, D., Rolando, C., David, H., Chabbert, B. and Hawkins S. (2003). Genomic organization and biochemical characterization of a flax caffeoyle-coenzyme A 3-O-methyltransferase. Journées du Réseau Français des Parois. Nantes, France.
- Day, A., Neutelings, G., Lenne, S., Belingheri, L., Dehorter, B., Crônier, D., Chabbert, B. and David H. (2001). Characterization of a Caffeoyle Coenzyme A 3-O-Methyltransferase gene expressed in outer fiber bearing tissues of flax stem and correlation with corresponding lignin levels. 9th International Cell Wall meeting. Toulouse, France.
- Day, A., Dehorter, B., Neutelings, G., Crônier, D., Cathala, B., Chabbert, B., Belingheri, L. and David, H. (2001). Caffeoyle-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase enzyme activity, protein and transcript accumulation in flax (*Linum usitatissimum*) stem during development. Workshop COST Action E20. Wood Fibre Cell Wall Structure : "Interaction between cell wall components". Uppsala, Suède.
- Day, A., Dehorter, B. and David, H. (2000). Characterization of a Caffeoyle-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase in flax (*Linum usitatissimum*). New Frontiers in Plant Science and Plant Biotechnology. Toulouse, France.

RESUME / ABSTRACT

Angiosperme dicotylédone de la famille des linacées, le lin (*Linum usitatissimum* L.) est la principale plante à fibres cultivée en France. L'intérêt industriel de cette plante repose sur la longueur et les propriétés exceptionnelles (finesse, résistances aux tensions et à l'usure) de ses fibres cellulosiques périphloémiennes. Ces dernières, localisées dans la tige, sont regroupées en faisceaux de quelques dizaines d'unités fortement associées entre elles et aux tissus environnants. De ce fait, leur exploitation requiert une succession d'étapes biologique (rouissage), mécaniques et chimiques (teillage et filage) afin d'obtenir leur dissociation et ceci au détriment de leurs propriétés intrinsèques. La présence de composés phénoliques limiterait l'efficacité de ces procédés agro-industriels en favorisant la cohésion intercellulaire de ces fibres. Les caractérisations quantitative et qualitative de ces composés s'avèrent être un prérequis à l'optimisation de la production et de l'utilisation des fibres de lin.

À maturité ces fibres possèdent une structure pariétale caractéristique, leur paroi secondaire, constituée de l'extérieur vers le lumen, d'une S1, d'une importante S2 et d'une S3, représentent plus de 90 % de leur section transversale. Une approche microscopique basée sur la mise en œuvre de méthodes (immuno-)cytochimiques a permis de révéler la présence de lignine au niveau des zones mitoyennes et dans la paroi secondaire des cellules fibreuses. Des lignines condensées de type gäiacyle (G) ont été détectées au niveau de la lamelle moyenne, des jonctions tricellulaires et dans S1. En outre, des lignines de type gäiacyle-syringyle (G-S) ont été identifiées, en moindre quantité, dans l'ensemble de la paroi secondaire. La quantification de ces lignines révèle une hypolignification marquée dans les fibres périphloémiennes par rapport au bois. La caractérisation des lignines inscrustant les faisceaux fibreux du lin par thioacidolyse puis par oxydation alcaline par le nitrobenzène suggère la présence d'une lignine G-S riche en unités *p*-hydroxyphényl (H) possédant un très faible ratio S/G associé à un fort degré de condensation. Ces particularités des lignines des fibres de lin semblent s'accroître au cours de leur maturation s'effectuant pendant quelques semaines après la floraison des plantes. La caféoyl-coenzyme A 3-*O*-Méthyltransférase, CCoAOMT, est une enzyme clé de la voie de biosynthèse des lignines contrôlant leur synthèse et leur composition. Son étude a mis en évidence une corrélation positive entre i. l'expression du gène, ii. la présence de la protéine et iii. son activité enzymatique, suggérant une régulation transcriptionnelle de cette enzyme. Par ailleurs, l'activité de cette enzyme et l'expression de ses gènes coïncident avec les variations spatio-temporelles du dépôt de lignines dans les tiges. La production d'une CCoAOMT recombinante a permis de tester *in vitro* la spécificité de substrat de cette enzyme. Ces analyses ont suggéré l'implication de la CCoAOMT dans la synthèse des sous-unités G et S proposant ainsi une nouvelle voie dans la biosynthèse des monolignols.

Flax (*Linum usitatissimum* L.), a dicotyledon plant of the *linaceae* family, is the main fibre plant grown in France. The industrial interest of this plant depends on the length and the exceptional properties (small diameter, tensile strength, resistance) of its periphloemien fibres, rich in cellulose. These fibres are localized in the stem where they are organized in bundles in which the cells (individual fibres) are tightly bound to each other and to the surrounding tissues. In consequence, the commercial exploitation of these fibres requires a succession of biological (retting) and mechanical and chemical (separation and spinning) steps so as to separate them. The presence of phenolic compounds is supposed to increase intercellular cohesion, thereby rendering fibre separation more difficult. As a result, the quantification and characterisation of such phenolic compounds is a prerequisite for the optimisation of flax fibre utilisation.

The cell wall of mature flax fibres has a distinctive structure with a secondary cell wall (S1, large S2 and S3 layers) representing more than 90 % of its cross-sectional area. Immunochemical and cytochemical microscopic analyses indicated that lignin was present in the common wall zone between different cells as well as in the secondary cell wall. Condensed guaiacyl (G) type lignins (were detected in the middle lamella, cell-wall junctions and in the S1 layer of the secondary cell wall. In addition, lower quantities of mixed syringyl-guaiacyl (G-S) lignins could be detected throughout the secondary cell wall. Chemical investigation confirmed that flax fibres are hypolignified in comparison with xylem tissue. Thioacidolysis and alkaline oxidation analyses suggested that the lignin associated with fibres is highly condensed (G-S type with a low S/G ratio and rich in *p*-hydroxyphenyl units (H)). Developmental studies revealed that lignification occurs during the space of the few weeks after flowering. Caffeoyl Coenzyme A 3-*O*-methyltransferase (CCoAOMT) is a key enzyme of lignin biosynthesis implicated in the control of the monolignol composition of the polymer. The study of this enzyme in flax plants revealed a positive correlation between, i) the expression of the *CCoAOMT* gene, ii) the presence of the CCoAOMT protein, and iii) CCoAOMT activity, suggesting a regulation at the transcriptional level. In addition, gene expression and enzyme activity are correlated with spatio-temporal variations in the deposition of lignin in the stem. The determination of different *in vitro* activities for the recombinant CCoAOMT protein suggested that CCoAOMT is involved in the control of both G and S units of the lignin polymer.

