HAL
open science

Etude biochimique et immunocytochimique de l'impact de mutations génétiques sur la lignification et l'assemblage des parois d'Arabidopsis thaliana

Jimmy Berrio-Sierra

To cite this version:

Jimmy Berrio-Sierra. Etude biochimique et immunocytochimique de l'impact de mutations génétiques sur la lignification et l'assemblage des parois d'Arabidopsis thaliana. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00223893

HAL Id: tel-00223893

https://theses.hal.science/tel-00223893v1

Submitted on 29 Jan 2008

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

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

GRENOBLE I

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Spécialité: Chimie - Biologie

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Présentée par

Jimmy BERRIO-SIERRA

Etude biochimique et immunocytochimique de l'impact de mutations génétiques sur la lignification et l'assemblage des parois d'*Arabidopsis thaliana*

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2007 devant le Jury composé de:

Mme. Elisabeth JAMET, Directeur de recherche CNRS, Toulouse.	Rapporteur
M. Gilles PILATE, Directeur de recherche CNRS-INRA, Orléans.	Rapporteur
M. Michel HERZOG, Professeur UJF, Grenoble.	Examinateur
Mme. Lise JOUANIN, Directeur de recherche CNRS-INRA, Versailles.	Examinateur
Mme. Katia RUEL, Directeur de recherche CNRS, Grenoble.	Directeur de thèse
Mme. Catherine LAPIERRE, Professeur AgroParisTech-INRA, Paris-Grignon.	Co-Directeur

Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales

UPR CNRS 5301, Grenoble

Je dédie ce travail à toute ma famille spécialement à ma mère « Eva », mon épouse « Marito » et mon fils « Jiji », qui m'ont donné beaucoup d'amour, la force et le courage de continuer sur ce chemin.

« Vivez comme si vous deviez mourir demain,
apprenez comme si vous deviez vivre toujours »

Bouddha

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été le fruit d'une collaboration entre les laboratoires du CERMAV, laboratoire propre du CNRS (unité 5301) associé à l'Université Joseph Fourier de Grenoble et l'Unité de Chimie Biologique AgroParisTech-l'INRA de Thiverval-Grignon. Elle a été cofinancée par une demi-bourse dans le cadre du GDR associée à une demi-bourse européenne Marie Curie.

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Katia RUEL, directeur de recherche au CNRS et madame Catherine LAPIERRE, directeur de l'Unité de Chimie Biologique AgroParisTech-INRA, pour leur accueil au sein de leurs équipes respectives. Je remercie de la même manière le professeur Monsieur Jean-Paul JOSELEAU du CERMAV qui a également participé à la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement ces trois personnes pour l'aide scientifique qu'ils ont su m'apporter tout au long de ces trois années, mais aussi pour leur patience, leur disponibilité et les nombreuses relectures de mon manuscrit.

J'adresse ma reconnaissance à tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer ce travail de thèse et toutes les remarques intéressantes qu'ils ont pu faire lors de la soutenance: Monsieur Michel HERZOG pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury et pour son rôle d'examinateur, Monsieur Gilles PILATES et Madame Elizabeth JAMET pour avoir été les rapporteurs de mon travail, ainsi que Madame Lise JOUANIN pour son rôle d'examinatrice.

Je remercie très sincèrement Madame LAPIERRE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et initié aux différentes techniques de l'analyse chimique des lignines, ainsi que son équipe, particulièrement Brigitte, Laurent et Fréderic qui m'ont beaucoup aidé pour l'exécution des différentes expériences nécessaires pour ce travail de thèse.

Je tiens à remercier Madame JOUANIN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant une semaine et initié aux techniques de biologie moléculaire. Je

voudrais remercier également son équipe, spécialement Johanne et Mohamad, pour la production des plantes, les contributions et leurs aides pour la réalisation des différentes expériences.

Je tiens à présenter mes remerciements les plus chaleureux à Madame Isabelle PAINTRAND et Monsieur Jean-Luc PUTAUX pour leurs précieux conseils en Microscopie Electronique en Transmission, les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues et pour leur collaboration enrichissante. Merci également à Danièle Dupeyre pour les observations en Microscopie Electronique à Balayage.

J'adresse mes remerciements à Madame Elizabeth BRAMBILLA de « l'Hôpital de la Tronche de Grenoble (France) » et à Monsieur Ingo BURGERT du « Max Planck Institute de Potsdam (Allemagne) » pour m'avoir permis de faire les microdissections sur *A. thaliana* à l'aide d'un microscope à capture laser, au sein de leurs laboratoires. Le séjour à Potsdam a été finance sous forme de « Short Term Scientifique Mission », par l'action européenne COST E-50.

Un grand merci à toutes les personnes et thésards du CERMAV qui, grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréable les moments passés ensemble, particulièrement: Lilie, Val, Alex, « mi cuate » Guillermo Angeles, Michael, Edu, Roby, Marie France, les deux Martine, Magali, Alberte, Josiane, Patrick, Claudius, Gérard et à mes amis les colombiens qui m'ont fait me sentir comme chez moi: Lina, Carlos, Evelio, Hernán, Gabriel, …….

SOMMAIRE

SOMMAIRE

ABREVIATIONS i

LISTE DE FIGURES ET DE TABLEAUX ii

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 1

I.1. *Arabidopsis thaliana* 1

I.2. Morphologie ultrastructurale de la paroi secondaire lignifiée des végétaux supérieurs 3

I.2.1. La lamelle mitoyenne 3

I.2.2. La paroi primaire 3

I.2.3. La paroi secondaire 4

I.3. Les constituants chimiques de la paroi des cellules végétales 5

I.3.1. La cellulose 5

I.3.2. Les hémicelluloses 5

I.3.3. Les substances pectiques 7

I.3.4. Les lignines 7

I.3.4.1. Nature chimique des lignines 8

I.3.4.2. Biosynthèse des monolignols 11

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES 15

II.1. Matériel végétal 15

II.2. Lignines de synthèse (déhydropolymères ou DHP) 15

II.3. Les anticorps utilisés 17

II.3.1. Antisera dirigés contre les structures condensées des lignines obtenues par la méthode *Zulauf z*l 17

II.3.2. Antisera dirigés contre les structures dites non condensées obtenues par la méthode *Zutropf zt* 18

II.4. Observations microscopiques 18

II.4.1. Observation en Microscopie Electronique à Balayage 18

II.4.1.1. Préparation des échantillons..... 18

II.4.2. Observation en Microscopie Electronique à Transmission..... 20

II.4.2.1. Préparation des échantillons ……..……..……... 20
II.4.2.2. Ultramicrotomie ……..……...…… 22
II.4.2.3. Marquages des ultracoupes pour l'observation en M.E.T……..... 22
II.4.2.4. Observation en M.E.T et photographies …….. 27

II.5. Analyse chimique des lignines …… 27

II.5.1. Quantification des lignines ……..……..... 27
II.5.1.1. Dosage des lignines par la méthode de Klason..……..... 28
II.5.1.2. Dosage des lignines par la méthode au bromure d'acétyle..... 28
II.5.2. Caractérisation structurale des lignines par thioacidolyse ……..... 29
II.5.3. Caractérisation structurale des lignines par thioacidolyse des échantillons pre-méthylés ……..……. 31

II.6. Autres méthodes …… 32

II.6.1. Analyse globale des polysaccharides ……..... 32
II.6.2. Microdissection à l'aide d'un microscope à capture laser…… 33
II.6.3. CP/MAS ^{13}C RMN à l'état solide ……..…… 35
II.6.4. Diffraction de Rayons X ……..……..…… 35

CHAPITRE III: ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'ARABIDOPSIS THALIANA: COMPARAISON DES ECOTYPES WS ET COL-0 **36**

INTRODUCTION 36

III.1. Composition chimique globale des parois des hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* écotypes Ws et Col-0 …… 38

III.1.1. Composition en sucres neutres des parois des hampes florales……..... 38
III.1.2. Etude globale des lignines par analyses chimiques…… 39
III.1.3. Morphologie tissulaire des hampes florales des écotypes Ws et Col-0.. 40

III.2. Micromorphologie à l'échelle ultrastructurale des hampes florales de Ws et Col-0…….... 42

III.2.1. Marquage cytochimique au P.A.T.Ag……...…… 42
III.2.2. Répartition ultrastructurale des unités constitutives des lignines……... 44

CHAPITRE IV: IMPACT DU GENE CCR 1 DANS L'ASSEMBLAGE DES PAROIS SECONDAIRES LIGNIFIEES CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA* **51**

- **Summary……..……** 53
- **Keywords……** 53

- **Abbreviations**…….. 54
- **Introduction**……. 55
- **Materials And Methods**……. 57
- **Results And Discussion**…….. 61
- **Conclusions**……. 70
- **Acknowledgements**……... 72
- **References**…….. 72
- **Figures**…….. 80
  - Figures Legends…… 90
- **Tables**…… 92

CHAPITRE V: ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES DU DOUBLE MUTANT *cad-c x cad-d* ET DU TRIPLE MUTANT *cad-c x cad-d + ref1* **94**

INTRODUCTION…… 94

PREMIERE PARTIE 97

V.1. Composition chimique globale des parois des hampes florales du double mutant *cad-c x cad-d* …….. 97

V.1.1. Composition en sucres neutres des parois des hampes florales…… 97

V.1.2. Etude globale des lignines par analyses chimiques…….. 98

V.2. Morphologie tissulaire des hampes florales du mutant *cad-c x cad-d* 103

V.3. Etude micromorphologique et ultrastructurale des hampes florales du mutant *cad-c x cad-d*…… 105

V.3.1. Marquage cytochimique au P.A.T.Ag…… 105

V.3.2. Répartition ultrastructurale des unités constitutives des lignines……... 107

V.3.2.1. Distribution des structures non condensées ……... 107

V.3.2.2. Distribution des unités coniféraldéhyde ……... 109

V.3.2.3. Distribution des structures condensées ……... 111

V.4. Conclusion…… 116

DEUXIEME PARTIE

V.5. Composition chimique globale des parois des hampes florales du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*…….. 124

V.5.1. Etude globale des lignines par analyses chimiques……..…… 124

V.6. Etude micromorphologique et ultrastructurale des hampes florales du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*…… 125

V.6.1. Marquage cytochimique au P.A.T.Ag……..……..…… 125

V.6.2. Répartition ultrastructurale des unités constitutives des lignines…….. 126

V.7. Conclusion…….. 128

CHAPITRE VI: EFFETS COMPARATIFS DE DIFFERENTS MUTANTS SUR COMPOSITION ANALYTIQUE ET LA TOPOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE DE PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*A. THALIANA* **129**

VI.1. Effets des mutations sur la micromorphologie interne des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux du xylème…….. 129

VI.2. Caractéristiques analytiques des plantes d'*A. thaliana* témoins et transformées …… 134

VI.3. Variations dans la topochimie de la lignification consécutives aux mutations affectant la biosynthèse des monolignols…….. 135

VI.4. Conclusion…… 139

VI.5. Bilan et conclusions générales: Essais de rationalisation des modifications structurales des parois en fonction des modifications analytiques des lignines?..... 141

VI.5.1. Aspects analytiques …… 141

VI.5.1.1. Mutant simple *ccr 1*…….. 141

VI.5.1.2. Double mutant *cad-c x cad-d*…….…. 141

VI.5.1.3. Triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* ……... 142

VI.5.1.4. Mutant simple EBL 87 (*f5h*)…… 142

VI.5.2. Impacts sur la formation et la structure des parois …….. 143

CONCLUSIONS GENERALES **147**

BIBLIOGRAPHIE **150**

ANNEXES **168**

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

- ABRC : *Arabidopsis* biological research center
- *A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*
- ALDH : aldéhyde déshydrogénase
- CAD : cinnamyle alcool déshydrogénase
- C3H : *para*-coumarate 3-hydroxylase
- C4H : cinnamate 4-hydroxylase
- 4CL : 4-coumarate CoA ligase
- CCoA : caféoyl-CoA
- CCR : cinnamoyl-CoA réductase
- CoA : coenzyme A
- CCoAOMT : caféoyl-CoA *O*-méthyltransférase
- COMT : acide caféique *O*-méthyltransférase
- CPG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- DHP : déhydropolymère
- FAH : ferulique acide hydroxylase
- F5H : férulate 5-hydroxylase
- G : gaïacyle
- H : *para*-hydroxyphényle
- HCT : *para*-hydroxycinnamoyltransférase
- LAS : lignine acido-soluble
- LK : lignine Klason
- LM : lamelle mitoyenne
- LRW : London resine white
- MEB : microscopie électronique à balayage
- MET : microscopie électronique à transmission
- NASC : Nottingham *Arabidopsis* stock center
- mA : milliampère
- PAL : phényalanine ammonia-lyase
- PATAg : periodic acid thiocarbohydrazide silver proteinate
- PBS : phosphate buffered saline
- PEG : polyéthylène glycol
- PHE : phényalanine
- PP : paroi primaire
- PS : paroi secondaire
- REF1 : reduced epidermal fluorescence
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- RP : résidu pariétal
- RS : résidu saponifié
- S : syringyle
- SAD : sinapyle alcool déshydrogénase
- SS : stilbène synthase
- TAIR : the *Arabidopsis* information resource
- TBS : tris buffered saline
- TCH : thiocarbohydrazide
- U.V. : ultraviolet
- Zl : Zulauf
- Zt : Zutropf

LISTE DE FIGURES ET DE TABLEAUX

LISTE DE FIGURES

CHAPITRE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

		Page
Figure I.1.	*Arabidopsis thaliana*	2
Figure I.2.	Représentation schématique de la paroi secindaire de végétaux supérieurs	4
Figure I.3.	Homopolymères de cellulose avec liaisons hydrogène intra et inter-chaînes	5
Figure I.4.	Principaux sucres composant les hémicelluloses	6
Figure I.5.	Représentation schématique d'un glucuronoxylane (A) et d'un glucommannane (B) présents dans les bois feuillus	7
Figure I.6.	Les trois monolignols précurseurs des unités H, G et S des lignines	8
Figure I.7.	Mécanisme de formation des principaux radicaux issus de l'alcool coniféryliquel	9
Figure I.8.	Schéma simplifié de la lignine	10
Figure I.9.	Liaisons possibles entre les polysaccharides pariétaux et les lignines de graminées	11
Figure I.10.	Biosynthèse des monolignols	13

CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

Figure II.1.	Principales liaisons inter-unités contenues dans les DHPs dits condensés (obtenus par la méthode *Zulauf*) R = H ou OMe	16
Figure II.2.	Liaisons non condensées de type β-O-4	16
Figure II.3.	Principe du marquage des polysaccharides en M.E.T par la méthode du P.A.T.Ag.	23
Figure II.4.	Principe du marquage immunocytochimique indirect (étapes 1 et 2) et de l'intensification à l'argent de la taille des grains d'or (étapes 3 et 4).	25
Figure II.5.	Mécanisme de la thioacidolyse	29
Figure II.6.	Principe de thioacidolyse des échantillons pre-méthylés	31

CHAPITRE III ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*: COMPARAISON DES ECOTYPES WS ET Col-0

Figure III.1.	Observations en microscopie électronique à balayage des hampes florales d'*A. thaliana* Ws (A) et Col-0 (B)	40
Figure III.2.	Organisation structurale des fibres inter-fasciculaires des écotypes Ws (A) et Col-0 (B)	41
Figure III.3.	Organisation structurale des faisceaux libéro-ligneux des écotypes Ws (A) et Col-0 (B)	42
Figure III.4.	Organisation ultrastructurale des fibres de hampes florales de Ws (A) et Col-0 (B)	43
Figure III.5.	Organisation ultrastructurale des vaisseaux des hampes florales de Ws (A) et Col-0 (B)	44
Figure III.6.	Principales structures reconnues par les 4 types d'anticorps utilisés	45
Figure III.7.	Immunomarquage avec différents anticorps dans la paroi des fibres inter-fasciculaires d'*A. thaliana* écotypes Ws (A, C, F, et H) et Col-0 (B, D, G et I)	48
Figure III.8.	Immunomarquage avec différents anticorps dans la paroi des vaisseaux d'*A. thaliana* écotypes Ws (A, C, F, et H) et Col-0 (B, D, G et I)	49

CHAPITRE V ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES DU DOUBLE MUTANT *cad-c x cad-d* ET DU TRIPLE MUTANT *cad-c x cad-d + ref1*

Figure V.1.	Structures des monomères minoritaires issus de la thioacidolyse du coniféraldéhyde lié aux lignines sous forme de groupes terminaux, du coniféraldéhyde et du sinapaldéhyde liés en Cβ par liaison β-O-4 et des groupes terminaux vanilline et syringaldéhyde	100
Figure V.2.	Observations en M.E.B. de l'organisation structurale des fibres inter-fasciculaires et du faisceau-libéroligneux des hampes florales de Ws (A et C) et de *cad-c x cad-d* (B et D)	104
Figure V.3.	Coupe longitudinale de la région des fibres inter-fasciculaires des hampes florales de Ws (A) et de *cad-c x cad-d* (B)	104

Figure V.4. Observations en M.E.T et après marquage au P.A.T.Ag des parois secondaires des fibres inter-fasciculaires du témoin (A), du double mutant *cad-c x cad-d* (C) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E) et des vaisseaux du témoin (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (F) 106

Figure V.5. Immunomarquage des unités mixtes gaïacyle-syringyle non condensées (anticorps S/C-zt) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E et F) 108

Figure V.6. Immunomarquage des unités syringyle non condensées (S) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E et F) 110

Figure V.7. Immunomarquage des unités coniféraldéhyde dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et C) et de *cad-c x cad-d* (B et D) 111

Figure V.8. Immunomarquage des unités gaïacyle condensées (G) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E et F) 112

Figure V.9. Immunomarquage des unités mixtes gaïacyle-syringyle condensées (anticorps GS-zl) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E et F) 114

Figure V.10. Immunomarquage des structures dibenzodioxocines dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales du témoin (A et C) et du double mutant *cad-c x cad-d* (B et D) 116

CHAPITRE VI EFFETS COMPARATIFS DE DIFFERENTS MUTANTS SUR LA COMPOSITION ANALYTIQUE ET LA TOPOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*A. THALIANA*

Figure VI.1. Comparaison à faible grossissement (marquage au P.AT.Ag) de l'organisation des fibres inter-fasciculaires du témoin Ws (A), du mutant *ccr 1* (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87* (F) 129

Figure VI.2. Comparaison à faible grossissement (marquage au P.AT.Ag) de l'organisation des faisceaux libéroligneux du témoin Ws (A), du mutant *ccr 1* (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87* (F) 130

Figure VI.3. Micromorphologie comparée à fort grossissement (marquage au P.A.T.Ag) des parois secondaires des fibres inter-fasciculaires du témoin (A), du mutant *ccr 1* (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87* (F) 131

Figure VI.4. Micromorphologie comparée à fort grossissement (marquage au P.A.T.Ag) des parois secondaires des vaisseaux du témoin (A), du mutant *ccr 1*(B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87*(F) 132

LISTE DE TABLEAUX

CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

Page

Tableau II.1 Protocole de marquage immunocytochimique indirect utilisé au laboratoire pour le marquage des tissus végétaux 26

CHAPITRE III ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*: COMPARAISON DES ECOTYPES WS ET Col-0

Tableau III.1 Composition en sucres neutres des parois des hampes florales matures d'*A.thaliana* écotypes Ws et Col-0 39

Tableau III.2 Analyses globales des lignines de hampes matures (après extraction au Soxhlet) des écotypes Ws et Col-0 39

Tableau III.3 Moyenne (écart-type entre parenthèse) du taux de Lignine Klason (en % des échantillons extraits) et du rapport molaire S/G de thioacidolyse des hampes florales matures issues de 55 et 33 séries de cultures différentes (réparties sur 5 ans) 40

Tableau III.4 Evaluation Semi-quantitative de la distribution des épitopes structuraux des lignines dans les écotypes d'*Arabidopsis thaliana* Ws et Col-0 46

Tableau III.5 Comparaison de la distribution des épitopes structuraux des lignines dans les fibres inter-fasciculaires des hampes florales des écotypes Ws et Col-0 46

Tableau III.6 Comparaison de la distribution des épitopes structuraux des lignines dans les vaisseaux des hampes florales des écotypes Ws et Col-0 47

CHAPITRE V ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES DU DOUBLE MUTANT *cad-c x cad-d* ET DU TRIPLE MUTANT *cad-c x cad-d + ref1*

Tableau V.1 Composition en sucres neutres des parois des hampes florales matures du témoin Ws et du double mutant *cad-c x cad-d* 97

Tableau V.2 Dosage des lignines dans les parois des hampes florales matures du témoin Ws, du double mutant *cad-c x cad-d* et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* 98

Tableau V.3	Rendement (µmole par gramme de lignine Klason) et fréquence relative (% molaire) des monomères principaux obtenus par thioacidolyse des lignines des hampes florales matures du témoin Ws, du mutant *cad-c x cad-d* et du mutant *cad-c x cad-d + ref1*	99
Tableau V.4	Monomères minoritaires des lignines obtenus par thioacidolyse des hampes florales matures du témoin Ws, du mutant *cad-c x cad-d* et du mutant *cad-c x cad-d + ref1*	101
Tableau V.5	Pourcentage de groupes phénoliques libres et méthylables dans les unités G ou S liées en β-O-4 des lignines des hampes florales matures du témoin Ws et du double mutant *cad-c x cad-d*	102
Tableau V.6	Taux de lignine Klason dans les résidus pariétaux RP et les résidus saponifiés RS (1 g de RP traité par 50 mL de NaOH 1 M, 2h, 37 °C) des hampes florales de Ws et du double mutant *cad-c x cad-d* et pourcentage de lignines alcalino-solubles.	102
Tableau V.7	Analyse immuno-cytochimique semi-quantitative comparative de la distribution topochimique des épitopes de lignines dans les parois des tiges des hampes florales (6 semaines, partie basse). Variations induites par la double mutation *cad-c x cad-d*	119

CHAPITRE VI EFFETS COMPARATIFS DE DIFFERENTS MUTANTS SUR LA COMPOSITION ANALYTIQUE ET LA TOPOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*A. THALIANA*

Tableau VI.1	Principales altérations ultrastructurales de la sous-couche S_2 dans les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux	133
Tableau VI.2	Récapitulatif des données analytiques concernant les lignines dans les plantes témoins d'A. thaliana et dans les plantes mutées	134
Tableau VI.3	Analyse immuno-cytochimique comparative de la distribution topochimique des épitopes de lignine dans les fibres inter-fasciculaires. Variations induites par la mutation.	135
Tableau VI.4	Analyse immuno-cytochimique comparative de la distribution topochimique des épitopes de lignine dans les vaisseaux	136
Tableau VI.5	Evaluation semi-quantitative des variations induites par les mutations sur les épitopes gaïacyles et syringyles de la sous-couche principale S_2 des fibres inter-fasciculaires et des Vaisseaux	139

CHAPITRE I:

Etude Bibliographique

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. *Arabidopsis thaliana*

Les plantes, source de l'oxygène vital avec le plancton et premier maillon des chaînes alimentaires, ont un rôle primordial dans la vie sur terre; elles constituent en outre la principale source de l'alimentation humaine. Déterminer l'ensemble des mécanismes qui permettent à une plante de germer, de se développer et de se reproduire est donc un enjeu considérable sur le plan scientifique, mais aussi et surtout d'un point de vue écologique et économique.

La première plante modèle choisie par la communauté internationale pour l'inventaire des gènes végétaux est une petite plante de la famille des Brassicacées, cousine du colza et du chou, l'arabette *Arabidopsis thaliana* (Figure 1). Elle se reproduit généralement par autofécondation, ce qui permet d'obtenir facilement des individus homozygotes et de maintenir des lignées pures. Les fleurs sont abondantes et les croisements relativement faciles. Son génome, l'un des plus petits génomes végétaux (157 Mb), a été entièrement séquencé et contient environ 25,000 gènes codants pour des protéines appartenant à 11,000 familles (*Arabidopsis* and Initiative, 2000)

Depuis que son génome a été déchiffré, cette Angiosperme dicotylédone est devenue l'organisme modèle pour pouvoir comprendre la formation des parois cellulaire des plantes (Somerville and Koornneef, 2002). Un des grands avantages d'*Arabidopsis thaliana* est également la disponibilité de mutants. De nombreuses ressources en génomique fonctionnelle sont disponibles pour cette plante, incluant une dizaine de collections de lignées d'inactivation de gènes (le plus souvent par insertion aléatoire dans le génome). D'après la base de données TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) (Huala et al., 2001), environ 750 écotypes d'*A. thaliana* ont été identifiés dans le monde. Des graines des différents écotypes sont disponibles dans des centres de stockage comme le ABRC (*Arabidopsis Biological Research Center*) et le centre européen de stockage NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*).

La première observation faisant référence à une modification génétique touchant la biosynthèse des lignines a été recensée, il y a plus de 70 ans, par

Jorgensen. Il décrivait, en 1931, la mutation *brown midrib* (*bm1*) chez le maïs affectant l'expression de la CAD (Anterola and Lewis, 2002).

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux pour modifier la voie de biosynthèse des lignines ont été réalisés. Ces modifications portent sur la diminution de la production d'enzymes sélectionnées pour leur rôle clé dans la biosynthèse des monolignols et des lignines.

Figure I.1. ***Arabidopsis thaliana***
(*www-ijpb.versailles.inra.fr/.../cyto/arabido.htm*)

I.2. Morphologie ultrastructurale de la paroi secondaire lignifiée des végétaux supérieurs

Les parois des cellules d'*Arabidopsis thaliana* répondent au modèle de la structure de la paroi végétale des plantes supérieures. En particulier les parois secondaires du systéme vasculaire et de soutien (fibres interfasciculaires) sont constituées d'une charpente fibrillaire cellulosique entournée d'une matrice de polysaccharides et de lignine. Dans le paragraphe qui suit la description sera centrée sur les parois secondaires. L'observation microscopique de la structure pariétale, permet de distinguer deux types de parois cellulaires chez les végétaux supérieurs: les parois primaires et les parois secondaires qui sont formées à différents stades de croissance de la cellule. Les cellules contiguës sont assemblées les unes aux autres par la lamelle mitoyenne (Figure 2).

I.2.1. La lamelle mitoyenne

La lamelle mitoyenne couche intercellulaire fine, assure la cohésion entre les parois des cellules adjacentes et confère aux tissus leur rigidité. Cette zone composée de pectines et de protéines, dans les tissus jeunes se lignifie dans les tissus plus âgés

I.2.2. La paroi primaire

La paroi primaire est mise en place pendant la croissance cellulaire. Elle est nécessaire à la fois pour la stabilité mécanique des cellules et assure une extensibilité suffisante pour permettre l'expansion cellulaire sans risque de rupture de la membrane plasmique. Cette paroi primaire se présente comme un réseau de microfibrilles de cellulose, englobées dans un mélange amorphe fortement hydraté de pectines, d'hémicelluloses, de protéines et de composants phénoliques. Du fait de la très faible épaisseur de la paroi primaire (~0.1 µm), l'appréciation de la limite entre cette paroi et la lamelle mitoyenne est rendue difficile. C'est pourquoi le terme de «lamelle mitoyenne composite» est souvent employé pour désigner l'ensemble.

I.2.3. La paroi secondaire

La paroi secondaire se forme à la fin du processus d'élongation cellulaire et représente plus de 60 % du volume de la paroi cellulaire; elle est rigide et moins riche en eau que la paroi primaire. Typiquement, la paroi secondaire des trachéides est constituée de trois sous-couches successives nommées S_1, S_2 et S_3, se distinguant entre elles par l'orientation des microfibrilles de cellulose (Figure 2).

La sous-couche S_1 (externe) est la plus mince, avec une épaisseur de 0.1 à 0.3 µm, elle peut représenter 5 à 10 % de l'épaisseur totale de la paroi. Les microfibrilles de cellulose, qui constituent cette sous-couche possèdent une orientation par rapport l'axe longitudinal de la cellule de 60° à 80°.

La sous-couche S_2 (médiane) d'épaisseur 1 à 10 µm, est la plus dense et représente environ 75 à 85 % de l'épaisseur totale de la paroi dont elle assure la rigidité grâce à la présence de dépôts concentriques de lignines. L'orientation des microfibrilles varie de 5° à 30° par rapport l'axe longitudinal de la cellule et peut être modifiée selon le stress mécanique que subit la plante (Plomion et al., 2001).

La sous-couche S_3 est la plus interne de la paroi et est relativement mince (environ 0.1 µm). Selon l'espèce végétale et le type de cellule, elle peut quelquefois être absente. Les microfibrilles de cellulose y présentent une orientation privilégiée moins stricte que celles de la sous-couche S_2 (60° à 90°).

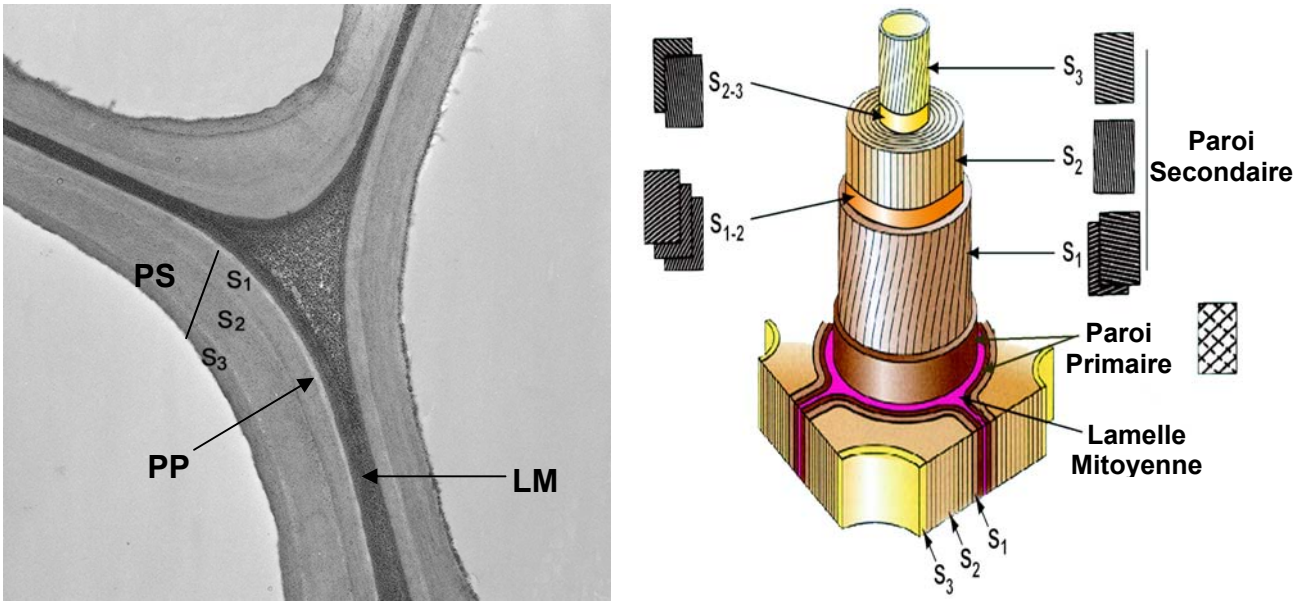


Figure I.2. Représentation schématique de la paroi secondaire de végétaux supérieurs. LM= Lamelle mitoyenne PP= Paroi primaire, PS= Paroi secondaire

I.3. Les constituants chimiques de la paroi des cellules végétales

Du fait de la diversité des types végétaux et de la grande variété des types cellulaires dans une même plante, il n'est pas possible de décrire la composition et la constitution d'une paroi cellulaire unique. Cependant quelques généralisations peuvent être faites.

I.3.1. La cellulose

La cellulose (Figure 3) est le polymère naturel le plus abondant dans les végétaux, elle représente 15 à 30 % de la masse sèche de toute la paroi primaire. Ce biopolymère a un rôle structural très important dans la grande majorité des parois végétales. Il s'agit d'un homopolysaccharide linéaire de la série des β-D-glucanes constitué d'un motif de base: deux unités glucose reliés par une liaison osidique β-(1→4), et dénommé cellobiose. Les chaînes de cellulose ont une configuration en ruban étendu grâce à la présence de liaisons hydrogène intra-chaînes. L'existence de liaisons hydrogène inter-chaînes donne une association linéaire en microfibrilles. Cet assemblage confère à la cellulose la possibilité de s'organiser jusqu'à former des structures cristallines. Chez les angiospermes, le diamètre des microfibrilles mesuré par microscopie électronique serait compris entre 5 et 12 nm de large (Carpita and McCann, 2000).

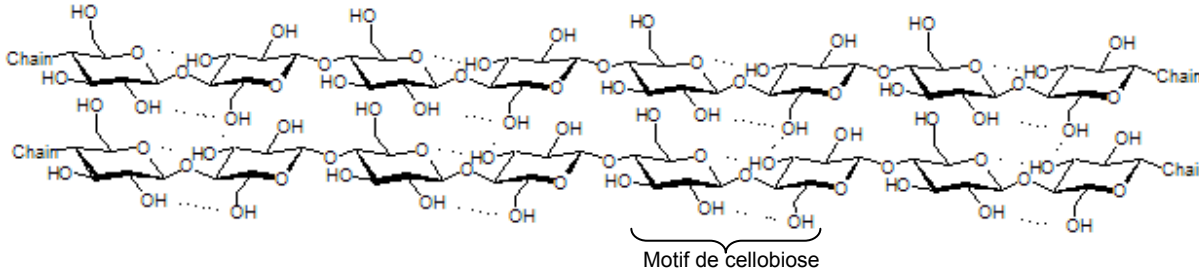


Figure I.3. Homopolymères de cellulose avec liaisons hydrogène intra et inter-chaînes

I.3.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont une classe de polysaccharides non cellulosiques très variés, associés de façon non covalente à la cellulose et de manière covalente aux lignines. Elles représentent, par définition, des polysaccharides extractibles par

des solvants alcalins. Les plus représentées sont les xylanes, que l'on trouve en proportions différentes selon l'espèce végétale (Joseleau et al., 1992). Le rôle des hémicelluloses au sein de la structure cellulaire végétale est d'assurer les liens entre les fibrilles de cellulose. Ces hémicelluloses sont beaucoup plus faciles à dégrader que la cellulose; elles sont très sensibles aux milieux acides et alcalins.

Les oses constitutifs des unités de base de ces polymères peuvent être des pentoses (xylose ou arabinose), des hexoses (glucose, mannose et galactose) et parfois des acides uroniques (Figure 4).

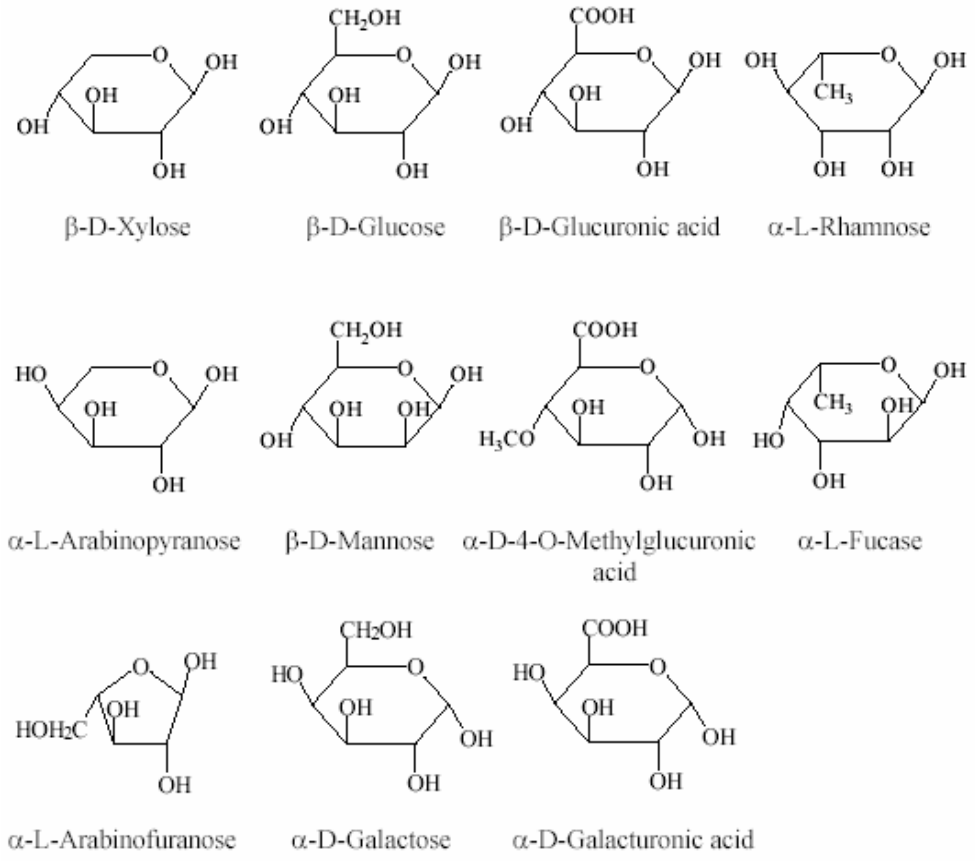


Figure I.4. Principaux sucres composant les hémicelluloses

La chaîne principale comprend généralement des enchaînements par liaisons β-(1→4) d'un ou deux types de monosaccharides. Parmi les hémicelluloses les plus communes dans la paroi des cellules des bois feuillus, on trouve les familles de polysaccharides dont la chaîne principale linéaire est constituée de xylose, de mannose et de glucose. Ces chaînes peuvent être soit ramifiées par le greffage d'autres unités de sucres ou de groupements acétyles (glucuronoxylane, Figure 5A),

soit entrecoupées par l'incorporation de sucres dans la chaîne linéaire (glucomannanes, Figure 5B) (Sjöström, 1993).

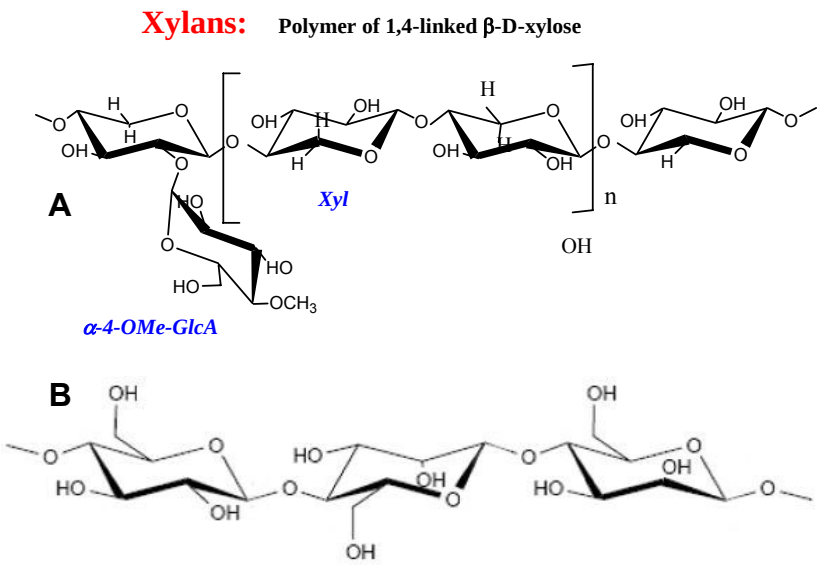


Figure I.5. Représentation schématique d'un glucuronoxylane (A) et d'un glucommannane (B) présents dans les bois feuillus.

I.3.3. Les substances pectiques

Les substances pectiques sont des polysaccharides complexes acides ou neutres extractibles à l'eau, présents en abondance dans la lamelle mitoyenne et la paroi primaire. Elles interviennent dans l'hydratation, la porosité, la plasticité, la modulation du pH et de la charge électrostatique des parois. En outre, elles participent à l'adhésion cellulaire et sont également impliquées dans la signalisation cellulaire et les mécanismes de défense (Carpita and McCann, 2002). Les deux constituants fondamentaux des pectines sont les homogalacturonanes qui sont des homopolymères de résidus acide (1→4) α-D-galacturonique et les rhamnogalacturonanes de type I qui sont des hétéropolymères dont l'unité répétitive est un disaccharide (1→2) α-L-rhamnosyl - (1→4) α-D-galacturonique.

I.3.4. Les lignines

Les lignines constituent, après la cellulose, le deuxième biopolymère terrestre le plus abondant, soit approximativement 30 % du carbone organique dans la biosphère. La capacité des plantes à synthétiser les lignines a été essentielle pour leur adaptation et leur évolution d'un environnement aquatique vers un

environnement terrestre (Lewis and Davin, 1994). Les lignines se déposent principalement dans les parois des cellules des tissus impliqués dans le support mécanique comme le sclérenchyme et des tissus conducteurs comme le xylème ou le phloème. Chez les plantes vascularisées, les lignines confèrent la rigidité aux tissus de soutien, l'imperméabilité aux vaisseaux du xylème et forment une barrière physico-chimique contre les micro-organismes pathogènes (Sarkanen, 1971). La quantité et la structure des lignines varient en fonction de l'appartenance taxonomique, de l'espèce végétale, des tissus considérés, des types cellulaires (Campbell and Sederoff, 1996), de la zone pariétale considérée (Joseleau and Ruel, 1997), du stade de développement, des conditions environnementales et des facteurs de stress. La composition et la quantité de lignines synthétisées varient également en fonction de la période de l'année et des contraintes physiques auxquelles peut être soumise la plante telles que le vent ou la rencontre d'un obstacle (Campbell and Sederoff, 1996).

I.3.4.1. Nature chimique des lignines

Les lignines sont des hétéropolymères aromatiques complexes, dont la synthèse se fait par polymérisation déshydrogénative dans l'espace extracellulaire de trois alcools hydroxycinnamiques, nommés monolignols (Figure 6): l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, précurseurs respectifs des unités *p*-hydroxyphénylpropanes (H), gaïacylpropanes (G) et syringylpropanes (S) diffèrant entre eux par leur degré de méthoxylation en position 3 et 5 du noyau phénolique.

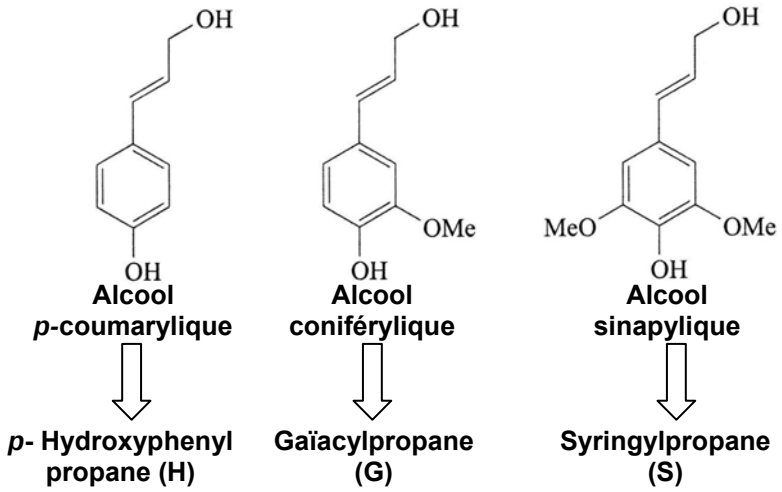


Figure I.6. Les trois monolignols précurseurs des unités H, G et S des lignines

Les lignines des Gymnospermes (dont font partie les lignines de bois de conifère ou «softwood») sont constituées essentiellement d'unités G avec peu d'unités H. Les lignines des Angiospermes dicotylédones (dont font partie les lignines de bois de feuillus ou «hardwood») contiennent principalement des unités G et S avec des traces d'unités H. Au cours de la lignification des Angiospermes, le dépôt de ces unités est séquentiel: les unités H et G sont déposées avant les unités S (Terashima et al., 1993; Donaldson, 2001). Les Graminées (Angiospermes monocotylédones) possèdent des lignines qui comportent des unités H en plus des unités G et S (Baucher et al., 1998).

La lignification est un processus au cours duquel les monolignols sont couplés entre eux par un mécanisme radicalaire initié par des peroxydases (Sarkanen, 1971) (Figure 7).

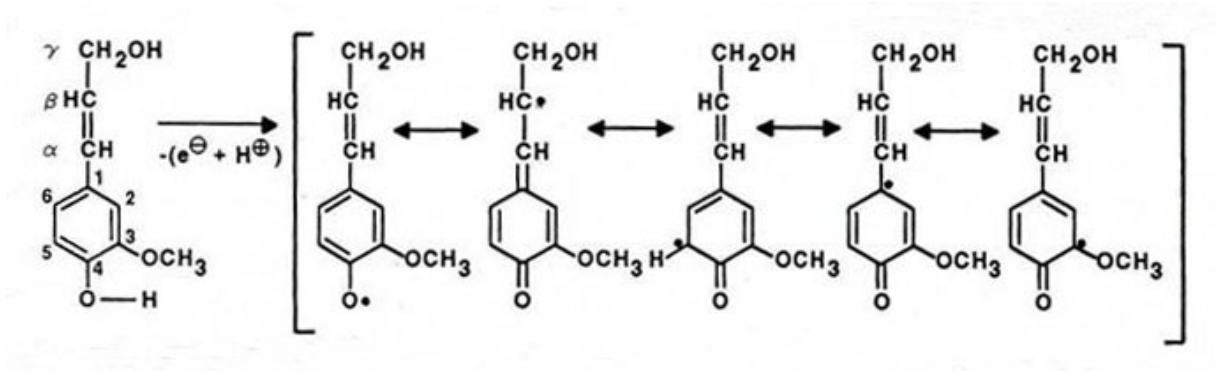


Figure I.7. Mécanisme de formation des principaux radicaux issus de l'alcool coniférylique (Sjöström, 1993).

Les liaisons inter-monomériques les plus fréquentes chez les angiospermes sont les liaisons de type non condensé (alkyl aryl éther β-O-4) (Figure 8). En effet, les lignines de ces plantes contiennent des unités S, où les carbones C_3 et C_5 ne sont pas disponibles pour établir des liaisons parce qu'ils sont méthoxylés; seule la fonction phénolique en position C_4 et la chaîne latérale restent libres pour le couplage radicalaire. Les autres liaisons inter-monomériques sont de type condensé carbone - carbone (β-5, β-1, β-β, 5-5). Elles sont abondantes dans les lignines de Gymnospermes qui présentent une forte proportion d'unités G, où le carbone C_5 peut être engagé dans une liaison C-C (Figure 8).

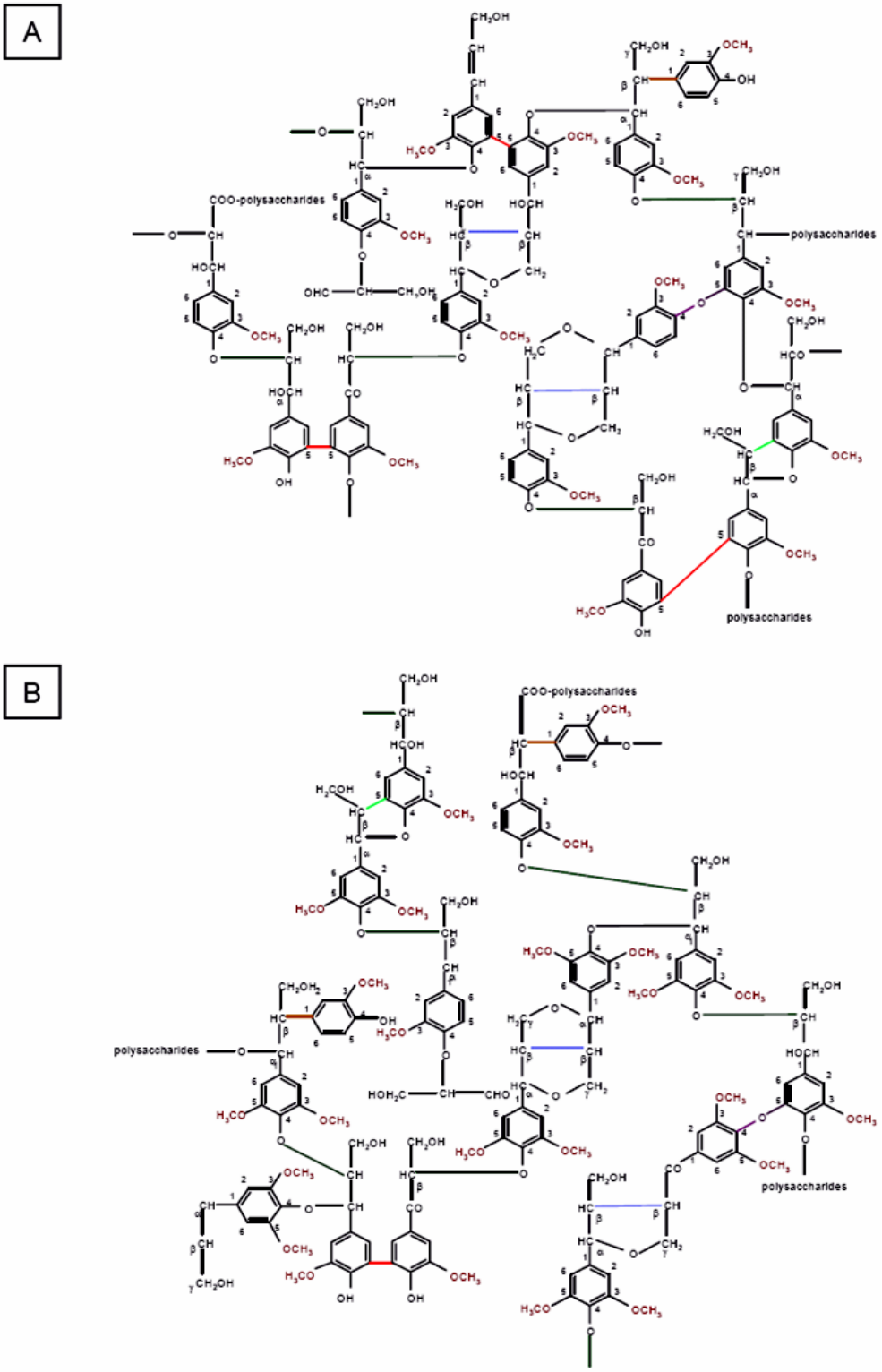


Figure I.8. Schéma simplifié de la lignine (Hoffmann, 2003a).

A: Lignines de Gymnosperme.
B: Lignines d'Angiosperme.
Ceci est une représentation schématique ne tenant pas compte de la fréquence des différents types de liaisons intramoléculaires. Les polysaccharides pariétaux sont liés aux monomères de lignines par des liaisons esters ou par des liaisons éthers.

Les lignines peuvent établir des liaisons avec d'autres molécules comme les polysaccharides et les acides hydroxycinnamiques par des liaisons esters ou éthers, en particulier dans le cas des lignines de graminées (Figure 9) ou encore être liée aux glycoprotéines et aux tannins (Monties, 1989).

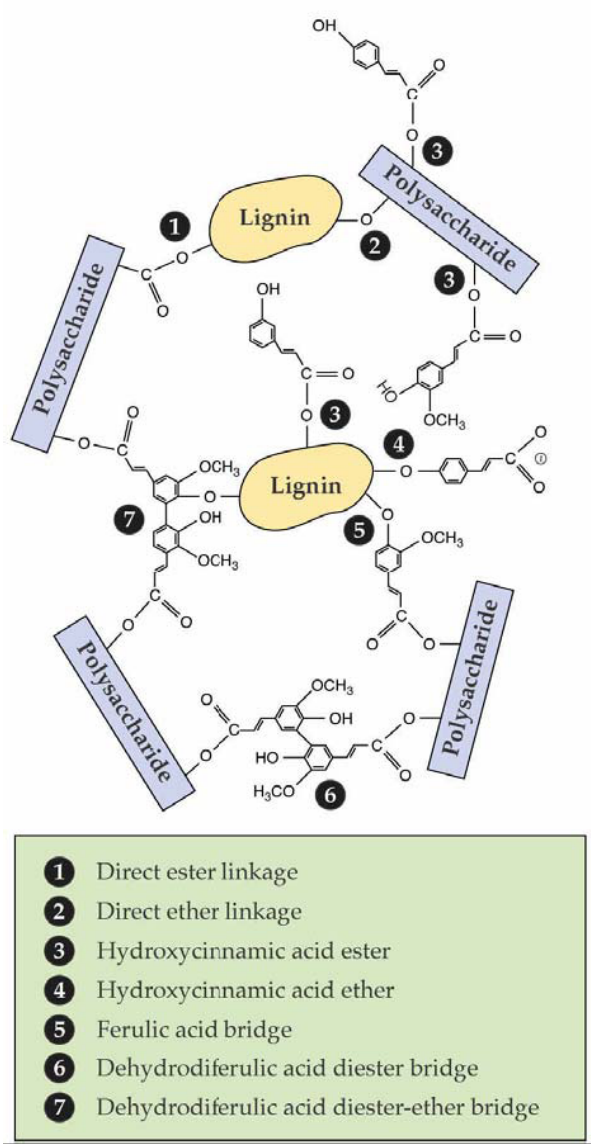


Figure I.9. Liaisons possibles entre les polysaccharides pariétaux et les lignines de graminées (Buchanan et al., 2000).

I.3.4.2. Biosynthèse des monolignols

Bien que les premières études sur la biosynthèse des lignines aient commencé dans les années 50 (Higuchi, 1990), des découvertes importantes ont été faites ces dernières années. Facilitées par la combinaison de la biologie moléculaire, la génétique, la modélisation, la biochimie et la physiologie, ces découvertes sont à

la base des mises à jour successives des schémas proposés pour la voie de biosynthèse des monolignols (Boerjan et al., 2003; Barriere et al., 2004; Sibout et al., 2005; Chiang, 2006; Besseau et al., 2007).

La biosynthèse des précurseurs des lignines «les monolignols», (Figure 10) commence par la désamination de la chaîne latérale de la phénylalanine (PHE). Elle est transformée en acide cinnamique par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), puis subit une première hydroxylation du noyau phénolique en position 4 par l'action de la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et une thioestérification du group carboxyle par la 4-coumarate CoA ligase (4CL). Le *p*-coumaroyl-Coenzyme A ainsi synthétisé est un constituant de la voie commune de biosynthèse des phénylpropanoïdes dont font partie les lignines, les flavonoïdes et d'autres composées phénoliques. A partir de ce composé, il est possible de synthétiser le monolignol H. Le *p*-coumaroyl CoA est converti en *p*-coumaroyl-shikimate ou *p*-coumaroyl-quinate par une *p*-hydroxycinnamoyl-CoA transférase (HCT). Ces esters sont ensuite hydroxylés en dérivés caféiques par une 3-hydroxylase (C3H), puis reconvertis en caféoyl-CoA grâce à la réversibilité de l'activité HCT. Pour former le féruloyl-CoA, précurseur des unités G, la caféoyl-CoA *O*-méthyltransférase (CCoAOMT) méthyle le caféoyl CoA en position 3 du noyau phénolique. Ces deux précurseurs (le *p*-coumaroyl-CoA et le féruloyl-CoA) sont réduits ensuite en *p*-coumaraldéhyde et en coniféraldéhyde respectivement par l'action d'une cinnamoyl-CoA réductase (CCR). Enfin, ces aldéhydes sont réduits en alcools *p*-coumarylique et coniférylique par la cinnamyle alcool déshydrogénase (CAD). L'alcool sinapylique, précurseur des unités S, est synthétisé en deux étapes, à partir du coniféraldéhyde et/ou de l'alcool coniférylique, par une hydroxylation suivie d'une méthylation en position 5 du noyau phénolique, catalysées respectivement par la férulate-5-hydroxylase (F5H) et l'acide caféique *O*-méthyltransférase (COMT) (Osakabe et al., 1999). Les monolignols synthétisés dans le cytosol sont stockés sous forme de glucosides et transportés vers la paroi où ils sont déglycosylés avant d'être polymérisés. La polymérisation est initiée par un mécanisme d'oxydation enzymatique faisant intervenir des peroxydases et/ou des laccases qui génèrent des radicaux se couplant spontanément (Jouanin and Lapierre, 2006).

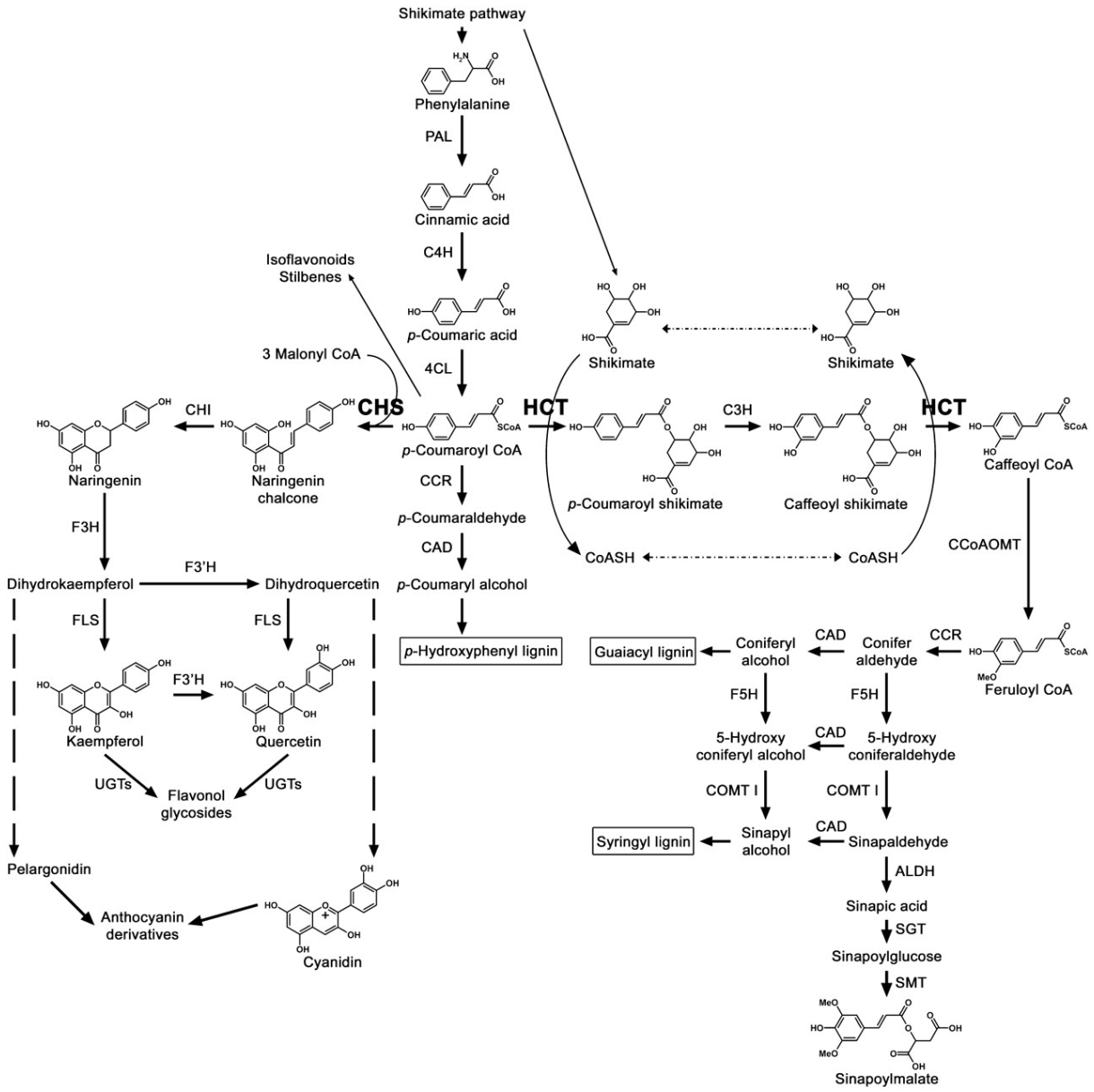


Figure I.10. Biosynthèse des monolignol (D'après Besseau et al., 2007).

L'utilisation d'*Arabidopsis thaliana* pour l'étude de la voie de biosynthèse des lignines est relativement récente car sa petite taille et sa croissance en rosette ne la désignaient pas, *a priori*, comme un modèle adapté à l'étude de la lignification. La composition des lignines d'*Arabidopsis* est typique des Angiospermes Dicotylédones mais la fraction labile accessible aux méthodes d'analyse est plus faible que celui des arbres (Jouanin and Lapierre, 2006). Cependant, depuis que son génome a été déchiffré, cette petite plante est devenue l'organisme modèle pour la recherche dans le secteur végétal.

Chez *Arabidopsis* le premier gène muté de la voie métabolique des lignines est le gène codant la férulate-5-hydroxylase (F5H) (Chapple et al., 1992). Ce mutant synthétise des lignines déficientes en unités syringyles, sans modification de développement, et se caractérise par l'absence d'un composé majeur dérivant du métabolisme des phénylpropanoïdes, le sinapoylmalate, dont la disparition provoque une modification de la fluorescence de ses feuilles sous UV. Après ce mutant, de nombreuses études on été développées chez *A. thaliana*, sur des enzymes qui interviennent dans la formation de la paroi secondaire et plus particulièrement dans la biosynthèse des lignines.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié la biochimie et la cytologie des parois de lignées d'*A. thaliana* présentant des mutations sur la CCR, enzyme qui permet la conversion des fonctions cinnamoyl-CoAs en aldéhydes, sur la CAD enzyme qui permet la réduction des aldéhydes en alcools correspondants, sur une aldéhyde déshydrogénase (nommée REF1) qui catalyse l'oxydation du sinapaldéhyde et du coniféraldéhyde en acide sinapique et en acide férulique, respectivement, et sur la F5H enzyme qui catalyse l'étape d'hydroxylation en position 5 du noyau aromatique. Ces mutations portent sur des gènes de la biosynthèse des lignines et il est nécessaire d'analyser les modifications que cela provoque dans les plantes mutantes, tant au niveau biochimique qu'au niveau structural et ultrastructural.

CHAPITRE II:

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel végétal

Le matériel étudié est constitué des hampes florales d'*Arabidopsis thaliana*. Les analyses globales de lignines sont réalisées sur les hampes collectées à complète maturité. Le matériel étudié en cytologie et immunocytologie est échantillonné dans la partie basse des hampes florales encore vertes et âgées de 6 semaines. Les lignées étudiées correspondent aux écotypes Columbia-0 (Col-0) et Wassilewskija (Ws), lignées normales (ou «sauvage», wild-type) et lignées mutantes correspondantes. Les lignées mutantes ont été sélectionnées et cultivées par l'équipe de L. Jouanin, laboratoire de Biologie Cellulaire de l'INRA-Versailles. Les modifications génétiques ont porté sur des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des monolignols. L'ARN messager des gènes n'est plus détecté dans les lignées transformées (mutants nuls).
Les mutants retenus sont:

- Mutant nul *ccr 1* pour la cinnamoyl-CoA réductase 1 obtenu en fond génétique Col-0.
- Double mutant *cad-c* x *cad-d* pour les 2 isoformes CAD C et CAD D de la cinnamyl-alcool déshydrogénase, obtenu en fond génétique Ws (Sibout et al., 2005).
- Triple mutant *cad-c* x *cad-d x ref1*, le gène *REF1* codant pour une aldéhyde déshydrogénase capable d'oxyder le sinapaldéhyde ou le coniféraldéhyde en acide sinapique et en acide férulique, respectivement (Nair et al., 2004).
- Mutant nul EBL87 pour la férulate 5-hydroxylase F5H en fond génétique Ws, analogue au mutant *fah* obtenu par l'équipe de Chapple dans le fond génétique Col-0 (Chapple et al., 1992).

II.2. Lignines de synthèse (déhydropolymères ou DHP)

Les lignines de synthèse ou DHP ont été fournies au laboratoire par le Pr. O. Faix (Federal Research centre for Forestry and Forest Products, Hamburg, Germany) et par le Dr. K.I. Kuroda (Institute of Agricultural and Forest Engineering,

University of Tsukuba, Japan). Elles ont été utilisées pour obtenir des anticorps anti-lignines spécifiquement dressés contre certains motifs structuraux de ces polymères.

Ces modèles de lignines synthétiques produites par polymérisation déshydrogénative (DHP) ont été synthétisés selon deux modes classiques de polymérisation in vitro (Sarkanen, 1971) des alcools *p*-OH cinnamyliques (méthodes *Zulauf* et *Zutropf*).

Le principe de la méthode *Zulauf* (**zl** ou «à la verse») repose sur l'ajout des alcools précurseurs des lignines de façon massive dans le milieu réactionnel contenant la peroxydase et l'eau oxygénée. Ce protocole fournit des lignines synthétiques riches en liaisons dites «condensées» carbone-carbone (C-C), essentiellement représentées par les structures phénylcoumarane (avec liaison β-5) et résinol (avec liaison β-β) (Figure 1).

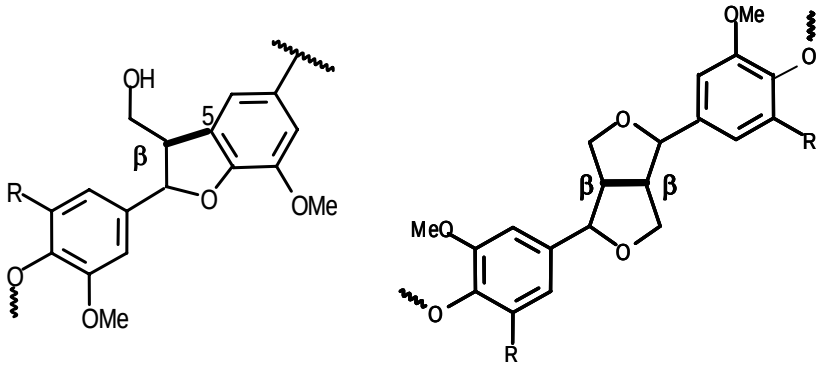


Figure II.1. Principales liaisons inter-unités contenues dans les DHPs dits condensés (obtenus par la méthode *Zulauf*) R = H ou OMe. Ces liaisons correspondent aux structures phénylcoumaranes (à gauche) et pinorésinol (à droite).

Le principe de la méthode *Zutropf* (**zt** ou à la goutte) repose sur la très lente addition des alcools précurseurs des lignines dans le milieu réactionnel contenant la peroxydase et l'eau oxygénée. Ce protocole fournit des lignines synthétiques plus riches en liaisons dites «non condensées», essentiellement représentées par les structures β-O-4 (Figure 2).

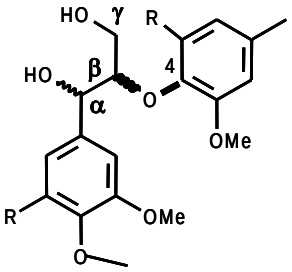


Figure II.2. Liaisons non condensées de type β-O-4.

Les anticorps anti-lignines ont été obtenus à l'aide des DHPs suivants:

- Un DHP obtenu à partir d'alcool coniférylique et par la méthode *Zulauf*. Ce DHP est donc riche en liaisons condensées et constitué uniquement d'unités gaïacyles (**G-zl**) (Ruel et al., 1994).
- Un DHP obtenu à partir d'un mélange équimolaire d'alcool coniférylique et d'alcool sinapylique et par la méthode *Zulauf*. Ce DHP est donc riche en liaisons condensées et constitué d'un mélange d'unités gaïacyles et syringyles (**GS-zl**) (Ruel et al., 1994).
- Un DHP obtenu à partir d'un mélange 5:1 d'alcool sinapylique et d'alcool coniférylique respectivement et par la méthode *Zutropf* (**S/C-zt**) (Izumi and Kuroda, 1997).
- Un DHP obtenu à partir d'alcool sinapylique, constitué uniquement d'unités S et riches en liaisons non condensées (**S-zt**) (Faix, 1986).
- Un DHP obtenu par polymérisation de coniféraldéhyde avec la méthode *Zulauf* (résultats non publiés)

II.3. Les anticorps utilisés

Les antisera polyclonaux dirigés contre des polymères de lignine obtenus par déshydrogénation radicalaire (DHP) ont été préparés chez le lapin à partir de chacun des DHP sélectionnés (Ruel et al., 1994). Pour chaque DHP, deux à trois lapins ont été immunisés. Les suspensions de DHP à 1 mg/mL ont été réalisées dans un mélange eau/DMSO (80/20, V/V) puis soniquées 30 secondes. Des injections intradermiques sont alors effectuées en diluant l'antigène avec de l'adjuvant de Freund complet pour la première injection puis avec l'adjuvant de Freund incomplet pour les trois rappels mensuels suivants. Les échantillons de sang sont prélevés huit jours après chaque injection. Les lapins ont été sacrifiés six mois après la première injection et la récupération du sang a été effectuée par ponction cardiaque.

II.3.1. Antisera dirigés contre les structures condensées des lignines obtenues par la méthode *Zulauf* zl

- Anticorps dirigé contre les unités gaïacyles condensées (anti-G-zl) (Ruel et al., 1994; Joseleau and Ruel, 1997).

- Anticorps dirigé contre les unités condensées gaïacyles et syringyles (**anti-GS-zl**) (Ruel et al., 1994; Joseleau and Ruel, 1997).
- Anticorps dirigé contre les structures dibenzodioxocines (**anti-dibenzodioxocine**) (Kukkola et al., 2003).

II.3.2. Antisera dirigés contre les structures dites non condensées obtenues par la méthode *Zutropf* zt

- Anticorps dirigé contre les unités mixtes gaïacyles et syringyles (**anti-S/C-zt**) (Joseleau et al., 2004a).
- Anticorps dirigé contre les unités syringyles non condensées (**anti-S-zt**) (Joseleau et al., 2004a).

II.4. Observations microscopiques

II.4.1. Observation en Microscopie Electronique à Balayage

La Microscopie électronique à balayage (M.E.B) est une technique qui permet l'observation de la surface d'un échantillon, grâce à l'utilisation d'un faisceau d'électrons. Pour la formation de l'image, les électrons incidents excitent la couche superficielle de l'échantillon, produisant une émission d'électrons secondaires. Ceux-ci ont plus facilement émis par les reliefs de la surface de l'échantillon, donnant naissance à des zones lumineuses alors que les creux apparaîtront plus sombres. On reconstitue ainsi l'image de la surface de l'échantillon.

II.4.1.1. Préparation des échantillons

La qualité des images en trois dimensions obtenues grâce au M.E.B, est directement reliée à la nature de l'échantillon étudié et à la qualité de la préparation de celui-ci. Par nature, les échantillons biologiques contiennent de l'eau et sont plus ou moins mous. Ils nécessitent donc une préparation plus attentive qui vise à les déshydrater sans en détruire la paroi des cellules. Un recouvrement d'or ou d'or-palladium est recommandé pour rendre les échantillons conducteurs et pouvoir obtenir images topographiques de qualité.

- *Fixation aldéhydique*

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures cellulaires des tissus du matériel étudié, tout en s'efforçant de conserver ces structures pour que l'on puisse observer l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état natif. Un mélange contenant 0.2 % de glutaraldéhyde et 2 % de paraformaldéhyde dans un tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.0-7.04 de composition identique à celle utilisée en Microcopie électronique à transmission (M.E.T), a été retenu. Le protocole de fixation se déroule à température ambiante. Les échantillons de tiges (partie basse) d'*A. thaliana* ont été coupés en petits morceaux de 11 mm de long pour faciliter leur transfert dans les réactifs successifs. Le mélange de fixation doit être préparé juste avant la manipulation dans un tampon phosphate frais contenant de l'azoture de sodium (NaN_3 2 mM). La fixation dure 2 heures à température ambiante avec plusieurs alternances vide/entrée d'air puis une nuit à 4°C. Le matériel est ensuite rincé dans 4-5 bains de tampon phosphate 0.05 M pH 7.4 de 15 min chacun puis, lavé dans 3 bains de 15 min d'eau distillée.

- *Déshydratation*

Une déshydratation alcoolique des échantillons est réalisée, à température ambiante, par passage dans différents bains successifs d'éthanol de concentration croissante: 20 %, 40 %, 60 %, 80 % 90 % et 100 % (2 fois). Chaque bain a une durée de 15 min plus 1 bain de toute la nuit dans l'éthanol à 100 %.

- *Séchage par contournement du point critique*

Cette étape de préparation consiste en un séchage progressif des échantillons, pour ne pas altérer leur structure d'origine par des phénomènes de racornissement qui engendreraient un écrasement général des parois des cellules de manière irréversible. Pour éviter ces phénomènes, un contournement du point critique au CO_2 des échantillons est réalisé dont le principe est de passer de l'état liquide à l'état gazeux sans transition de phase visible, c'est-à-dire en évitant les discontinuités des propriétés physico-chimiques observées lors du franchissement de la courbe d'équilibre liquide-gaz. Durant la transformation de phase liquide - gazeux, la tension de surface entre le gaz et le liquide peut endommager les tissus. Un moyen de contourner cette tension de surface est de passer directement de l'état subcritique à l'état supercritique en contournant le point critique. Dans la phase supercritique, la densité du gaz et du liquide sont identiques. Le passage liquide-gaz

se fait doucement. Le principe consiste donc à remplacer l'eau contenue dans les échantillons par de l'alcool puis par du CO_2 liquide. Ce CO_2 liquide passe ensuite à l'état gazeux sous pression en augmentant la température. Celle-ci doit être supérieure à la température critique du CO_2 (31.5°C à 72 bars).

- *Recouvrement et observation des échantillons*

Les techniques d'analyse par M.E.B conventionnel (chambre sous vide) nécessitent un échantillon propre et recouvert d'une fine pellicule conductrice d'or, ou d'alliage d'or et palladium ou de carbone, ce recouvrement minimise l'effet de charge qui se produit sur les échantillons non conducteurs (échantillons biologiques). Les électrons primaires qui n'interagissent pas avec les atomes de l'échantillon, lors de l'analyse, s'accumulent à la surface de l'échantillon, ces électrons interférents, produisant un potentiel négatif qui déforme la trajectoire du faisceau primaire et ainsi provoque une forte distorsion de l'image. Le dépôt d'une mince couche conductrice (alliage d'or et palladium) d'environ 6 à 15 nm permet d'obtenir des images topographiques en trois dimensions de qualité, éliminant l'effet de charge, sans nuire d'une façon significative à la pénétration des électrons du faisceau primaire dans l'échantillon. Le dépôt d'or-palladium se fait à l'aide d'un évaporateur cathodique JEOL JFC 1100, pendant 180 secondes à une tension de 8 mA. Ensuite les échantillons sont observés au microscope électronique à balayage JEOL JSM 6100 (pouvoir de résolution de 15 nm).

II.4.2. Observation en Microscopie Electronique à Transmission

La Microscopie électronique à transmission (M.E.T) est une technique qui permet l'observation de l'ultrastructure d'un échantillon, grâce à l'utilisation d'un faisceau d'électrons. Lors de la formation d'une image, les électrons incidents provenant de la source sont soit totalement arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis. Dans le cas du M.E.T un diaphragme objectif élimine les électrons déviés. Les électrons arrêtes se traduisent à l'observation par des zones sombres. Les électrons transmis correspondent, à l'observation, à des zones claires.

II.4.2.1. Préparation des échantillons

Avant de pouvoir être observés en M.E.T, les échantillons biologiques doivent subir une série d'étapes préparatoires. La préparation des échantillons est une

phase très importante. C'est elle qui déterminera en partie la qualité des résultats obtenus.

- *Fixation aldéhydique*

Cette étape qui a pour but d'immobiliser les structures cellulaires des tissus du matériel étudié, tout en s'efforçant de conserver ces structures pour que l'on puisse observer l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état natif, a été décrite dans le paragraphe M.E.B. Un mélange contenant 0.2% de glutaraldéhyde et 2% de paraformaldéhyde dans un tampon phosphate de sodium 0.1 M pH 7.0-7.04 a été utilisé.

- *Déshydratation*

La déshydratation est indispensable car l'inclusion doit être réalisée dans une résine non hydrosoluble et elle doit être suffisamment progressive pour préserver l'intégrité des tissus. Une déshydratation éthanolique des échantillons est réalisée, à température ambiante, par passage dans différents bains successifs d'éthanol de concentration croissante: 25 %, 50 % (2 fois), 70 % et 80 % (3 fois). Chaque bain à une durée de 20 min.

- *Infiltration dans la résine*

La résine utilisée est une résine acrylique partiellement hydrophile [London Resin White (LRW), Hard Mixture, England)]. Cette résine a été choisie pour plusieurs raisons: Elle a la capacité de conserver l'antigénicité des protéines, elle permet des réactions sur coupes ultrafines (cytochimie et immunocytochimie) et est stable sous le faisceau d'électrons. Des plus elle est peu visqueuse et pénètre facilement les tissus. Les échantillons fixés et déshydratés sont progressivement imprégnés de résine par passage dans des bains successifs de 30 min chacun à température ambiante de solutions d'éthanol/ résine LRW (résine dégazée) en proportion croissante: 2/1, 1/1, 1/2 (v/v) et de résine pure. Au stade pur, une alternance vide/entrée d'air assure une bonne pénétration de la résine dans les tissus. Les échantillons sont ensuite laissés dans un bain de résine une nuit à 4 °C.

- *Inclusion et polymérisation*

Chaque échantillon ayant subi les précédents traitements est placé au fond d'une capsule de gélatine (TAAB N° 00) de 5.5 mm de diamètre et d'un volume de 0.3 mL contenant 0.15 à 0.2 mL de résine LRW 100% fraîchement dégazée au

préalable. Les gélules sont soigneusement fermées et placées dans un four à 50°C pendant 24h (polymérisation).

II.4.2.2. Ultramicrotomie

Les échantillons inclus sont débités en coupes transversales ultrafines de 50 nm d'épaisseur (les électrons incidents provenant de la source ne peuvent pénétrer que dans des coupes ultrafines de 50 à 80 nm maximum) à l'aide d'un ultramicrotome (UC6, Leica) et d'un couteau en diamant d'angle de coupe 45°. Les coupes ultrafines sont récupérées sur anneaux en plastique ou sur grilles en or de 200 mesh (préalablement carbonées), selon l'utilisation ultérieure.

II.4.2.3. Marquages des ultracoupes pour l'observation en M.E.T

Les réactions de marquage sont réalisées sur ultracoupes récupérées soit sur anneaux en plastique ou sur grille en or, ces réactions sont des réactions de surface.

- *Marquage cytochimique: Technique du P.A.T.Ag (Periodic Acid Thiocarbohydrazide silver proteinate)*

La méthode du P.AT.Ag (Thiery, 1967), permet la mise en évidence de la majorité des polysaccharides pariétaux. Cette technique a été mise au point dans le domaine végétal par Reis et Roland (Reis and Roland, 1974) et modifiée par Ruel (Ruel et al., 1977), pour pouvoir obtenir un marquage des parois secondaires lignifiées. Le principe est basé sur l'oxydation périodique des fonctions alcool vicinales des sucres (Figure 3). 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 soufre transparents aux électrons. Les grains d'argent (50 Å de diamètre), denses aux électrons ainsi présents 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 periodate (Figure 3). 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.

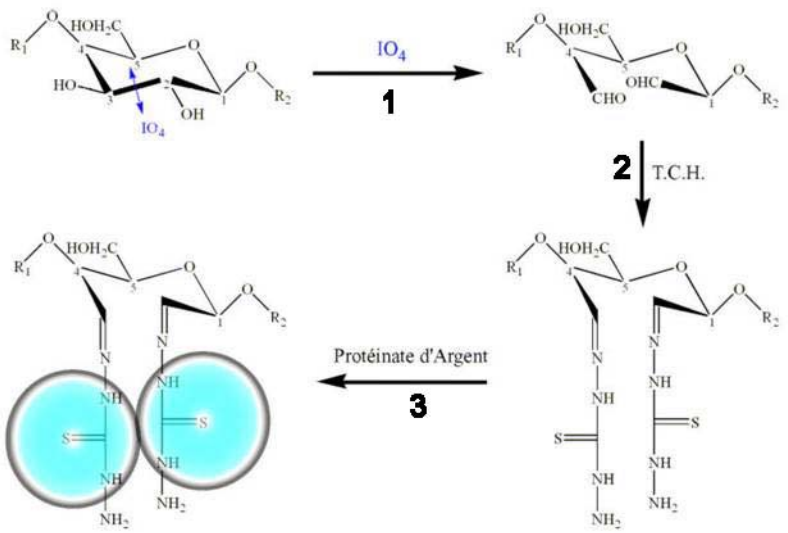


Figure II.3. Principe du marquage des polysaccharides en M.E.T par la méthode du P.A.T.Ag. 1. Oxydation periodique des sucres au niveau des alcools vicinaux. Ouverture du cycle osidique et création de fonctions aldéhydiques. 2. Réaction d'un compose soufré (TCH) sur les fonctions aldéhydiques. 3. Formation d'un complexe métallique opaque aux électrons sur les résidus soufre, par action du proteinate d'argent.

Ce marquage se déroule à température ambiante. Les ultracoupes récupérées sur anneaux en plastique ou sur grilles en or carbonées, sont mises à flotter sur une solution d'acide périodique à 5 % (p/v dans de l'eau distillée) durant 1h30 min. Après 5 rinçages de 3 min dans l'eau distillée, les coupes sont transférées sur une solution de T.C.H à 0.2 % (p/v dans l'acide acétique 20 %) pendant 48h. Les coupes sont ensuite soigneusement rincées par flottage sur des solutions d'acide acétique de concentrations décroissantes: 20 %, 10 %, 5 % et 2.5 %. Ce gradient de concentrations d'acide acétique permet d'éviter un choc osmotique. Puis, les coupes sont passées sur de l'eau distillée (4 fois 5 min). La coloration au protéinate d'argent 1 % (p/v dans de l'eau distillée) est effectuée pendant 30 min à l'obscurité. Les coupes contenues sur des anneaux sont finalement rincées sur plusieurs bains d'eau distillée et ensuite transférées sur grilles en cuivre carbonées, séchées sur papier filtre.

- *Marquage immunocytochimique*

La technique du marquage immunocytochimique est basée sur l'aptitude que possède un anticorps à se lier spécifiquement à son antigène (Figure 4). L'interaction antigène-anticorps dépend de nombreuses forces attractives intermoléculaires et est donc très sensible aux variations de pH et de molarité d'où l'importance de la molarité et du pH des tampons utilisés lors de nos expériences. Afin de déterminer la

concentration de l'anticorps permettant d'obtenir la réponse spécifique optimale, plusieurs dilutions progressives sont effectuées en parallèle. Pratiquement, la première gamme de dilution réalisée doit être large, puis le résultat est affiné par des dilutions plus resserrées autour de la zone optimale.

Principe: Il s'agit d'un marquage de surface indirect en deux étapes qui s'effectue sur ultracoupes et donc après inclusion de l'échantillon. Ce marquage est réalisé sur des anneaux en plastique dans lesquels flottent les coupes. Les incubations sont effectuées sur des gouttes de 50 µL des différents réactifs déposés sur du para film. Les tampons de travail utilisés sont le tampon Tris (Tris Buffered Saline ou TBS_{500}: Tris-HCl 0.01 M pH 7.6, NaCl 500 mM) et le tampon phosphate (Phosphate Buffered Saline ou PBS: 0.01 M, pH 7.4); choisis pour leur adaptabilité au matériel végétal. Le tampon PBS évite la dissociation du complexe à l'or (au moment de l'utilisation du marqueur secondaire). Dans une première étape et pour bloquer les interactions non-spécifiques avec les aldéhydes du fixateur qui n'auraient pas été éliminés après fixation, on a utilisé de la glycine 0.15 M, diluée dans le TBS_{500}.

Le complexe anticorps-antigène est rendu opaque aux électrons par un marqueur secondaire couplé à l'or colloïdal. Pratiquement la protéine A est diluée dans un mélange PBS 0.01 M, pH 7.4 / gélatine de poisson 0.15 % p/v pour éviter le bruit de fond. L'or de granulométrie 5 nm a été retenu, ce qui permet d'obtenir un marquage plus dense. Afin d'améliorer la visualisation du complexe en M.E.T, il est préférable d'intensifier la taille des grains d'or par un enrobage à l'argent (Danscher and Norgaard, 1983; Holgate et al., 1983). Cette technique repose sur le principe suivant: des ions argent sont ajoutés à un révélateur photographique classique. Ces ions et les molécules réductrices d'hydroquinones du révélateur viennent adhérer à la surface des particules d'or. Après avoir été oxydées, les molécules d'hydroquinones se détachent permettant à de nouvelles molécules de venir adhérer et ainsi de suite. Les particules d'or sont ainsi progressivement encapsulées par l'argent. (Figure 4). Le protocole de marquage immunocytochimique est décrit dans le Tableau 1.

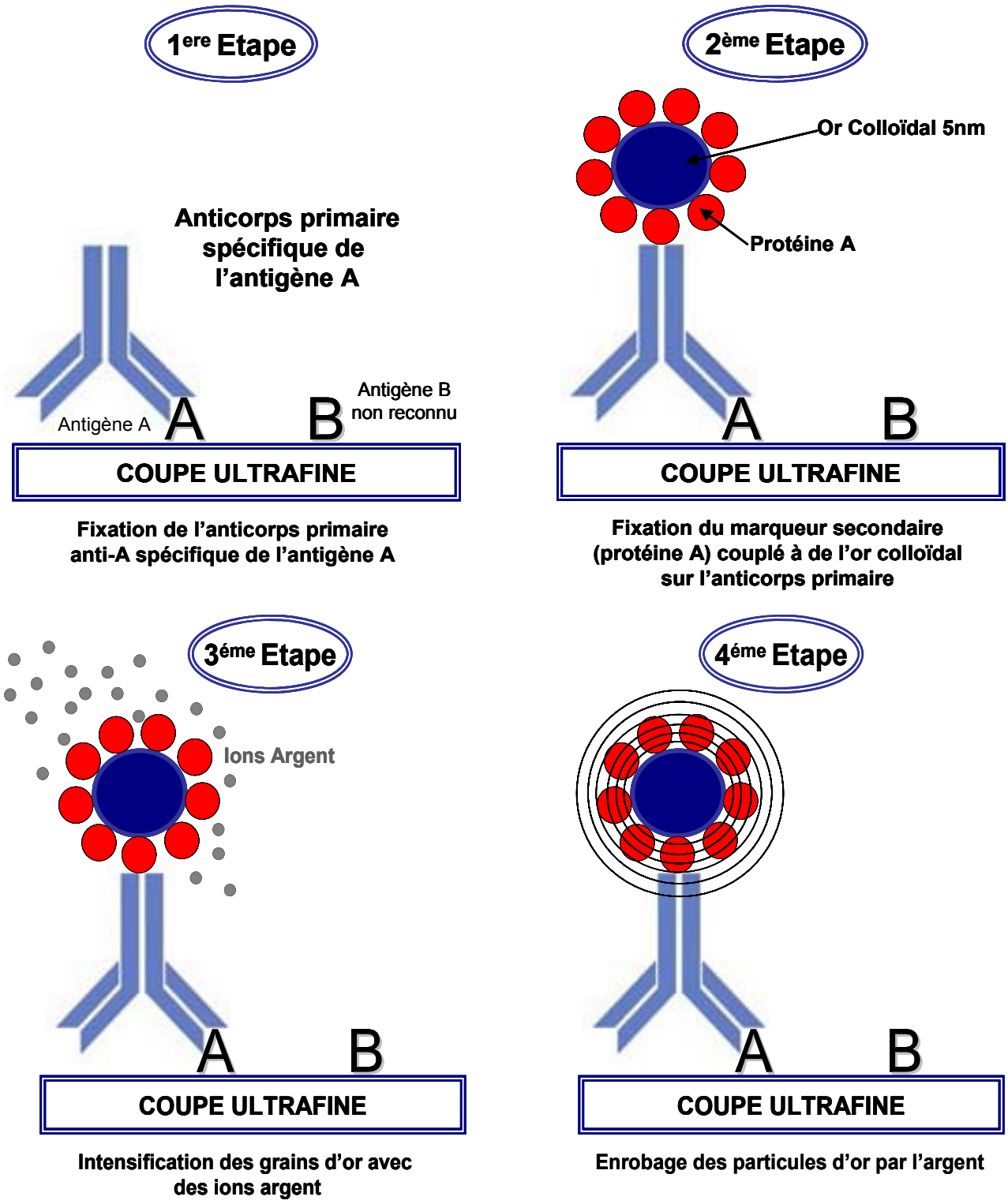


Figure II.4. Principe du marquage immunocytochimique indirect (étapes 1 et 2) et de l'intensification à l'argent de la taille des grains d'or (étapes 3 et 4)

Tableau II.1: Protocole de marquage immunocytochimique indirect utilisé au laboratoire pour le marquage des tissus végétaux (Joseleau and Ruel, 1997).

Etape	Durée
Blocage des sites aldéhydiques	
TBS_{500} (Tris Buffered Saline) 0.01 M, pH 7.6 / Glycine 0.15 M	15 min
Rinçages	
TBS_{500} 0.01 M, pH 7.6	4 x 3 min
Blocage des interactions non spécifiques protéine-protéine	
TBS_{500} 0.01 M, pH 7.6 / lait 5 % (p/v)	30 min
Formation du complexe Antigène-Anticorps (Ag-Ac)	
Anticorps dilué dans TBS_{500} / lait	3 h à T° ambiante + 1 nuit à 4 °C
Rinçages	
TBS_{500} 0.01 M, pH 7.6	5 x 3 min
PBS (Phosphate Buffered Saline) 0.01 M, pH 7.4	3 x 2 min
Marquage secondaire: visualisation du complexe Ag-Ac	
Protéine A 5 nm diluée 1/30 dans PBS 0.01 M, pH 7.4 /gélatine de poisson 0.15 % (p/v)	90 min
Rinçages	
PBS 0.01 M, pH 7.4	4 x 2 min
H_2O distillée	3 x 1 min
Post-Fixation	
Glutaraldéhyde 2 % (v/v) dans H_2O distillée	10 min
Rinçages pour éliminer toute trace qui pourrait faire précipiter l'argent: H_2O distillée	4 x 2 min
Intensification de l'or par enrobage à l'argent	
Kit intenSE mélange 1/1(v/v) des deux constituants	8 – 12 min
Rinçages	
H_2O distillée	3 rinçages rapides :3 x 3 min
Récupération des coupes sur grilles de cuivre carbonées	
Augmentation du contraste à l'acétate d'uranyle	
Acétate d'uranyle 2,5 % (p/v) dans H_2O distillée	2 min 30
H_2O distillée	1 rinçage très rapide

Ag= antigene **Ac= anticorps**

II.4.2.4. Observation en M.E.T et photographies

Les observations en M.E.T sont réalisées à 80 kV sur un microscope Philips CM200 Cryo (pouvoir de résolution de 0.3 nm). Les micrographies sont prises sur des plans film Kodak (E.M. film 4489) développés à l'aide du révélateur Kodak D19.

II.5. Analyse chimique des lignines

Avant de pouvoir être analysées, les hampes florales mâtures séchées et broyées doivent subir une série d'extractions au Soxhlet pour éliminer les composants présents dans le matériel végétal qui pourraient interférer avec l'analyse gravimétrique des lignines (il s'agit essentiellement des protéines).

Extractions Soxhlet realisées: 1ère Extraction avec le mélange éthanol-toluène (1:2, v/v) (12 h); 2ème Extraction avec l'éthanol (12 h); 3ème Extraction avec de l'eau (12 h). Les échantillons sont ensuite séchés quelques jours sous hotte a température ambiante et ensuite dans une étuve à 40°C pendant 24h. Le résidu final obtenu est appelé «résidu pariétal» ou RP.

II.5.1. Quantification des lignines

Deux méthodes sont couramment utilisées pour quantifier les lignines. La première méthode dite «méthode de Klason» (Dence, 1992), consiste à hydrolyser les polysaccharides pariétaux à l'aide d'acide sulfurique, tout en rendant le polymère de lignine insoluble. Le résidu final, nommé lignine de Klason (LK) ou lignine acido-insoluble, est filtré, lavé et enfin pesé. Une partie des lignines, dites lignines acido-solubles (LAS), peut être solubilisée dans le surnageant sulfurique. Cette fraction est évaluée par mesure de l'absorbance à 205 nm (Dence, 1992). La deuxième méthode dite «Au bromure d'acétyle», développée par Morrison (Morrison, 1972) et reprise par Fukushima et Hatfield (Fukushima and Hatfield, 2001) est une méthode spectrométrique: son principe est de solubiliser le résidu pariétal dans un réactif très agressif (mélange de bromure d'acétyle et d'acide acétique), de mesurer l'absorption de la solution à 280 nm et de la convertir en équivalent lignines.

II.5.1.1. Dosage des lignines par la méthode de Klason

La teneur en lignine acido-insoluble ou lignine de Klason est mesurée sur le matériel végétal (résidu pariétal) après l'extraction, selon un protocole standardisé résumé par Dence (1992). Il comporte une première phase d'hydrolyse par de l'acide sulfurique concentré (72 % p/p) à température ambiante, phase qui permet l'hydrolyse des polysaccharides et laisse un résidu correspondant à la Klason. Cette première hydrolyse est suivie d'une post-hydrolyse par l'acide sulfurique dilué (3 %) et à reflux, cette étape permettant de recondenser une fractin des lignines afin de faciliter la filtration ultérieure.

Dans la première phase de l'hydrolyse, 150 mg de résidu pariétal sont mis en présence de 2 mL d'H_2SO_4 72 % (p/p), dans un bécher de 10 mL. Après avoir malaxé le mélange à l'aide d'une baguette de verre, on laisse le récipient d'hydrolyse à température ambiante pendant 2 h, avec agitation manuelle à la baguette de verre à intervalles réguliers. Pour la post-hydrolyse, la suspension est diluée par 29 mL d'eau distillée, pour amener la solution à une concentration de 3% en H_2SO_4. Le milieu est ensuite porté à ébullition (sous reflux) pendant 3 heures. Après refroidissement, la solution est filtrée sur un creuset avec filtre préalablement taré, le résidu insoluble est lavé avec de l'eau distillée et séché dans une étuve à 105 °C pendant une nuit. Le résidu de lignine Klason isolé est pesé et par différence avec la masse initiale, le pourcentage de lignine Klason est déterminé.

II.5.1.2. Dosage des lignines par la méthode au bromure d'acétyle

Cette méthode est applicable à des prises d'essai d'une dizaine de milligrammes ou de quantités de lignines de quelques milligrammes. La méthode utilisée est celle de Fukushima et Hatfield (2001) (sans acide perchlorique qui conduit à des dosages erronés par excès). Elle présente, par rapport à la méthode de Klason, l'avantage d'être une micro méthode. Comme pour le protocole de Klason, le protocole qui suit correspond à la procédure suivie par l'équipe de l'Unité de chimie biologique et reportée dans les fiches collectées dans le cadre de la démarche qualité en recherche.

Dans cette méthode, les lignines sont solubilisées à chaud par une solution de bromure d'acétyle dans l'acide acétique glacial tandis que les polysaccharides sont hydrolysés. La solution concentrée est ensuite diluée par une solution de soude, les

ions polybromures qui absorbent à 280 nm sont détruits par le chlorhydrate d'hydroxylamine. L'absorbance de la solution diluée par l'acide acétique, mesurée à 280 nm, est convertie en quantité de lignine (coefficient d'aborption à 280 nm: 20 pour 1 mg/ml de lignine).

10 mg d'échantillon (résidu pariétal) sont mis en présence de 5 mL de bromure d'acétyle 17.4 % (v/v dans l'acide acétique, réactif préparé extemporanément) dans des tubes en verre à vis bouchés. La réaction est ensuite réalisée dans un bain d'huile à 50 °C pendant 2h15 min, avec agitation manuelle toutes les 20 min. Après refroidissement et dans de nouveaux tubes, 1.2 mL de NaOH 2 M (préparé dans l'acide acétique), 0.2 mL d'échantillon digéré, 0.3 mL d'hydroxylamine 0.5 M et 1.3 mL d'acide acétique, sont ajoutés. Après avoir homogénéisé la solution, on en mesure l'absorbance à 280 nm, contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions mais sans échantillon.

II.5.2. Caractérisation structurale des lignines par thioacidolyse

La structure des lignines est évaluée par thioacidolyse (Rolando et al., 1992) Cette approche qui permet d'identifier par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM) les monomères libérés par la coupure sélective des liaisons inter-unités non condensées de type β-O-4 est très utilisée (Figure 5) (Lapierre et al., 1986a). Cette méthode est spécifique des lignines et est très sensible. Le rendement en monomères thioéthylés H, G et S permet de déterminer la proportion d'unités H, G et S liées uniquement en liaison β-O-4. Une analyse supplémentaire des dimères libérés peut être réalisée après désulfuration sur nickel de Raney et donne accès aux autres types de liaisons intermonomériques (Lapierre et al., 1999). Cette analyse des dimères n'a pas été réalisée dans le cadre de cette étude.

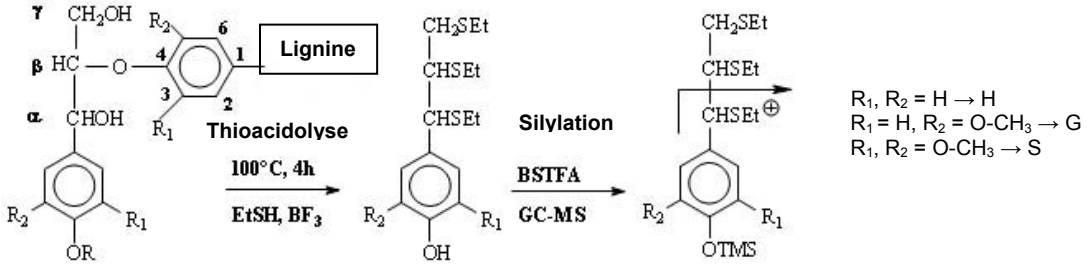


Figure II.5. Mécanisme de la thioacidolyse: les monomères thioéthylés H, G et S sont libérés à partir des unités liées seulement en β-O-4 et sont dosés par CPG-SM de leurs dérivés TMS sur des chromatogrammes reconstruits sur les ions spécifiques (ions benzyliques notés à droite du chemin réactionnel).

Le réactif de thioacidolyse est préparé extemporanément et sous la hotte en mélangeant 2.5 mL de BF_3 éthérate, 10 mL d'éthanethiol et en complétant à 100 mL avec du dioxanne. 25 mg de résidu pariétal sont mis en présence de 10 mL de réactif de thioacidolyse et de 100 µL d'étalons internes (C_{19}: 5 mg/mL; C_{21}: 5 mg/mL dans CH_2Cl_2) dans des tubes en verre à vis bouchés. La réaction est ensuite réalisée dans un bain d'huile à 100°C pendant 4 heures. Après refroidissement, la suspension ainsi que 3x10 mL d'eau de rinçage des tubes sont versés dans un bécher. L'acide de Lewis (BF_3) est détruit par ajout de $NaHCO_3$ 0.4 M, puis le milieu est un peu acidifié par quelques gouttes d'HCl 6 M avant extraction par CH_2Cl_2 (3x25 mL). Les extraits organiques combinés sont ensuite séchés sur Na_2SO_4 et évaporés sous pression réduite à 40 °C. Les produits de thioacidolyse sont repris dans 0,5 à 1 mL de CH_2Cl_2. Les échantillons sont ensuite silylés avant analyse. La silylation est réalisée en minitubes de 500 µL. La solution réactionnelle est constituée du thioacidolysat (20 µL), de 100 µL de BSTFA (bis-triméthyl-silyl-trifluoro-acétamide) et 10 µL de pyridine. L'ensemble est mis à réagir 1 h à température ambiante avant injection en CPG-SM.

Les échantillons sont analysés par CPG-SM à l'aide d'un ensemble Varian Saturn 2000 ou d'un ensemble Saturne 2100. La colonne utilisée est une colonne capillaire de polydiméthylsiloxane (30 m x 0.25 mm de diamètre interne, 0.25 µm d'épaisseur de film, Supelco SPB1) et le gaz vecteur est l'hélium (débit 1ml/min). 2 µL microlitres d'échantillon sont injectés. L'injecteur (fonctionnant en mode split/splitless) est à 280 °C, la ligne de transfert vers le spectromètre de masse est à 270°C et la colonne fonctionne en gradient de température selon le programme suivant : de 40°C à 180°C à + 30°C/min, puis de 180°C à 260°C à +2°C/min.

Les produits élués de la colonne pénètrent dans le spectromètre de masse (trappe ionique) où ils sont analysés par impact électronique (70 eV) et en mode balayage des ions (plage de masse balayée 45 à 650 m/z). Les produits monomères majeurs H, G ou S, analysés sous forme de leurs dérivés triméthylsilylés (TMS) sont dosés sur des chromatogrammes reconstruits sur leurs ions spécifiques (pics de base de leurs spectres de masse) à m/z 239, 269 et 299 respectivement. Les hydrocarbures étalons internes sont dosés sur des chromatogrammes reconstruits sur leurs ions spécifiques également (57+71+85). La quantification est ensuite réalisée en utilisant un coefficient de réponse (rapport des concentrations relatives

sur les surfaces relatives) déterminé à l'aide de solutions standards de produits S et G et d'étalon interne.

II.5.3. Caractérisation structurale des lignines par thioacidolyse des échantillons pre-méthylés

Afin de déterminer la distribution des groupes phénoliques libres dans les unités G, S et/ou H engagées uniquement par des liaisons β-O-4 (Figure 6), une analyse par thioacidolyse des échantillons pre-méthylés est réalisée (Lapierre and Rolando, 1988).

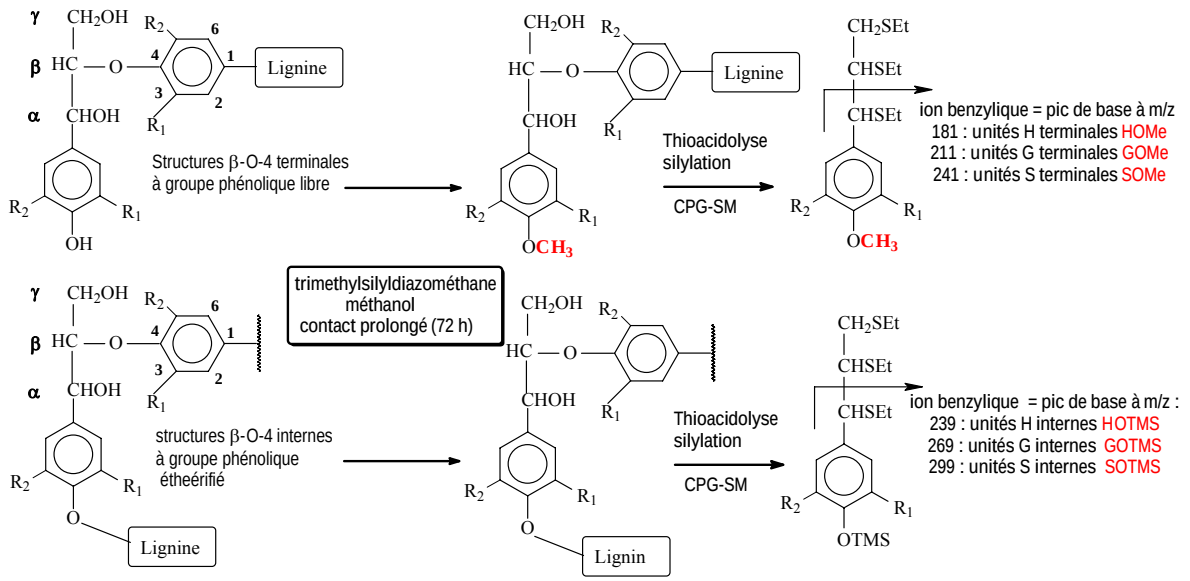


Figure II.6. Principe de thioacidolyse des échantillons pre-méthylés: les unités terminales méthylées et les unités internes non méthylées sont dosées sur les ions spécifiques notés respectivement au bout du chemin réactionnel supérieur et du chemin réactionnel inférieur

Dans des tubes en verre à vis bouchés et sous la hotte, 25 mg de résidu pariétal sont mis en contact avec 2 mL de méthanol et 0.5 mL de triméthylsilyldiazométhane 2 M (solution commerciale dans l'hexane). La réaction est laissée à température ambiante et dans l'obscurité pendant 24 h, avec agitation constante. Une 2ème et une 3ème fraction de réactif est ajoutée par 24h. Après 72 h de contact, le milieu réactionnel est évaporé sous azote. L'échantillon pre-méthylé est ensuit rincé plusieurs fois avec le pentane, séché et pesé avant de subir la méthode de thioacidolyse, décrite dans le paragraphe II.5.2. Les monomères silylés ou

méthylés sont dosés sur des chromatogrammes reconstruits sur leurs ions spécifiques (Figure 6).

II.6. Autres méthodes

II.6.1. Analyse globale des polysaccharides

La méthode utilisée est celle dite de Saeman (Saeman et al., 1954) comportant une première phase d'hydrolyse par de l'acide sulfurique à forte concentration (72 %) à 25 °C, suivie d'une seconde phase par l'acide sulfurique dilué (1 Molaire) à 100 °C.

- *Hydrolyse acide*

Dans des tubes pyrex à vis, 10 mg de résidu pariétal sont mis en présence de 0.15 mL d'acide sulfurique 72 % (p/p), après avoir malaxé à l'aide d'une baguette en verre, l'hydrolyse est laissé à 25°C pendant 4 heures, avec agitation sporadique à l'aide de la baguette en verre. Dans la seconde phase de l'hydrolyse, le mélange est alors dilué avec la solution d'étalon interne (inositol 0.8 mg/mL dans l'eau distillée) et de l'eau distillée, de façon à amener la concentration de H_2SO_4 à 1 M. Cette solution est alors hydrolysée dans un bain d'huile thermostaté à 100°C pendant 6 heures. Après hydrolyse, les tubes sont refroidis et afin d'arrêter l'hydrolyse, le mélange est neutralisé à l'aide d'un lait de carbonate de baryum (vérifié au papier pH). La solution contenant les monosaccharides est filtrée sur papier filtre.

- *Réduction des oses par $NaBH_4$*

Après hydrolyse, les oses se retrouvent sous forme de monomères libres. Ils sont soumis à une réduction qui transformera leurs fonctions aldéhydes en fonctions alcools, ce qui permet l'ouverture des cycles. Les oses libres sont réduits en alditols par addition de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) solide à la solution. Cette réaction devant se faire en milieu basique, une goutte d'ammoniaque 50 % est ajoutée avant l'addition du $NaBH_4$. La réduction est laissée à température ambiante pendant une nuit. La partie limpide de la solution est récupérée et transvasée dans un ballon en verre. La solution est alors neutralisée avec de l'acide acétique 50 %, jusqu'à pH neutre et puis concentrée à sec dans un évaporateur rotatif. 1 mL d'acide chlorhydrique 1 % (préparé dans le méthanol) est ajouté au ballon pour sécher l'eau

et la solution est alors concentrée à sec par évaporation; cette étape est répétée 3 fois.

- *Acétylation des alditols*

Pour effectuer l'acétylation 1 mL d'un mélange 50/50 (v/v) d'anhydride acétique et pyridine comme catalyseur de l'acétylation est ajouté dans le ballon et celui-ci est placé dans un bain d'huile à 100°C pendant 1 heure. Le ballon est ensuite retiré et 2 mL d'eau distillée ajoutés afin de refroidir la solution, puis la solution est évaporée. Cette étape est réalisée encore trois fois, afin d'éliminer l'excès d'anhydride acétique et de pyridine, puis 2 mL d'éthanol 99 % sont versés dans la solution afin de la sécher et d'éliminer les dernières traces de pyridine et une évaporation est effectuée. Enfin, les acétates d'alditols sont repris dans 1 mL de chloroforme et la séparation des oses est réalisée par CPG dans les conditions suivantes: 1 µL de solution est injecté sur un chromatographe, Agilent 6850, la colonne utilisée est une colonne capillaire macrobore SP 2380, garnie d'une phase stationnaire polaire (poly: 90 % biscyanopropyl/10 % cyanopropylphényl siloxane), (30 m x 0.53 mm de diamètre interne), gaz vecteur azote.

Température de l'injecteur: 260°C; température du détecteur: 280°C; température de la colonne: 195°C au départ puis montée en température de 2.5 °C/min jusqu'à une température finale de 225 °C.

Détection: ionisation de flamme

Un échantillon de référence contenant 1mg/mL d'oses (rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, inositol) a été traité de la même façon avant injection dans le chromatographe et séparation de ces oses (sous formes d'acétates d'alditol) de référence par CPG. Cette calibration préalable a permis de calculer le coefficient de réponse de la colonne par rapport à l'inositol ainsi que d'évaluer les différentes quantités d'oses de l'échantillon.

II.6.2. Microdissection à l'aide d'un microscope à capture laser

- *Préparation des échantillons*

Les tiges d'*A. thaliana* sont incluses à -20°C dans le polyéthylène-glycol (PEG) Tissue-Tek 4583 OCT après fixation aldéhydique, et débitées en coupes transversales de 10 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome à froid (MICROM, Waldorf, Germany). Les coupes sont récupérées sur une lame de verre recouverte

d'une membrane spéciale (Palm Microlaser technology, Bernried, Germany). Juste avant utilisation, le PEG est éliminé en rinçant dans des bains d'éthanol de concentration croissante 50, 70, 95 et 100% pendant 15 min. Les lames sont finalement rincées dans un bain de toluène et sont alors séchées à température ambiante pendant 24 h.

- *Microdissection à l'aide du microscope à capture laser*

Pour réaliser la microdissection, un microscope à capture laser «P.A.L.M. Laser Microbeam System (Bernried, Germany)» est utilisé. Cet appareil est équipé d'un laser à lumière UV de 337 nm et d'un microscope inversé (Zeiss inverse microscope Axiovert 200 resp. 200M). La microdissection est réalisée à un grossissement de 20x ou 40x. Le rayon laser coupe sélectivement autour des cellules d'intérêt, laissant le tissu qui reste intact. Ensuite le system P.A.L.M utilise une impulsion laser pour catapulter la zone découpée de l'échantillon choisi, puis les tissus sont catapultés dans un eppendorf de 0.5 mL qui contient une goutte d'eau distillée. Les microtubes qui contiennent les tissus sont gardés à -4°C pour analyses ultérieures (thioacidolyse ou analyse des polysaccharides).

- Microanalyse des lignines

Pour récupérer les échantillons, les eppendorfs ont été centrifugées et la goutte d'eau qui contient les microdissections (100 coupes) a été transférée dans des tubes en verre à vis bouchés, ensuite les tubes ont été lyophilisés. Les microdissections ont été mises en présence de 5 mL de réactif de thioacidolyse et avec les étalons internes (C_{19}: 1840 ng et C_{21}: 1980 ng dans CH_2Cl_2). La réaction de thioacidolyse est ensuite réalisée comme expliqué dans le paragraphe II.5.2.

La silylation est réalisée en minitubes de 500 µL. La totalité du thioacidolysat est reprise en 50 µL de CH_2Cl_2 et silylé par 50 µL de BSTFA + 5 µL de pyridine. Les échantillons sont analysés par CPG-SM comme expliqué dans le paragraphe II.5.2.

- Microanalyse des polysaccharides

Les microdissections ont été transférées des eppendorfs à des tubes de centrifugation coniques avec l'éthanol. Les lipides ont été extraits avec le mélange méthanol - chloroforme (1:1, v/v), puis les tissus ont été immergés dans le mélange toluène - éthanol (1:1, v/v, 50°C) pour extraire les pigments. A chaque étape les solvants ont été soigneusement enlevés avec une pipette Pasteur capillaire. L'extraction a été répétée à 50°C, suivie par deux extractions successives de

l'amidon à l'eau chaude (95°C, 30 minutes). Le matériel résultant, a été alors soumis à l'hydrolyse acide sulfurique, comme décrit dans (Angeles et al., 2006), et ci-dessus.

II.6.3. CP/MAS ^{13}C RMN à l'état solide

Afin de préserver l'intégrité de la structure cristalline de la cellulose les échantillons n'ont pas été broyés comme pratiqué d'ordinaire pour l'enregistrement des spectres RMN-solide. Des coupes minces de tiges ont été réalisées et introduites dans la cellule de la sonde RMN. Les expériences ont été conduites selon le protocole de Heux et al. (1999) sur un appareil Bruker MSL opérant à une fréquence ^{13}C de 25 MHz avec découplage des protons, angle magique (MAS) et cross-polarisation (CP). La vitesse de rotation était de 3000 Hz, le temps de contact de 1 ms, le temps d'acquisition de 70 ms et le délai de recyclage de 4 s. Le nombre de scans était de 10,000.

II.6.4. Diffraction de Rayons X

Des petits fragments de tige florale fraîche ont été utilisés. Les expériences de diffraction ont été réalisées en utilisant le tube de RX à 30 kV et 20 mA. La ligne CuKa était collimatée par deux trous devant l'échantillon. La diffraction a été enregistrée sur une plaque Imaging plate (FUJIFILM type FDL) qui a ensuite été lue avec l'imaging plate reader BAS 1800IL. Les échantillons de tige ont été positionnés verticalement par rapport au rayon incident, et la diffraction a été observée avec un axe vertical.

CHAPITRE III:

Etude ultrastructurale et biochimique des parois des hampes florales d'*Arabidopsis thaliana*: comparaison des écotypes Ws et Col-0

CHAPITRE III: ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*: COMPARAISON DES ECOTYPES WS ET COL-0

INTRODUCTION

Arabidopsis thaliana est une petite plante sauvage de la famille des Brassicacées (Crucifères) à laquelle appartiennent de nombreuses espèces cultivées comme le colza, plante oléagineuse de grande culture, ou comme d'autres plantes d'intérêt alimentaire (chou, navet, radis, raifort, moutarde…). Depuis que son génome a été déchiffré (The *Arabidopsis* Information Resource), cette petite plante est devenue l'organisme modèle des recherches en biologie des végétaux supérieurs (en génétique, physiologie, phytopathologie…). Outre son petit génome décrypté, cette plante a l'intérêt d'avoir une taille réduite et un cycle court et d'être facilement transformée (Somerville and Koornneef, 2002).

Elle présente une vaste distribution géographique et s'est répandue depuis environ 5 millions d'années des rivages de l'océan atlantique jusqu'à la Sibérie et aux montagnes de l'Asie centrale, en passant par les régions méditerranéennes et la Scandinavie (Hoffmann et al., 2005). Sa présence en Amérique et en Australie est liée aux migrations humaines. En raison de cette confrontation à des latitudes et conditions climatiques différentes, de nombreux variants naturels, nommés écotypes ou accessions, sont apparus (Passardi et al., 2007). D'après la base de données TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource) (Huala et al., 2001), environ 750 écotypes d'A. thaliana ont été collectés dans le monde et leurs graines sont disponibles dans les deux principales banques de graines, le ABRC (*Arabidopsis* Biological Research Center) et le NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center) (Passardi et al., 2007). Leurs différences morphologiques et physiologiques reflètent la plasticité phénotypique de cette plante et ses capacités d'adaptation à un habitat particulier.

Les trois accessions les plus utilisées en recherche sont Columbia (Col), accession dont le génome a été entièrement décrypté (*Arabidopsis* and Initiative, 2000), Landsberg erecta (Laer), accession obtenue par mutagénèse de l'écotype naturel Landsberg, et Wassilewskija (Ws), accession collectée dans les régions

froides (Bevan and Murphy, 1999). La plupart des mutants disponibles dans des banques de mutants sont obtenus dans l'un de ces 3 fonds génétiques.

La plante *A. thaliana* est largement utilisée comme modèle d'étude de la formation des parois végétales (Somerville and Koornneef, 2002). Pour mieux comprendre la mise en place des polymères pariétaux et ses régulations spatio-temporelles, l'utilisation de mutants affectés dans la biosynthèse des parois s'est avérée fructueuse (Fagard et al., 2000; Jouanin and Lapierre, 2006). Le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a révélé que sur environ 25,000 gènes codant pour des protéines, au moins 1000 sont dédiés à la formation, à l'assemblage et au remodelage des parois végétales (Roberts, 2001).

Pour mieux appréhender l'impact des mutations, il faut évaluer la variabilité génétique naturelle entre les écotypes utilisés pour l'obtention des mutants. Les variations qui ont été étudiées entre écotypes naturels portent sur des paramètres liés au développement (taille de la plante, taille des graines, morphologie des trichomes…) et sur des caractères physiologiques (dormance des graines, efficacité de l'utilisation de l'eau…) ou biochimiques (composition en métabolites primaires ou secondaires, activités enzymatiques…) (Alonso-Blanco and Koornneef, 2000).

La nature de l'écotype associé à l'étude d'un mutant d'insertion est imposée par la banque de mutants employée. Dans notre travail, nous avons étudié les parois des hampes florales de mutants obtenus dans les fonds génétiques Col-0 et Ws. Ces mutants ont été sélectionnés par l'équipe de Lise Jouanin dans trois banques de mutants d'insertion (T-DNA): la banque de mutants d'insertion de Versailles (environ 56,000 lignées obtenues dans le fond génétique Ws; (http://www-ijpb.versailles.inra.fr/fr/sgap/equipes/variabilite/crg/index.htm), la banque du Salk Institute Genomic Analysis laboratory (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress/) et la banque Gabi-Kat (http://www.gabi-kat.de/), ces deux dernières étant constituées dans le fond génétique Col-0.

Afin de comparer des données concernant des mutants obtenus à partir d'écotypes différents, il faut vérifier que les différences liées à l'écotype n'interfèrent pas avec celles liées à la mutation. Dans nos travaux sur les différentes lignées d'*A. thaliana* génétiquement modifiées sur des gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines, il nous est apparu que les deux écotypes utilisés, Wassilewskija (Ws) et Columbia (Col-0), n'étaient pas totalement identiques au niveau de l'organisation

ultrastructurale de leurs parois secondaires. Ces deux écotypes ont déjà été l'objet de comparaisons approfondies au niveau du développement du système vasculaire (Altamura et al., 2001) et au niveau morphologique (Passardi et al., 2007). A notre connaissance, il n'existe pas de données concernant l'étude ultrastructurale des parois des tissus lignifiés de leur hampe et la topochimie des polymères pariétaux qui s'y trouvent. Cette observation nous a incité à étudier l'ultrastructure et la distribution topochimique des polymères pariétaux des hampes florales des écotypes Ws et Col-0, afin d'établir s'il existe des différences concernant ces écotypes de référence.

III.1. Composition chimique globale des parois des hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* écotypes Ws et Col-0

Afin de vérifier s'il y a des différences dans la composition chimique entre les deux accessions d'*A. thaliana* (Ws et Col-0), nous avons entrepris une analyse globale de sucres neutres et des lignines.

III.1.1. Composition en sucres neutres des parois des hampes florales

La composition globale en sucres neutres des parois a été analysée par hydrolyse totale des hampes florales matures (Saeman et al., 1954). Le matériel pariétal a été préparé par extractions au mélange éthanol-toluène, puis à l'éthanol et finalement par l'eau chaude afin d'éliminer l'amidon dont le glucose pourrait interférer avec la détermination de la cellulose. Les résultats (Tableau 1) montrent que l'écotype Ws serait moins riche en hémicelluloses avec un taux de xylose inférieur à celui des parois de Col-0. Cela se répercute, en proportions relatives, par un taux de glucose (et donc de cellulose) un peu plus élevé. Les différences mineures entre les deux écotypes en ce qui concerne la composition globale de polysaccharides sont en accord avec des résultats publiés dans la littérature (Gardner et al., 2002).

Tableau III.1: Composition en sucres neutres des parois des hampes florales matures d'*A.thaliana* écotypes Ws et Col-0

	Pourcentages relatifs des sucres*				
Ecotype	**Arabinose**	**Xylose**	**Mannose**	**Galactose**	**Glucose**
Ws	2.8 (±0.26)	26.2 (±1.8)	5.1 (±0.22)	3.4 (±0.25)	62.7 (±1.9)
Col-0	3.8 (±0.26)	31.2 (±1.9)	3.9 (±0.17)	3.9 (±0.24)	57.6 (±1.9)

***% Sucres exprimés en proportions molaires**

III.1.2. Etude globale des lignines par analyses chimiques

Le taux de lignines des hampes florales mâtures des écotypes Ws et Col-0 a été déterminé après traitement dans l'acide sulfurique selon la méthode de Klason (Dence, 1992). La structure des lignines a été étudiée par thioacidolyse (Rolando et al., 1992). Le tableau 2 suggère que les deux échantillons de hampes des écotypes Ws et Col-0 diffèrent en terme de taux de lignine Klason et que les hampes de l'écotype Col-0 ont des lignines un peu plus riches en unités S.

Cette conclusion doit être pondérée par une remarque importante : les deux types d'échantillons n'ont pas été cultivés en même temps et d'une culture à l'autre, la composition des hampes florales collectées à complète maturité peut présenter des variations. Pour mieux appréhender cette variabilité, le tableau 3 présente la moyenne du taux de LK et du rapport molaire S/G de thioacidolyse obtenues à partir de 55 cultures de Ws et de 33 cultures de Col-0. Sur cette série importante d'échantillons (Lapierre et Jouanin, résultats non publiés), on constate qu'il n'existe pas de différence significative entre le taux de LK des hampes matures extraites. En revanche, le rapport S/G de Col-0 est significativement plus élevé (à $p<0.05$) que celui de Ws.

Tableau III.2: Analyses globales des lignines de hampes matures (après extraction au Soxhlet) des écotypes Ws et Col-0. Les taux de lignine Klason LK et de lignines acido-solubles LAS sont exprimés en % du résidu pariétal. Les données de thioacidolyse sont exprimées en µmoles par g LK. Les valeurs correspondent aux moyennes entre doubles analytiques (écart-moyen entre parenthèse)

Ecotype	%LK	%LAS	Thioacidolyse (en µmole/g LK)				
			H+G+S	S/G	% H	% G	% S
Ws	16.16 (0.07)	2.36 (0.01)	937 (15)	0.35 (0.00)	0.6 (0.0)	73 (0.0)	26 (0.0)
Col-0	18.26 (0.18)	2.03 (0.00)	1200 (29)	0.40 (0.00)	0.7 (0.0)	71 (0.2)	28 (0.2)

Tableau III.3: Moyenne (écart-type entre parenthèse) du taux de Lignine Klason (en % des échantillons extraits) et du rapport molaire S/G de thioacidolyse des hampes florales matures issues de 55 et 33 séries de cultures différentes (réparties sur 5 ans)

Ecotype	Nombre des échantillons analysés	LK (%)	S/G
Ws	55	17.07 (1.7)	0.37 (0.02)
Col-0	33	17.04 (1.4)	0.41 (0.03)

III.1.3. Morphologie tissulaire des hampes florales des écotypes Ws et Col-0

Nous avons étudié les hampes florales des deux écotypes cultivés en serre (INRA Versailles) en conditions identiques (photopériode de 16h) et collectées à 6 semaines. Une coupe transversale a été réalisée à la base des hampes florales des écotypes Ws (Figure 1A) et Col-0 (Figure 1B) et observée à faible grossissement en microscopie électronique à balayage (M.E.B) afin de distinguer l'organisation des principaux tissus lignifiés: les fibres inter-fasciculaires, qui donnent le support à la hampe florale, et les faisceaux libéro-ligneux composés par des vaisseaux, tissus conducteurs de la sève brute et de fibres associées. Chez les deux écotypes, la répartition anatomique des tissus est identique. Chacun possède 8 zones correspondant aux fibres inter-fasciculaires et 8 zones correspondant aux faisceaux libéro-ligneux, en accord avec les résultats de la littérature (Turner and Sieburth, 2002). Les deux écotypes présentent une organisation compacte des tissus de la hampe florale, ce qui confère une bonne rigidité à la hampe florale.

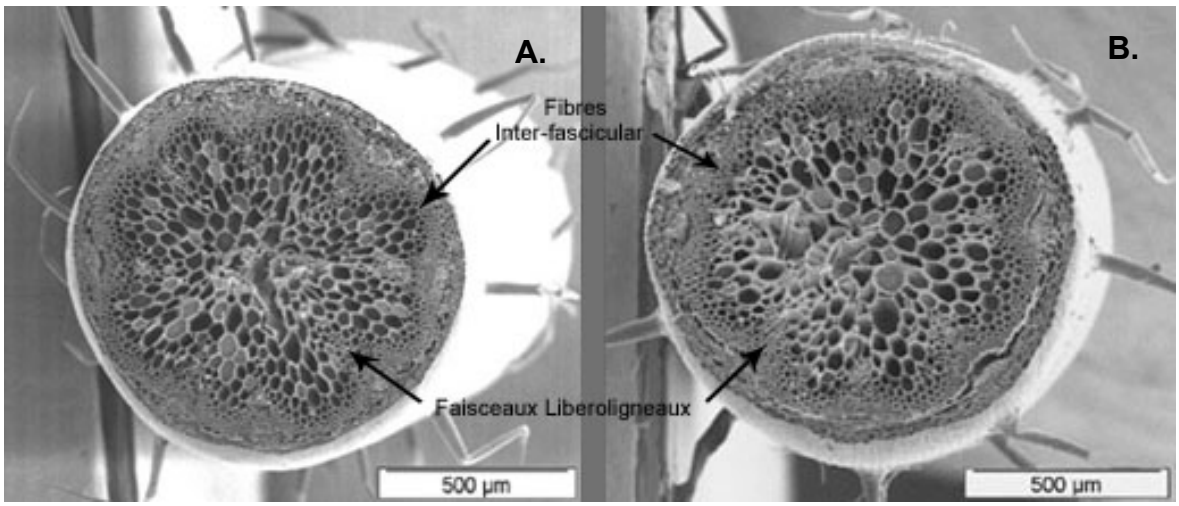


Figure III.1. Observations en microscopie électronique à balayage des hampes florales d'*A. thaliana* Ws (A) et Col-0 (B)

Un grossissement plus fort montre l'organisation des fibres inter-fasciculaires (Figure 2). L'épaisseur de la paroi de ces fibres a été calculée en soustrayant la valeur de la distance de lamelle mitoyenne à lamelle mitoyenne (flèche sombre, distance D, Figure 2) à la valeur de la distance entre lumen et lumen (flèche claire, distance d) de deux fibres voisines. Les mesures ont été faites sur le petit et le grand axe des cellules, ce qui permet d'évaluer l'épaisseur moyenne comment étant égale à (D-d)/2.

Chez Ws (Figure 2A), chaque zone comporte 3 à 4 couches de fibres, dont la largeur est hétérogène et dont les parois cellulaires sont épaisses (environ 1.7 µm) et compactes. Comme Ws, l'écotype Col-0 (Figure 2B) présente 3 à 4 couches de fibres, mais la largeur de ces cellules est supérieure à celles de Ws. Les mesures montrent que les parois des fibres de Col-0 sont un peu moins épaisses (environ 1.5 µm) que celles des fibres de Ws (environ 1.7 µm).

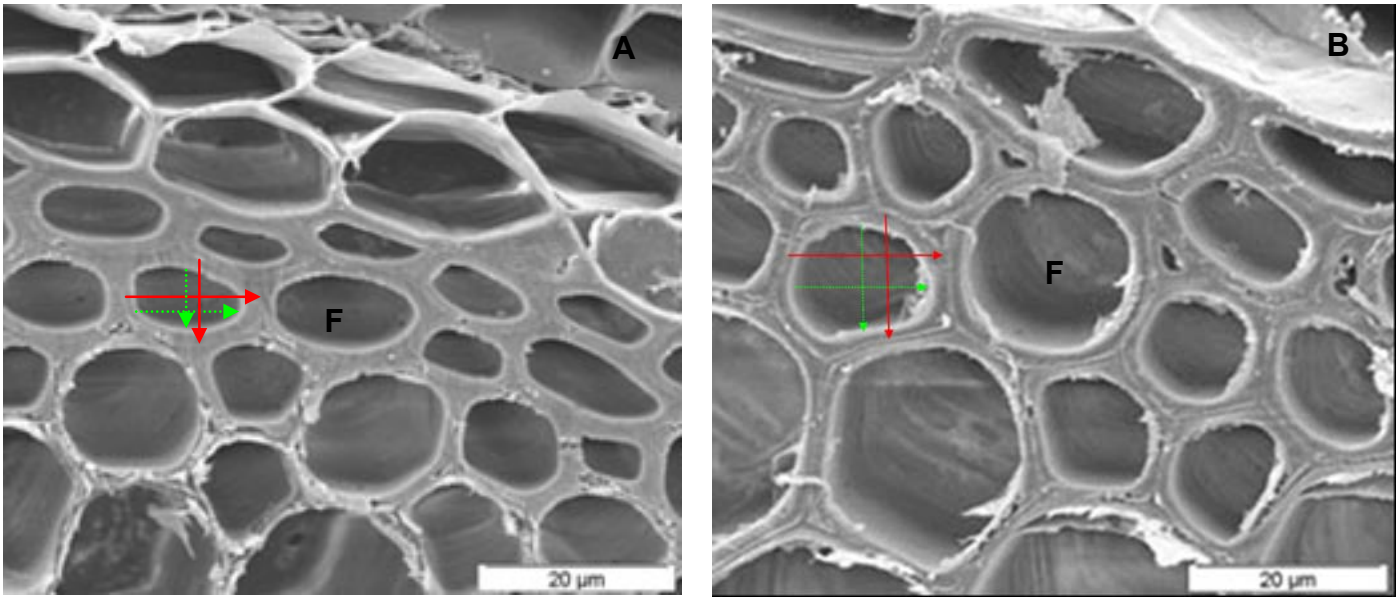


Figure III.2. Organisation structurale des fibres inter-fasciculaires des écotypes Ws (A) et Col-0 (B) F=Fibre inter-fasciculaire

La figure 3 montre l'organisation d'un faisceau libéro-ligneux. Dans le cas de Ws (Figure 3A) et de Col-0 (Figure 3B), cette région est composée de vaisseaux et de quelques fibres, nommées «fibres adjacentes». Chez les 2 écotypes, la largeur des cellules et l'épaisseur des parois sont variables. Contrairement aux fibres inter-fasciculaires, les parois des vaisseaux semblent plus épaisses chez Col-0 que chez Ws.

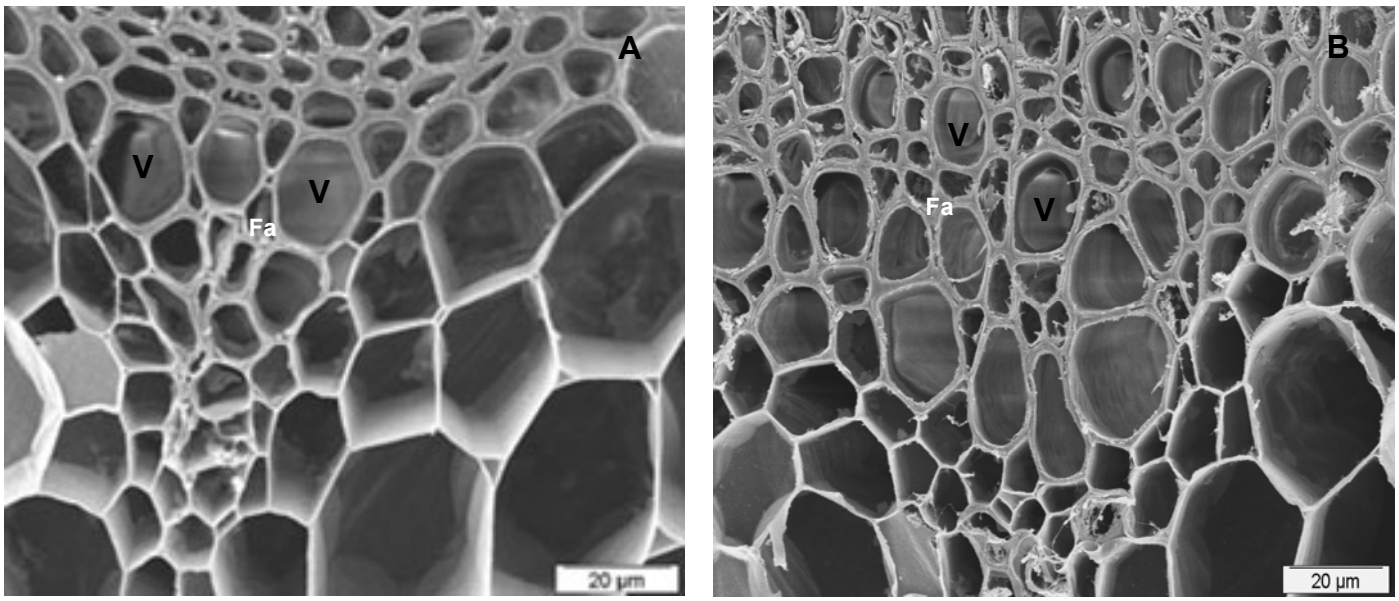


Figure III.3. Organisation structurale des faisceaux libéro-ligneux des écotypes Ws (A) et Col-0 (B) V=Vaisseau du xylème, Fa= Fibre adjacente

III.2. Micromorphologie à l'échelle ultrastructurale des hampes florales de Ws et Col-0

Pour évaluer s'il existe des différences d'organisation des parois entre ces écotypes et pour avoir des informations plus approfondies sur la distribution topochimique des sous-unités constitutive des lignines, il a été nécessaire de travailler à l'échelle ultrastructurale en M.E.T.

III.2.1. Marquage cytochimique au P.A.T.Ag

Les lignines sont les composants pariétaux que nous avons plus particulièrement étudiés dans le cadre de cette étude. Il était cependant important de connaître la distribution des polysaccharides pariétaux dans la mesure où ces derniers sont associés aux lignines au sein des parois.

La technique cytochimique du P.A.T.Ag (Periodic Acid Thiocarbohydrazide silver proteinate), adaptée aux parois secondaires par Ruel (Ruel et al., 1977), a été utilisée pour l'étude micromorphologique des parois. Cette technique permet de contraster l'ensemble des polysaccharides pariétaux. La cellulose et les hémicellulose sont très réactives au P.AT.Ag, ainsi que d'autres polysaccharides pariétaux comme les substance pectiques.

Les figures 4 et 5 montrent l'ultrastructure des fibres et des vaisseaux des hampes florales des écotypes Ws et Col-0. Dans les fibres de Ws (Figure 4A), on distingue nettement le triangle de jonction, la lamelle mitoyenne et les subdivisions de la paroi secondaire en sous-couches S_1 et S_2. Ces parois se caractérisent par une sous-couche S_2 très épaisse et, surtout, par la présence de subdivisions supplémentaires soulignées par des lignes concentriques de démarcation plus réactives à l'oxydation périodique. Cette plus forte réactivité peut être attribuée à une différence de composition des polysaccharides dans ces zones ou bien à un changement d'orientation des microfibrilles de cellulose. Ceci donnerait des parois plus lâches où le faisceau d'électrons contraste fortement les grains d'argent.

La figure 4B montre le triangle de jonction, la lamelle mitoyenne et la paroi secondaire des fibres de Col-0. Leur paroi secondaire apparaît subdivisée en sous-couches S_1, et S_2, mais elle présente une épaisseur inférieure à celle des fibres de Ws. En outre, dans les parois secondaires des fibres de Col-0, il n'existe pas, comme chez Ws, des lignes concentriques de démarcation.

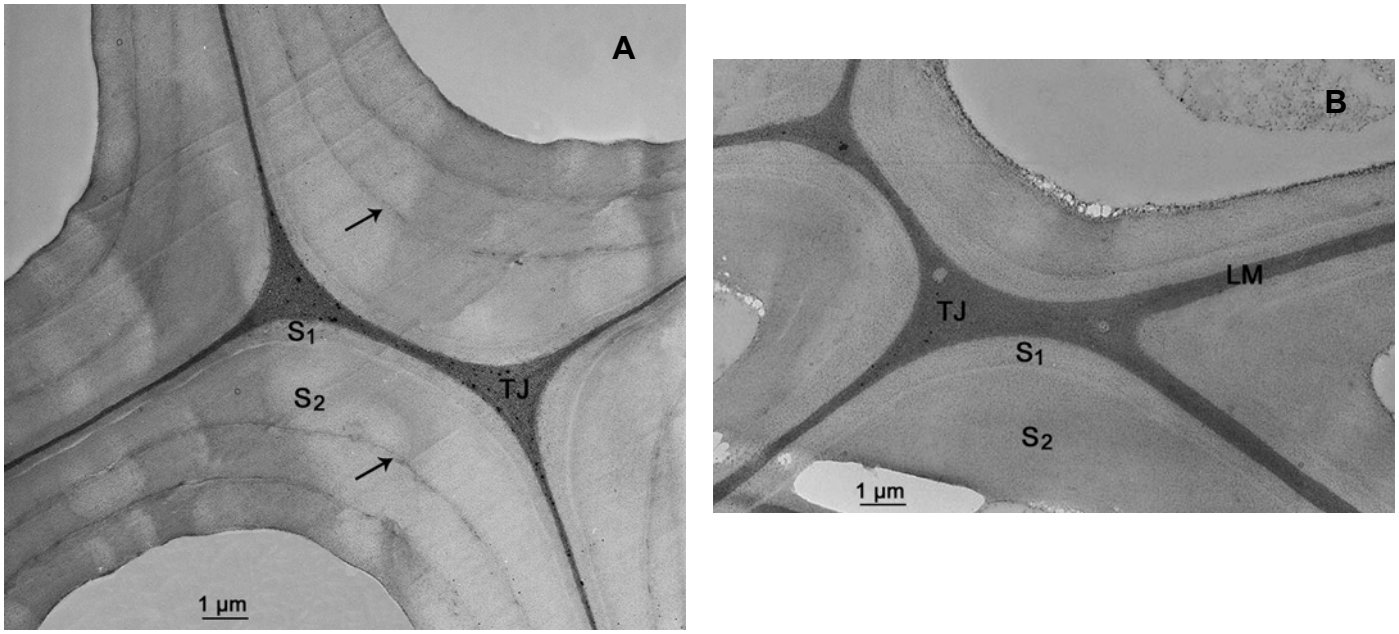


Figure III.4. Organisation ultrastructurale des fibres de hampes florales de Ws (A) et Col-0 (B)

A l'exception de l'épaisseur de la paroi secondaire des vaisseaux de Ws (Figure 5A) inférieure à celle de Col-0 (Figure 5B), on ne note pas de différence dans la structure des vaisseaux.

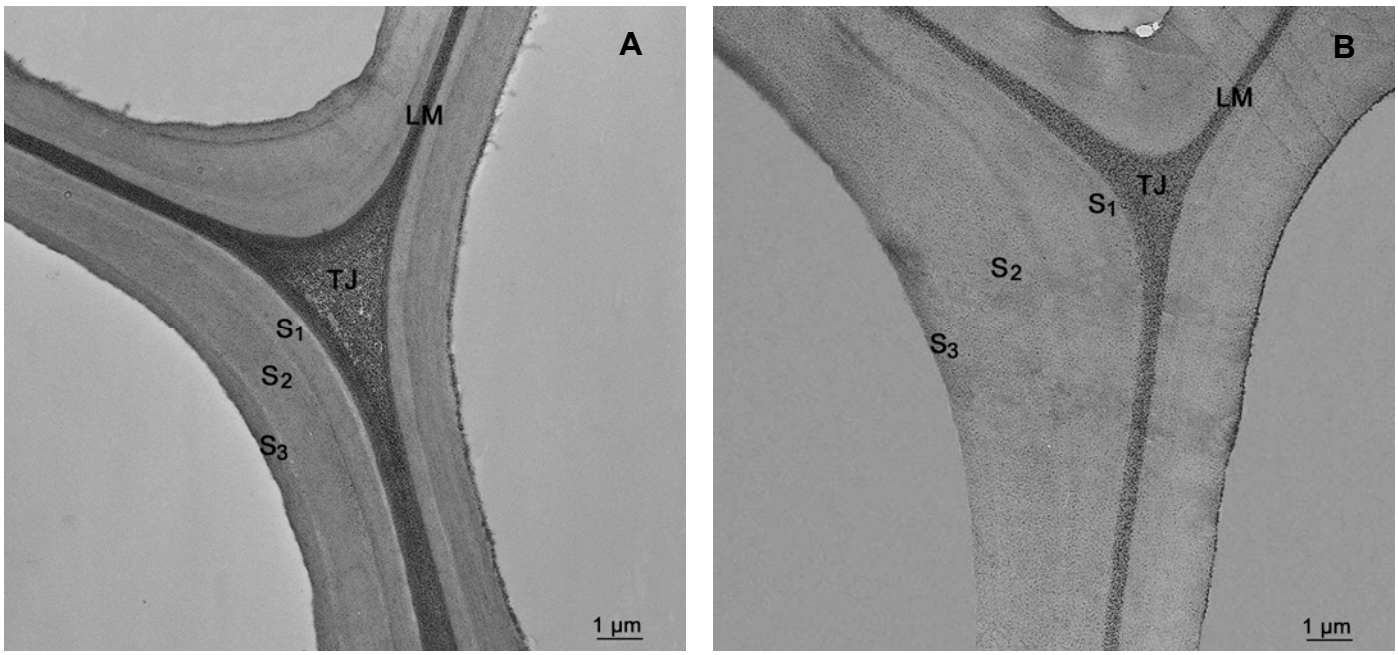


Figure III.5. Organisation ultrastructurale des vaisseaux des hampes florales de Ws (A) et Col-0 (B)

L'étude de la micromorphologie des parois à l'échelle ultrastructurale chez les deux écotypes confirme donc les observations faites en M.E.B: les parois des fibres inter-fasciculaires de Ws sont un peu plus épaisses que celles de Col-0. En revanche et dans le cas des vaisseaux, les parois de Ws sont moins épaisses que celles de Col-0.

En accord avec les données de la littérature, obtenues sur d'autres paramètres (Altamura et al., 2001; Passardi et al., 2007), il semble que les différences structurales et ultrastructurales des tissus lignifiés des hampes florales des 2 écotypes sont minimes, lorsqu'ils sont cultivés en serre, c'est-à-dire en conditions favorables.

III.2.2. Répartition ultrastructurale des unités constitutives des lignines

En dépit de la similitude des compositions analytiques globales des hampes des 2 écotypes et en tenant compte des légères différences d'organisation de leurs parois (épaisseurs, diamètres et réactivité au P.A.T.Ag), il est possible que des variations existent dans la distribution spatiale des constituants dans l'épaisseur de la paroi. De plus, ces variations peuvent concerner un type cellulaire particulier. Ce type d'analyse se situe par excellence à l'échelle ultrastructurale observée avec la résolution du microscope électronique en transmission et nécessite la mise en œuvre

de marqueurs spécifiques des polymères pariétaux. En utilisant les marqueurs immunologiques permettant la visualisation des principaux épitopes des lignines et en effectuant un comptage manuel des grains d'or par unité de surface, il nous a été possible de quantifier de façon comparative la présence de ces épitopes dans les parois des fibres et des vaisseaux des hampes florales de Ws et Col-0. Nous avons fait porter les analyses sur les épitopes correspondants aux anticorps suivants:

- anticorps anti-S/C-zt, dirigé contre les unités β-O-4 non condensées;
- anticorps anti-G-zl, dirigé contre les unités gaïacyles condensées;
- anticorps anti-GS-zl, dirigé contre les unités gaïacyles-syringyles condensées;
- anticorps anti-dibenzodioxocine, dirigé contre les structures dibenzodioxocines qui contiennent une liaison condensée de type biphényle.

Les épitopes contre lesquels ces anticorps sont dirigés sont illustrés en Figure 6.

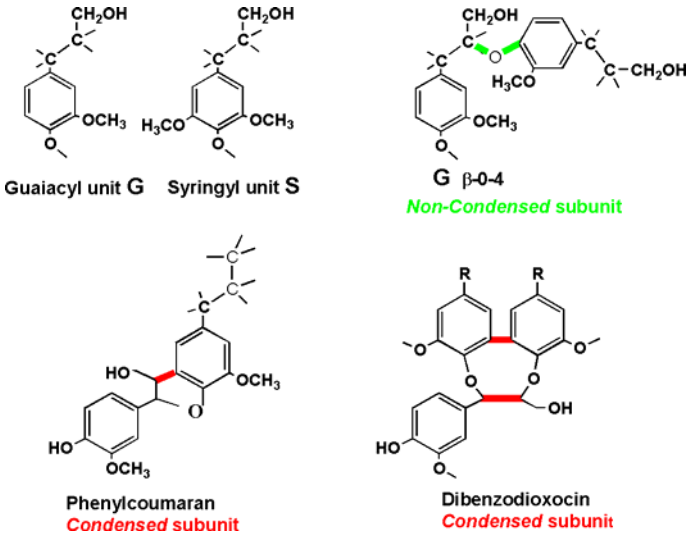


Figure III.6. Principales structures reconnues par les 4 types d'anticorps utilisés

Il faut noter, à propos des évaluations semi-quantitatives, que les comparaisons ne peuvent être faites que lorsque le même antiserum est appliqué en parallèle à la même dilution sur les deux écotypes. En aucun cas on ne peut faire une estimation des quantités relatives de deux épitopes différents identifiés et visualisés à travers deux anticorps différents car nous ignorons les affinités respectives propres à chacun des anticorps. C'est pourquoi dans les tableaux, les valeurs sont exprimées de manière relative pour chaque épitope (Ruel et al., 2001).

Les résultats regroupés dans les tableaux 4 à 6 rapportent les variations semi-quantitatives de la répartition des épitopes des lignines des fibres et des vaisseaux.

Tableau III.4 Evaluation Semi-quantitative de la distribution des épitopes structuraux des lignines dans les écotypes d'*Arabidopsis thaliana* Ws et Col-0

Epitope	*A. thaliana* Ws					*A. thaliana* Col-0				
	Fibre		Vaisseau			Fibre		Vaisseau		
	S_1	S_2	S_1	S_2	S_3	S_1	S_2	S_1	S_2	S_3
S/C non condensées	0.42	0.98	0.72	0.85	1.00	0.22	0.68	0.77	0.59	0.24
Gaïacyles condensées	0.86	1.00	0.72	0.72	0.77	0.72	0.50	0.58	0.45	0.52
GS condensées	0.39	0.28	0.85	0.52	1.00	0.57	0.35	0.79	0.29	0.41
Dibenzodioxocine	0.29	0.78	0.39	0.64	0.28	0.31	1.00	0.28	0.23	0.08

Tableau III.5 Comparaison de la distribution des épitopes structuraux des lignines dans les fibres inter-fasciculaires des hampes florales des écotypes Ws et Col-0

Epitope	*A. thaliana* Ws		*A. thaliana* Col-0	
	Fibre		Fibre	
	S_1	S_2	S_1	S_2
S/C non condensées	0.43	1.00	0.22	0.69
Gaïacyles condensées	0.86	1.00	0.72	0.50
GS condensées	0.68	0.49	1.00	0.61
Dibenzodioxocine	0.29	0.78	0.31	1.00

Tableau III.6 Comparaison de la distribution des épitopes structuraux des lignines dans les vaisseaux des hampes florales des écotypes Ws et Col-0

Epitope	*A. thaliana* Ws			*A. thaliana* Col-0		
	Vaisseau			Vaisseau		
	S_1	S_2	S_3	S_1	S_2	S_3
S/C non condensées	0.72	0.85	1.00	0.77	0.59	0.24
Gaïacyles condensées	0.94	0.94	1.00	0.75	0.58	0.67
GS condensées	0.85	0.52	1.00	0.79	0.29	0.41
Dibenzodioxocine	0.61	1.00	0.44	0.43	0.36	0.12

Les intensités relatives des marquages immunologiques font ressortir une grande similitude dans la répartition des épitopes dans les deux écotypes. La lignification des couches S_1 et S_2 montre quelques différences qui se retrouvent de la même façon chez Ws et Col-0. Les variations de concentration selon les sous-couches S_1 et S_2 suivent des fluctuations tout à fait parallèles chez les deux écotypes, aussi bien dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 7) que dans les vaisseaux (Figure 8).

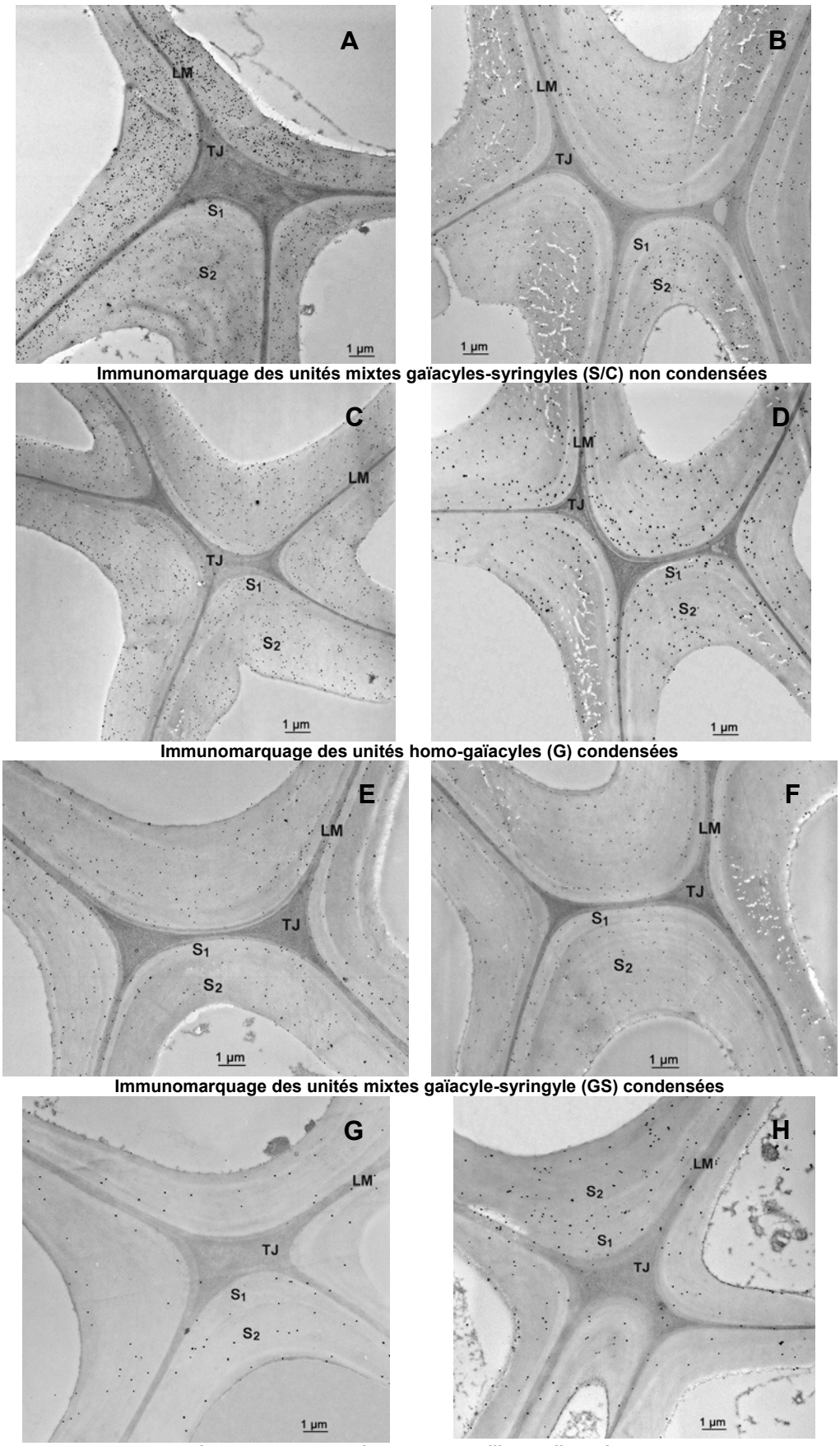


Figure III.7. Immunomarquage avec différents anticorps dans la paroi des fibres inter-fasciculaires d'*A. thaliana* écotypes Ws (A, C, E, et G) et Col-0 (B, D, F et H)

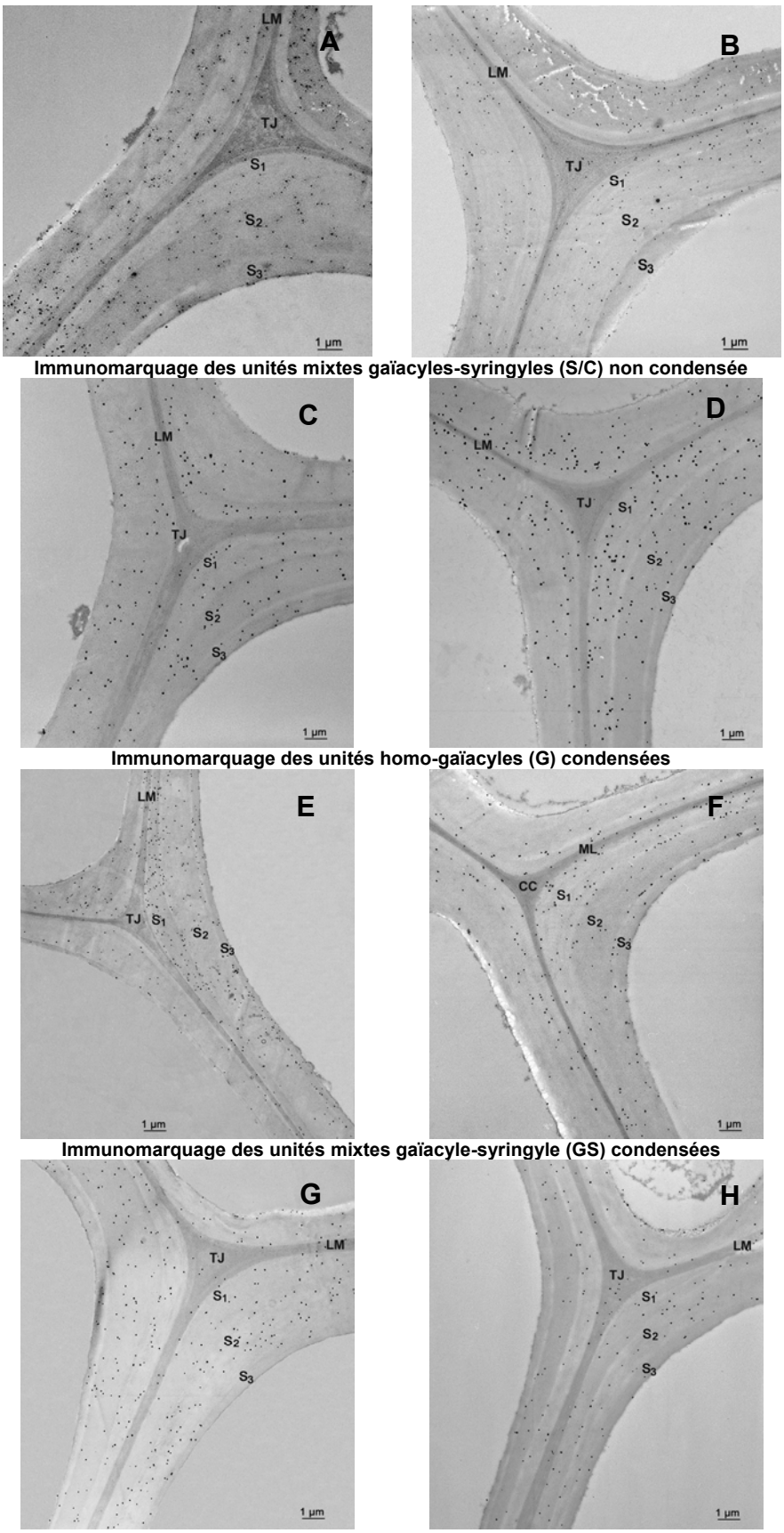


Figure III.8. Immunomarquage avec différents anticorps dans la paroi des vaisseaux d'*A. thaliana* écotypes Ws (A, C, E, et G) et Col-0 (B, D, F et H)

Dans le détail on observe une intensité un peu plus forte des unités condensées gaïacyles chez Ws, aussi bien dans les fibres inter-fasciculaires (S_2=1.00) que dans les vaisseaux (S_3=0.77). Cette différence est en bon accord avec la différence soulignée par la thioacidolyse (fréquence des unités G plus élevée en Ws). La différence est un peu moins nette pour les autres épitopes structuraux GS condensés et GS non condensés.

A travers cette étude des deux écotypes Ws et Col-0, il apparaît que quelques différences existent au niveau de l'architecture fine et de la composition des parois de leurs hampes florales. Même si ces différences sont très faibles, il est important de les noter avant de comparer des mutants obtenus chez ces deux écotypes.

CHAPITRE IV:

Impact du gène *CCR 1* dans l'assemblage des parois secondaires lignifiées chez *Arabidopsis thaliana*

CHAPITRE IV: IMPACT DU GENE *CCR 1* DANS L'ASSEMBLAGE DES PAROIS SECONDAIRES LIGNIFIEES CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

INTRODUCTION

Grâce à l'émergence du génie génétique, depuis quelques années on a développé un intérêt considérable pour la modification de la voie de biosynthèse des lignines. La cinnamoyl-CoA réductase (CCR) est une enzyme qui permet, à partir de la voie générale des phénylpropanoïdes, de catalyser la première étape qui conduite à la formation de monolignols et constitue une étape clé dans le contrôle du flux métabolique dirigé vers la synthèse des lignines. Cette enzyme permet la réduction des esters de CoA en aldéhydes correspondants, en utilisant le NADPH comme cofacteur.

C'est sur la modulation de l'activité de cette enzyme que notre intérêt s'est concentré au cours de ce chapitre, dont les résultats sont présentés sur la forme d'un manuscrit qui est soumis à publication. La mutation porte sur un gène clé de la biosynthèse des lignines. Il a été nécessaire d'analyser les modifications que cela provoque dans la plante mutante, tant au niveau biochimique qu'au niveau topochimique, afin de mieux connaître la fonction du gène *ccr 1* dans la formation des parois des fibres et des vaisseaux.

IMPACT of CCR1-silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*

Jimmy Berrio-Sierra[1], Brigitte Pollet[2], Johanne Thévenin[3], Catherine Lapierre[2], Lise Jouanin[3], Jean-Paul Joseleau[1] and Katia Ruel[1]

[1] Jimmy Berrio-Sierra, Jean-Paul Joseleau, Katia Ruel

Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), UPR 53 01, associée à l'Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble, France

[2] Brigitte Pollet, Catherine Lapierre

UMR 206 Chimie Biologique AgroParisTech-INRA, AgroParisTech Centre de Grignon, 78850 Thiverval-Grignon, France

[3] Lise Jouanin,

Biologie Cellulaire, INRA, 78026 Versailles cedex, France

Katia Ruel (✉)

CERMAV – UPR CNRS 5301, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

E-mail : ruel@cermav.cnrs.fr, Fax: 33 4 76 54 72 03

Summary

A cinnamoyl-CoA reductase 1 *(ccr1g)* knockout mutant in *Arabidopsis thaliana* plants was investigated for the consequences of the mutation on the ultrastructural assembly of the cell walls and for the role of lignins in their organization and cohesion. The mutant plants displayed a dwarf phenotype and a strong collapse of their xylem vessels. The lower lignin content of the mature c*cr1g* stems was accompanied by an important loss of the frequency of lignin units only involved in β-O-4 bonds (referred to as non-condensed lignin structures), A slight increase in the proportion of hemicelluloses and a decrease in cellulose was observed in the *ccr1g* cell walls of mature floral stems. At the ultrastructural scale, transmission electron microscopy (TEM) revealed that the transformation had considerably impaired the capacity of the interfascicular fibers (iF), and to a lesser extent of the vessels of the vascular bundles (Vb), to complete the assembly of the cellulose microfibrils in the S_2 layer of their secondary walls, whilst the formation of the S_1 layer appeared unaltered. The disorder in cellulose was confirmed by the lower resolution of the X-ray diffraction pattern given by *ccr1g* plants. Immuno-gold labeling of the main lignin structural epitopes in the control Col-0 and *ccr1g* showed that the patterns of distribution of the lignin structures were differentially affected by the mutation in iFs and Vbs. The semi-quantitative topochemical immunoelectron microscopy investigation pointed out to the importance of non-condensed lignin structures for the assembly of a coherent secondary wall. To further characterize the tissue-specific impacts of the *ccr1g* mutation revealed by TEM, a new approach involving laser capture microdissection technique associated with micro-analysis methods was implemented. This allowed for the first time to characterize the types of lignins and carbohydrates in the cell walls of the interfacsicular fibers and of the vessels from wild type and mutant plants of *A. thaliana*. The wild type plant displayed a two-fold higher S/G ratio in the fibers than in the vessels while this difference was less marked in the *ccr1g* mutant.

Keywords

Lignin – cinnamoyl-CoA reductase - Cell wall ultrastructure – *Arabidopsis thaliana*- Quantitative immunogold labeling, Laser capture microdissection

Abbreviations

CCR: Cinnamoyl-CoA-reductase; G: guaiacyl unit; H: *p*-hydroxyphenyl unit; S: syringyl unit; Fe: ferulic acid; GS: mixed guaiacyl-syringyl structures, SEM: Scanning Electron Microscopy, TEM: transmission electron microscopy, LCM: Laser Capture Microdissection, iF: interfascicular fibers, Vb: vascular bundles; CMF: cellulose microfibrils; KL: Klason lignin

Introduction

The precise contribution of lignins in the assembly of plant cell walls has not been completely elucidated. However it is widely accepted that during differentiation the composition and structure of lignin have a specific impact on the assembly and the structural cohesion of the secondary walls according to cell types. The study of mutant plants altered in the biosynthesis of lignins offers promising opportunities to get insight about plant cell wall macromolecular assembly and organization. The monolignols originate from the phenylpropanoid pathway which includes many steps that are potential targets to modify lignin biosynthesis (Dixon *et al.*, 2001; Donaldson, 2001). Many transgenic or mutant plants affected in the expression of the corresponding genes have been studied (as reviewed in Anterola & Lewis, 2002). Cinnamoyl-CoA reductase (CCR) is the first enzyme specific to the monolignol pathway (Lacombe *et al.*, 1997). This enzyme has been shown to catalyze the NADPH-dependent conversions of *p*-coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA and sinapoyl-CoA into the corresponding aldehydes. By analyzing CCR down-regulated tobacco plants (Piquemal *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 1998), the authors observed a reduction of approximately 50% of the lignin content, an increase in the S/G ratio and an increase in the amounts of cell wall-bound phenolics, such as ferulic and sinapic acids. A higher concentration of cholorogenic acid and of other soluble phenolics was also observed in tobacco (Chabannes *et al.*, 2001a). The plants with the lowest CCR activity presented a dwarf size and a collapsed vessel-phenotype. Notably, an important alteration of the cell walls was observed, with a loss of the arrangement of the cellulose microfibrils, leading to a reduction of the wall cohesion (Pinçon *et al.*, 2001) and an alteration of the lignin deposition, mainly in the S_2 and S_3 sub-layers (Chabannes *et al.*, 2001b). Lignins from these tobacco transgenic plants released lower yields of thioacidolysis monomers, which indicates that they were more condensed (Piquemal *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 2002).

Although *Arabidopsis thaliana* has little direct significance for agriculture, it has several advantages that made it the model plant for understanding lignin synthesis, deposition and function (Boudet, 2000; Goujon *et al.*, 2003b; Jouanin & Lapierre, 2006). The first mutant for CCR1 in *A. thaliana* was named *irx4* (Jones *et al.*, 2001) due to its irregular xylem. CCR1-down-regulated lines were obtained by the antisense strategy (Goujon *et al.*, 2003a). In these mutant and transgenic plants, an important reduction of lignin content and modifications of lignin structure associated to an increased level of ferulic acid ester-bound to the cell wall were observed.

Most of these previous works have studied the impact of genetic modifications in plants using biochemical approaches and light microscopy. Since the genetic transformations modify the structural components of the cell wall architecture, it appeared necessary to investigate the resulting modifications of the fundamental microfibrillar framework of the wall at the appropriate scale of resolution that is provided by electron microscopy. A few ultrastructural investigations have demonstrated that lignin modification could have characteristic consequences on cell wall assembly (Ruel *et al.,* 2001; Chabannes *et al*. 2001b, Ruel *et al*. 2002). In the CCR1 down-regulated *A. thaliana* lines obtained by the antisense strategy, a clear ultrastructural phenotype was evidenced by cytochemical staining and transmission electron microscopy (TEM). Important alterations in the cell walls were observed, typically as a loosening in the arrangement of the cellulose microfibrils, that resulted in reduced cell wall cohesion (Goujon *et al.*, 2003a).

We have recently identified two knockout mutants for CCR1. Both have a dwarf phenotype, a delayed senescence, a decreased lignin level, some alterations in lignin structure and a dramatically altered pool of soluble phenolics (Mir Derikvand *et al.,* 2007). In this work, we examine the effects of the mutation on the phenotype and the micromorphological characteristics of the interfascicular fibers (iF) and of the xylem vessels. Since the mutation originates from a gene related to lignin biosynthesis, it was important to analyze the distribution of lignin structures in *planta.* This was achieved using immunological probes for various lignin units and structures.

In this work we also used the technique of preparative Laser Capture Microdissection (LCM) (Matsunaga *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 2002), coupled to microanalysis (Angeles *et al*. 2006) to study the specific composition of the iFs and of the Vbs of *A. thaliana* floral stems. This is the first time that LCM coupled to chemical microanalysis is used to characterize the tissue-specific impact of a genetic modification.

Materials and Methods

Plant material

The Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) control line and the *ccr1* mutant plant (*ccr1g*; Mir Derikvand *et al.*, 2007) in the same ecotype were grown together in the same greenhouse (20°C, 60% relative humidity) to ensure the same environmental conditions. For polysaccharide analyses and for ultrastructural and microdissection experiments, we used the floral stems at complete flowering stage corresponding to stage 6.90 (Boyes *et al.,* 2001). Lignin analyses were performed on floral stems at complete maturity. Both lignin and polysaccharide analyses were carried out from extract-free samples recovered from mature floral stems after milling and solvent extraction (toluene-EtOH, 2/1 v/v, EtOH, and H_2O).

Lignin and polysaccharide analyses

The lignin content was estimated by the gravimetric Klason procedure (Dence, 1992). Lignin structure was investigated using thioacidolysis (Rolando *et al*., 1992; Lapierre *et al.*, 1995). The lignin-derived monomers were identified by GC-MS of their trimethylsilylated (TMS) derivatives.

For total carbohydrate composition, the procedure with 72% H_2SO_4 then 2M H_2SO_4 adapted from Saeman et al. (1954) was used. The released monosaccharides were converted to their alditol-acetate derivatives (Chambat et al., 1997) and analyzed by gas-liquid chromatography using an Agilent 6850 Series GC System equipped with a SP 2380 macrobore column, 25 m x 0.53 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, U.S.A.).

Selective hydrolysis of the non-cellulosic wall polysaccharides was carried out with 2M TFA (0.5 ml; 120°C; 4 h). After evaporation of the excess acid, the dry carbohydrates were converted to their alditol acetate derivatives and analyzed as above.

CP/MAS ^{13}C NMR spectra.

In order to avoid grinding,the stem segments were hand-sectioned and introduced as such in the NMR cell. The solid state NMR experiments were performed according to Heux *et al.,* (1999) on a Bruker MSL spectrometer operated at a ^{13}C frequency of 25 MHz using the combined proton decoupling, magic angle spinning (MAS) and cross-polarization (CP).The

spinning speed was 3000 Hz, the contact time was 1ms, the acquisition time 70 ms and recycled delay 4s. About 10 000 scans were accumulated for each sample.

Isolation of *A. thaliana* tissues by preparative Laser Capture Microdissection (LCM) and further chemical analyses.

Stem segments (2-3 cm in length) from *A. thaliana* wild type (Col-0) and *ccr1g* lines were cut and fixed in a 0.2% glutaraldehyde – 4% para-formaldehyde in phosphate buffer pH 7.0. They were washed in phosphate buffer (pH 7.0-7.2) and then were trimmed into 2 pieces to obtain a final length of 10-15 mm. Embedding was in Tissue-Tek 4583 OCT compound (as recommended by the manufacturer), and the material was frozen at -20 °C for 10 min. The frozen stems were cut into sections of 10 µm in thickness with a cryostat (MICROM, Waldorf, Germany) before being mounted onto membrane-coated slides (Palm Micro-laser technology, Bernried, Germany), they were gradually dehydrated in increasing concentrations of ethanol (50, 70, 95, 100%, 15 min at each step), then the tissues were washed 15 min in toluene and dried overnight at room temperature.

The PALM MicroBeam System (Bernried, Germany) employed, was equipped with a low heat UV (337 nm nitrogen) laser and an inverted microscope (Zeiss inverse microscope Axiovert 200 resp. 200M). This system involves cutting the target cells or tissue from the surrounding structures using the UV laser, then the PALM system uses a single laser pulse to catapult the selected sample from the tissue plan into the cap of a 0.5 mL microcentrifuge tube containing a drop of distilled water, allowing the collection of tissue fragments. The microdissection experiments were run in order to specifically recover the iFs or the Vbs. About 100 catapulted tissue fragments were enough for thioacidolysis and GC-MS analyses of the lignin-derived monomers.

Thioacidolyses of LCM isolated materials. These were run by carefully transfering the tissue fragments into a Teflon-lined screw capped glass tube with water and then freeze-drying the sample before addition of 5 ml of thioacidolysis reagent together with 1840 ng of the C19 and 1980 ng of the C21 internal standard (added in CH_2Cl_2 solution). Thioacidolysis was run as previously described (Rolando *et al*., 1992) and the lignin-derived products were redissolved in 50 µl of CH_2Cl_2. The whole extract was dried over Na_2SO_4 and then silylated by 50 µl of BSTFA and 5 µl of pyridine before injection onto a GC-MS (Varian 4000, Ion trap, 1µl injected). The GC separation was performed with a Supelco SPB1 column (25 m x 0.25 mm,

0.25 µm film thickness) operated in the temperature program mode (from 40 to 180°C at + 30°C/min, then 180 to 260°C at +2°C/min), with helium as the carrier gas (constant flow rate: 1 ml/min), an injector at 270°C operating in the split/splitless mode and a transfer line to MS at 280°C. The mass spectral analyses were run with an ion trap (electronic impact, 70 eV, 220°C) either in the full scan mode (mass range 45-650 m/z) or in the single ion monitoring mode (at m/z 239, 269 and 299) for a better signal to noise ratio. All GC-MS analyses were carried out as duplicate injection analyses whereas only one thioacidolysis was run per sample as the sample collect was very time-consuming (100 collect per tissular type). The GC-MS determinations of the H, G and S lignin-derived monomers were carried out on ion chromatograms reconstructed at m/z 239, 269 and 299 (base peaks of their TMS derivatives) as compared to the internal standard hydrocarbons evaluated on the ion chromatogram reconstructed at m/z (57+71+85). The common response factor of the lignin-derived G and S monomers relative to the internal standard was checked from an appropriate standard G and S mixture and the response factor of the H monomers was assumed to be identical to the G or S one. Thioacidolysis blank experiments were carried out just in the same way, but without any tissue sample.

Polysaccharides hydrolysis of the LCM isolated materials. The tissues were transferred from the microscope slides to conical centrifuge tubes with ethanol. Lipids were extracted with a chloroform-methanol mixture (1:1, v/v), then the tissues were soaked in ethanol-toluene mixture (1:1, v/v, 50°C) to extract the pigments. At each extraction step the solvents were carefully removed with a glass Pasteur pipette whose tip had been made thinner by drawing above the flame of a burner. The extraction was repeated at 50°C. This was followed by two successive extractions of starch and cytoplasmic soluble sugars with hot water (95°C, 30 min). The resulting material, considered as crude cell wall material (CWM), was then submitted to sulphuric acid hydrolysis (Angeles *et al.,* 2006), as described above.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Stems were sectioned with a razor blade (sections cut to approximately 3 mm thick) and dehydrated through an ascending series of ethanol ending in 100% ethanol. Then, the ethanol inside the stems was replaced by CO_2 making a critical point. Before SEM examination the stems were coated with a very thin film of gold\palladium and then observed with a JEOL JSM 6100.

Transmission Electron Microscopy (TEM) procedures

Fixation and embedding. Small slices (1 mm in thickness) taken from the base of the stem by freehand sectioning with a razor blade were fixed in a freshly prepared mixture of 0.2% glutaraldehyde (v/v), 2% para-formaldehyde (w/v) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7- 7.4). After rinsing in phosphate buffer they were dehydrated through a graded ethanol series up to 80 % (v/v), then infiltrated and embedded in LR White resin (hard mixture) and polymerized for 24 h at 50°C as described earlier (Ruel et al., 1994).

Cytochemical staining for polysaccharides. The polysaccharide moiety of the walls was contrasted on ultrathin sections by the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate (PATAg) method (Thiery, 1967) modified for secondary walls by Ruel *et al.*, (1981). Briefly, the periodate oxidation was carried out with a 5% solution of periodic acid in water for 90 min (instead of a 1% solution for 30 min), thiocarbohydrazide was applied for 48 h and silver proteinate for 30 min, in the dark.

Immunocytochemistry analysis. Five polyclonal antibodies directed against specific lignin sub-structures were used :

- the antibody S/C_{Zt} directed against non-condensed mixed guaiacyl-syringyl lignin structures (Joseleau *et al.*, 2004a) ;
- the antibody S_{Zt} directed against non-condensed homo-syringyl lignin structures (S) (Joseleau *et al.*, 2004a);
- the antibody G_{Zl} directed against condensed lignin homo-guaiacyl G structures (Joseleau & Ruel, 1997);
- the antibody GS_{Zl} directed against the condensed mixed guaiacyl-syringyl lignin structures (Ruel *et al.*, 1994; Joseleau & Ruel, 1997);
- an antibody directed against dibenzodioxocin structures (Kukkola *et al.*, 2003).

The samples were immunolabeled as previously described (Joseleau & Ruel, 1997). Immunolabeling was done on ultrathin transverse sections (50 nm) floating on plastic rings. Briefly, the sections were incubated on the serially diluted antiseras. The secondary marker was Protein A-gold (pA G5, BioCell). The gold particles were further enhanced using a silver-enhancement kit (Amersham). Finally, the thin sections were transferred to copper grids, post-stained with 2.5% aqueous uranyl acetate and examined with a Philips CM 200 Cryo-TEM at an accelerating voltage of 80 kV.

All comparative immunolabeling experiments were carried out in parallel in order to keep the same experimental conditions (dilutions of antibodies, time of contact etc…) and pre-immune serum for each antibody was assayed in the conditions described for the immuno-gold labeling. For quantitative estimation of the labeling a section of the control plant was used for each antiserum. The number of gold particles per μm^2 was counted and the relative labeling index was calculated. Value 1.00 was assigned to the highest labeled sub-layer in the control, and that for each antiserum since it is not possible to compare the values given by two different antisera (Ruel *et al.,* 2001; Mayhew *et al*., 2004).

X-ray diffraction experiment

Small segments of fresh floral stem were used. X-ray diffraction experiments were carried out using point focus beam from X-ray tube operated at 30kV and 20 mA. CuKa line filtered with Ni foil was collimated with two pin holes before the sample. The diffraction was recorded on an Imaging Plate (FUJIFILM type FDL) which was subsequently read using imaging plate reader BAS 1800II. The wet stem samples were positioned vertical to the incident beam, and the diffraction was shown with fiber axis vertical.

Results and discussion

Cell wall compositional analysis of the mature floral stems of the wild type (Col-0) and of the mutant (*ccr1g*) lines

In agreement with previous results obtained on CCR1-deficient *A. thaliana* lines (Jones *et al.*, 2001; Goujon *et al.*, 2003a; Mir Derikvand *et al.*, 2007), the extract-free stems from the ccr1g mutant displayed a substantially lower Klason lignin level than the control sample (Table 1)..

Lignin structure was evaluated by thioacidolysis (Rolando *et al.*, 1992; Lapierre *et al.*, 1995). The *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), and syringyl (S) lignin units only involved in β-*O*-4 bonds give rise to thioethylated H, G, and S monomers, respectively (Lapierre *et al.*, 1986). Therefore, when calculated on the basis of the Klason lignin content (KL), the recovery yield of these diagnostic monomers is a reflection of the frequency of β-*O*-4 bonds in lignins. In addition, ferulic acid incorporated in the cell wall through thioacidolysis-cleavable bonds was quantified as well as the thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into lignins (Ralph *et al.* 2008) (Table 1). In agreement with previous results (Mir Derikvand *et*

al., 2007), the total yield of thioacidolysis monomers released by the lignins of the extract-free *ccr1g* stem was lower compared to the control (825 versus 1127 µmoles per gram KL). With the assumption that the average molecular weight of a C_6C_3 lignin unit is 200 and that the yield of the thioacidolysis induced β-O-4 cleavage is 80%, these yields suggest that about 20 % of lignin units only are involved in β-O-4 bonds in the *ccr1g* sample, versus 28 % for the control. In both plants (mutant and wild type) these β-O-4 linked units are mainly G units, accompanied by lower amount of S units and trace amount of H units. The impact of CCR1 deficiency on the frequency of S thioacidolysis monomers will not be discussed as it varies according to the culture conditions, as previously reported (Goujon *et al.,* 2003a). By contrast, CCR1 deficiency systematically induces a lower thioacidolysis yield (by 30 %), which is diagnostic for a higher frequency of resistant interunit-bonds (referred to as the condensed bonds in the following). Such a higher condensation degree has been previously reported in the ASCCR lines (Goujon *et al.*, 2003a). In agreement with previous data (Mir Derikvand *et al.*, 2007), the data of Table 1 indicate that CCR1 deficiency also induces an increased incorporation of ferulic acid in the cell walls and in the lignins.

We examined the impact of the *ccr1g* mutation on the carbohydrate status of the cell walls. To evaluate the possible change in the hemicellulose fraction, two types of hydrolyses were performed. Trifluoroacetic acid (TFA) hydrolysis which is selective of non-cellulosic polysaccharides (Albersheim *et al.,* 1967) revealed only slight variations within the hemicellulose components, with a slightly higher proportion of xylose (Table 2). This result is not much different from that ones reported for the *irx4* mutant (Jones *et al.*, 2001).

The total polysaccharide composition including the hydrolysis of the resistant cellulose fraction was obtained by concentrated sulfuric acid hydrolysis (Saeman *et al.* , 1954). The results in Table 3 revealed a higher proportion of hemicelluloses in the walls of *ccr1g* along with a lower proportion of cellulose. These results are reminiscent of the data reported for the *irx4* plants in which only very slight variations in the hemicellulosic and the cellulosic components were reported (Jones *et al.,* 2001).

Cell wall ultrastructure in the floral stems of the *ccr1g* mutant

According to the results initially described in tobacco (Piquemal et *al.*, 1998), CCR down-regulation induced changes in the general growth. The *ccr1g* mutant actually displayed a

dwarf phenotype, with floral stem height decreased by about 50% (Mir Derikvand *et al.*, 2007). The micromorphological repercussions of modifications of lignin content and structure were first studied by scanning electron microscopy (SEM). Basal segments taken from the control stems showed good cohesion of iFs (Fig. 1a) and vessels in Vbs (Fig. 1c). In contrast, the corresponding stem segments of *ccr1g* showed that the altered lignin content and structure resulted in slightly collapsed iFs (Fig. 1b) and strongly collapsed xylem vessels (Fig. 1d). It is interesting to note that the dehydration step involved in sample preparation for SEM caused a separation within the secondary wall, likely between S_1 and S_2 (arrows). The phenomenon affected mostly the iFs but also some of the vessels from the Vbs. This loss of cohesion constitutes a first indication of the mechanical weakness of the cell walls of the mutant plants. Another aspect of this low cohesion was observed in longitudinal sections of the iFs which exhibited a loose internal network of fibrils contrary to the compact wall of the control plant (Fig. 1 e, f). The collapsed-vessel phenotype has been repeatedly observed in transgenic or mutant plants with decreased or suppressed CCR activity (Piquemal *et al.*, 1998; Chabannes *et al.*, 2001b; Jones *et al.*, 2001; Goujon *et al.*, 2003a). In addition, the mutation induced the apparent diminution of the cell wall thickness compared to the wild type. These morphological alterations observed at the structural scale must be correlated with the modifications in the composition of the secondary cell walls.

A precise picture of the impact of the mutation on the organization of the cell wall requires to work at the ultrastructural scale, typically at the domain of resolution provided by transmission electron microscopy (TEM). To underscore the global architecture of the cell wall, the polysaccharide moiety was contrasted on ultrathin sections using the PATAg cytochemical staining method. This technique stains the majority of polysaccharides and therefore provides an image of the micromorphological arrangement of the cell wall in the control and *ccr1g* lines. At low magnification, the secondary walls of the control stems (Fig. 2a) are organized and compact and display a very good cohesion. In contrast, the mutant line sample exhibited dramatically disorganized and loosened secondary walls (Fig. 2b).

At higher magnification, the loss of the ability to assemble the cellulose microfibril framework into a coherent wall is obvious in the iFs and vessels from the mutant plant. It is noteworthy that although the collapse appears most pronounced in the vessels, it is not specific of conducting cells since it also affects the supporting fibers (Fig. 2 b-d). It is important to note that the loosening mostly concerns the S_2 layer, particularly its inner part,

which exhibits an important delamination of the cellulose microfibrils, accompanied by an apparent loss of the orientation of the cellulose network (Fig. 2d and f), whereas S_1 seems to be normally completed. The juxtaposition of the compactness of S_1, against the loosened S_2 may explain the shrinkage of S_2 observed in SEM. It is interesting to note that similar shrinkage of the gelatinous layer (G-layer) of fibers from tension wood, in which the lignin content is very low (Clair and Thibaut, 2001; Joseleau *et al.*, 2004b), also occurs in the same conditions of dehydration. The fact that the impact of the mutation affects primarily S_2, leaving S_1 apparently unmodified, suggests that *ccr1g* gene is more specifically involved in the lignification of S_2.

Taking together the results from structural and ultrastructural analyses, it appears that the mutation of CCR1 in *Arabidopsis thaliana* had the same type of effects as those shown in CCR down-regulated tobacco (Chabannes *et al.*, 2001b) and in *Arabidopsis* ASCCR lines (Goujon *et al.*, 2003a), although somewhat more pronounced.

X-ray analysis

To further confirm the perturbation in the orientation of the cellulose in S_2 we recorded the X-ray diffraction diagrams of the control and *ccr1g* stems (Fig. 3). Because the X-ray diffraction was recorded from the whole plant stem section the contribution of the different cell types with their diversity in cellulose and non-cellulose polymer composition somewhat blurs the diagrams. However, the results showed the typical patterns of cellulose with the clearly distinct spots corresponding to 1-10/110 (5.8 Å) and 200 (3.9 Å) crystal plane of cellulose Ib. The diffraction diagrams underscored the lower resolution of *ccr1g* compared to the Col-0 control. This suggests a loose aggregation and a lower degree of orientation of the cellulose microfibrils (CMFs) in *ccr1g* corresponding to its inability to properly associate CMFs in the S_2 layer of fibers and vessels. Similar manifestation of disordered CMFs orientation was observed previously by recording the electron diffraction pattern from antisense CCR down-regulated tobacco and wild type stems (Ruel and Joseleau, unpublished results). Such relationship between the pattern of cellulose deposition and assembly of lignin was originally suggested by the study of the irregular xylem (*irx*) mutations (Turner and Somerville, 1997).

CP/MAS-^{13}C NMR spectra

To detect possible variation of cell wall composition between Col-0 and *ccr1g*, the solid-state CP/MAS-^{13}C NMR spectra were compared. Figure 4 shows that the spectra were essentially identical and that no differences significant enough between the two spectra could be identified. Similar observation was made in the study of the *irx4 Arabidopsis* mutant (Patten et *al.,* 2005). Indeed, in the present case solid-state 13C NMR gave only a global picture of the wall constituents of the wild type and mutant plant stems but could not provide enough resolution to detect minor differences in lignin and carbohydrate composition nor in cellulose cristallinity and ordering, mostly when the mutation is selective of specific cell types, as shown by TEM results.

Distribution of lignin structures in the floral stems of the Col-0 and ccr1g lines by immunolabeling and TEM analyses

To analyze the patterns of lignification in the walls of the different cell types of Col-0 and *ccr1g*, we carried out immunolabeling in TEM using antibodies directed against non-condensed (Joseleau *et al.*, 2004a) and condensed lignin structures (Ruel *et al.*, 1994; Joseleau & Ruel, 1997). Manual counting of the number of gold particles per μm^2 area (Ruel *et al.* 2001; Mayhew *et al.*, 2004) provided semi-quantitative comparative estimation of the respective distribution of the epitopes within the iFs and the vessels from Vb in the control and mutant *A. thaliana* plants, allowing to calculate a relative labeling index for each antiserum (Table 4).

The use of antibodies directed against non-condensed lignin structures (S/C-antibody) revealed that, in the control, the distribution of the gold particles in iFs (Fig. 5a) and vessels (Fig. 5c) varied between sub-layers. The corresponding epitopes were particularly abundant in the S_2 sub-layers of iFs and vessels walls, and present in lower amounts in S_1, in S_3 in vessels and in the middle lamellae and cell corners junctions. The absence of CCR1 substantially reduced the frequency of these epitopes, both in the iFs and in the vessels. At the spatial level, the irregular and low distribution of non-condensed guaiacyl-syringyl lignin units was restricted to the inner part of the S_2 sub-layer in the iFs (Fig. 5b), and to the S_2 and S_3 sub-layers in the vessels with a very low density in the cell corners (Fig. 5d). Similar severe reduction of these epitopes due to CCR down-regulation has already been evidenced in previous works (Chabannes *et al.*, 2001b; Ruel *et al.*, 2002; Goujon *et al.*, 2003a), but our

present results revealed that, not unexpectedly, *CCR1* mutation had a more pronounced effect than *CCR1* down-regulation.

The immunolabeling directed against non-condensed homo-syringyl lignin units (S) showed that in the control sample, gold particles were principally observed in the iFs with the highest concentration in the S_2 sub-layer (Fig. 5e). The labeling of vessels from Vbs was clearly positive, but a little weaker than that observed in iFs and was concentrated in S_2 sub-layer with a discrete presence in the S_3 sub-layer, middle lamella and cell corner (Fig. 5g). In contrast in the mutant plant, the immunolabeling showed that these epitopes could hardly be detected in the iFs (Fig. 5f) and vessels (Fig. 5h). This agrees with the significant decrease of lignin and particularly with the reduction of non-condensed structures.

To complete our study of the topochemical distribution of non-condensed lignin epitopes, we investigated the presence of the dibenzodioxocin structures. This compound can be formed during biosynthesis by oxidative coupling of a lignin precursor with a 5-5 biphenyl structure in the growing lignin polymer (Karhunen *et al.*, 1995). We carried out immunolabeling of the dibenzodioxocin structures with the specific antibody previously described by Kukkola *et al.*, (2003). In the control Col-0, the dibenzodioxocin structures were well represented in the secondary wall of iFs, more precisely in the S_2 sub-layer (Fig. 6a) and in vessels through S_1 and S_2 sub-layers, with a few gold particles in cell corners (Fig. 6c). The labeling in the iFs of the mutant plant was very low (Fig. 6b), while in vessels these structures could not be detected (Fig. 6d). The dibenzodioxocin structures occur in lignins by coupling of phenolic end-units that can lead to branch-points in the chain (Brunow *et al.*, 1998, Ralph *et al.*, 2004). The fact that these structures which result from end-wise coupling mechanism are considerably lowered in the *ccr1g* mutant is an indication that the mutation impacted the mode of polymerization of the monolignols. According to Brunow *et al.* (1998), the dibenzodioxocin structures are produced in the late phases of cell wall lignification. The low level in fibers, and near absence in vessels, of these structures in *ccr1g* mutant agrees with delayed lignification (Laskar *et al.,* 2007) and immature lignin formation.

The results obtained with the three preceding antibodies directed against **structures** formed by end-wise coupling mechanism (ie β-O-4 and dibenzodioxocins bonding patterns) lead to the following conclusions: In the control *A. thaliana* Col-0, the particularly low intensity of immunolabeling in the S_1 layer suggests that non-condensed lignin structures are deposited at

the later stages of secondary wall formation. This result is in agreement with literature data (Terashima *et al*., 1993) about the spatio-temporal deposition of lignins. In the *ccr1g* mutant, the distribution observed indicates that, in addition to a reduced lignin content, the plant did not synthesize a normal proportion of non-condensed units. The particularly low occurrence of non-condensed structures is substantiated not only by the results of thioacidolysis showing the low level of non-condensed units in the transgenic plant since only 20% of the lignin units, versus 30% in the normal plant Col-0, are only involved in non condensed bonds, but also by the reduction of the total lignin content (Mir Derikvand *et al*, 2007).

The immunolabeling of the **condensed** guaiacyl units (G) in the secondary walls of the null mutant (Fig. 7 a-d) showed that, like in the control plant Col-0, the gold particles were abundantly and regularly distributed in the sub-layers of the interfascicular fibers and vessels. Interestingly it can be noticed that the density of condensed guaiacyl epitopes appears higher in the mutant (see also Table 4), suggesting that the guaiacyl units contribute primarily to the condensed lignins. From that it can be deduced that the absence of cinnamoyl-CoA-reductase activity induced a mechanism of monolignol polymerization that favoured the formation of condensed guaïacyl lignin units. Similar results were previously reported in the *Arabidopsis ASCCR* down-regulated lines (Ruel *et al.*, 2002).

The labeling with antibodies directed against the condensed mixed guaiacyl-syringyl epitopes (GS) (Fig. 7 e-h), revealed that their distribution in the control Col-0 was in the S_1 and S_2 sub-layers in the iFs (Fig. 7e), and predominantly in S_1 and S_3 in the vessels (Fig. 7g). *CCR1*-mutation induced a clear reduction of these lignin sub-structures in the iFs (Fig. 7f) as well as in the vessels (Fig. 7h). Considering the results furnished by the two antibodies directed against condensed structures, it appears that the changes differentially influenced the mixed GS and the G epitopes as shown by the semi-quantitative evaluation (Table 4).

The immunolabeling investigation completed the results of global chemical analyses, namely the reduced lignin level and the higher frequency of condensed bonds in the lignins from *A. thaliana ccr1g* mutant, giving a detailed description of the occurrence and patterns of distribution of the lignin structures in the main lignified supporting and conducting cells.

Chemical composition of microdissections of different tissues from floral stems of Col-0 and *ccr1g* lines

The previous results obtained at the ultrastructural level, with the use of immunological probes against cell wall polymer constituents, showed us that the alterations in the deposition of the corresponding lignin epitopes were most of the time tissue-specific. However, the employed methods only allow a semi-quantitative evaluation of the modifications. In order to get a more precise quantitative information, we performed the separation and isolation of the interfascicular region and of the vascular bundle region by Laser Capture Microdissection (LCM) (Matsunaga *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 2002). The laser beam selectively cuts out the iFs (Fig. 8a-c) and Vbs (Fig. 8d-f), leaving the surrounding tissue intact. iFs and Vbs were collected by catapulting them with a laser pulse into the caps (Fig. 8 c, f) allowing the collection of tissue fragments for polysaccharides and lignin analysis.

Tissue specific polysaccharides analysis

The preceding cell wall polysaccharide analyses reflected the global changes in the whole stem, regardless of the tissue-specific action of the genes involved in cell wall differentiation (Campbell and Sederoff, 1996; Demura and Fukuda, 2007). Thus, in view of characterizing the tissue-specific impact of the mutation, the wall carbohydrates of the iFs and Vbs, respectively, isolated by LCM, were subjected to selective and total polysaccharide analyses (Angeles *et al.*, 2006). Due to the limited amount of collected material, only the relative proportions of the main cell wall sugars, glucose and xylose, could be established, allowing the relative proportions of cellulose and xylans in the walls (Figure 9).

The results suggest that the *ccr1g* mutation differentially affected the Vbs and the iFs. From the variations of glucose/xylose ratios it is difficult to interprete wether they may be ascribed to variation in cellulose or xylan content. However, the images in TEM showing the loosened microfibril organization and low compactness of the fiber wall support a defect in cellulose synthesis. This defect in cellulose also correlates with the X-ray diffraction results of altered cellulose deposition. On the other hand, the increased glucose/xylose ratio of the Vbs, whose collapse indicates a lowered mechanical resistance, would better correlate with a diminution of xylans than with an augmentation of cellulose. The contribution of xylans to cell wall cohesion and mechanical resistance is known to be closely related to their arrangement

relative to CMFs (Salmén, 2004; Zhong *et al*., 2005; Lawoko *et al.,* 2005; Joseleau & Ruel, 2006).

Lignin micro-analysis

Lignin structure of the microdissected samples was evaluated by thioacidolysis from 100 collects per each tissular type (iFs and Vbs) recovered from the mature floral stems of *A. thaliana*. As for the polysaccharide micro-analysis, it was the first time that LCM samples were analyzed by the thioacidolysis method. A satisfying signal-to-noise ratio was obtained, as evidenced from the GC traces employed for the quantitative determination of the S and G lignin-derived monomers (Fig. 10). As the analyses of these monomers are in the range of trace analyses, we checked that blank experiments did not yield any lignin-derived monomers.

Importantly enough and in the control samples, the relevancy of the LCM-thioacidolysis combination was confirmed by the higher S/G molar ratio of the iFs samples, relative to the Vbs samples (Fig. 10 and Table 5). Consistently with the results of Mäule histochemical staining (data not shown) and of the immunolabeling with the anti-S antibody, the frequency of thioacidolysis S monomers recovered from control samples was found to be twice higher in the iFs sample, relative to the Vbs sample. Contrary to the classical assertion that vessel walls are primarily formed with G units, S units were present in the vascular bundles confirming the localization obtained with the anti-S antibody (Fig.5 e, g). The total thioacidolysis yield obtained from the control Col-0 samples and expressed in nanomoles per 100 microdissections are given just as indicative values as we cannot certify that all the 100 samples were actually recovered in the sampling tube. The yield (Table 5) and the surface area of the collected samples (data not shown) were found to be similar from the iF and Vb samples, which suggests that the lignin content of these two regions are not very different.

In the mutant plant, the S/G ratio was also found to be higher in the iFs sample than in the Vbs one (Table 5). Compared to Col-0, the S/G ratio in *ccr1g* samples was higher in the vascular bundles and lower in the interfascicular fibers. This tissue-specific impact of the mutation could not be detected from the global analyses of the stem lignins. The indicative thioacidolysis yields of the *ccr1g* iFs and Vbs samples were substantially lower than the control levels. This reduction is related to several parameters, ie the lower surface area of the collected samples (data not shown), their lower lignin level (revealed by the global analyses) and/or the higher condensation degrees of *ccr1g* lignins. Thioacidolysis of microdissected

samples revealed that the *ccr1g* lignins released more H monomers than the control, whatever the tissue (Table 5).

Conclusions

Taken together the results of thioacidolysis and of immuno-cytochemical analyses demonstrate that *CCR 1*-mutation in *A.thaliana* had a strong impact on the assembly of the secondary walls of fibers and vessels. The defect in CCR activity both reduces the lignin level and alters the ultrastructural distribution of the guaiacyl and syringyl units, which severely impairs the assembly of the lignified secondary cell walls. The overall result of the mutation was to impair the capacity of the lignified walls of the interfascicular fibers and of the xylem vessels to properly assemble the cellulose microfibril network in the S_2 layer, with the consequence that their orientation was disturbed. The defect in the orientation of the CMFs in S_2 does not seem to be the result of a defect in secondary wall cellulose synthesis since the S_1 layer of the cells was not affected by the mutation, but rather the consequence of lignin, and perhaps hemicelluloses, modifications in quantity and structure. Thus, a correlation is suggested between the defect in lignin synthesis and the capacity of organization of CMFs. Specifically, the topochemical investigation points out to the particular participation of the non-condensed structures for the coherent secondary wall of fibers to assemble properly. Since the mode of coupling of monolignols defines the type of inter-unit linkages in condensed or non-condensed lignin structures, these results indicate that CCR1-absence influenced the mode of coupling of the condensed units whether they involved guaiacyl units only or mixed syringyl-guaiacyl units. Since thioacidolysis shows that 80% of the lignin in the *ccr1g* mutant is of the condensed type, the results from immunolabeling suggest that this condensed moiety, which cannot be fully characterized by biochemical analysis, is predominantly built up of guaiacyl units. It is noteworthy, in this mutation, that the modifications affecting the topochemical distribution of the lignin epitopes followed almost the same trends, as shown by the relative labeling indices values, in the interfascicular fibers and the vessels showing that in spite of their specific topochemistry, the two types of lignified cells were influenced in the same way by CCR1-absence.

The reduction of lignin content is very likely one of the primary causes of the strongly unstructured S_2 layers in interfascicular fibers and in xylem vessels. On the other hand, it is remarkable that S_1, the first deposited layer of the secondary wall, is apparently not altered in

its capacity to assemble properly. This could be explained by the fact that in S_1 lignins are essentially of condensed guaiacyl nature (Terashima, 1989), similar in that to the lignins from the middle lamella. Thus, it appears normal that the global analysis of *ccr1g* reflects its higher proportion of condensed lignin structures, as it is the case with the immunolabeling. On the other hand it is clear that the abnormal decrease of non-condensed epitopes in S_2, in which lignins are normally non-condensed (Terashima, 1989; Joseleau and Ruel, 1997), must be related to the incapacity of CMFs to associate properly. This underscores the importance of the cellulose/lignin interaction in which the orientation of lignin rings is guided by the orientation of cellulose (Houtman and Atalla, 1995). In the same way as the inhibition of cellulose synthesis caused the abnormal deposition of lignin in zinnia cells (Taylor *et al.,* 1992), we have here with the *ccr1g* mutant the reverse situation where the alteration of lignin synthesis impedes cellulose organization.

Beyond the description of the very impact of the *ccr1g* mutation on the wall structure of *A. thaliana*, the present results underscore the fundamental difference in the process of assembling of S_1 and S_2 in the lignified interfascicular fiber wall. It appears that S_1 can form in a coherent manner in the absence of non-condensed syringyl lignin units whereas the participation of these units seems important for S_2 to organize a normal spatial pattern of its cellulose framework.

Caution must be exerted in interpreting the global carbohydrate analysis results since one must keep in mind that the impact of the mutation is tissue-specific, as it is demonstrated here at the scale of electron microscopy, and therefore that the results of carbohydrate analyses are partly blurred by the fact that all the mixed cell types of the stem contribute to average the result of the analysis. To overcome these difficulties the implementation of LCM followed by micro-analysis of carbohydrates and lignins allowed selected tissues of a single type to be analyzed. This approach had proven to be effective for comparative polysaccharide composition (Angeles *et al.,* 2006), but was implemented for the first time here for tissue specific lignin analysis.

Finally, the LCM technique associated with sensitive analytical degradations combined to GC-MS of the recovered products was used for the first time to investigate the heterogeneous distribution of lignins and polysaccharides in the lignified tissues of *A. thaliana* stems. Albeit some improvements are to be performed in order to improve the tedious sample recovery, the

very first results reported herein underline the potential of such a micro-strategy for cell wall investigation.

Acknowledgements

The financial supports of European Union (Marie-Curie scholarship to J.B-S) and of GDR INRA-CNRS are gratefully acknowledged. The authors are indebted to Dr. Yoshiaru Nishiyama for the X-ray diffraction and helpful discussion, and to Michel Trierweiler for the solid sate NMR spectra (CERMAV, Grenoble). They also would like to thank Dr. Philippe Lorimier (Grenoble Hospital) and Dr. Ingo Burgert (Max-Planck-Institute,Potsdam, Germany) for kindly providing access to Laser Confocal Microscope. Danièle Dupeyre (CERMAV, Grenoble), Bruno Letarnec and Fréderic Légée are also thanked for their skillful assistance.

References

Albersheim P, Nevins, DJ, English, PD. Karr, A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohyd Res* **5**: 340-345.

Angeles G, Berrio-Sierra J, Joseleau JP, Lorimier P, Lefèbvre A, Ruel K. 2006. Preparative laser capture microdissection and single-pot cell wall material preparation: a novel method for tissue-specific analysis. *Planta* **224**: 228-232.

Anterola AM, Lewis NG. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity *Phytochemistry* **61:** 221-294

Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K-i. 2002. Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *Plant J* **32:** 401-408

Boudet AM. 2000. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol Bioch* **38:** 81-96

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13:** 1499-1510

Brunow G, Kilpelaïnene I, Sipilä J, Syrjänen K, Karhunen P, Setälä H, Rummako P. 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. In: Lewis NG, Sarkanen S (eds) Lignin and lignan biosynthesis. **ACS Symp Ser** vol *697*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 131-147

Campbell MM and Sederoff RR. 1996. Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implication for he genetic improvement of plants. *Plant Physiol* **110:** 3-13.

Chabannes M, Barakate A, Lapierre C, Marita JM, Ralph J, Pean M, Danoun S, Halpin C, Grima-Pettenati J, Boudet AM. 2001a. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J* **28:** 257-270

Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A, Chabbert B, Jauneau A, Joseleau JP, Boudet AM. 2001b. 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

Chambat G, Cartier N, Lefèbvre, Marais M-F, Joseleau J-P. 1997. Changes in cell wall and extracellular polysaccharides during the culture cycle of *Rubus fruticosus* cells in suspension culture. *Plant Physiol Bioch* **35:** 655-664

Clair B , Thibaut B. 2001. Shrinkage of gelatinous layer of poplar and beech tension wood. *IAWA J* **22:** 121-131

Demura T and Fukuda H. 2007. Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in Plant Sci* **12:** 64-70.

Dence CW. 1992. The determination of lignin. *In* S Lin, Y., CW Dence, eds, *Methods in Lignin Chemistry*. Springer-Verlag, pp 33-61

Dixon RA, Chen F, Guo D, Parvathi K. 2001. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **57:** 1069-1084

Donaldson LA. 2001. Lignification and lignin topochemistry an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57:** 859-873

Fukushima RS, Hatfield RD. 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:** 3133-3139

Goujon T, Ferret V, Mila I, Pollet B, Ruel K, Burlat V, Joseleau JP, Barriere Y, Lapierre C, Jouanin L. 2003a. Down-regulation of the *AtCCR1* gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* **217:** 218-228

Goujon T, Sibout R, Eudes A, MacKay J, Jouanin L. 2003b. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Bioch* **41:** 677-687

Heux L, Dinand E and Vignon MR. 1999. Structural aspects of ultrathin cellulose microfibrils followed by ^{13}C CP-MAS NMR. *Carbohyd Polym* **40:** 115-124

Houtman CJ & Atalla RH. 1995. Cellulose-lignin interactions, a computational study. *Plant Physiol* **107:** 977-84.

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

Joseleau JP, Ruel K. 1997. Study of lignification by non-invasive 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:** 1123-1133

Joseleau JP and Ruel K. 2006. New Insights on the Occurrence and Role of Lignin in the Secondary Wall Assembly. *In* Hayashi T, ed, *The Science and Lore of the Plant Cell Wall; Biosynthesis, structure and function*, Brown Walker Press, Boca Raton, USA, pp 294-302.

Joseleau J-P, Faix O, Kuroda K-I, Ruel K. 2004a. A polyclonal antibody directed against syringylpropane epitopes of native lignins. *CR Biol* **327:** 809-815

Joseleau J-P, Imai K, Kuroda K-I, Ruel K. 2004b. Detection in situ and characterization of lignin in a G-layer of tension wood fibers of *Populus deltoides*. *Planta* **219:** 338-345

Jouanin L, Lapierre C. 2006. Avantages et limites d'*Arabidopsis thaliana* pour l'étude des premières étapes de la lignification. *Cah Agric* **15:** 179-185

Karhunen P, Rummakko P, Sipila J, Brunow G, Kilpelainen I. 1995. Dibenzodioxocins -a novel type of linkage in softwood lignins. *Tetrahedron Lett* **36:** 169-170

Kukkola EM, Koutaniemi S, Gustafsson M, Karhunen P, Ruel K, Lundell TK, Saranpää P, Brunow G, Teeri TH, Fagerstedt KV. 2003. Localization of dibenzodioxocin substructures in lignifying Norway spruce xylem by transmission electron microscopy-immunogold labeling. *Planta* **217:** 229-237

Lacombe E, Hawkins S, Van Doorsselaere J, Piquemal J, Goffner D, Poeydomenge O, Boudet AM, 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:** 429-441

Lapierre C, Monties B, Rolando C. 1986. Thioacidolysis of Poplar lignins : identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions. *Holzforschung* **40:** 113-118

Lapierre C, Pollet B, Rolando C. 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res on Chem Intermediat* **21:** 397-412.

Laskar DD, Jourdes M, Patten AM, Helms GL, Davin LB, and Lewis NG. 2006. The *Arabidopsis* cinnamoyl CoA reductase *irx4* mutant has a delayed but coherent (normal) program of lignification. *Plant J* **48:** 674-686

Lawoko M, Henriksson G, Gellerstedt G. 2005. Sructural differences between the lignin carbohydrate complexes present in wood and chemical pulps. *Biomolecules* **6:** 3467-3473.

Matsunaga S, Schutze K, Donnison IS, Grant SR, Kuroiwa T, Kawano S. 1999. Single pollen typing combined with laser-mediated manipulation. *Plant J* **20:** 371-378

Mayhew TM, Griffiths G, Lucocq JM. 2004. Application of an efficient method for comparing immunogold labelling patterns in the same sets of compartments in different groups of cells. *Histochem Cell Biol* **122:** 171-177

Mir Derikvand M, Berrio-Sierra J, Ruel K, Pollet B, Do CT,Thévenin J, Buffard D, Jouanin L, Lapierre C. 2007. Redirection of the phenylpropanoid Pathway to Feruloyl Malate in *Arabidopsis* mutants deficient for Cinnamoyl-CoA reductase 1. *Planta* (**on line**)

O'Connell A, Holt K, Piquemal J, Grima-Pettenati J, Boudet A, Pollet B, Lapierre C, Petit-Conil M, Schuch W, Halpin C. 2002. Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res* **11:** 495-503

Patten AM, Cardenas CL, Cochrane FC, Laskar DD, Bedgar DL, Davin LB, Lewis NG. 2005. Reassessment of effects on lignification and vascular development in the *irx4 Arabidopsis* mutant. *Phytochemistry* **66:** 2092-2107

Pinçon G, Chabannes M, Lapierre C, Pollet B, Ruel K, Joseleau J-P, Boudet AM, Legrand M. 2001. 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:** 145-155

Piquemal J, Lapierre C, Myton K, O'Connell A, Schuch W, Grima-Pettenati J, Boudet AM. 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J* **13:** 71-83

Ralph J, Hatfield RD, Piquemal J, Yahiaoui N, Pean M, Lapierre C, Boudet AM. 1998. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *P Natl Acad Sci USA* **95:** 12803-12808

Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SH, Christensen JH, Boerjan W. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Rev* **3:** 29-60

Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber J, Leplé J-C, Berrio Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Boerjan W, Lapierre C. 2008. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperms lignins (and a pseudo marker compound for cinnamoyl-CoA reductase deficiency). *Plant J* **53:** 368-379

Rolando C, Monties B, Lapierre C. 1992. Thioacidolysis. *In C Dence, SY Lin, eds*, *Methods in lignin chemistry*. Springer Verlag, pp 334-349

Ruel K, Barnoud F, Eriksson KE. 1981. Micromorphological and ultrastructural aspects of spruce wood degradation by wild-type Sporotrichum pulverulentum and its cellulase-less mutant Cel 44. *Holzforschung* **35:** 157-171

Ruel K, Faix O, Joseleau J-P. 1994. New immunogold probes for studying the distribution of the different lignin types during plant cell wall biogenesis. *J Trace Microprobe T* **12:** 247-265

Ruel K, Chabannes M, Boudet AM, Legrand M, Joseleau JP. 2001. Reassessment of qualitative changes in lignification of transgenic tobacco plants and their impact on cell wall assembly. *Phytochemistry* **57:** 875-882

Ruel K, Montiel MD, Goujon T, Jouanin L, Burlat V, Joseleau JP. 2002. Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. *Plant Biology* **4:** 2-8

Saeman, J.F., Moore, W.E., Mitchell, R.L. and Millett, M.A. 1954. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi*, **37**: 336-343.

Salmén L. 2004. Micromechanical understanding of the cell-wall structure. *CR Biol* **327:** 873-880.

Taylor JG, Haigler CH. 1993. Patterned secondary wall assembly in tracheary elements occurs as a self-perpetuating cascade. *Acta Bot Neerl* **42:** 153-163.

Terashima N, Fukushima K. 1989. Biogenesis and structure of macromolecular lignin in the cell of tree xylem as studied by microautoradiography. *In Plant cell wall polymers*, NG Lewis and MG paice (Eds), ACS Symp. Series **399**, pp 160-168.

Terashima N, Fukushima K, Takabe K. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. *In HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield, J Ralph, eds*, *Forage cell wall structure and digestibility.* ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp 247-270

Thiery JP. 1967. Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc-Paris* **6:** 987-1017

Turner SR, Somerville CR. 1997. Collapsed Xylem Phenotype of *Arabidopsis* Identifies Mutants Deficient in Cellulose Deposition in the Secondary Cell Wall. *Plant Cell* **9:** 689-701

Zhong R, Pena MJ, Zhou GK, Nairn CJ, Wood-Jones A, Richardson EA, Morrison III WH, Darvill AG, York WS, Ye ZH. 2005. *Arabidopsis* Fragile Fiber 8, which

encodes a putative glucuronyltransferase, is essential for normal secondary wall synthesis. *Plant Cell* **17:** 3390-3408.

Figures

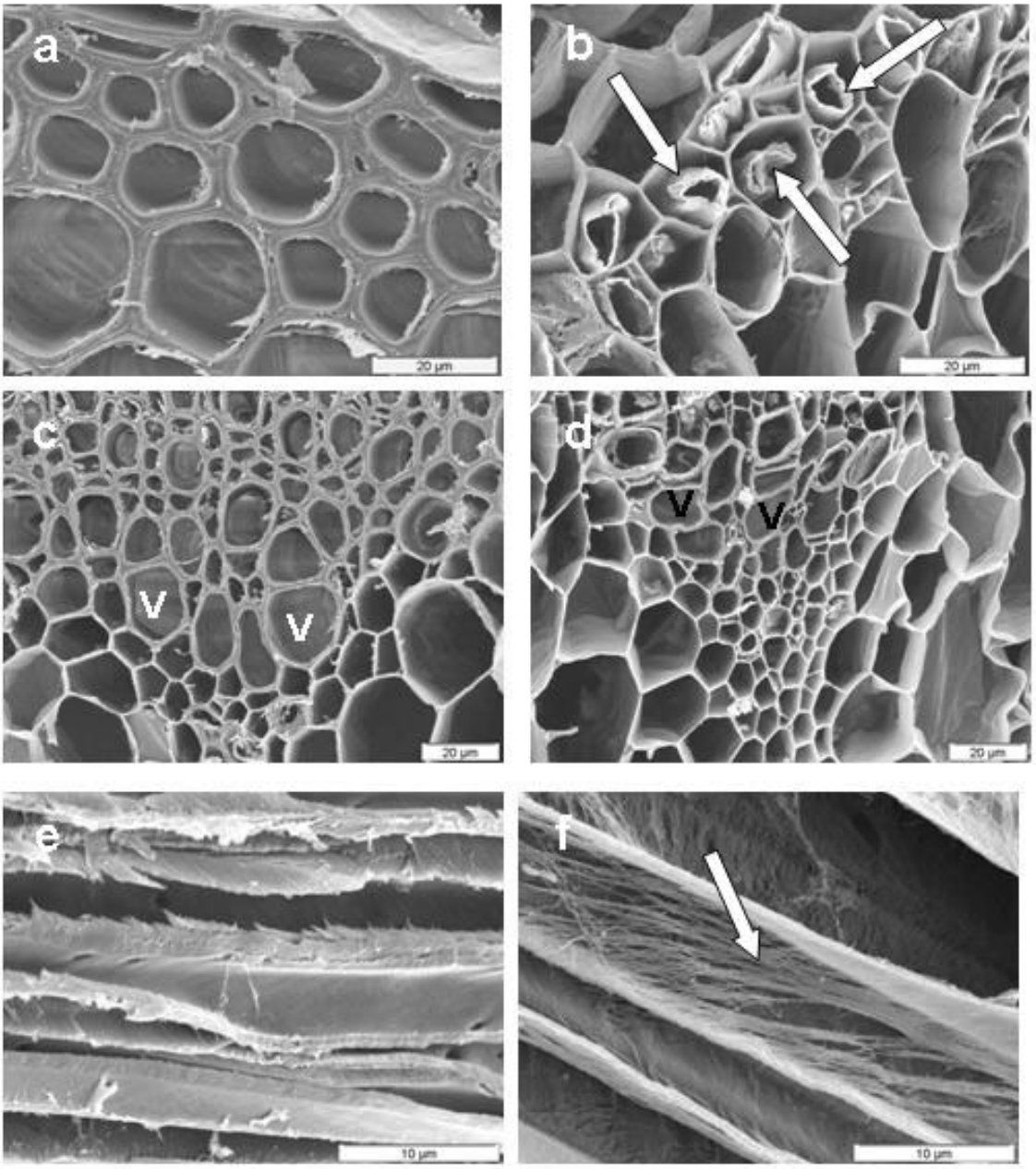


Fig. 1

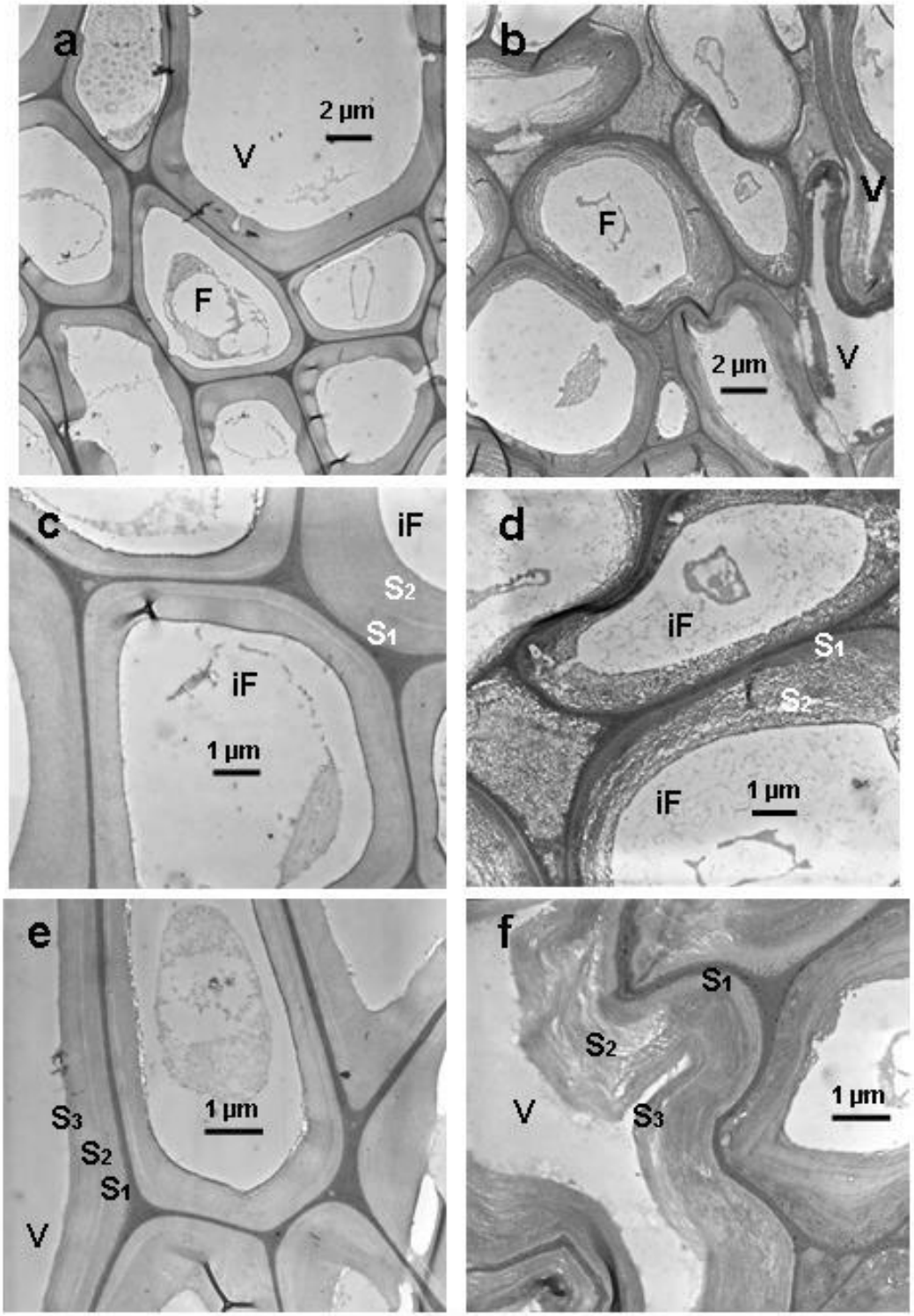

a
2 µm
V
F
b
F
V
2 µm
V
c
iF
S2
S1
iF
1 µm
d
iF
S1
S2
iF
1 µm
e
S3
S2
S1
V
1 µm
f
S1
S2
V
S3
1 µm

Fig. 2

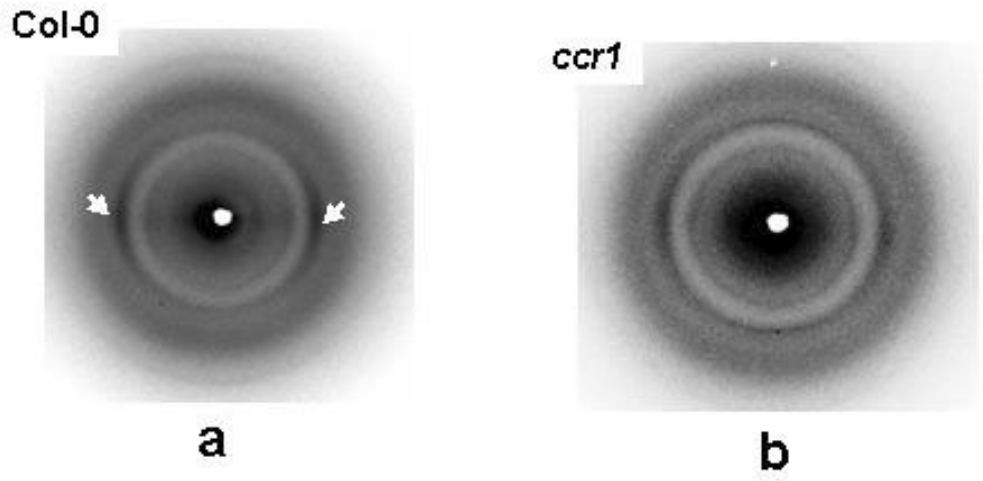


Fig. 3

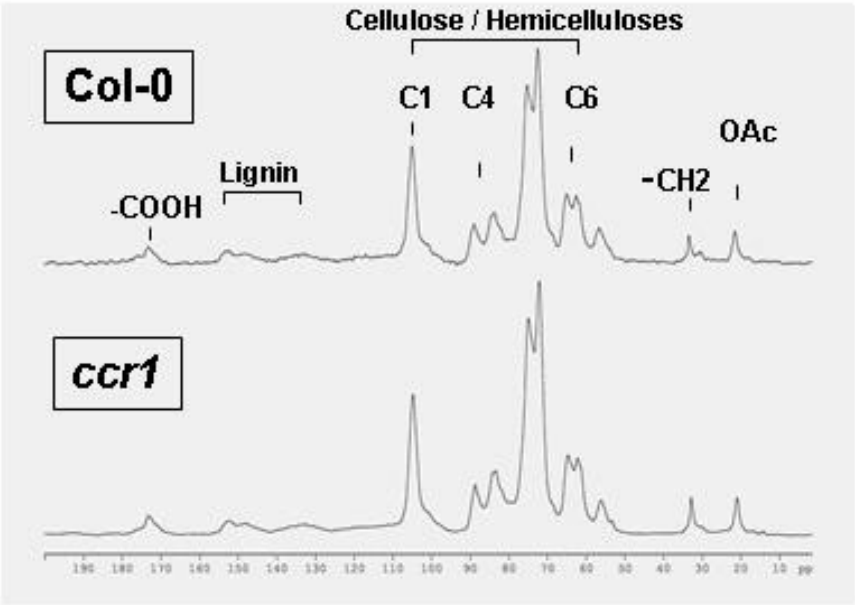

Cellulose / Hemicelluloses
Col-0
C1
C4
C6
OAc
Lignin
-COOH
-CH2
ccr1

Fig. 4

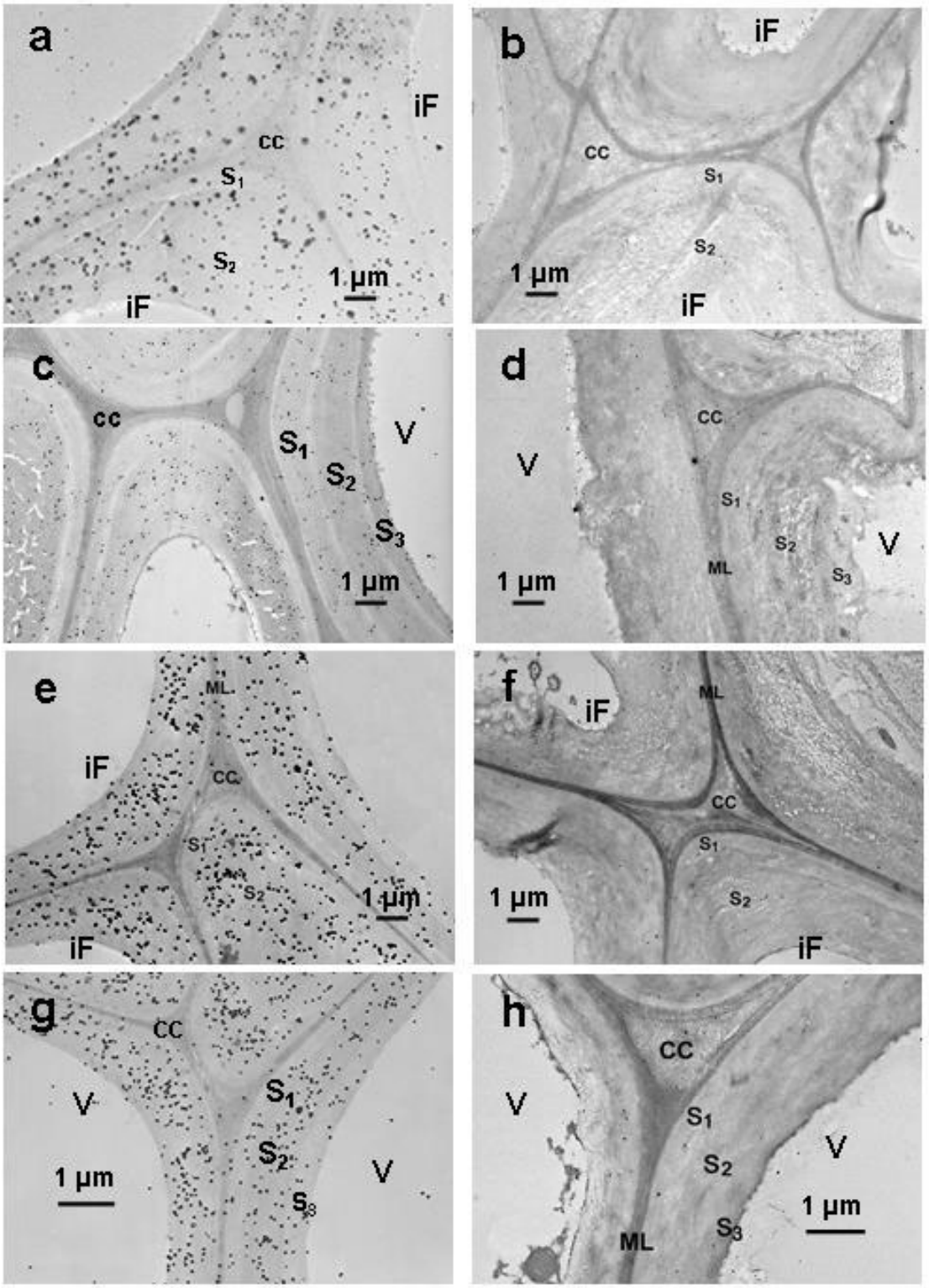

a
iF
CC
S1
S2
1 µm
iF
b
iF
CC
S1
S2
1 µm
iF
c
CC
S1
V
S2
S3
1 µm
d
CC
V
S1
S2
V
ML
S3
1 µm
e
ML
iF
CC
S1
S2
1 µm
iF
f
iF
ML
CC
S1
1 µm
S2
iF
g
CC
V
S1
S2
V
1 µm
S3
h
CC
V
S1
V
S2
1 µm
ML
S3

Fig. 5

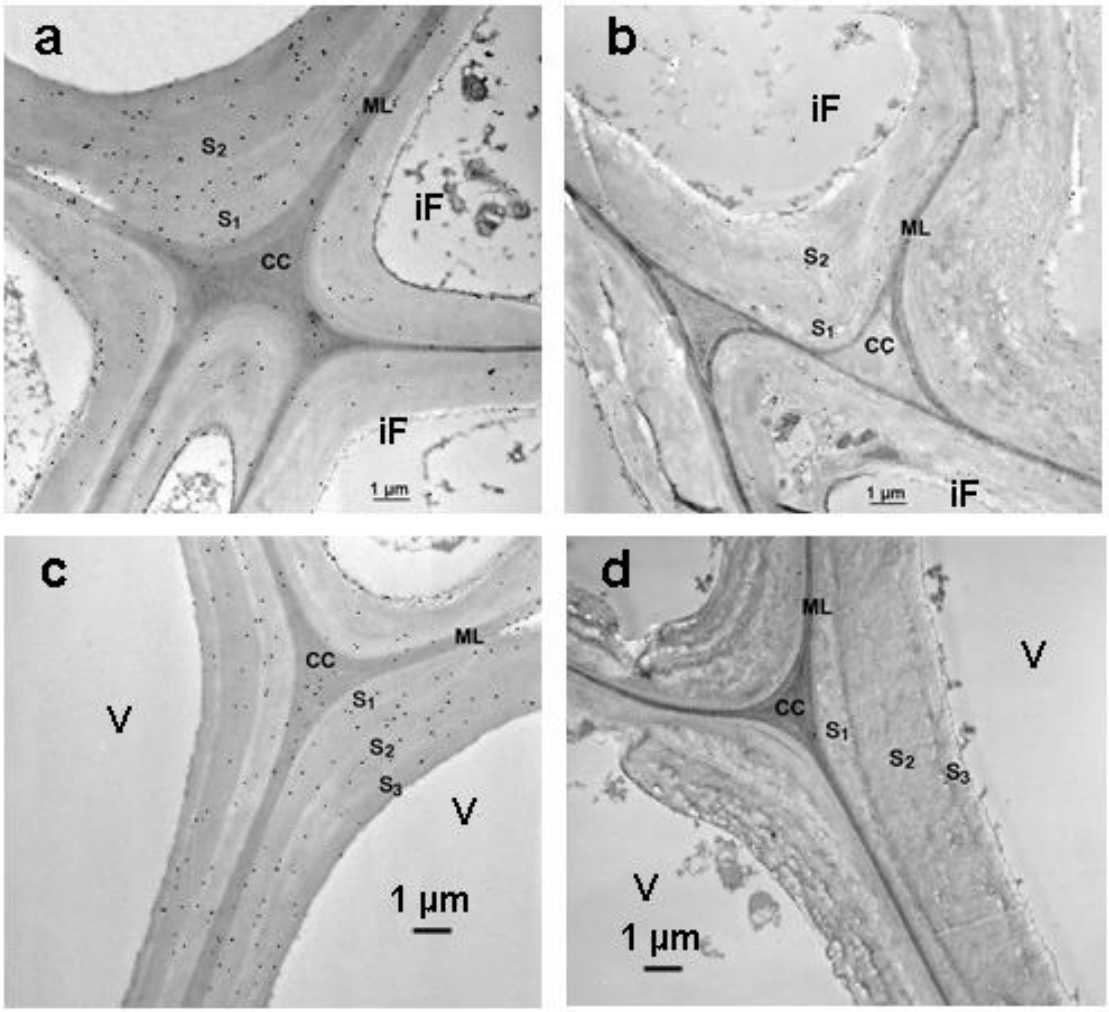

a
ML
S2
S1
CC
iF
iF
1 µm
b
iF
ML
S2
S1
CC
1 µm
iF
c
CC
ML
S1
S2
S3
V
V
1 µm
d
ML
V
CC
S1
S2
S3
V
1 µm

Fig. 6

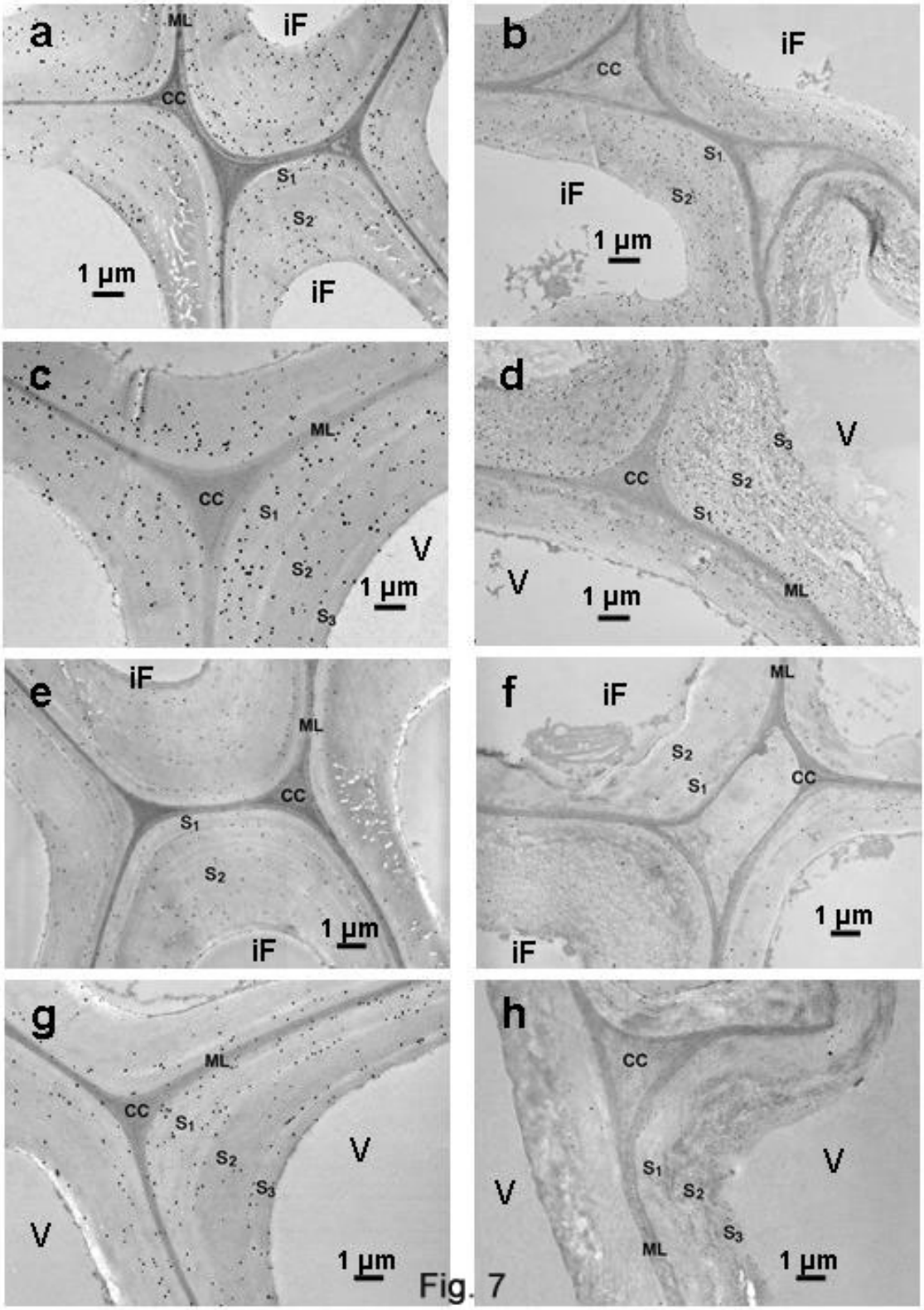

a
ML
iF
CC
S1
S2
1 µm
iF
b
CC
iF
S1
iF
S2
1 µm
c
ML
CC
S1
V
S2
1 µm
S3
d
S3
V
CC
S2
S1
V
1 µm
ML
e
iF
ML
CC
S1
S2
1 µm
iF
f
iF
ML
S2
S1
CC
1 µm
iF
g
ML
CC
S1
S2
V
S3
V
1 µm
h
CC
S1
V
V
S2
S3
ML
1 µm

Fig. 7

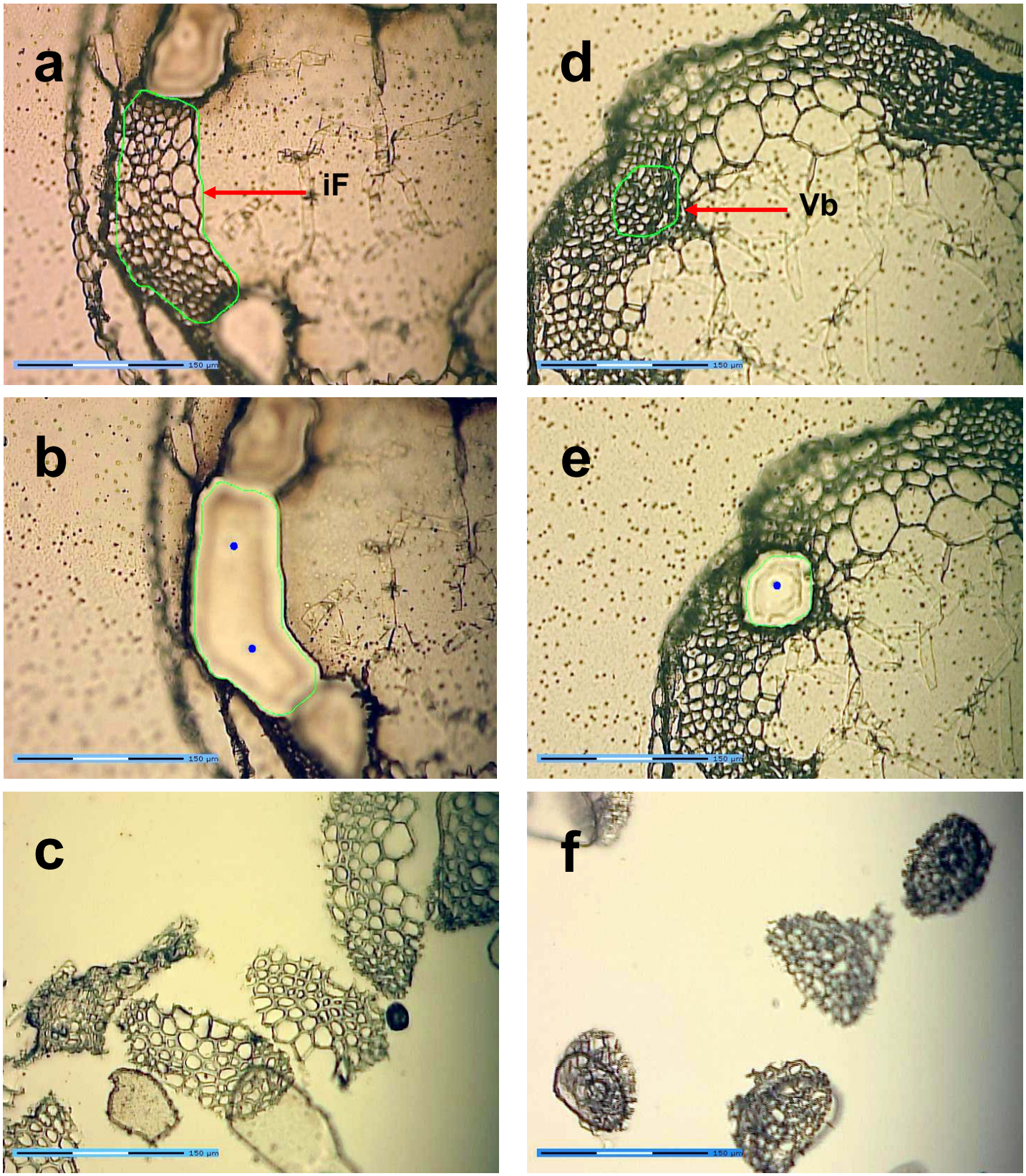


Fig. 8

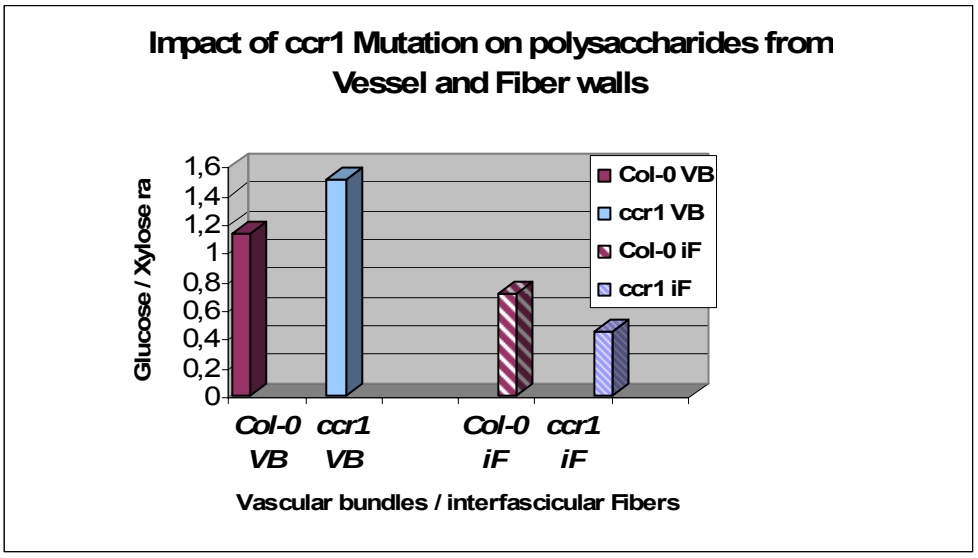

Impact of ccr1 Mutation on polysaccharides from Vessel and Fiber walls
Glucose / Xylose ra
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Col-0 VB
ccr1 VB
Col-0 iF
ccr1 iF
Col-0 VB
ccr1 VB
Col-0 iF
ccr1 iF
Vascular bundles / interfascicular Fibers

Fig. 9

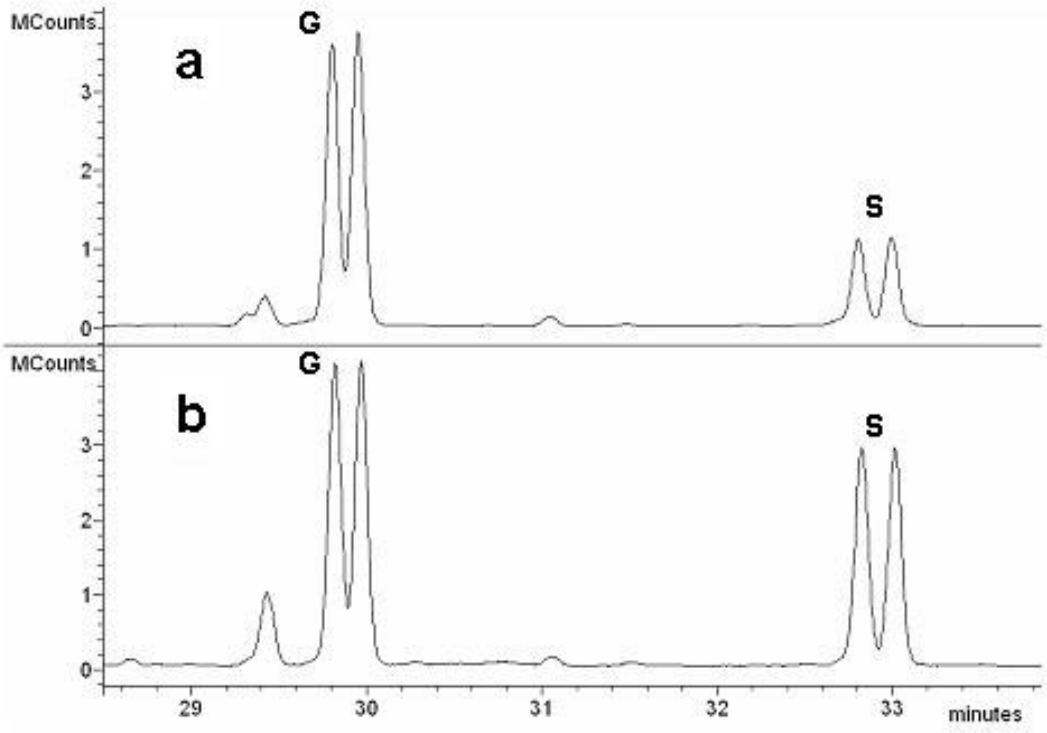


Fig. 10

Figure legends

Fig. 1 Scanning electron microscope images of the main tissues of the mature floral stems of the control (Col-0) and the *ccr1g* lines. a-d: transverse sections; a,b: interfascicular fibers (iFs)-Note in *ccr1g* the detachment of the secondary wall which results in annular rings independent of the wall; c,d: vascular bundle (Vb)- a collapse of the vessel wall is evident in *ccr1g* (d); e,f: longitudinal sections – the fibrillar organization of the secondary wall is apparent in *ccr1g* (f)

Fig. 2 Ultrastructural organization of the interfascicular fibers (iFs) and the vascular bundles (Vbs) of the mature floral stems of the control (Col-0) and the *ccr1g* lines – PATAg staining – a,b : low magnification showing the collapse of vessels and fibers and the changes in cellular junctions – Note the loosening of both fibers and vessels cell walls ; c,d : details of iFs walls – the modification of the walls is restricted to S_2, S_1 remains compact; e,f: vessels walls are strongly collapsed in *ccr1g*, S_1 remains unchanged

Fig. 3 X-ray diagrams of control *A. thaliana* Col-0 and *ccr1* mutant floral stems

Fig. 4 CP/MAS-^{13}C NMR spectra of control *A. thaliana* Col-0 and *ccr1* mutant floral stem tissues

Fig. 5 Topochemical distribution of non-condensed lignin structures in the mature floral stems of the control (Col-0) and the *ccr1g* lines; a-d:non-condensed mixed guaïacyl-syringyl (GS) structures; e-h: syringyl epitopes. There is a strong reduction of the mixed GS epitopes both in iFs (b) and vessel walls (d) in *ccr1g;* Syringyl epitopes almost disappeared in *ccr1* both in iFs and vessel walls

Fig. 6 Topochemical distribution of dibenzodioxocin structures in the mature floral stems of the control (Col-0) and the *ccr1g* lines. a,b: iFs - less gold particles in the loosened walls of *ccr1* fibers; c,d: disappearance of the gold particles in vessels walls of *ccr1*

Fig. 7 Topochemical distribution of condensed lignin structures in the mature floral stems of the control (Col-0) and the *ccr1g* lines. a-d: homoguaïacyl lignin structures, e – h: condensed mixed guaïacyl-syringyl structures.

a,b: in iFs, the gold particles are more numerous in both the control and the *ccr1* lines, but more homogeneously distributed in *ccr1g*; c,d: same observation as for iFs; e – f: the weak labeling of iFs in the control Col-0 disappears in iFs of *ccr1*; g,h: in vessel walls condensed GS structures which are more concentrated in S_1 and S_3 only remain present in small number in S_3 of *ccr1g*.

Fig. 8 Laser Capture Microdissection (LCM) of different tissues from *A. thaliana ccr1g* stem; a-c: isolation of iFs; d-f: isolation of Vbs

Fig. 9 Variation of cellulose to xylans ratio in the walls of Vbs and iFs from *A. thaliana* Col-0 and *ccr1* mutant

Fig. 10. Partial GC-MS chromatograms showing the separation of the thioacidolysis G and S lignin-derived monomers recovered from the a) Vbs and b) iFs collected from 100 microdissections of the Col-0 floral stems.

Tables

Table 1 Lignin content and structure in the wild type Col-0 and the mutant *ccr1g* extract-free mature stems. The Klason lignin content is expressed as weight percentage of the extract-free stems. Lignin structure is evaluated by thioacidolysis. The yields of lignin derived H, G and S thioacidolysis monomers, of thioacidolysis-released ferulic acid and of the G marker compound for ferulic acid incorporation into lignins (G-CHR-CHR_2 with R = SEt) are expressed in µmol per gram of Klason lignin. Standard errors between duplicate analyses are in the 5-10% range

Line	Klason lignin KL (%wt)	Total yield H+G+S	Fe	G-CHR-CHR_2	%H	%G	%S
Col-0	15.06	1127	1.8	1.0	0.8	78.1	21.3
ccr1g	13.76	825	7.1	4.7	0.6	71.6	27.8

Table 2. Non-cellulosic polysaccharide composition in the extract-free mature stems of *A. thaliana* wild-type Col-0 and *ccr1g* mutant lines.

Line	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
WT Col-0	8.5 (0.6)	7.8 (0.6)	58.5 (0.1)	5.5 (0.1)	11.3 (0.3)	8.1 (0.4)
ccr1g	9.0 (0.8)	9.2 (0.3)	61.5 (1.0)	4.4 (0.1)	9.5 (0.4)	6.0 (0.4)

Values are relative molar proportions (standard deviation)

Table 3. Total cell wall carbohydrate composition in the extract-free mature stems of A. thaliana wild-type Col-0 and ccr1g mutant lines.

Line	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Glucose/Xylose
WT Col-0	4.3 (0.3)	31.3 (2.0)	3.9 (0.2)	3.4 (0.3)	57.6 (1.8)	1.8
ccr1g	6.5 (0.2)	41.5 (2.0)	3.0 (0.1)	2.9 (0.2)	45.7 (1.3)	1.1

Values are relative molar proportions (standard deviation)

Table 4. Semi-quantitative immuno-cytochemical analysis of the topochemical distribution of lignin sub-structure epitopes in the cell walls of Col 0 and *ccr1g* mature stems.

Epitope	*A. thaliana* Col-0					*A. thaliana ccr1*				
	Fiber		Vessel			Fiber		Vessel		
	S_1	S_2	S_1	S_2	S_3	S_1	S_2	S_1	S_2	S_3
S/C Non-Condensed	2.1 ***0.33***	6.3 ***1.00***	1.5 ***0.24***	4.5 ***0.71***	1.5 ***0.24***	0 ***0***	1.2 ***0.19***	0.4 ***0.06***	2.1 ***0.33***	0.6 ***0.10***
S Non-Condensed	3.4 ***0.32***	7.4 ***1.00***	0.9 ***0.08***	3.2 ***0.30***	2.0 ***0.19***	0 ***0***	0.3 ***0.03***	0 ***0***	0 ***0***	0 ***0***
Dibenzodioxocin	2.5 ***0.76***	3.3 ***1.00***	1.8 ***0.30***	1.4 ***0.42***	0.3 ***0.09***	0 ***0***	0.7 ***0.21***	0 ***0***	0 ***0***	0 ***0***
G Condensed zl	7.5 ***1.00***	4.5 ***0.60***	5.0 ***0.66***	3.1 ***0.41***	3.2 ***0.43***	6.3 ***0.85***	10.2 ***1.36***	11.2 ***1.50***	7.9 ***1.05***	n.d. ***n.d.***
GS Condensed zl	3.5 ***0.71***	4.1 ***0.84***	4.9 ***1.00***	2.0 ***0.42***	3.6 ***0.73***	1.2 ***0.25***	1.1 ***0.22***	1.2 ***0.25***	0.8 ***0.16***	0.8 ***0.16***

* n.d.: Sub-layer non differentiated
** The intensity of the labelling was evaluated manually by the number of gold grains per μm^2
*** Values in italics represent the relative labelling indices and have been calculated by giving for each antibody the value 1.00 to the highest labeled sub-layer in the wild type sample Col-0. In this way, the variations in the intensities of labeling by each antiserum and in each cell type become clearly apparent. Absolute values cannot be compared between different antisera. Only their variation is significant.

Table 5. Molar ratio (S/G) and relative frequency (% molar) of the H, G and S lignin-derived monomers recovered from wild-type (Col-0) or from ccr1g interfascicular fibers (iF) and vascular bundles (Vb) recovered by laser capture microdissection. The total yield (H+G+S) is expressed in nanomoles per 100 microdissections. Standard errors between two injections are indicated in parentheses

Line and tissue	S/G	%H	%G	%S	H+G+S
Col-0 **iF**	0.64 (0.01)	0.72 (0.11	60.7 (0.1)	38.6 (0.1)	3.02 (0.01)
Col-0 **Vb**	0.27 (0.01)	0.88 (0.03)	78.3 (0.2)	20.8 (0.2)	2.53 (0.05)
ccr1 **iF**	0.51 (0.00)	1.6 (0.2)	64.8 (0.2)	33.6 (0.5)	1.98 (0.04)
ccr1 **Vb**	0.39 (0.00)	1.50	71.6 (0.3)	27.9 (0.3)	0.51 (0.03)

CHAPITRE V:

Etude ultrastructurale et biochimique des parois des hampes florales du double mutant *cad-c x cad-d* et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*

CHAPITRE V: ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES DU DOUBLE MUTANT *cad-c x cad-d* ET DU TRIPLE MUTANT *cad-c x cad-d + ref1*

INTRODUCTION

De nombreuses études ont été dédiées aux parois de plantes transgéniques ou mutantes affectées dans l'expression du gène de l'enzyme cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD). La CAD catalyse la réduction des aldéhydes *p*-OH cinnamyliques en alcools correspondants, en ayant NADPH pour cofacteur. Cette enzyme a été purifiée chez plusieurs espèces comme le peuplier (Sarni et al., 1984), l'eucalyptus (Goffner et al., 1992), le tabac (Halpin et al., 1992). Des plantes transgéniques présentant une réduction de l'activité CAD ont été produites, chez le tabac (Halpin et al., 1994; Stewart et al., 1997; Yahiaoui et al., 1997) et le peuplier (Baucher et al., 1996). Deux mutants naturels déficients en activité CAD ont été caractérisés: un chez le pin (MacKay et al., 1997) et l'autre chez le maïs (Halpin et al., 1998). Une quantité plus importante de dérivés *p*-OH cinnamaldéhydes a été détectée dans les lignines des tabacs transgéniques (Halpin et al., 1994; Ralph et al., 1998) et du pin mutant (Ralph et al., 1997). L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) des lignines des tabacs réprimés pour la CAD a suggéré que le sinapaldéhyde était engagé par liaisons β-O-4 avec les unités G et S, alors que le coniferaldéhyde ne se liait qu'aux unités S (Ralph et al., 2001).

La plupart des plantes déficientes en activité CAD présentent un phénotype xylème coloré et une diminution du taux de lignines (Higuchi et al., 1994; MacKay et al., 1997; Lapierre et al., 1999; Abbott et al., 2002; Pilate et al., 2002; Lapierre et al., 2004). Les peupliers transgéniques déficients en activité CAD présentent des altérations de la structure des lignines dépendant du pourcentage d'activité CAD résiduelle (Lapierre et al., 2004). Elles sont réduites lorsque le niveau d'activité résiduelle est supérieur à 20% (Lapierre et al., 1999). En revanche, elles sont marquées lorsque l'activité CAD résiduelle est très faible (Lapierre et al., 2004). Chez les plantes déficientes en activité CAD, l'analyse des lignines révèle le plus souvent l'incorporation de *p*-OH cinnamaldéhydes en quantité substantielle associée à une augmentation du degré de condensation des lignines. Des études récentes (Sibout et al., 2003; Sibout et al., 2005) ont révélé que, sur les 9 gènes *CAD* identifiés chez *A.*

thaliana, les gènes *CAD-C* et *CAD-D* étaient des gènes fondamentaux dans la voie de biosynthèse des lignines. La lignification des simples mutants présente une lignification très altérée par rapport au témoin (Ws): cette double mutation entraîne une réduction de la quantité de lignine des hampes florales matures d'environ 40 %, l'accumulation de coniféraldéhyde et de sinapaldéhyde dans les lignines, une réduction de 94 % de la fréquence des unités liées uniquement par liaisons β-O-4, une diminution du rapport S/G des monomères de thioacidolyse suggérant que les unités S non condensées sont les plus affectées.

Une étude récente a révélé que le gène *REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE* (*REF1*) chez *Arabidopsis thaliana* code une aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui est capable d'oxyder le coniféraldéhyde et le sinapaldéhyde en acide férulique et en acide sinapique, respectivement.

Les travaux décrits précédemment ont évalué l'impact de la déficience CAD sur la biochimie de la lignification sans étude approfondie de l'ultrastructure des parois secondaires. L'objectif de cette partie du travail de thèse est d'étayer ces données biochimiques par une étude de l'ultrastructure des parois secondaires et de la topochimie de la lignification. Elle est conduite sur le double mutant *cad-c x cad-d* obtenu chez l'écotype Ws d'*A. thaliana* (Sibout et al., 2005). Les résultats de biochimie et de biologie moléculaire obtenus sur ce double mutant en 2005 ont été essentiellement confirmés par une étude plus récente de l'équipe de Lewis (Jourdes et al., 2007), étude qui a également laissé de côté l'examen de la micromorphologie et de la topochimie des parois du mutant (rebaptisé *cad 4* x *cad 5* par N. Lewis). Les études phénotypiques à l'échelle de la microscopie optique ne permettent pas de suivre avec suffisamment de précision l'impact de l'extinction d'un ou plusieurs gènes sur le mode d'assemblage des constituants matriciels autour de la charpente microfibrillaire cellulosique. Il est donc nécessaire de travailler à l'échelle ultrastructurale à l'aide de la microscopie électronique en transmission (M.E.T). En effet, l'unité structurale de base qu'est la microfibrille de cellulose a un diamètre de 3 nm en moyenne et ne peut être visualisée qu'en M.E.T. Comme dans le cas du mutant *ccr 1*, nous avons réalisé une étude de la topochimie de la lignification du double mutation *cad-c x cad-d*.

Selon Nair et al., (2004), l'aldéhyde déshydrogénase REF1 catalyse la réduction du coniféraldéhyde en acide férulique et le mutant *ref1* est appauvri en

esters féruliques liés aux polymères pariétaux. Les travaux de Sibout et al. (2005) ont établi que la double mutation *cad-c x cad-d* provoque l'accumulation de coniféraldéhyde, composé phénolique ensuite incorporé dans les lignines. L'activité REF1 pourrait convertir une partie de ce coniféraldéhyde excédentaire en acide férulique ensuite converti en esters féruliques susceptibles de réticuler les polymères pariétaux (ponts de type ester-éther, Mir Derikvand et al., 2007). Un tel pontage pourrait atténuer l'impact de la diminution du taux de lignines et de l'altération de leur structure sur l'assemblage des parois secondaires lignifiées. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié de manière comparée les parois des hampes florales du double mutant *cad-c x cad-d* et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* afin d'examiner si la triple mutation induit un phénotype pariétal plus accentué.

Ce chapitre est divisé en deux parties, la première partie est dédiée à l'étude du double mutant *cad-c x cad-d* vis-à-vis de leur témoin Ws, la deuxième partie est consacrée à faire une comparaison entre le double mutant et le triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1*. Bien que les tableaux et figures concernant le triple mutant soient présentés dans la première partie du chapitre, ils seront discutés séparément dans la deuxième partie.

PREMIERE PARTIE

V.1. Composition chimique globale des parois des hampes florales du double mutant *cad-c x cad-d*

Nous avons entrepris une analyse globale des lignines des échantillons du double mutant, afin de confirmer et approfondir les études antérieures réalisées sur cette lignée (Sibout et al., 2005). Nous avons également réalisé l'analyse globale des polysaccharides des parois des hampes florales de ce mutant.

V.1.1. Composition en sucres neutres des parois des hampes florales

Les modifications affectant le métabolisme des lignines pourraient entraîner des modifications dans la synthèse et l'assemblage des polysaccharides des parois. L'analyse de la composition en oses neutres des parois des hampes est obtenue par hydrolyse totale et fournit des indications sur les proportions relatives en cellulose vis-à-vis des hémicelluloses.

Les résultats des analyses en sucres neutres présentés dans le tableau 1 montrent que dans le double mutant *cad-c* x *cad-d*, il y a une légère augmentation de l'arabinose, du xylose et du galactose (sucres présents dans les hémicelluloses) par rapport à la plante sauvage Ws. En contre partie, la quantité relative de glucose (assimilé à la cellulose) libéré par hydrolyse acide, a diminué dans le mutant vis-à-vis de la plante sauvage. Ces résultats suggèrent qu'il y a proportionnellement moins de cellulose dans les parois du double mutant, ce qui pourrait justifier en partie le collapse et l'affaissement de la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux observé précédemment dans ce mutant (Sibout et al., 2005). En effet, un tel déficit en cellulose affaiblirait la résistance mécanique des parois.

Tableau V.1: Composition en sucres neutres des parois des hampes florales matures du témoin Ws et du double mutant *cad-c x cad-d*

	Pourcentages relatifs des sucres*				
Lignée	**%Arabinose**	**%Xylose**	**%Mannose**	**%Galactose**	**%Glucose**
Ws	2.8	26.2	5.1	3.4	62.7
cad-c* x *cad-d	5.6	28.9	4.5	6.7	54.4

*exprimés en % molaires par rapport aux sucres totaux libérés par hydrolyse sulfurique

V.1.2. Etude globale des lignines par analyses chimiques

Le taux de lignine des hampes florales matures du témoin Ws et du double mutant *cad-c x cad-d* a été déterminé par la méthode de Klason. En accord avec les travaux antérieurs sur d'autres cultures du témoin Ws et du double mutant (Sibout et al., 2005), les analyses des échantillons issus d'une nouvelle culture confirment que la double mutation fait considérablement diminuer le taux de lignine Klason (LK) dans les hampes florales. Les résultats du tableau 2 confirment que le taux de LK des hampes florales du témoin peut varier d'une culture à l'autre, ce qui souligne la stricte nécessité de cultiver en même temps et dans les mêmes conditions les lignées à comparer.

Lors du dosage de la lignine Klason, dénommée aussi lignine acido-insoluble, une partie des lignines peut être perdue dans le surnageant de l'hydrolyse sulfurique employée pour cette détermination. Nous avons évalué cette fraction de lignines acido-soluble (LAS) par mesure de l'absorbance UV à 205 nm et selon la méthode de Klason (1992). La diminution du taux de lignine Klason des hampes du double mutant n'est pas compensée par un taux plus élevé en lignine LAS (Tableau 2).

Tableau V.2: Dosage des lignines dans les parois des hampes florales matures du témoin Ws, du double mutant *cad-c x cad-d* et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*. Les analyses sont réalisées sur le résidu pariétal RP obtenu après extraction des composés solubles et les résultats sont exprimés en % pondéral du RP.

Lignée	Résultats publiés (Sibout et al., 2005)	Résultats obtenus sur une nouvelle série de cultures	
	% LK	% LK	% LAS
Ws*	19.5 (0.7)	16.16 (0.07)	2.36 (0.01)
cad-c x cad-d	11.9 (0.5)	11.05 (0.02)	2.82 (0.01)
Ws**	-	17.17 (0.10)	1.60 (0.13)
cad-c x cad-d + ref1	-	11.02 (0.04)	2.61 (0.06)

* Témoin pour le double mutant *cad-c x cad-d*
** Témoin pour le triple mutant *cad-c x cad-d + ref*1

La structure globale des lignines de hampes florales matures a été étudiée par CPG-SM des produits issus de leur thioacidolyse (Tableau 3). En accord avec les résultats antérieurs obtenus sur une autre culture (Sibout et al., 2005), l'effet le plus marquant de la double mutation est l'effondrement du rendement global (H+G+S) en

monomères conventionnels (Ar-CHSEt-CHSEt-CH_2SEt, avec Ar = noyau H, G ou S) de thioacidolyse, rendement rapporté à la teneur en lignine Klason de l'échantillon (937 µmoles/ g LK en Ws contre 68 µmoles/ g LK en double mutant).

Dans le cas du témoin, le rendement obtenu suggère que 25 % des unités sont impliquées uniquement dans des liaisons β-O-4 et que 75 % sont impliquées dans des liaisons condensées (Lapierre et al. 1995). Les unités liées uniquement en β-O-4 sont principalement des unités G (~73 %), accompagnées de quantités plus faibles d'unités S (~26 %) et de traces d'unités H.

En revanche, dans le cas du double mutant, le très faible rendement obtenu suggère que près de 98 % des unités sont impliquées dans les liaisons condensées. Les unités conventionnelles engagées uniquement dans des liaisons β-O-4 sont essentiellement des unités G (~90 %), la fréquence des unités S homologues étant plus affectée par la mutation (le rapport S/G s'effondre à 0.12, contre 0.35 dans le témoin). La rémanence d'unités conventionnelles issues du couplage oxydatif de l'alcool coniférylique principalement et, dans une plus faible mesure, de l'alcool sinapylique peut être explicitée de la façon suivante: même si les enzymes CAD-C et CAD-D, essentiellement impliquées dans la lignification, ont totalement disparu dans ce double mutant, d'autres activités CAD peuvent permettre la formation d'une faible quantité d'alcool *p*-OH cinnamiques, telles que l'activité CAD 1 essentiellement impliquée en début de lignification (Eudes et al., 2006).

Tableau V.3: Rendement (µmole par gramme de lignine Klason) et fréquence relative (% molaire) des monomères principaux obtenus par thioacidolyse des lignines des hampes florales matures du témoin Ws, du mutant *cad-c x cad-d* et du mutant *cad-c x cad-d + ref1*

Lignée	Monomères Principaux (µmol/g LK)				Fréquence relative (% molaire)			
	µmol H	µmol G	µmol S	H+G+S	S/G	% H	% G	% S
Ws*	5.2 (0.8)	689 (12)	243 (4)	937 (15)	0.35 (0.00)	0.6 (0.1)	73 (0)	26 (0)
cad-c x cad-d	0.8 (0.1)	60 (10)	7.0 (3.3)	68 (29)	0.12 (0.04)	1.2 (0.1)	90 (3)	9.2 (3.1)
Ws**	7.7 (0.2)	722 (17)	257 (10)	987 (27)	0.36 (0.01)	0.8 (0.0)	73 (0)	26 (0)
cad-c x cad-d + ref1	2.1 (0.8)	98 (34)	4.2 (1.3)	104 (36)	0.04 (0.00)	2.0 (0.0)	94 (0)	4.1 (0.2)

* Témoin pour le double mutant *cad-c x cad-d*
** Témoin pour le triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*

A côté des monomères conventionnels de thioacidolyse, issus spécifiquement des unités de type arylglycérol liées en β-O-4 seulement, la thioacidolyse libère des monomères minoritaires issus d'unités ayant des chaînes latérales particulières. Ainsi, le coniféraldéhyde, le sinapaldéhyde, la vanilline ou le syringaldéhyde liés aux lignines par des liaisons éthers labiles génèrent les monomères particuliers représentés en Figure 1.

Les analyses de ces monomères minoritaires (Tableau 4) indiquent que les groupes terminaux de coniféraldéhyde existent à l'état de traces dans Ws (~1 $^{0}/_{00}$). En revanche, ils sont plus abondants dans le mutant (2 µmol/g KL). De plus, les monomères de type indène, qui sont les marqueurs spécifiques de la déficience CAD chez les lignines d'angiospermes (Kim et al., 2002), sont obtenus en quantité substantielle à partir du double mutant et à l'état de traces à partir du témoin. Il en est de même des dérivés de type dithioacétal issus de la thioacidolyse d'extrémités vanilline ou syringaldéhyde.

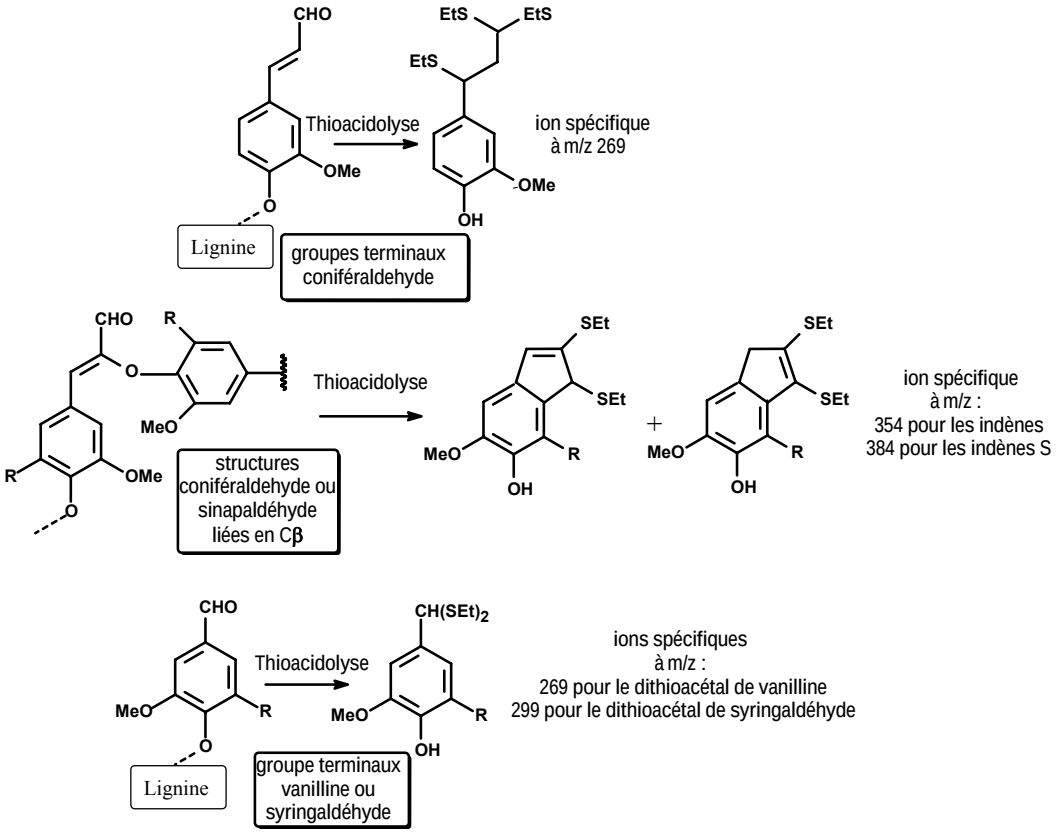


Figure V.1. Structures des monomères minoritaires issus de la thioacidolyse du coniféraldéhyde lié aux lignines sous forme de groupes terminaux, du coniféraldéhyde et du sinapaldéhyde liés en Cβ par liaison β-O-4 et des groupes terminaux vanilline et syringaldéhyde. Les différents produits obtenus sont dosés après silylation et par CPG-SM sur les chromatogrammes reconstruits sur les ions spécifiques indiqués.

Tableau V 4: Monomères minoritaires des lignines obtenus par thioacidolyse des hampes florales matures du témoin Ws, du mutant *cad-c x cad-d* et du mutant *cad-c x cad-d + ref1*

	Monomères Minoritaires (µmol/g LK)						
Lignée	**µmol Conifér-aldéhyde terminal**	**µmol Indène 354**	**µmol Sinap-aldéhyde terminal**	**µmol Indène 384**	**µmol Vanilline**	**µmol Syring-aldéhyde**	**µmol Acide férulique**
Ws*	0.8 (0.1)	0.2 (0.0)	traces	0.2 (0.0)	3.0 (0.9)	0.4 (0.0)	0.7 (0.0)
cad-c x cad-d	2.2 (0.0)	13 (1)	traces	7.0 (0.6)	4.0 (0.7)	4.0 (1.1)	1.65 (0.05)
Ws**	2.8 (0.0)	traces	0.06 (0.00)	traces	3.0 (0.3)	traces	0.6 (0.0)
cad-c x cad-d + ref1	2.6 (1.1)	12 (4)	0.10 (0.1)	6.8 (3.0)	7.6 (0.3)	7.3 (0.4)	3.2 (1.6)

* Témoin pour le double mutant *cad-c x cad-d*
** Témoin pour le triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*

Dans leur ensemble, les résultats de thioacidolyse sur cette nouvelle série de cultures confirment entièrement les résultats obtenus sur des cultures antérieures par Sibout et al. (2005). Ils démontrent que le coniféraldéhyde et le sinapaldéhyde participent réellement à la formation des tissus lignifiés de *cad-c x cad-d*. Leur incorporation est probablement responsable de la coloration rouge des hampes florales du mutant et de la richesse des lignines en liaisons condensées. En effet, les travaux antérieurs sur des plantes dont les lignines sont enrichies en coniféraldéhyde en raison d'une déficience en activité CAD ont révélé que le coniféraldéhyde était incorporé dans les lignines non seulement par liaisons β-O-4 (Figure 1) mais aussi par liaisons biphényles 5-5'. Un tel enrichissement en structures biphényles associant 2 unités coniféraldéhyde a été établi par analyse des dimères de thioacidolyse issus du pin mutant déficient en activité CAD (Lapierre et al., 2000), du sorgho mutant *bm6* ou de DHPs modèles synthétisés à partir de coniféraldéhyde et par la méthode à la verse (Jacquet, 1997a).

La thioacidolyse des échantillons perméthylés a été réalisée pour étudier la fréquence des groupes phénoliques libres dans les lignines. Les résultats du tableau 5 confirment que, dans les lignines du témoin, les unités S liées en β-O-4 sont essentiellement des unités internes. La fréquence des unités G liées en β-O-4 et ayant des groupes phénoliques libres est égale à 12 %. Cette valeur est notablement plus faible que les valeurs rapportées dans le cas de lignines de bois ou de paille de graminées (Lapierre, 1993). Dans le cas du mutant, la fréquence des unités G liées en β-O-4 et à groupe phénolique libre augmente considérablement pour atteindre des valeurs observées chez les graminées (~40 %). Avec la réserve que ce résultat

ne concerne qu'une petite fraction des lignines du mutant (2 % des unités sont liées seulement en β-O-4), ce résultat suggère que l'organisation des lignines dans les parois du mutant est profondément bouleversée.

Tableau V.5: Pourcentage de groupes phénoliques libres et méthylables dans les unités G ou S liées en β-O-4 des lignines des hampes florales matures du témoin Ws et du double mutant *cad-c x cad-d* (le principe de l'analyse est présenté dans le chapitre matériel et méthodes

Lignée	%GOMe/(GOMe+GOTMS)	%SOMe/(SOMe+SOTMS)
Ws	12.5 (0.1)	1.3 (0.1)
cad-c x cad-d	38.8 (0.2)	7.6 (0.3)

Un tel enrichissement en groupes phénoliques est associé à une solubilité élevée des lignines en milieu alcalin. Ce résultat a été obtenu sur une autre série de cultures conduites en 2006: le taux de lignines Klason a été déterminé dans le résidu pariétal RP issu des hampes florales (après extraction Soxhlet), ces hampes ont été ensuite soumises à une hydrolyse alcaline douce (NaOH 1 M, 2 heures, 37 °C); le résidu «saponifié» ou RS a été lavé, séché et pesé; le taux de lignine Klason du RS a ensuite été déterminé. Le pourcentage de lignines éliminées lors du traitement alcalin est alors calculé à partir du rendement en RS et des taux de LK en RP et en RS. Les valeurs correspondant à ces manipulations (Tableau 6) confirment le plus faible taux de lignines des hampes du mutant par rapport au témoin. Ils soulignent surtout la solubilité remarquable des lignines du mutant dans la soude diluée et à température ambiante. Cette solubilité dépasse 52 %, ce qui correspond aux valeurs obtenues pour des tiges de graminées (Lapierre, 1993).

Tableau V6: Taux de lignine Klason dans les résidus pariétaux RP et les résidus saponifiés RS (1 g de RP traité par 50 mL de NaOH 1 M, 2h, 37 °C) des hampes florales de Ws et du double mutant *cad-c x cad-d* et pourcentage de lignines alcalino-solubles.

Lignée (culture 2006)	% LK en RP	% RS	% LK en RS	% lignines alcalino-solubles
Ws	18.7 (0.16)	71.2 (0.04)	22.7 (0.01)	11.7 %
cad-c* x *cad-d	13.3 (0.03)	61.2 (0.31)	14.4 (0.02)	52.6 %

L'enrichissement en groupe phénoliques libres et la solubilité remarquable des lignines du mutant en milieu alcalin sont diagnostiques d'un réseau ligneux morcelé en petits domaines facilement lessivables en milieu alcalin. Un tel bouleversement a

été déjà rapporté, à partir des mêmes critères, dans le cas de peupliers transgéniques présentant une déficience sévère en activité CAD (Lapierre et al., 2004).

Un tel impact sur la lignification des parois aurait des répercussions défavorables sur les performances biologiques de plantes cultivées (faible résistance mécanique des tiges, plus grande sensibilité aux micro-organismes pathogènes), mais serait bénéfique au niveau industriel car les lignocelluloses correspondantes pourraient être plus facilement converties en pâte à papier par les procédés de délignification industrielle en milieu alcalin.

V.2. Morphologie tissulaire des hampes florales du mutant *cad-c x cad-d*

Une coupe transversale observée en M.E.B (Figure 2) permet d'apprécier les différences entre les parois des hampes florales (plante âgée de 6 semaines, zone inférieure de la hampe) de la plante sauvage (*A. thaliana* écotype Ws) et du double mutant *cad-c x cad-d*. Chez le témoin, les parois des fibres inter-fasciculaires (Figure 2A, flèche) et des vaisseaux (Figure 2C, flèche) sont compactes et rigides. En revanche, les fibres inter-fasciculaires du double mutant (Figure 2B, flèche) sont collapsées (lumen réduit) et leurs parois plus épaisses que celles du témoin. Les vaisseaux du mutant (Figure 2D, flèche) présentent un léger affaissement qui témoigne d'une résistance mécanique affaiblie.

Les figures 3 montrent une coupe longitudinale de la région des fibres inter-fasciculaires observée en M.E.B. Chez le témoin (Figure 3A), la face interne de la paroi de ces cellules (marquée par la flèche) a une structure dense et massive confirmant la compacité observée précédemment dans la figure 2A. Chez le double mutant *cad-c x cad-d* (Figure 3B), il est clair que la double mutation a entraîné une perte partielle de la capacité d'assemblage des microfibrilles de cellulose (flèche). Cette observation rend compte du collapse des fibres observé dans la coupe transversale (Figure 2B).

Ces observations morphologiques tridimensionnelles informent sur la structure globale des tissus lignifiés du double mutant *cad-c x cad-d*. Elles révèlent que la double mutation induit des altérations morphologiques nettement mises en évidence par M.E.B (collapse et épaississement de la paroi des fibres, et léger affaissement

des vaisseaux). De telles altérations n'étaient pas visibles dans le cas des simples mutants (Sibout et al., 2005).

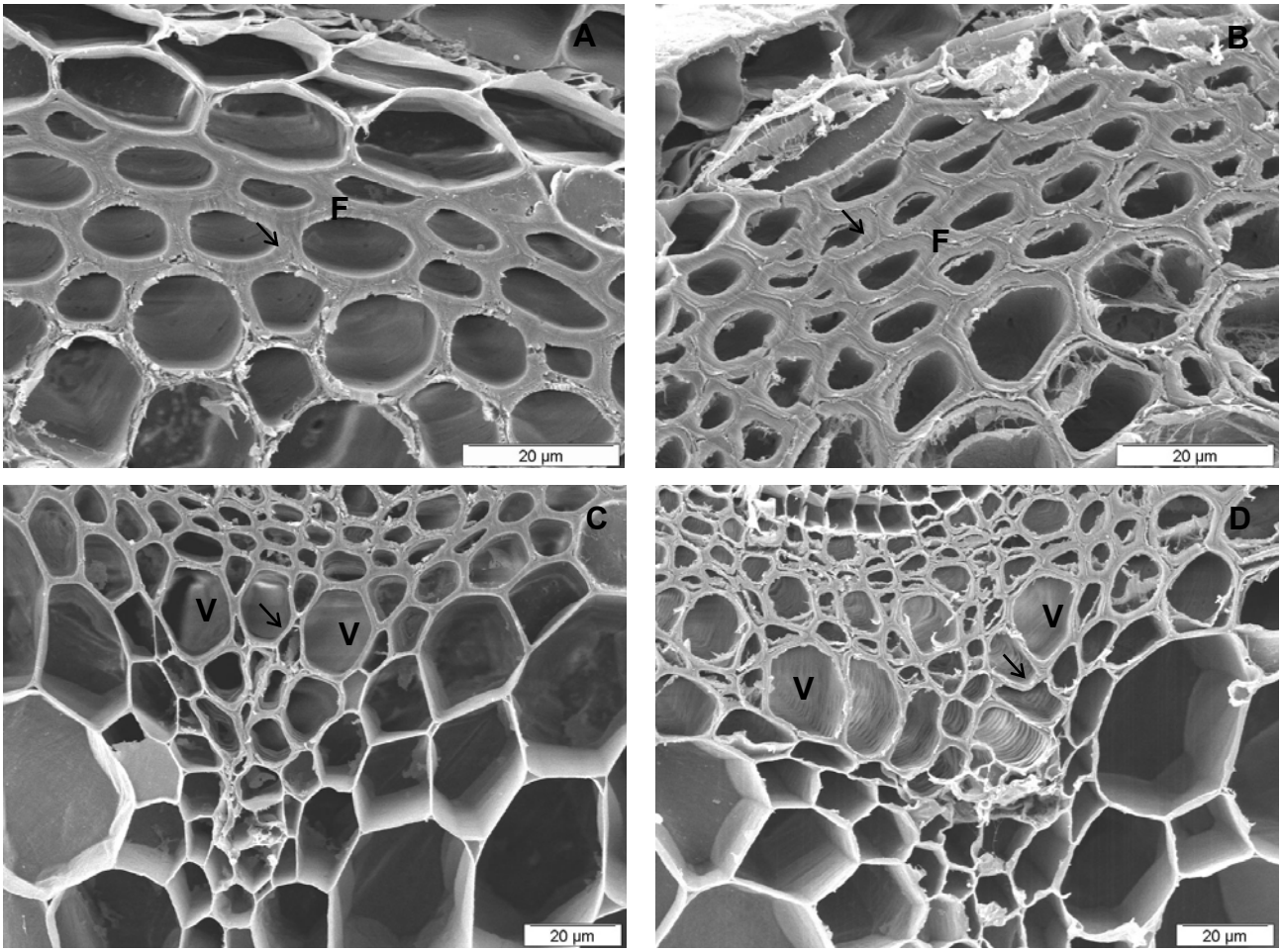


Figure V.2. Observations en M.E.B. de l'organisation structurale des fibres inter-fasciculaires et du faisceau-libéroligneux des hampes florales de Ws (A et C) et de *cad-c x cad-d* (B et D).

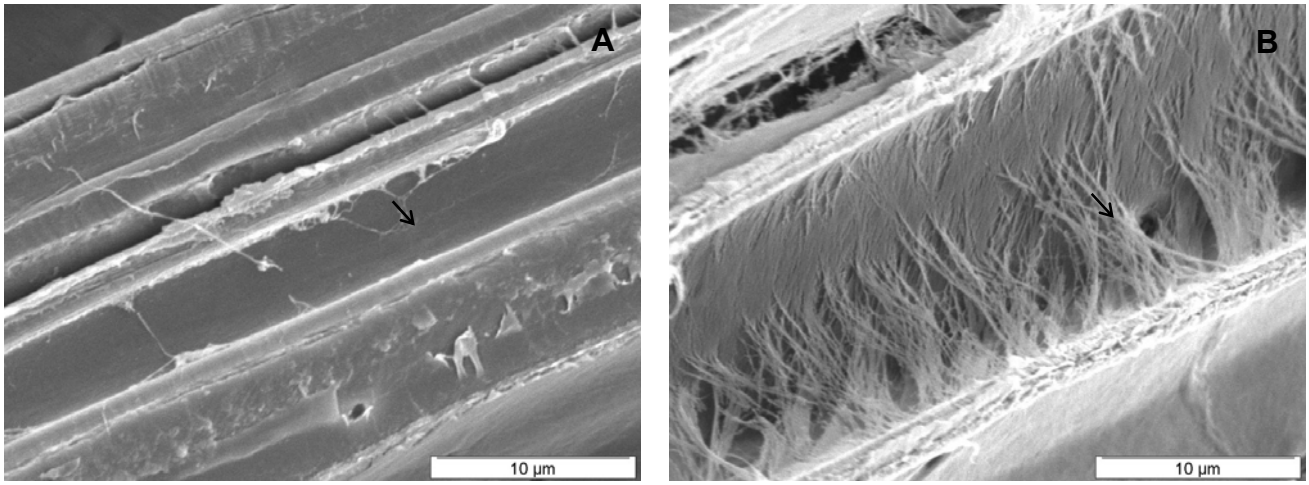


Figure V.3. Coupe longitudinale de la région des fibres inter-fasciculaires des hampes florales de Ws (A) et de *cad-c x cad-d* (B).

V.3. Etude micromorphologique et ultrastructurale des hampes florales du mutant *cad-c x cad-d*

V.3.1. Marquage cytochimique au P.A.T.Ag

La technique cytochimique du P.A.T.Ag qui permet de contraster l'ensemble des polysaccharides pariétaux a été utilisée pour l'étude de la micromorphologie des parois de hampe florale du double mutant *cad-c x cad-d*.

Les figures 4A et 4B montrent l'ultrastructure des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux du témoin. Les parois de ces tissus présentent un aspect compact, en accord avec les observations précédentes; on peut y voir les sous-couches S_1 et S_2 des parois secondaires des fibres inter-fasciculaires, et les sous-couches S_1, S_2 et S_3 des vaisseaux. Le triangle de jonction et la lamelle mitoyenne de ces deux types de tissus présentent une forte réactivité au P.A.T.Ag.

Chez le double mutant *cad-c x cad-d*, la sub-division des parois secondaires des vaisseaux en trois sous-couches n'est plus apparente (Figure 4D), S_3 n'est pas toujours différenciée. L'aspect de la coupe P.A.T.Ag est grenu, en particulier dans le cas des fibres inter-fasciculaires (Figure 4C). Cet aspect traduit la plus forte nucléation des grains d'argent rendue possible par un environnement pariétal plus lâche et moins organisé (flèche). Ce relâchement est moins prononcé dans les vaisseaux (Figure 4D). Le triangle de jonction et la lamelle mitoyenne des fibres et des vaisseaux du double mutant présentent une forte réactivité au P.A.T.Ag. La lamelle mitoyenne joignant les fibres de ce mutant est particulièrement épaisse, ce renforcement pouvant contrebalancer la plus faible cohésion observée dans la paroi secondaire. On peut voir également que les microfibrilles de cellulose, soulignées par les grains d'argent du P.A.T.Ag, ont partiellement perdu leur capacité d'assemblage. Cette technique qui met en évidence la majorité des polysaccharides structuraux a permis d'obtenir un marquage de l'ensemble des parois secondaires lignifiées dans les différentes cellules des hampes florales. La forte réactivité à l'oxydation périodique observée dans les zones relâchées du double mutant, peut être attribuée à un changement d'orientation et à une dissociation des microfibrilles de cellulose qui augmente la nucléation des grains d'argent. Cette désorganisation rend compte du caractère plus lâche des parois où le faisceau d'électrons pénètre plus facilement et contraste fortement les grains d'argent.

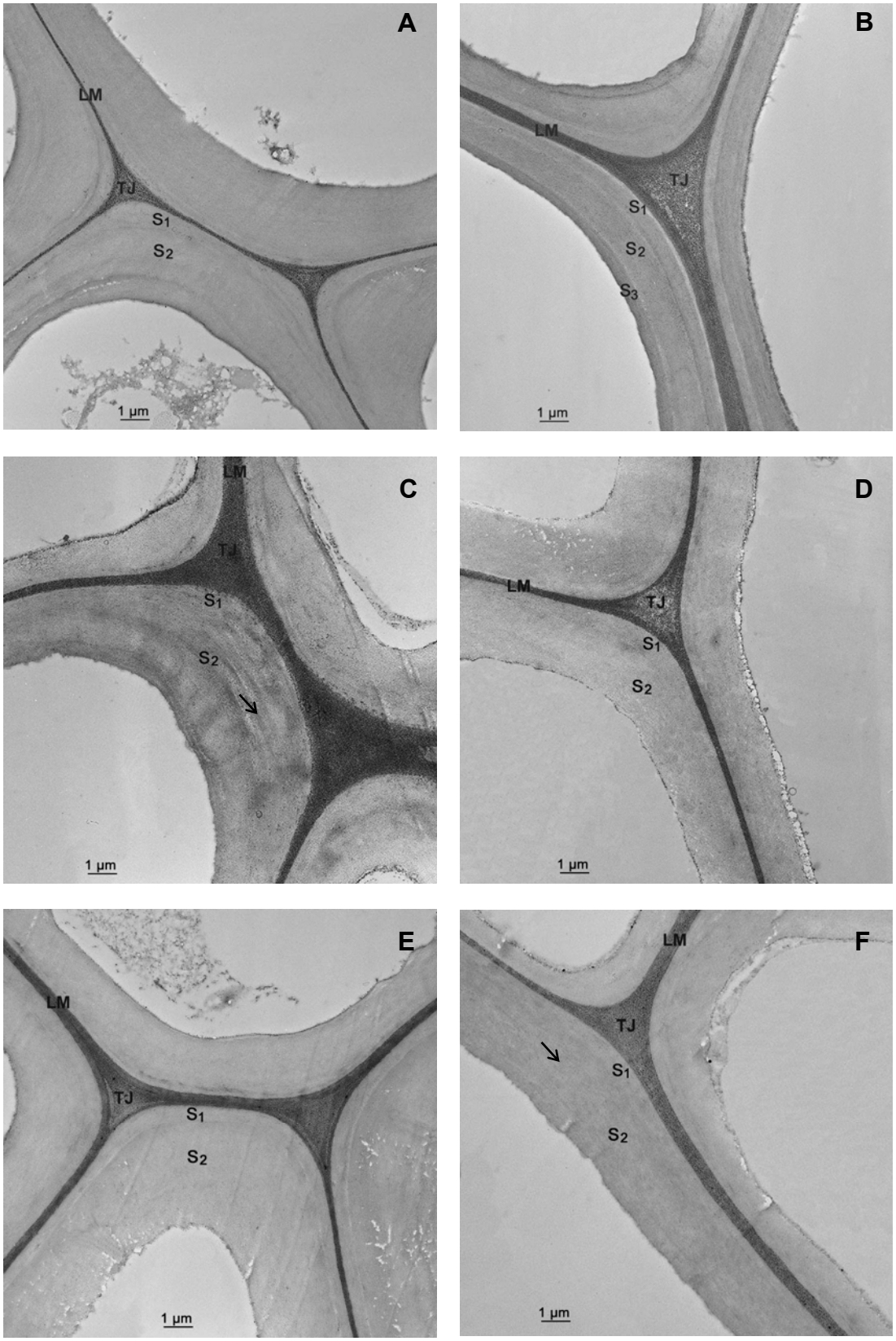


Figure V.4. Observations en M.E.T et après marquage au P.AT.Ag des parois secondaires des fibres inter-fasciculaires du témoin (A), du double mutant *cad-c x cad-d* (C) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E) et des vaisseaux du témoin (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (F).

En résumé, les plantes transformées présentent des altérations morphologiques montrant que l'assemblage pariétal ne s'est pas fait normalement, en liaison avec les modifications de la composition chimique de leurs parois.

V.3.2. Répartition ultrastructurale des unités constitutives des lignines

Afin d'analyser la distribution des différents types de structures des lignines dans les parois secondaires du double mutant *cad-c* x *cad-d*, des immunomarquages en M.E.T à l'aide des anticorps polyclonaux déjà utilisés dirigés contre les structures non condensées, d'une part, et contre les structures condensées, d'autre part, ont été réalisés.

V.3.2.1. Distribution des structures non condensées

- *Distribution des structures mixtes gaïacyle-syringyle (anticorps S/C-zt)*

L'utilisation de l'anticorps polyclonal S/C dirigé contre les unités mixtes S, G non condensées montre que ces épitopes sont très abondants dans les parois des fibres inter-fasciculaires du témoin Ws (Figure 5A) et le sont un peu moins dans les vaisseaux (Figure 5B). Ils sont plutôt concentrés dans la sous-couche S_2. Chez le double mutant *cad-c x cad-d,* le marquage avec cet anticorps a pratiquement disparu dans les parois des fibres inter-fasciculaires (Figure 5C) et des vaisseaux (Figure 5D). Des résultats similaires ont été trouvés chez des lignées de tabacs transgéniques déficientes en activité CAD (Chabannes et al., 2001b; Ruel et al., 2001). Les auteurs de ces travaux ont montré que la sous-expression de l'activité CAD provoque la diminution des structures gaïacyles et syringyles non condensées au sein des fibres et des vaisseaux de tiges de tabac.

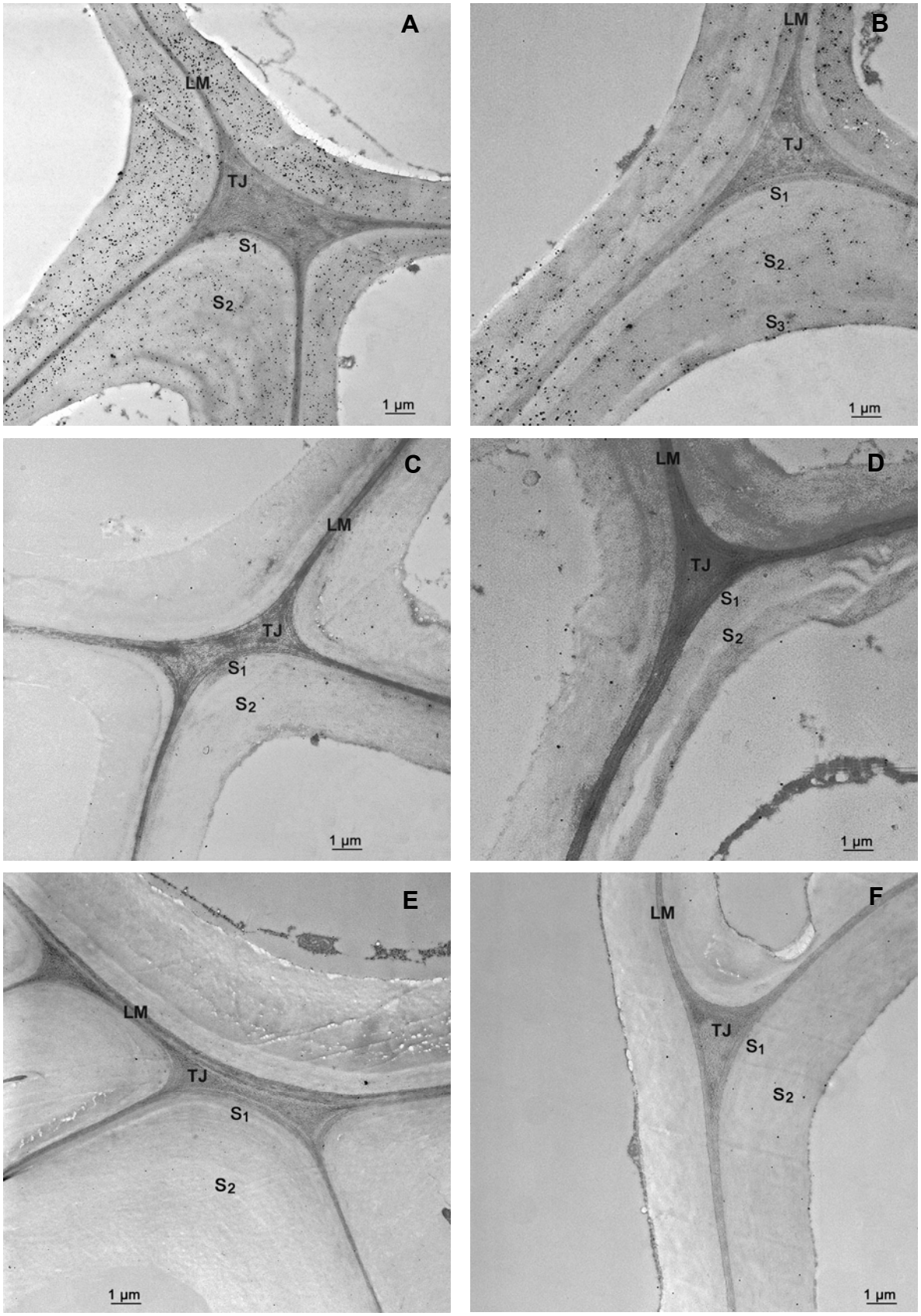


Figure V.5. Immunomarquage des unités mixtes gaïacyle-syringyle non condensées (anticorps S/C-zt) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* (E et F).

- *Distribution des structures syringyles (anticorps S-zt)*

L'utilisation de l'anticorps dirigé contre les unités S montre que dans les hampes du témoin, ces structures sont bien représentées dans la sous-couche S_2 des fibres inter-fasciculaires (Figure 6A) et le sont un peu moins dans les vaisseaux (Figure 6B). Ce résultat est en accord avec des résultats antérieurs (Joseleau et al., 2004) obtenus sur d'autres plantes modèles (tabac, peuplier, maïs).

Dans les hampes du double mutant, la population de ces épitopes a considérablement diminué dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 6C) et dans les vaisseaux (Figure 6D) par rapport au témoin. Le très faible marquage qui reste est distribué principalement dans la sous-couche S_2 des deux tissus.

V.3.2.2. Distribution des unités coniféraldéhyde

La thioacidolyse a révélé l'accumulation de coniféraldéhyde dans les lignines du double mutant. Pour étudier la distribution pariétale de cet aldéhyde, nous avons utilisé un anticorps préparé au laboratoire, obtenu à l'aide d'un DHP préparé à partir de coniféraldéhyde et par la méthode à la goutte. Même si l'analyse structurale de ce DHP n'a pas été réalisée, il est probable que ce DHP coloré (rouge foncé) est riche en unités coniféraldéhydes et en liaisons biphényles.

La plante sauvage ne présente aucune trace de marquage dans les parois des fibres inter-fasciculaires (Figure 7A) ou des vaisseaux (Figure 7C). La thioacidolyse démontre cependant qu'il existe des extrémités coniféraldéhyde dans les lignines du témoin (environ 1 µmole par gramme de LK, Tableau 4), extrémités par ailleurs responsables de la coloration histologique de Wiesner employée pour détecter les lignines. Elles sont sans doute présentes en dessous du seuil de détection de l'anticorps employé ici.

Par contre, chez le double mutant *cad-c* x *cad-d*, on observe un marquage discret et réparti de façon hétérogène dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 7B) et les vaisseaux (Figure 7D). L'apparition d'épitopes de type coniféraldéhyde est visualisée ici pour la première fois par immunocytologie et démontre bien l'incorporation accrue de structures coniféraldéhyde au sein des parois du double mutant, en accord avec les résultats de thioacidolyse.

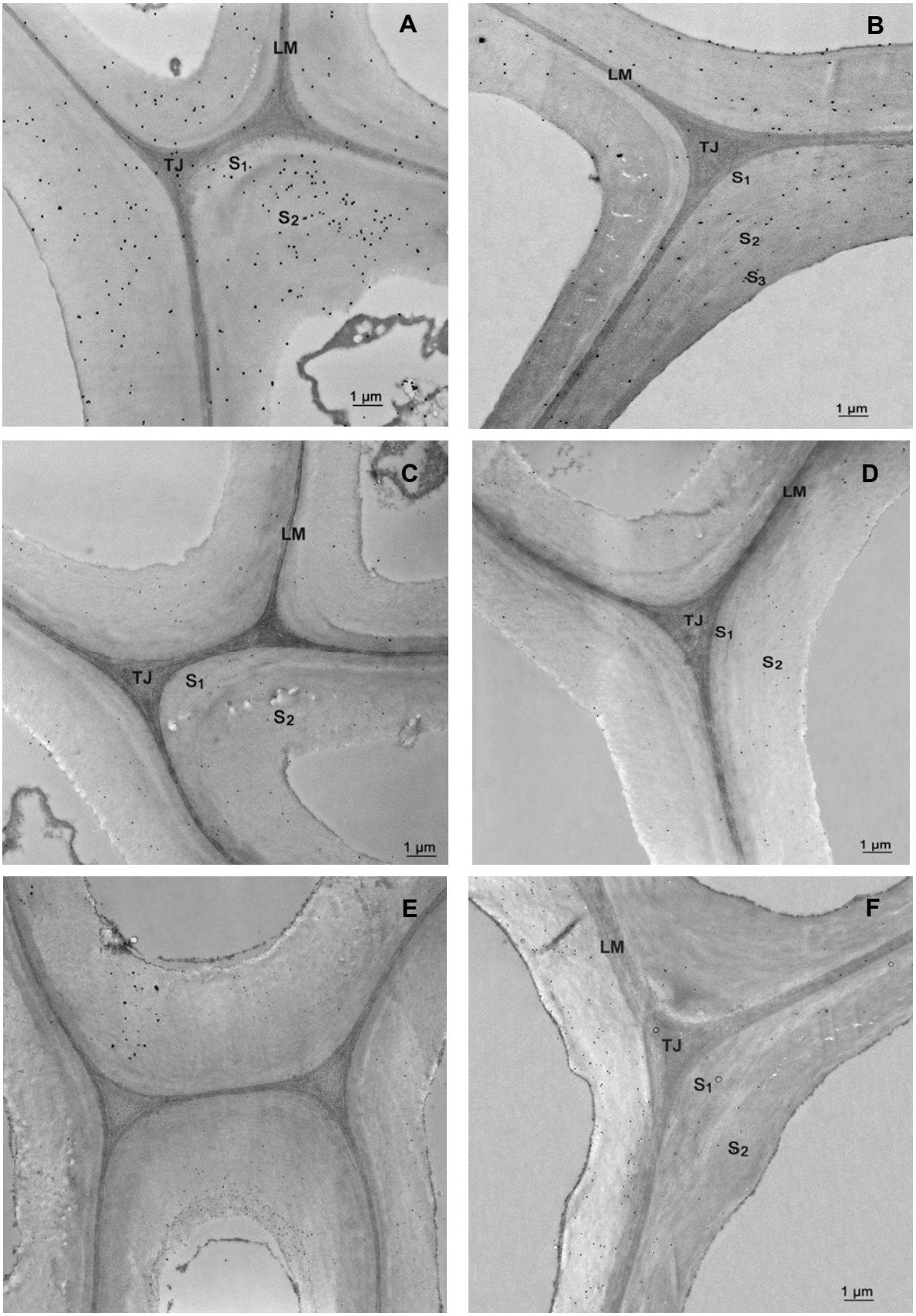


Figure V.6. Immunomarquage des unités syringyle non condensées (S) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* (E et F).

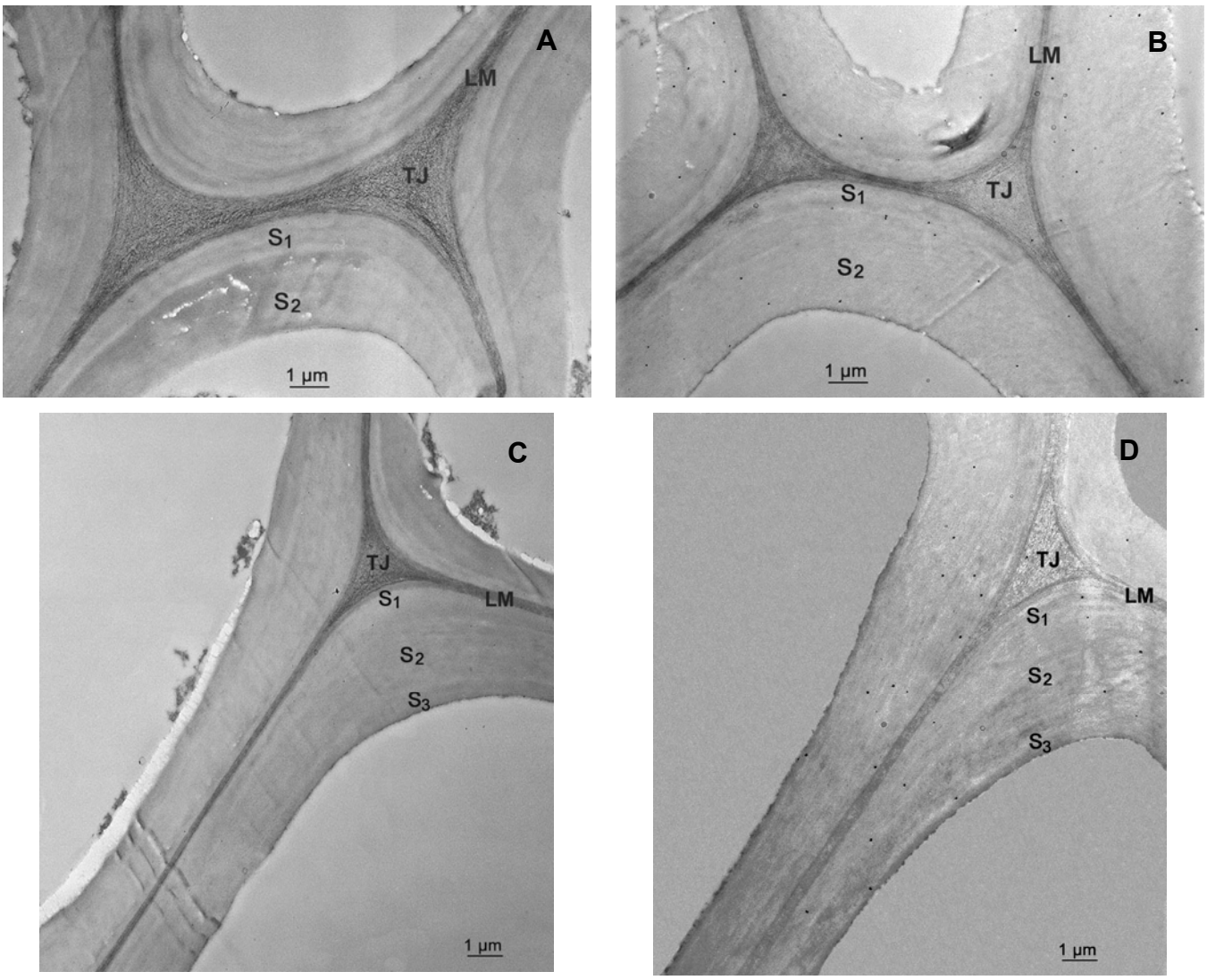


Figure V.7. Immunomarquage des unités coniféraldéhyde dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et C) et de *cad-c x cad-d* (B et D).

V.3.2.3. Distribution des structures condensées

- *Distribution des unités gaïacyle condensées* (*anticorps G-zl*)

Chez le témoin Ws, l'utilisation de l'anticorps dirigé contre les unités G condensée révèle que ces unités sont réparties de manière homogène dans les différentes sous-couches pariétales des fibres inter-fasciculaires (Figure 8A) et des vaisseaux (Figure 8B). Au sein des fibres inter-fasciculaires, elles sont plus reconnues dans la sous-couche S_2. Dans les vaisseaux, elles se répartissent à peu près également entre les trois sous-couches.

Chez le double mutant *cad-c x cad-d,* ces épitopes sont également bien reconnus dans la paroi secondaire des fibres inter-fasciculaires (Figure 8C). Ils sont

répartis dans les sous-couches pariétales à peu près de la même manière que chez le témoin. Dans les vaisseaux (Figure 8D), on observe une légère diminution de ces sous-unités qui sont plutôt distribuées dans les sous-couches S_1 et S_2 que dans la sous-couche S_3.

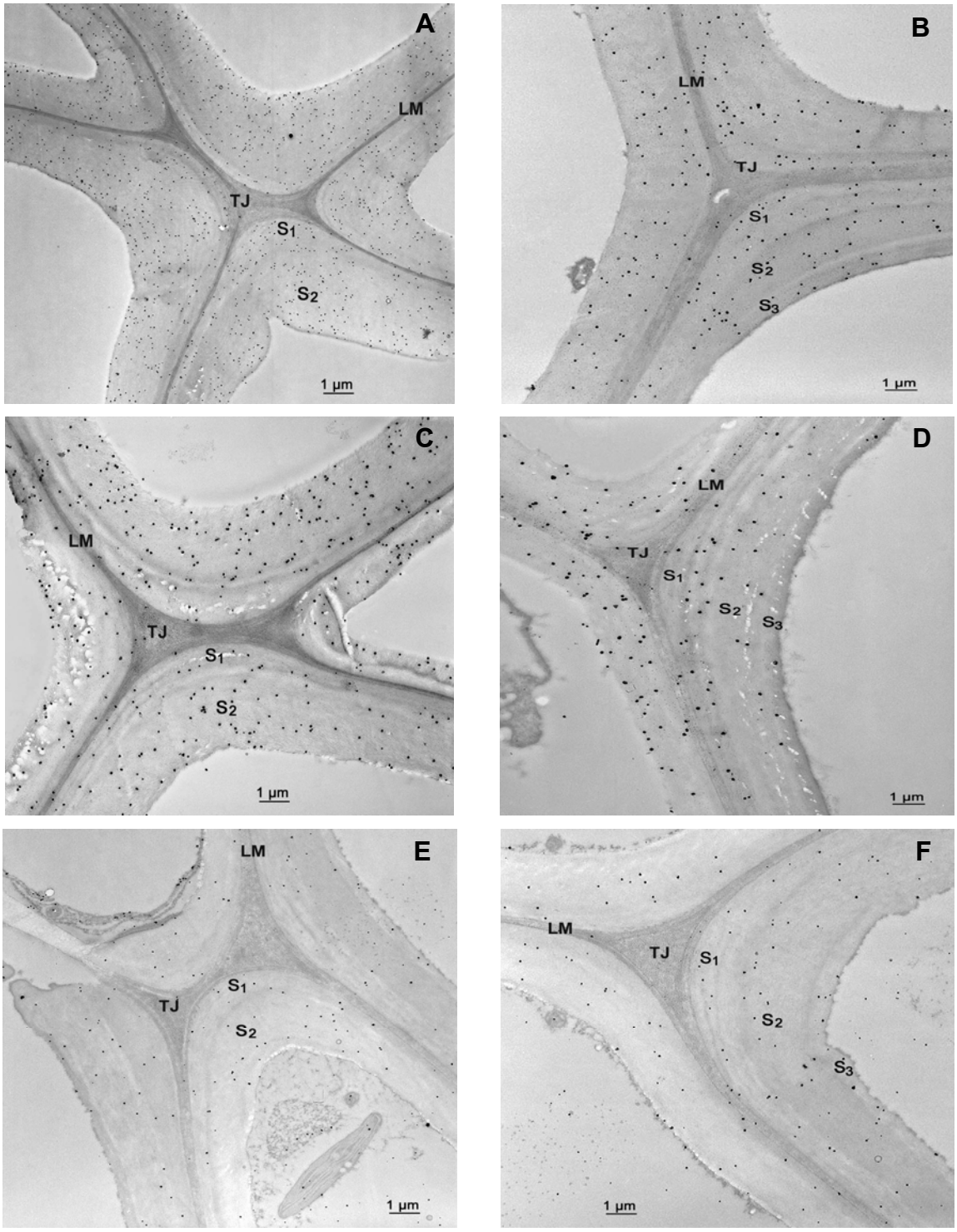


Figure V.8. Immunomarquage des unités gaïacyle condensées (G) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* (E et F).

- *Distribution des structures mixtes gaïacyle-syringyle (anticorps GS-zl)*

Un anticorps dirigé contre les structures mixtes GS condensées des lignines a été utilisé. Dans la plante sauvage, la répartition du marquage par cet antisérum montre une concentration de ces structures dans S_2 et la faible proportion de grains d'or au sein de la sous-couche S_1 des fibres inter-fasciculaires (Figure 9A). Dans les vaisseaux, ce type de structure est au contraire plus abondant dans S_1 et S_3 (Figure 9B).

Dans le double mutant *cad-c x cad-d*, l'anticorps dirigé contre ces épitopes révèle leur abondance dans la sous-couche S_2 des fibres inter-fasciculaires (Figure 9C). En revanche, ces épitopes sont peu reconnus dans les vaisseaux (Figure 9D) et disparaissent même dans la sous-couche S_1.

La répression des gènes *CAD-C* et *CAD-D* n'a pas le même impact selon les tissus. Ces différences de marquages immunochimiques entre fibres et vaisseaux confirment qu'il existe un contrôle tissu-spécifique de la structure des lignines et des mécanismes de polymérisation des monolignols.

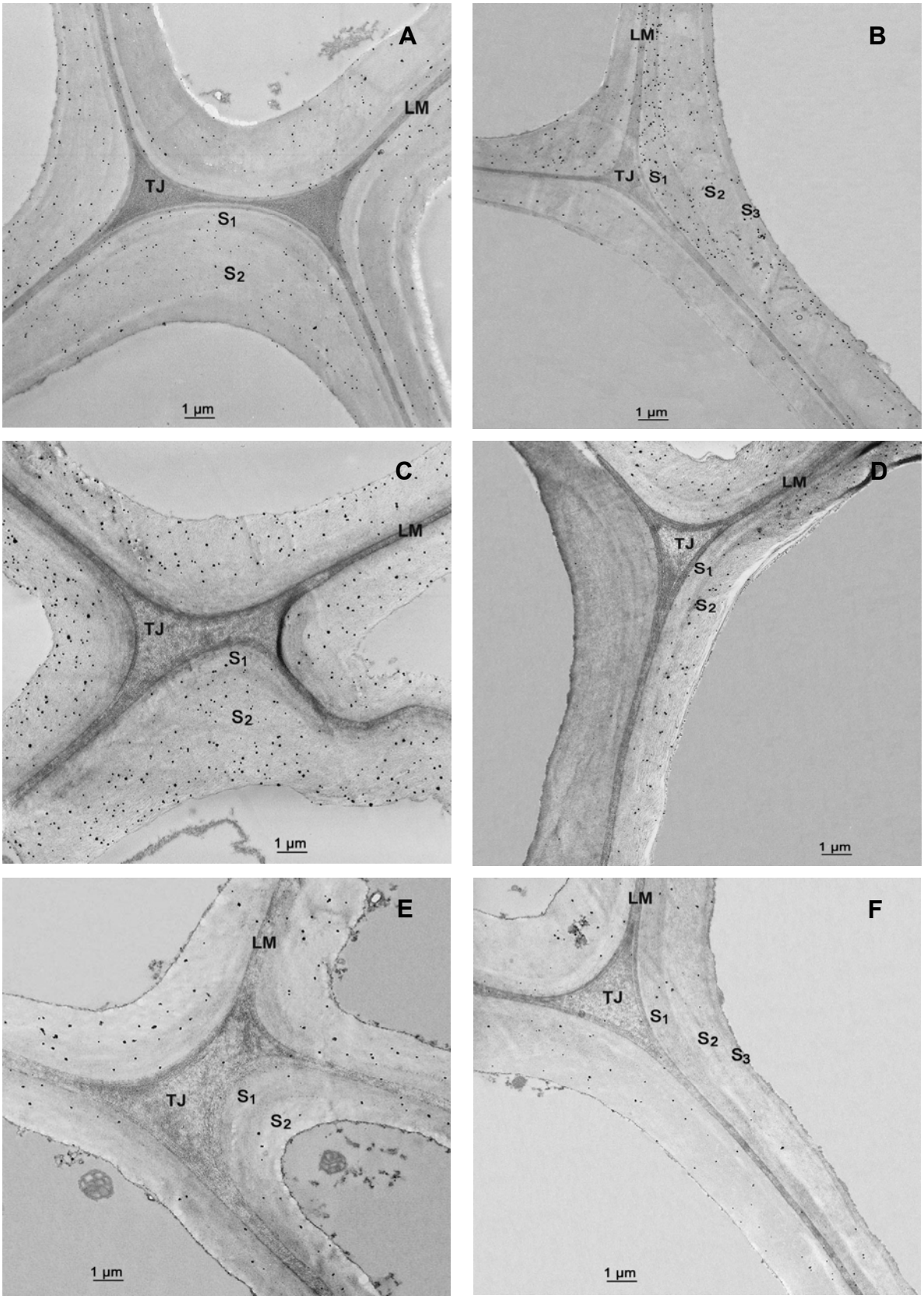


Figure V.9. Immunomarquage des unités mixtes gaïacyle-syringyle condensées (anticorps GS-zl) dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales de Ws (A et B), de *cad-c x cad-d* (C et D) et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (E et F).

- *Distribution des structures dibenzodioxocines*

Si les structures dibenzodioxocines comportent des liaisons biphényles condensées, elles sont cependant absentes des DHPs préparés par la méthode à la verse et riches en d'autres types de liaisons condensées (β-5 et β–β). Selon Brunow et al., (1998), ces structures sont associées à un mode de polymérisation de type «end-wise», avec une très faible concentration locale d'alcool coniférylique se couplant à une structure biphényle d'un oligomère pré-existant.

La présence des structures dibenzodioxocines a été mise en évidence chez le sapin et plus particulièrement dans les sous-couches S_2 et S_3 des trachéides à l'aide du même anticorps que celui que nous employons ici (Kukkola et al., 2003).

Dans le témoin Ws, les structures dibenzodioxocines reconnues par l'anticorps sont réparties de manière discrète et hétérogène dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 10A), mais par contre sont très présentes dans la région des vaisseaux (Figure 10C) où elles sont plutôt distribuées dans les sous-couches S_1 et surtout S_2. Ce résultat n'est pas inattendu car la liaison biphényle des structures dibenzodioxocines ne peut impliquer que les unités G. Or les résultats de microdissection ont bien confirmé que ces unités G sont plus abondantes dans les vaisseaux que dans les fibres (chapitre IV).

Chez le double mutant, ces épitopes ont disparu au sein des sous-couches pariétales des fibres inter-fasciculaires (Figure 10B) et des vaisseaux (Figure 10D). Ce résultat est peut-être lié au plus faible taux de lignines des parois du double mutant. Il traduit peut-être aussi que le mécanisme de polymérisation se déroulant au sein des parois du double mutant est plus proche d'un mécanisme de polymérisation «bulk» que d'un mécanisme de type end-wise.

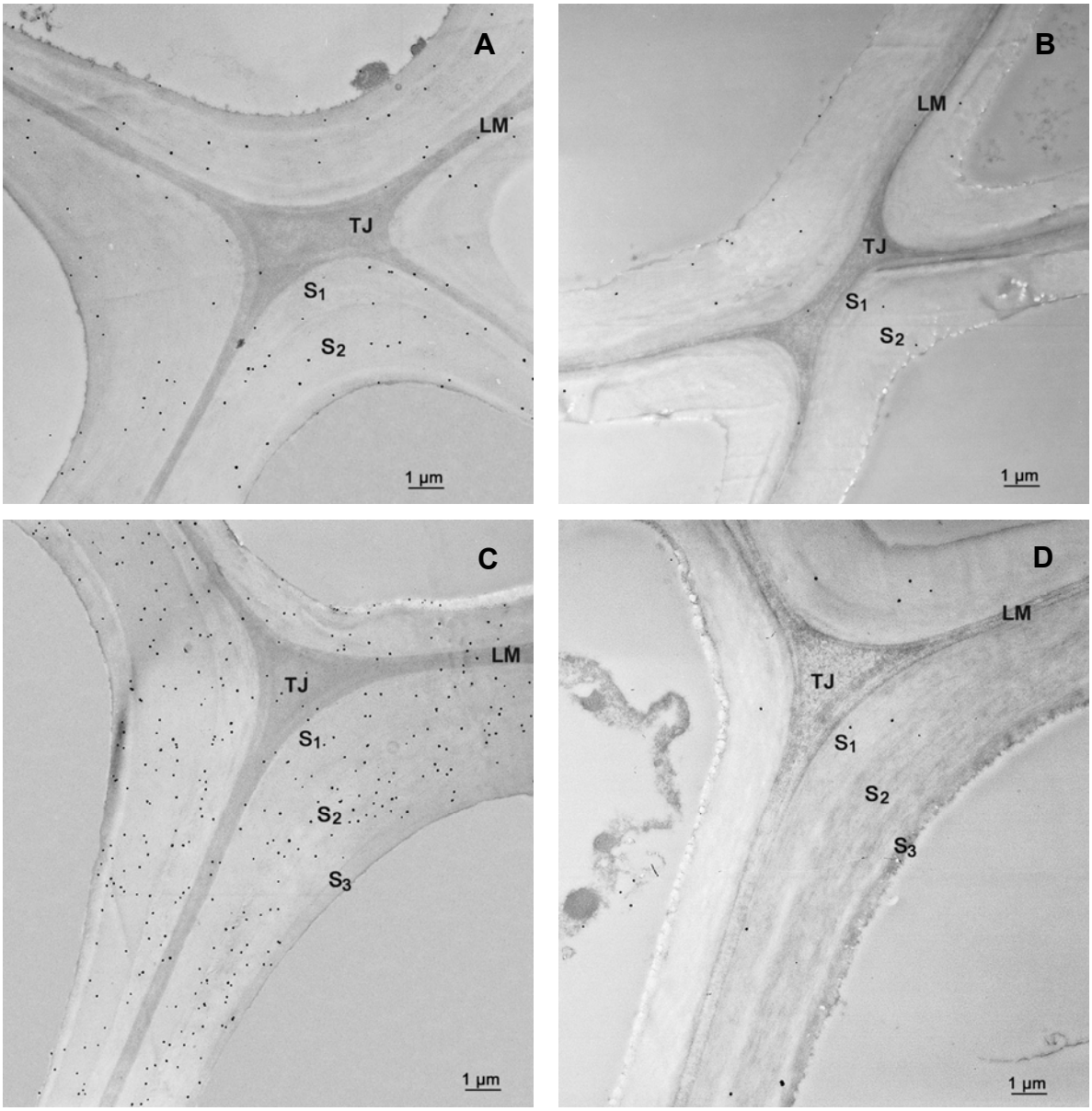


Figure V.10. Immunomarquage des structures dibenzodioxocines dans la paroi des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales du témoin (A et C) et du double mutant *cad-c x cad-d* (B et D).

V.4. Conclusion

Les résultats et discussion qui précèdent soulignent la synergie des études de la lignification par les méthodes de dégradation chimique et par les méthodes cytologiques et immuno-cytochimiques. Ces deux approches ne sont pas en compétition en terme de performances et d'informations délivrées. Elles sont au contraire complémentaires et leur usage combiné est fructueux.

Le comptage des grains d'or par unité de surface, réalisé pour accompagner les vues de microscopie électronique confirme les résultats présentés qualitativement dans ce qui précède (Tableau 7).

Ce comptage permet de discuter plus avant les résultats d'immunocytochimie et de thioacidolyse afin de les exploiter de manière synergique. Les principales conclusions du regard croisé entre la thioacidolyse et l'immunocytologie sont les suivantes:

- **Les lignines du double mutant sont caractérisées par un effondrement de la fréquence des structures non condensées**

L'écart le plus important entre parois lignifiées du témoin (Ws) et du double mutant *cad-c x cad-d* concerne les épitopes de type unités gaïacyles-syringyles non condensées, détectées à l'aide de l'anticorps S/C-zt. On observe un véritable effondrement de la fréquence de ces épitopes dans les parois du mutant: leur fréquence relative représente moins de 5% des valeurs comptées chez le témoin (1ère ligne en italique du tableau 7). Cet effondrement ne peut être explicité seulement par la baisse du taux de lignines (baisse d'environ 30 à 40 %). Les unités syringyles non condensées présentent une diminution marquée, mais moins spectaculaire. La double mutation provoque donc bien une altération structurale considérable des lignines, avec un effondrement des unités liées en β-O-4. Ce résultat confirme entièrement les conclusions de la thioacidolyse, étayées par l'effondrement du rendement en monomères conventionnels. En outre, il les élargit car il faut rappeler que les conclusions de thioacidolyse ne portent que sur les unités liées **uniquement** en β-O-4 (en effet, l'analyse des dimères de thioacidolyse qui élargirait l'examen n'a pas été réalisée).

- **L'effondrement du taux d'unités non condensées est corrélé à l'apparition de structures condensées inhabituelles et à des changements radicaux dans l'organisation et la conformation des lignines**

L'analyse par immunocytochimie a permis de montrer que les unités condensées présentaient des variations de distribution qui ne sont pas décelables par les méthodes d'analyse chimique globale.

En écho à cet effondrement des épitopes dits «non condensés», on s'attendrait à une forte augmentation des épitopes condensés. Selon la bibliographie (Sarkanen, 1971; Jacquet et al., 1997a; Brunow et al., 1998), les principaux modes de liaisons des DHPs à la verse sont, dans l'ordre: les liaisons β-5 (des structures phénylcoumaranes), suivie des liaisons résinol et β-O-4 en quantité équivalente. Les structures condensées contre lesquelles sont dressées les anticorps polyclonaux obtenus avec les DHPs à la verse sont donc essentiellement les structures phénylcoumaranes. Les données du tableau 7 indiquent que: les épitopes «condensés» G ou mixtes GS ne sont pas plus abondants dans les lignines du double mutant. Ce résultat semble être en contradiction avec les données de thioacidolyse qui suggérait que, dans les lignines du double mutant, 98% des unités étaient engagées dans des liaisons condensées. Cette contradiction apparente mène à l'hypothèse suivante: les lignines du double mutant sont structuralement si différentes des lignines «conventionnelles» que leurs structures condensées sont mal reconnues par les anticorps dressés contre les structures condensées usuelles. En d'autres termes, il n'y a pas davantage de structures condensées de type phénylcoumarane dans les structures condensées des lignines du double mutant.

En outre, l'incorporation de coniféraldéhyde et de sinapaldéhyde a profondément bouleversé l'organisation du réseau ligneux: il se présente comme un morcellement de petits domaines alcali-lessivables et riches en unités coniféraldéhyde et sinapaldéhyde et en groupes phénoliques libres. Il est donc possible que cette organisation radicalement différente fasse diminuer des épitopes conformationnels associés non pas à la séquence moléculaire des structures présentes dans les DHPs employés, mais à des arrangements dans l'espace. A ce stade, on peut donc conclure que la double mutation a induit la formation de lignines totalement différentes des lignines usuelles, au niveau moléculaire (types d'unités et de liaisons inter-unités) et au niveau conformationnel. Les résultats des marquages à l'aide de l'anticorps anti-dibenzodioxocines sont en accord avec cette conclusion: ces structures, diagnostiques d'un mode de polymérisation de type end-wise ne sont pas ou peu détectables dans les parois du double mutant.

Tableau V.7: Analyse immuno-cytochimique semi-quantitative comparative de la distribution topochimique des épitopes de lignines dans les parois des tiges des hampes florales (6 semaines, partie basse). Variations induites par la double mutation *cad-c x cad-d*. L'intensité du marquage a été évaluée par comptage manuel des grains d'or par unité de surface (μm^2) Les valeurs en italiques ont été calculées en affectant pour chaque anticorps la valeur 1.00 à la sous-couche la plus marquée dans la plante contrôle Ws. Ainsi, les variations d'intensité du marquage dues à la mutation sont ainsi plus apparentes; nd: sous couche non différenciée.

Epitope (anticorps)	***A. thaliana* Ws**					***A. thaliana* cad-c x cad-d**				
	Fibre		Vaisseau			Fibre		Vaisseau		
	S_1	S_2	S_1	S_2	S_3	S_1	S_2	S_1	S_2	S_3
S/G non condensées (S/C zt)	19.0 *0.63*	30.0 *1.00*	2.9 *0.10*	5.5 *0.18*	2.4 *0.80*	1.0 *0.03*	1.3 *0.04*	1.0 *0.03*	0.5 *0.02*	0 *0*
S non condensées (S zt)	0.8 *0.40*	2.0 *1.00*	0.4 *0.20*	1.7 *0.85*	0.4 *0.20*	0 *0*	0.8 *0.40*	0.2 *0.10*	0.5 *0.25*	nd *nd*
G condensées (G zl)	4.3 *0.74*	5.8 *1.00*	2.9 *0.50*	2.8 *0.48*	2.8 *0.48*	2.9 *0.50*	5.9 *1.02*	1.3 *0.22*	1.7 *0.29*	0.5 *0.08*
GS condensées (GS zl)	2.6 *0.35*	5.4 *0.72*	6.8 *0.91*	6.3 *0.84*	7.5 *1.00*	0.2 *0.03*	8.5 *1.15*	0 *0*	3.4 *0.45*	nd *nd*
Dibenzodioxocine	0.2 *0.03*	1.9 *0.27*	4.2 *0.60*	7.0 *1.00*	2.1 *0.30*	0 *0*	0 *0*	0 *0*	0.2 *0.03*	0 *0*

La structure et l'organisation des lignines du double mutant sont bouleversées par la simple incorporation de coniféraldéhyde et de sinapaldéhyde détectée par thioacidolyse et, pour la première fois, par immunocytochimie

La thioacidolyse nous a permis de démontrer et quantifier l'incorporation de coniféraldéhyde et de sinapaldéhyde dans les lignines du double mutant, en accord avec les résultats antérieurs publiés. Ces aldéhydes sont engagés dans des liaisons β–O-4 et, pour le coniféraldéhyde, dans des liaisons biphényles. Des travaux antérieurs ont démontré que le coniféraldéhyde est un substrat possible de la peroxydase de raifort employée pour synthétiser des lignines synthétiques in vitro (Connors et al., 1970; Higuchi et al., 1994; Jacquet et al., 1997b).

L'utilisation d'un anticorps anti-coniféraldéhyde dressé contre un DHPs préparé par la méthode à la goutte, mais dont la structure n'a pas été caractérisée (il n'est donc pas possible d'affirmer que ce DHP est riche en structures non condensées ou condensées) confirme l'incorporation de coniféraldéhyde dans les parois du double mutant. Même si le marquage est très discret dans les parois du

double mutant, l'observation d'épitopes de type coniféraldéhyde est réalisée ici pour la première fois par une technique immuno-chimique. Cet épitope n'est pas observable chez le témoin car les structures ciblées par l'anticorps sont présentes en dessous du seuil de détection de l'anticorps polyclonal employé. Le recours à un anticorps plus spécifique obtenu à l'aide de coniféraldéhyde lié à une protéine porteuse par son groupe phénolique serait sans doute plus efficace pour détecter les chaînes latérales Ar-CH=CH-CHO du coniféraldéhyde ou du sinapaldéhyde lié aux lignines par le groupe phénolique. Ces chaînes latérales sont en effet bien présentes chez le témoin car elles sont responsables de la réaction entre le phloroglucinol et les lignines, réaction histochimique très sensible utilisée pour détecter ces polymères (Kim et al., 2002).

Si le coniféraldéhyde est substrat de la peroxydase de Raifort, ce n'est pas le cas du sinapaldéhyde (Fournand et al., 2003). L'incorporation de sinapaldéhyde dans les lignines du double mutant relève donc des deux hypothèses suivantes:

(i) Parmi les nombreuses peroxydases présentes chez *A. thaliana* et impliquées dans la lignification constitutive ou de défense, certaines sont capables d'utiliser le sinapaldéhyde comme substrat; cette hypothèse doit inclure la lignification de défense car les altérations des parois du double mutant en terme de cytologie et de composition sont si marquées que l'induction de l'expression de gènes de peroxydases de défense ne peut être exclue. Une analyse plus fine des transcrits des peroxydases exprimées lors de la lignification de ces parois pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

(ii) Même si aucune des peroxydases exprimées lors de la lignification des parois du double mutant n'accepte le sinapaldéhyde pour substrat, les expériences modèles conduites par Fournand (Fournand et al., 2003) démontrent que le sinapaldéhyde peut être oxydé par le radical issu de l'alcool coniférylique. Il est sans doute aussi très facilement oxydable par le radical issu du coniféraldéhyde en raison de l'effet du 2ème groupe méthoxyle sur le potentiel redox de la molécule (Brunow et al., 1998).

L'étude chimique et cytologique des hampes du double mutant *cad-c x cad-d* fournit une démonstration supplémentaire de la plasticité biochimique de la lignification

L'étude de la lignification du double mutant *cad-c x cad-d* confirme la remarquable plasticité biochimique de la lignification, concept établi pour la première fois par le Professeur Alain Boudet (Boudet et al., 1995) et étayé à présent par de très nombreuses démonstrations sur plantes mutantes et transgéniques. Les études conduites *in vitro* et *in vivo* convergent vers la démonstration d'une situation intermédiaire. Il n'est pas nécessaire de faire intervenir des protéines dirigeantes pour que les réactions de couplage entre radicaux et surtout de couplages croisés («cross-coupling») ne soient pas aléatoires. Ces couplages sont guidés par:

- ✓ des facteurs enzymatiques (peroxydases et leurs spécificités spatio-temporelles et de substrat);
- ✓ la réactivité des molécules phénoliques et des espèces transitoires qui en résultent (réactivité et stabilité des radicaux, réactivité des méthylènes quinones vis-à-vis des nucléophiles présents dans le milieu);
- ✓ les effets dénommés «effets de matrice» qui sont sans doute les plus difficiles à cerner; ces effets regroupent aussi bien des facteurs physico-chimiques et biologiques comme le pH local, la concentration locale en eau, et la nature de la matrice polysaccharidique au sein de laquelle se déroule la polymérisation et qui peut l'orienter (effet dénommé «template effect» par les anglophones).

La désorganisation de la structure et de l'organisation des lignines induit, en retour, le bouleversement de l'assemblage des microfibrilles de cellulose

Ce résultat majeur confirme le résultat obtenu sur les mutants *ccr 1* (chapitre IV) et sur d'autres plantes étudiées par l'équipe parois du CERMAV. Il élargit le concept essentiel dégagé à partir des études antérieures et qui est le suivant: la structure et l'organisation des lignines qui imprègnent les parois secondaires a une influence majeure sur les capacités d'assemblage des microfibrilles de cellulose. Les observations réalisées à l'échelle micro-morphologique des mutants *ccr 1* et du double mutant *cad-c x cad-d* révèlent que les parois secondaires de leurs hampes florales présentent des microfibrilles désorganisées et relâchées. Ceci se traduit, à une autre échelle, par l'aspect collapsé des fibres et des vaisseaux, aspect

diagnostique de mauvaises propriétés mécaniques des parois. Cette diminution des propriétés mécaniques des tissus du double mutant a été établie dans une étude récente de ce double mutant (Jourdes et al., 2007).

L'interprétation de cet effet en retour de l'organisation des lignines sur les capacités d'assemblage des microfibrilles de cellulose peut être réalisée sur la base des deux études de modélisation moléculaire des assemblages lignines/cellulose conduites par K. Mazeau et son équipe (Besombes and Mazeau, 2005a) et (Besombes and Mazeau, 2005b). Ces travaux modélisant les interactions entre dilignols ou oligolignols et des whiskers de cellulose semblent particulièrement pertinents et importants à introduire dans cette discussion. Auparavant, il faut souligner que les modèles d'organisation des parois présentés par Goring et repris par Fengel et Wegener (Fengel and Wegener, 1989) favorisent plutôt les interactions entre hémicelluloses et lignines, plutôt qu'entre cellulose et lignines. Cette situation n'exclut pas la possibilité d'interactions directes entre lignines et microfibrilles de cellulose, ces microfibrilles n'étant sans doute pas entièrement revêtues de polysaccharides non cellulosiques. Par ailleurs, les études modèles d'interactions entre chaîne de cellulose et oligomères de lignines peuvent être partiellement extrapolées aux assemblages lignines-xyloglucanes, en raison de la conformation en ruban étirée des chaines de xyloglucanes, cette extrapolation étant limitée par la présence des substituants latéraux des chaînes de xyloglucanes.

Avec ces réserves en tête, le travail de modélisation moléculaire conduit par Besombes et Mazeau (2005 a et b) a permis d'établir les éléments suivants particulièrement pertinents dans le cadre de cette discussion:

(i) Un décamère d'unités G liées uniquement par des liaisons β-O-4 s'adsorbe à la surface des microfibrilles de cellulose en adoptant préférentiellement une conformation «aplatie» (les auteurs décrivent le phénomène par les termes («adsorb flat on the surface in order to maximize the interactions with cellulose») sur ces microfibrilles. Cette conformation maximise les interactions entre les noyaux aromatiques des unités de lignines et les chaînes de cellulose.

(ii) L'introduction de liaisons provoquant une ramification («branching point») dans le modèle de lignines gène cette «adsorption à plat» et diminue les interactions entre lignines et chaîne de glucanes. Dans les lignines, les

seules liaisons référencées à ce jour et provoquant un branchement sont les liaisons biphényles (qu'elles soient engagées ou non dans les structures dibenzodioxocines) et les liaisons biphényl éthers. Les liaisons β-O-4 («non condensées») et les liaisons condensées des structures phénylcoumaranes ou résinol ne sont associées à aucune ramification du polymère.

Ces travaux récents sont entièrement en accord avec les travaux plus anciens de l'équipe d'Atalla (Atalla and Agarwal, 1985) qui ont établi, par microspectrophotométrie Raman, que les cycles aromatiques des lignines ont une orientation préférentielle parallèle à l'axe des microfibrilles de cellulose.

A partir des études de Besombes et Mazeau (2005b) et des travaux antérieurs d'Atalla et Agarwal (1985), on peut donc émettre l'hypothèse suivante.

Dans les parois lignifiées du témoin, les lignines ont une conformation riche en domaines linéaires, capables de s'adsorber à plat sur les microfibrilles de cellulose, en interagissant ainsi avec les chaînes glucanes de ce polymère et/ou celles des xyloglucanes qui les revêtent en partie. Ce type d'interactions chasserait l'eau du voisinage des microfibrilles et renforcerait ainsi la cohésion des chaînes de cellulose et les propriétés mécaniques des microfibrilles.

Les parois lignifiées du double mutant ont à la fois 30 à 40 % de lignines en moins et ces lignines présentent de sévères altérations structurales. Elles sont très appauvries en unités liées en β-O-4, capables de s'adsorber à la surface des chaînes de glucanes. Elles sont en outre enrichies en unités coniféraldéhyde qui ont tendance à s'engager dans des liaisons biphényles, points de branchement qui gènent l'adsorption des lignines à la surface des chaînes de glucanes. Ces deux caractéristiques seraient responsables d'un effondrement des capacités d'interactions entre chaînes de glucanes (cellulose ou xyloglucanes) et molécules de lignines. Le taux réduit de lignines et leur structure particulière les empêchent ainsi d'exprimer toutes leurs capacités d'hydrophobation de l'environnement des microfibrilles de cellulose. L'organisation de ces microfibrilles est alors altérée par une concentration locale en eau anormalement élevée.

Des travaux déjà anciens d'Atalla (Atalla et al., 1993) ont présenté les hémicelluloses comme des polymères qui régulent les capacités d'agrégation de la cellulose native. Les travaux plus récents de l'équipe du CERMAV et les travaux associés à cette thèse démontrent qu'il en est de même des lignines.

DEUXIEME PARTIE

V.5. Composition chimique globale des parois des hampes florales du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*

Afin de connaître les possibles différences au niveau chimique entre le double mutant *cad-c x cad-d* et le triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1*, nous avons réalisé une analyse globale des lignines.

V.5.1. Etude globale des lignines par analyses chimiques

Le contenu en lignines des hampes florales du triple mutant *A. thaliana cad-c x cad-d* + *ref1* a été déterminé par la méthode de Klason et comparé avec le double mutant *cad-c x cad-d* (Tableau 2). Les réductions de quantité de lignine Klason dans le double mutant *cad-c x cad-d* et dans le triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* sont similaires (moins 32 % versus moins 36 %). La double mutation associée à la mutation du gène *REF1* (triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1*) ne génère pas de changements significatifs dans la quantité de lignines des hampes florales matures entre ces deux mutants.

La proportion en unités constitutives (H, G et S) liées seulement en β-O-4 déterminée par thioacidolyse (Tableau 3) montre que dans les hampes florales de *cad-c x cad-d* et de *cad-c x cad-d* + *ref1* la diminution du rendement global en monomères conventionnels se fait de manière similaire (92 % contre 90 %).

Dans le cas du double mutant, 98 % des unités sont impliquées dans les liaisons condensées. Les unités liées en β-O-4 sont essentiellement des unités G (~90 %), accompagnées de quantités beaucoup plus faibles d'unités S (~9 %) et de traces de sous-unités H. On peut voir que cet effondrement des unités S a pour conséquence un rapport S/G très faible (0.12)

Chez le triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1*, 97 % des unités sont impliquées dans les liaisons condensées. Les principales unités engagées dans des liaisons β-O-4 sont aussi les unités G (~94 %). Les données du tableau 3 montrent que les lignines des hampes du triple mutant ont une structure profondément bouleversée avec un effondrement de la fréquence des unités liées uniquement en β-O-4, plus

particulièrement des unités S; cet écroulement a pour conséquence une très forte diminution du rapport S/C (0.04).

En résume, les résultats ci-dessus montrent que l'impact de la triple mutation est similaire à celui de la double mutation. La seule différence visible concerne le rapport S/G plus faible chez le triple mutant que chez le double mutant *cad-c x cad-d*.

Le rendement en produits mineurs de thioacidolyse (Tableau 4) montre une incorporation similaire des groupes terminaux coniféraldéhyde liés en β-O-4 par leur chaîne latérale tant dans le double mutant que dans le triple mutant. Le monomère de type indène (monomère 354) tout comme le dithioacétal, dérivé de la vanilline et le syringaldéhyde sont obtenus en grands quantités dans les deux mutants.

Enfin, dans les deux mutants, on observe une incorporation accrue d'acide férulique dans les parois. Ce résultat suggère la présence d'autres ALDHs capables d'oxyder le coniféraldéhyde en acide férulique (Kirch et al., 2001; Skibbe et al., 2002). L'acide férulique incorporé pourrait également être synthétisé à partir du féruloyl-CoA (Meyer et al., 1991) ou à partir de l'action d'une estérase ou thioestérase qui libèrent les acides hydroxycinnamiques de leurs esters ou thioesters (Hoffmann et al., 2003b).

V.6. Etude micromorphologique et ultrastructurale des hampes florales du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*

V.6.1. Marquage cytochimique au P.A.T.Ag

La figure 4 montre l'ultrastructure des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux des hampes florales du double mutant *cad-c x cad-d* et du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* après marquage au P.A.T.Ag.

Comme on avait vu précédemment chez le double mutant, l'aspect grenu du P.A.T.Ag indique un relâchement de l'organisation de la paroi des fibres inter-fasciculaires (Figure 4C), lequel est moins fort dans les vaisseaux (Figure 4D). La réactivité au P.A.T.Ag du triangle de jonction et de la lamelle mitoyenne tant des fibres inter-fasciculaires que des vaisseaux est très forte, on voit aussi que la lamelle mitoyenne joignant les fibres inter-fasciculaires du mutant est très épaisse.

Chez le triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*, la figure 4E montre que les fibres inter-fasciculaires ont des parois souvent épaisses avec un léger relâchement dans

la S_2 mais ces parois son plus compactes que celles du double mutant. Dans les vaisseaux (Figure 4F) la rigidité est moins bonne que celle des fibres inter-fasciculaires et c'est dans ce type de tissu que l'on observe l'organisation microfibrillaire soulignée par le P.A.T.Ag, suggérant une «invidualisation» des microfibrilles de cellulose (flèche). Chez le triple mutant, on retrouve au niveau des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux, le phénotype du double mutant avec la lamelle mitoyenne et le triangle de jonction épais et une bonne réactivité au P.A.T.Ag au sein de ces zones. La bonne réponse à l'oxydation périodique et la grande épaisseur de la lamelle mitoyenne joignant les fibres inter-fasciculaires de ces deux mutants suggèrent un changement de la composition chimique, qui pourrait se traduire par un renforcement de cette zone afin de compenser la déficience mécanique provoquée par la mutation.

V.6.2. Répartition ultrastructurale des unités constitutives des lignines

En utilisant les marqueurs immunologiques dirigés contre les structures non condensées, et contre les structures condensées des lignine, on a analysé la distribution des différents épitopes dans les parois des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux du triple mutant *cad-c* x *cad-d* + *ref1* vis-à-vis du double mutant *cad-c* x *cad-d*.

L'anticorps S/C dirigé contre les unités mixtes de la lignine S, G non condensées montre qu'au sein des sous-couches pariétales des fibres inter-fasciculaires (Figure 5C) et des vaisseaux (Figure 5D) du double mutant, ces épitopes ne sont pas reconnus. Chez le triple mutant, le marquage avec cet anticorps dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 5E) et les vaisseaux (Figure 5F) a disparu, à l'image du double mutant.

Dans le double mutant, très peu d'unités S non condensées sont reconnues par l'anticorps anti-S, tant dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 6C) que dans les vaisseaux (Figure 6D) et le faible marquage qu'on observe reste distribué dans la sous-couche S_2 des ces deux tissus. Chez le triple mutant, le nombre d'épitopes S reconnus a diminué notablement au sein des sous-couches pariétales des fibres inter-fasciculaires (Figure 6E) et des vaisseaux (Figure 6F) et le faible marquage reste distribué aussi dans les sous couche S_2, à peu près de la même manière que pour le double mutant. Il apparaît donc que très peu d'unités non condensées sont

détectées par ces anticorps, à la fois dans les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux, chez le double et le triple mutant. Les sévères altérations observées dans la structure des lignines du double mutant n'ont pas été modifiées par la mutation *ref1*.

Par ailleurs, dans le double mutant, le marquage obtenu par l'anticorps dirigé contre les unités G condensées des lignines est bien distribué dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 8C). On observe que ces épitopes gaïacyles sont un peu plus reconnus dans la sous-couche S_2 des ces tissus. Au sein des vaisseaux (Figure 8D) ils sont moins reconnus et restent plus repartis dans les sous-couche S_1 et S_2 que dans la sous-couche S_3. Dans les parois des fibres inter-fasciculaires du triple mutant *cad-c* x *cad-d* + *ref1* (Figure 8E) les unités G se concentrent dans la sous-couche S_2. La présence de ces épitopes dans les fibres inter-fasciculaires du triple mutant est moins importante que chez le double mutant *cad-c* x *cad-d*. Chez le triple mutant, la population des unités G dans les vaisseaux (Figure 8F) se présente presque d'égale manière que chez le double mutant *cad-c* x *cad-d*

L'anticorps dirigé contre les unités mixtes GS condensées révèle que dans le double mutant ces épitopes sont bien reconnus au sein de la sous-couche S_2 des fibres inter-fasciculaires (Figure 9C) mais le marquage dans les vaisseaux (Figure 9D) est très faible et reste distribué essentiellement dans la sous-couche S_2. Dans les fibres inter-fasciculaires (Figure 9E) et les vaisseaux (Figure 9F) du mutant *cad-c* x *cad-d* + *ref1*, la population de ces unités GS est très faible par rapport au double mutant et reste distribuée principalement dans la sous-couche S_2 des deux tissus.

En conclusion, les résultats ci-dessus suggèrent montrent que la formation des unités condensées de la lignine dans les sous-couches pariétales des fibres inter-fasciculaires est plus affectée dans le triple mutant que chez le double mutant. Dans les vaisseaux la reconnaissance des ces épitopes se fait presque d'égale manière dans les deux mutants

V.7. Conclusion

De la comparaison des conséquences de la triple transformation vis-à-vis de la double transformation on pouvait espérer déduire des enseignements sur la fonction spécifique du gène *REF1* et son implication dans l'assemblage de la paroi secondaire. Or, la grande similitude des phénotypes pariétaux des deux mutants ne montre pas d'effets spécifiques imputables, à l'évidence, à *ref 1*. Il apparaît donc que du point de vue de la structure des parois, ce soit la mutation *cad* qui domine, entraînant une microfibrillation interne de la couche S_2, le gène *REF1* n'ayant pas d'effet d'augmentation de ce caractère. Bien que la diminution des unités S soit plus forte chez le triple mutant on n'observe pas d'effet ultrastructural qui puisse suggérer un rôle particulier des noyaux syringyles. Comme pour le double mutant les défauts dans l'assemblage des parois semblent plutôt mettre en cause la forte diminution de structures non-condensées, elle-même liée à la quasi absence d'unités S. Bien que nous n'ayons pas fait de mesures de résistance mécanique sur nos mutants, on peut avancer que ce défaut d'assemblage expliquerait vraisemblablement la faiblesse mécanique du système vasculaire observée chez des lignées de tabac et de peuplier CAD (-) (Hepworth and Vincent, 1998).

L'impact métabolique attendu de la mutation *ref 1* est une accumulation d'aldéhydes et une déficience en ester férulate lié à la paroi (Nair et al., 2004). Le triple mutant pourrait donc se distinguer du double mutant par une moins forte réticulation des polymères à travers le férulate. En fait, nous observons plutôt un effet inverse avec une plus forte cohésion des parois chez le triple mutant.

On voit avec cette comparaison entre double et triple mutant que la résultante des effets d'une mutation multiple est beaucoup plus complexe que la simple additivité des effets individuels des gènes concernés.

CHAPITRE VI:

Effets comparatifs de différents mutants sur la composition analytique et la topochimie ultrastructurale des parois des hampes florales d'*A. thaliana*

CHAPITRE VI: EFFETS COMPARATIFS DE DIFFERENTS MUTANTS SUR LA COMPOSITION ANALYTIQUE ET LA TOPOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE DES PAROIS DES HAMPES FLORALES D'*A. THALIANA*

VI.1. Effets des mutations sur la micromorphologie interne des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux du xylème

Les coupes transversales des différents mutants observées à faible grossissement en M.E.T et après marquage cytochimique par la méthode du P.A.T.Ag, ont permis de visualiser l'organisation ultrastructurale des parois des fibres inter-fasciculaires (Figure 1) et des faisceaux libéroligneux (Figure 2) des hampes florales chez la plante sauvage et les plantes mutées.

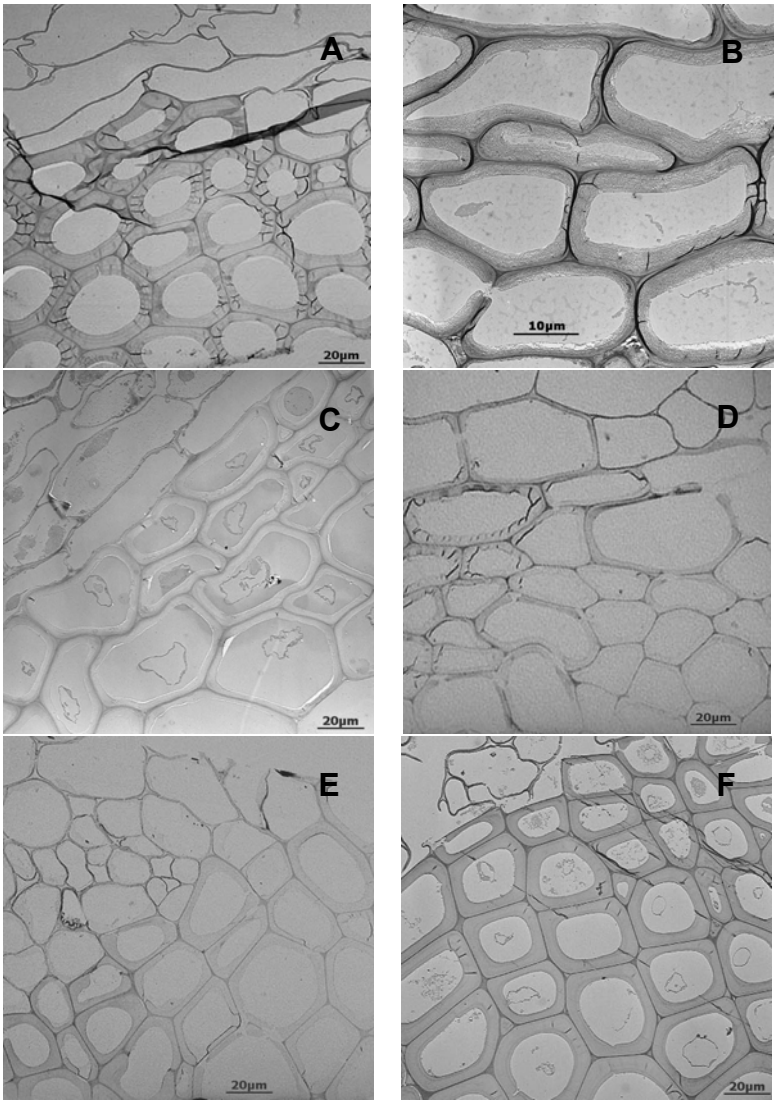


Figure VI.1. Comparaison à faible grossissement (marquage au P.A.T.Ag) de l'organisation des fibres inter-fasciculaires du témoin Ws (A), du mutant *ccr 1* (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87* (F).

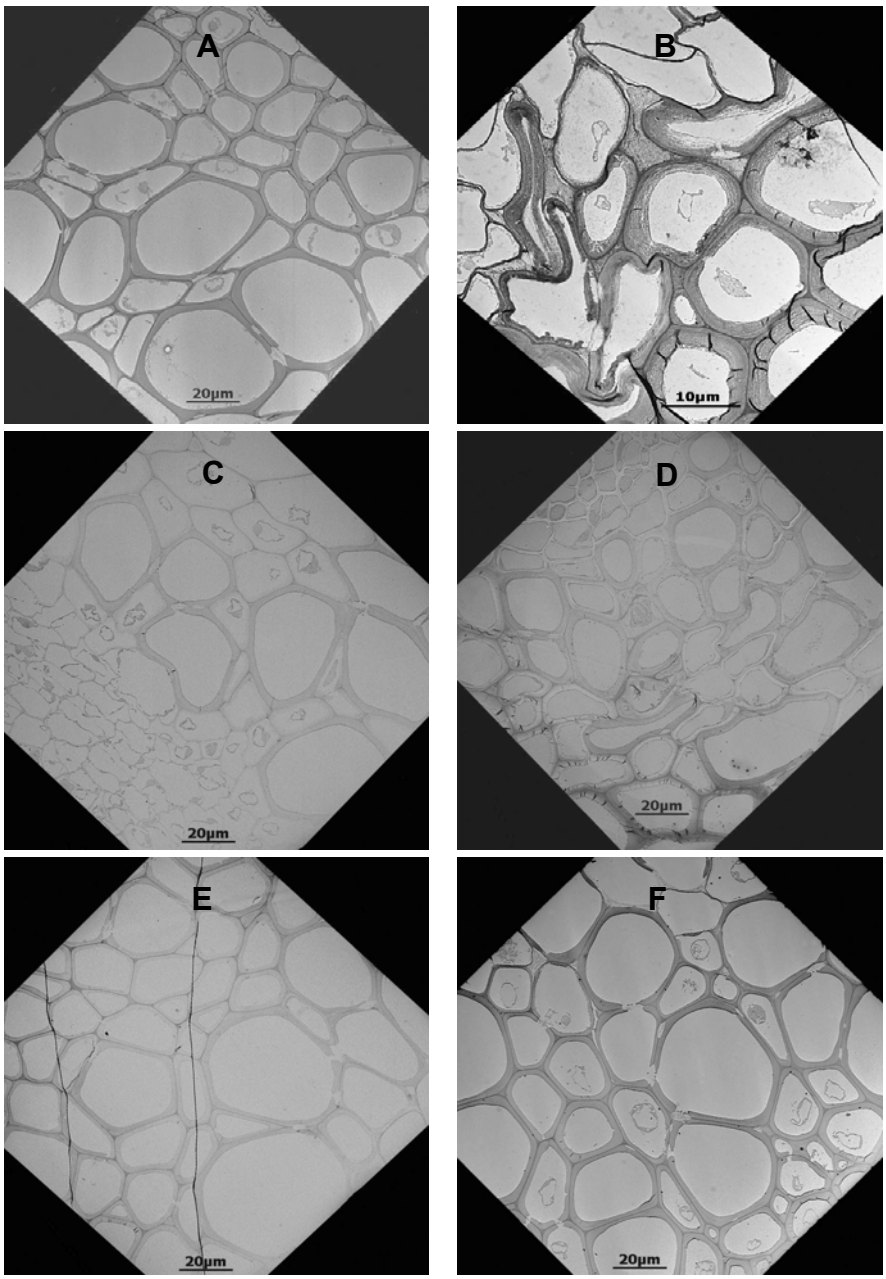


Figure VI.2. Comparaison à faible grossissement (marquage au P.AT.Ag) de l'organisation des faisceaux libéroligneux du témoin Ws (A), du mutant *ccr 1* (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87* (F).

Ces observations montrent qu'à l'échelle tissulaire les modifications le plus importantes concernent le mutant *ccr 1*, le double mutant *cad-c x cad-d* et le triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* et portent à la fois sur les fibres inter-fasciculaires et l'organisation des faisceaux libéroligneux (particulièrement chez *ccr 1*). Pour avoir des informations plus approfondies, et constater s'il existe des différences au niveau des parois des fibres inter-fasciculaires (Figure 3) et des vaisseaux (Figure 4) des hampes florales de ces plantes, on a travaillé à plus fort grossissement.

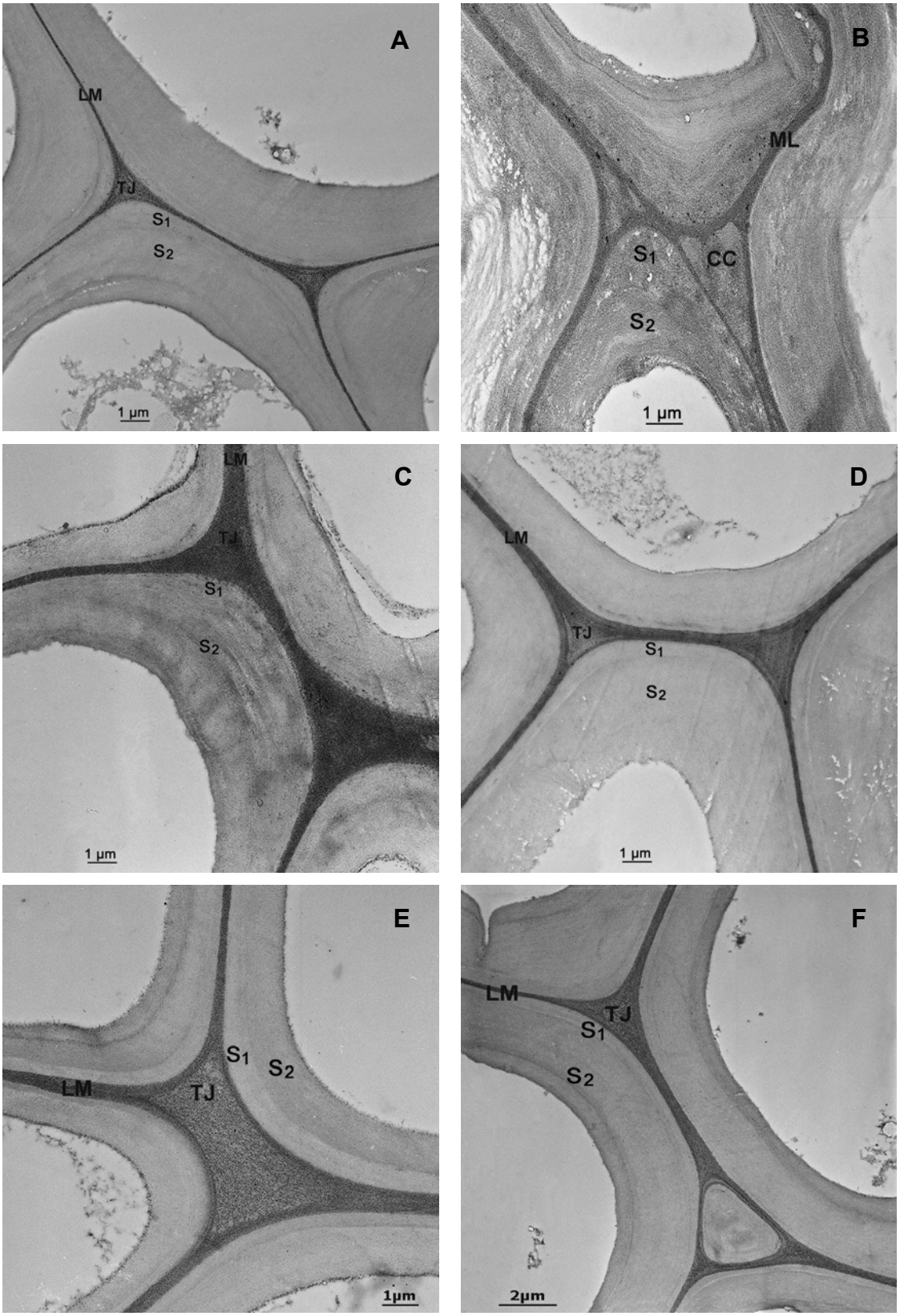


Figure VI.3. Micromorphologie comparée à fort grossissement (marquage au P.AT.Ag) des parois secondaires des fibres inter-fasciculaires du témoin (A), du mutant *ccr 1* (B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87* (F).

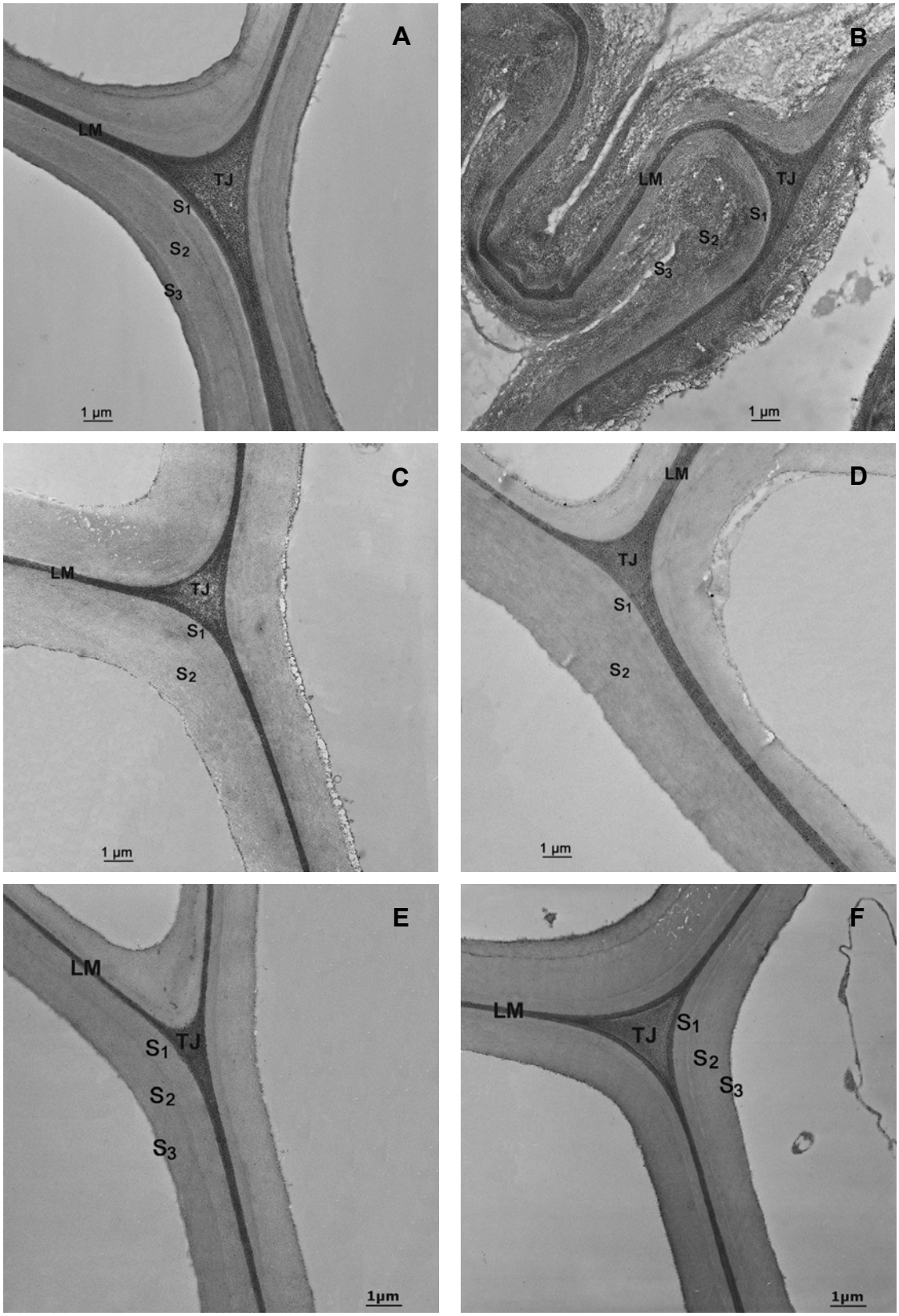


Figure VI.4. Micromorphologie comparée à fort grossissement (marquage au P.AT.Ag) des parois secondaires des vaisseaux du témoin (A), du mutant *ccr 1*(B), du double mutant *cad-c x cad-d* (C), du triple mutant *cad-c x cad-d + ref1* (D), du mutant *ref1* (E) et du mutant *EBL87*(F).

Les principales caractéristiques de la structure des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux sont rassemblées dans le tableau 1. On peut voir que chacune des transformations génétiques a eu un effet sur la formation de la paroi des fibres et des vaisseaux, sauf dans le cas de *EBL87* (F5H) qui ne présente pas d'altération notable de l'aspect de ses parois. Dans les trois autres cas, on dénote des aspects spécifiques affectant les fibres et/ou les vaisseaux.

Il est important de noter qu'aucune des transformations n'a entraîné d'apparente modification de S_1. Lorsque les parois sont affectées c'est au niveau de S_2. La plus caractéristique et spectaculaire de ces modifications concerne *ccr 1* qui présente un véritable phénotype qui est tout à fait semblable à celui précédemment caractérisé dans d'autres plantes CCR telles que le tabac (Dauwe et al., 2007) et le peuplier (Chabannes et al., 2001a; Pinçon et al., 2001).

Tableau VI.1. Principales altérations ultrastructurales de la sous-couche S_2 dans les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux

Plante	Fibres inter-fasciculaire	Vaisseaux du xylème
Ws	Paroi épaisse S_1 et S_2 distinctes (parfois S_3)	Paroi épaisse S_1, S_2 et S_3 distinctes
ccr 1	- Paroi mince - S_1 intacte - S_2 fortement relâchée -Microfibrilles désordonnées	- Paroi mince + collapse - S_1 intacte - S_2 relâchée - S_3 non différenciée
cad-c x cad-d	- Paroi épaisse - S_1 intacte - S_2 cohésion faible	- Paroi amincie - léger collapse - S_3 non différenciée
cad-c x cad-d + ref1	- Paroi épaisse - S_1 intacte - S_2 léger relâchement	- Paroi amincie - S1 intacte - Pas de relâchement de S_2 - S_3 peu différenciée
EBL 87	- Paroi épaisse - S1 intacte - S_2 épaisse et compacte	- Paroi épaisse - S1 intacte - S_3 différenciée - Aspect pluristratifié

Il est intéressant de noter qu'à l'exception de *EBL87* les transformations ont toujours eu un impact sur les vaisseaux du xylème, de façon plus ou moins forte. En revanche, les fibres inter-fasciculaires ne sont fortement affectées que chez *ccr 1*, et beaucoup plus faiblement chez les plantes *cad-c x cad-d* et *cad-c x cad-d + ref1*.

VI.2. Caractéristiques analytiques des plantes d'*A. thaliana* témoins et transformées

Les données analytiques des plantes d'*A. thaliana* faisant l'objet de notre étude sont rappelées dans le tableau 2. Il faut remarquer que les plantes transformées étudiées ici (et au stade de développement où nous les avons étudiées) à l'exception de *EBL87* présentaient un déficit dans le taux de lignine Klason. Les plantes *ccr 1*, *cad-c x cad-d* et *cad-c x cad-d + ref1* avaient toutes trois un déficit d'environ 33% par rapport aux plantes normales, alors que les plantes *f5h* (*EBL 87*) ne montraient pas de variation significative du taux de lignine Klason. Elles se prêtaient donc bien à une étude comparative.

Tableau VI.2 Récapitulatif des données analytiques concernant les lignines dans les plantes témoins d'*A. thaliana* et dans les plantes mutées

Plantes *A. thaliana*	Lignine Klason (%)	Rendement Thioacidolyse	G (%)	S (%)	S/G
Ws	16.16	937	73	26	0.35
Col-0	18.26	1200	71	28	0.40
ccr 1	12	774	71	28	0.39
cad-c x cad-d	11.05	68	90	9.2	0.10
cad-c x cad-d + ref1	11.02	104	94	4.1	0.04
EBL87	17.10	1100	99.3	0	0

- Il apparaît qu'au contraire de *ccr 1* dont le rapport global S/G n'a pas varié, les plantes *cad-c x cad-d* et *cad-c x cad-d + ref1* ont perdu une grande partie de leur aptitude à synthétiser les unités S.
- On constate aussi que les rendements de thioacidolyse sont différents entre *ccr 1* et les deux dérivés de CAD (*cad-c x cad-d* et *cad-c x cad-d + ref1*). En effet cela entraîne deux conséquences principales:

Les rendements faibles de thioacidolyses traduisent le faible niveau de liaisons non condensées dans ces lignines.

Ces lignines sont donc majoritairement de type gaïacyle et condensé.

VI.3. Variations dans la topochimie de la lignification consécutives aux mutations affectant la biosynthèse des monolignols.

Les effets des différentes mutations sur la distribution des types de lignines dans les fibres inter-fasciculaires et dans les vaisseaux du xylème ont été évalués par immuno-topochimie à l'échelle ultrastructurale comme vu dans les chapitres précédents.

L'ensemble de ces données nous a permis de réaliser une étude comparative de l'impact de chacune des mutations sur la mise en place des lignines respectivement sur les fibres inter-fasciculaires et sur les vaisseaux du xylème. Pour cette étude nous n'avons pris en compte que les épitopes gaïacyles condensés et les épitopes syringyles non condensés (Tableaux 3 et 4).

Tableau VI 3 Analyse immuno-cytochimique comparative de la distribution topochimique des épitopes de lignine dans les fibres inter-fasciculaires. Variations induites par la mutation.

Epitope	Col-0		Ws		*ccr 1*		*cad-c x cad-d*		*cad-c x cad-d + ref1*	
	S_1	S_2	S_1	S_2	S_1	S_2	S_1	S_2	S_1	S_2
Gaïacyles condensées	7.5 *1.30*	4.5 *0.77*	4.3 *0.75*	5.8 *1.00*	6.3 *1.08*	10.2 *1.75*	2.9 *0.5*	5.9 *1.02*	1.2 *0.21*	2.3 *0.40*
S/C Non condensées	2.1 *0.34*	6.1 *1.00*	2.6 *0.43*	6.1 *1.00*	0 *0*	1.2 *0.19*	1.0 *0.16*	1.3 *0.21*	0 *0*	0.3 *0.05*
Syringyle Non condensées	3.4 *1.70*	7.4 *3.70*	0.8 *0.4*	2.0 *1.00*	0 *0*	0.3 *0.15*	0 *0*	0.6 *0.3*	0 *0*	0.2 *0.10*

* L'intensité du marquage a été évaluée par comptage manuel des grains d'or par unité de surface (μm^2)
** Les valeurs en italiques ont été calculées en affectant pour chaque anticorps la valeur 1.00 à la sous-couche la plus fortement marquée dans la plante contrôle Col-0 et Ws. De ce fait, les variations d'intensité du marquage dues à la mutation et données pour chaque antiserum et dans chaque type cellulaire deviennent apparentes.

Tableau VI.4 Analyse immuno-cytochimique comparative de la distribution topochimique des épitopes de lignine dans les vaisseaux. Variations induites par la mutation.

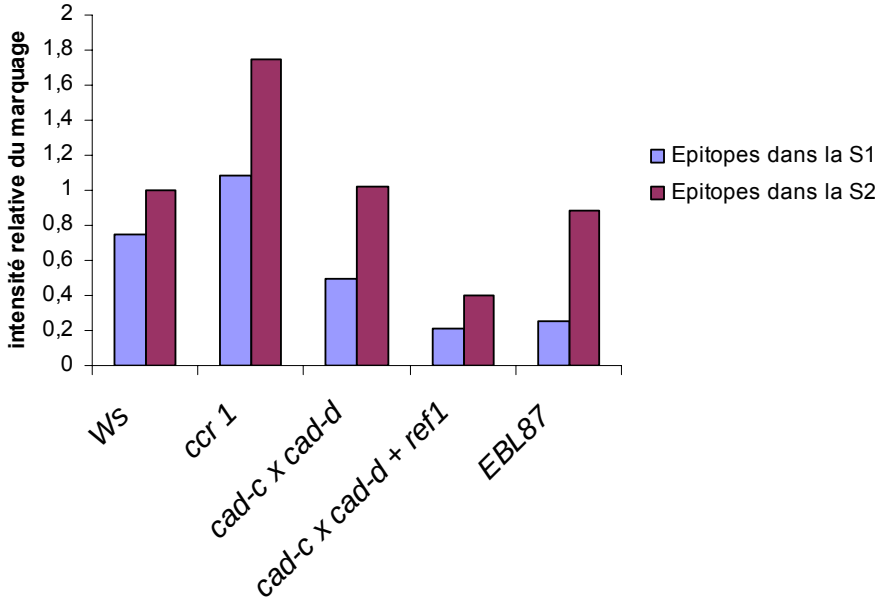
Epitope	Col-0	Ws	*ccr1*	*cad-c x cad-d*	*cad-c x cad-d + ref1*	*EBL87*
	S_2	S_2	S_2	S_2	S_2	S_2
Gaïacyles condensées	3.1 *1.07*	2.8 *1.00*	7.9 *2.82*	1.7 *0.60*	2.05 *0.73*	3.2 *1.15*
S/C Non condensées	4.5 *0.82*	5.5 *1.00*	2.1 *0.38*	0.5 *0.09*	0.6 *0.11*	0.6 *0.11*
Syringyle Non condensées	3.2 *1.8*	1.7 *1.00*	0 *0*	0.5 *0.31*	0.2 *0.12*	0 *0*

* L'intensité du marquage a été évaluée par comptage manuel des grains d'or par unité de surface (μm^2)
** Les valeurs en italiques ont été calculées en affectant pour chaque anticorps la valeur 1.00 à la sous-couche la plus fortement marquée dans la plante contrôle Col-0 et Ws. De ce fait, les variations d'intensité du marquage dues à la mutation et données pour chaque antiserum et dans chaque type cellulaire deviennent apparentes.
*** Seul le marquage de la sous-couche S_2 des vaisseaux a été quantifié, les deux autres sous-couches (S_1 et S_3) ne présentent pas de marquage significatif.

Dans une première démarche, on peut constater que quel que soit le gène de la biosynthèse de la lignine ayant subi la mutation, une répercussion s'en est suivie sur le pattern de lignification. En effet, sans considération des variations affectant le taux de lignine, on peut observer dans tous les cas de figure étudiés, *ccr 1*, *cad-c x cad-d*, *cad-c x cad-d + ref1* et *EBL 87*, que la distribution ultrastructurale des unités G et S de la lignine, représentant respectivement les structures condensées et non condensées, a été perturbée.

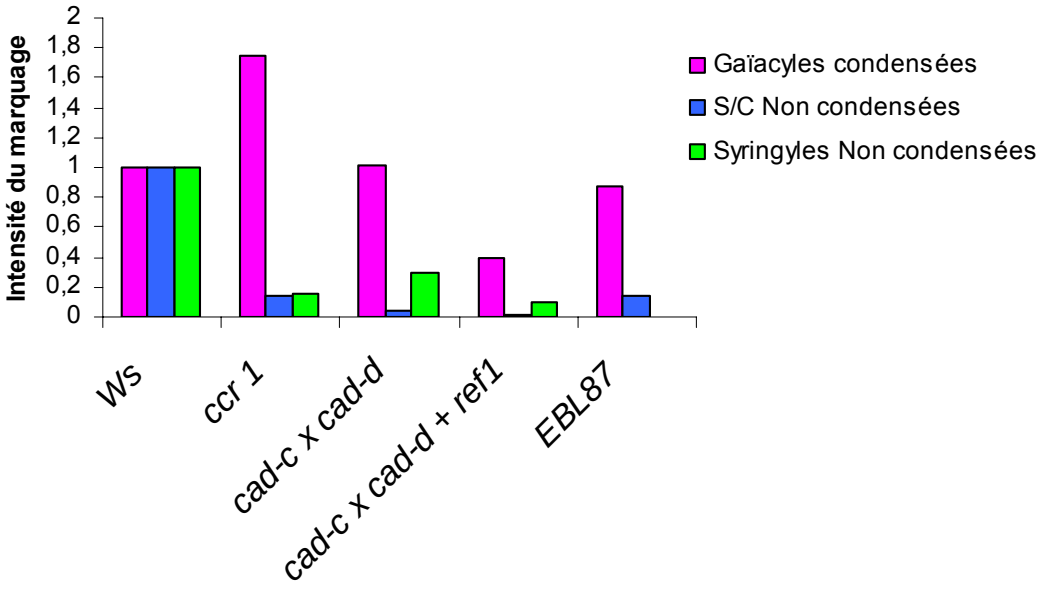
L'histogramme 1 montre la variation de répartition et d'abondance des épitopes G condensés dans les fibres inter-fasciculaires. On voit que même si les quantités absolues varient, l'abondance relative d'épitopes gaïacyles dans S_1 vis-à-vis de S_2 est conservée, avec une concentration toujours supérieure dans S_2.

Histogramme VI.1 Etude comparative de la distribution des épitopes gaïacyles condensées dans la sous-couche S_2 des fibres inter-fasciculaires de plante d'*A. thaliana* ayant subi différentes mutations

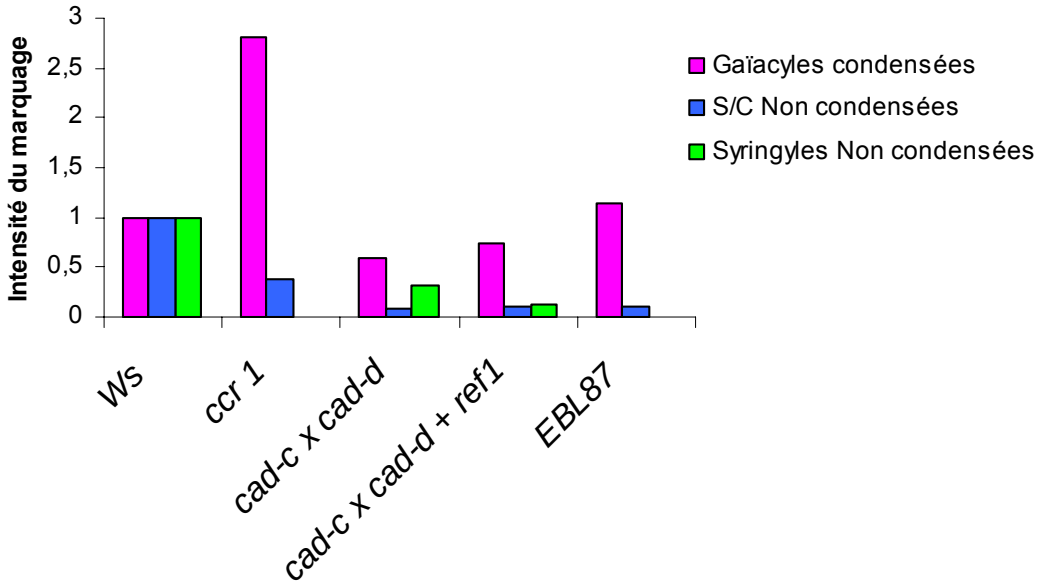


Les histogrammes 2 et 3 mettent en évidence les variations affectant les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux du xylème en exprimant en données relatives les variations sur chacun des épitopes. Ces variations sont reprises dans le tableau 5.

Histogramme VI.2 Etude comparative de la lignification dans les Fibres de plante d'*A.thaliana* ayant subi différentes mutations



Histogramme VI.3: Etude comparative de la lignification dans les Vaisseaux de plante d'*A. thaliana* ayant subi différentes transformations génétiques.



D'après les résultats ci-dessus:

- Il apparaît que les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux ne sont pas affectés de la même façon par les mutations. Les différences les plus marquées entre fibres inter-fasciculaires et vaisseaux sont celles affectant les plantes *ccr 1* où l'effet de la mutation sur la distribution des épitopes est totalement opposé (Tableau 5).
- Les structures gaïacyles et syringyles ne subissent pas les mêmes variations selon la mutation.
- Les variations des unités gaïacyles et syringyles ne présentent pas les mêmes profiles dans les fibres et les vaisseaux en fonction des mutations.

Ainsi, dans les fibres inter-fasciculaires, la proportion relative d'épitopes gaïacyles condensés apparaît augmentée chez les plantes *ccr 1*, alors qu'elle reste à peu près stable chez les mutants *cad-c x cad-d* et *EBL 87*. Elle apparaît diminuée chez les plantes *cad-c x cad-d + ref1*. En revanche, les unités syringyles non condensées sont diminuées quelle que soit la mutation.

Dans les vaisseaux, seules les plantes *ccr 1* montrent une augmentation d'unités G. Dans les deux cas impliquant les gènes *cad-c x cad-d*, on observe une diminution de ces unités. Pas de variation significative dans le cas de *EBL87*. Pour tous les mutants étudiés, la proportion des unités S est diminuée.

Tableau VI.5. Evaluation semi-quantitative des variations induites par les mutations sur les épitopes gaïacyles et syringyles de la sous-couche principale S_2 des fibres inter-fasciculaires et des Vaisseaux.

Epitope	*ccr 1*		*cad-c x cad-d*		*cad-c x cad-d + ref1*		*EBL87*	
	Fi	V	Fi	V	Fi	V	Fi	V
Gaïacyles condensées	↗	↗	=	↘	↘	↘	=	=
Syringyles non condensées	↘	↘	↘	↘	=	↘	↘	↘

* Fi= Fibres inter-fasciculaires
** V= Vaisseaux

VI.4. Conclusion

Toutes les plantes mutantes qui présentent un défaut dans l'assemblage de leurs parois secondaires (*ccr 1*, *cad-c x cad-d* et *cad-c x cad-d* + *ref1*) ont montré une diminution notable dans la quantité de lignine de leurs parois qui se manifeste particulièrement au niveau des unités non condensées. La présence d'unités S dans les vaisseaux des témoins, confirmée par la microdissection et microanalyse par thioacidolyse, s'est avérée non négligeable contrairement à la description généralement faite dans la littérature de la nature uniquement gaïacyle des vaisseaux. Il est de ce fait intéressant de noter que ces unités syringyles des vaisseaux ont été fortement diminuées dans tous les transformants.

Cas des **plantes *ccr 1***: On peut constater que la distribution des épitopes G et S évolue parallèlement dans les fibres et les vaisseaux, avec dans les deux cas une diminution de la quantité d'épitopes syringyles. Les marquages immuno-chimiques font ressortir la plus forte proportion relative en épitopes condensés qui deviennent très prépondérants dans les fibres. Cela s'accorde avec les analyses biochimiques montrant une forte diminution de la proportion en unités non condensées et avec les résultats de micro-analyse des tissus isolés par microdissection laser (chapitre IV).

Cas des **plantes c*ad-c x cad-d***: Si l'on se reporte au schéma des voies de biosynthèse revu par Nair et al., (2004), le blocage de la CAD, catalysant la conversion du coniféraldéhyde en alcool coniférylique, réoriente la voie vers

l'oxydation de cet aldéhyde en férulate par REF1. Cela justifierait une perte en unités G. Le fait que l'on n'observe la présence d'unités syringyles ni dans les fibres ni dans les vaisseaux des plantes *cad-c x cad-d* pourrait suggérer que la SAD dont l'activité a été rapportée chez le peuplier (Li et al., 2001), ne serait pas opérationnelle ici, en accord avec les résultats de Sibout et al., (2005)

Les résultats d'immunomarquage montrent une plus forte diminution des unités G condensées dans les vaisseaux. Compte tenu de la nature essentiellement gaïacyle des lignines des vaisseaux, ce serait donc au niveau de ces cellules que la diminution globale de lignine induite par la mutation *cad-c x cad-d* se ferait le plus sentir. C'est là un nouvel exemple de la régulation tissu-spécifique de la lignification. A ce sujet, il faut remarquer que l'on retrouve une différence entre fibre et vaisseau allant dans le même sens que la constatation par Sibout et al., (2005) en spectroscopie FTIR que l'impact de la mutation était différent pour les deux tissus

Cas des **plantes *cad-c x cad-d + ref1***: Ici les aldéhydes coniférylique et sinapylique ne sont pas déviés vers le férulate et le sinapate par REF 1. L'absence quasi complète d'unités S tend à montrer que l'aldéhyde sinapylique n'est pas réduit en alcool sinapylique et par conséquent cela constitue une autre indication que la SAD ne serait pas active ici.

Cas des **plantes *EBL 87***: L'absence quasi totale de marquage par les anticorps S est en accord avec l'analyse montrant que dans ces mutants où l'activité F5H a été totalement bloquée, il ne se forme plus d'unités S.

En définitive l'immuno-localisation des épitopes les plus typiques des lignines pour la comparaison des effets des mutations sur la lignification des parois secondaires d'*A. thaliana* a fourni des résultats en bon accord avec les analyses biochimiques et permet de distinguer les impacts relatifs sur les fibres inter-fasciculaires et les faisceaux du xylème où dominent les vaisseaux. Pour chacune des mutations, ce sont les unités non condensées qui apparaissent les plus affectées, l'impact étant donc non seulement sur la synthèse des monolignols eux-mêmes, mais aussi sur leur mode de couplage dans la paroi. Plusieurs facteurs sont à envisager pour justifier cet aspect purement structural tels que le flux des monolignols, qui influence la vitesse d'incorporation des unités et, par delà, le mode de couplage des radicaux, ou encore l'environnement physique de la paroi en

formation qui ne s'assemble pas de façon normale du fait de la faible proportion de lignines.

VI.5. Bilan et conclusions générales: Essais de rationalisation des modifications structurales des parois en fonction des modifications analytiques des lignines?

En provoquant la disparition des enzymes intervenant à des niveaux différents dans la biosynthèse des monolignols, on pouvait envisager que les impacts sur l'intégrité des parois secondaires lignifiées seraient différents dans la mesure où les modifications affectant la structure moléculaire des lignines seraient elles-mêmes différentes.

VI.5.1. Aspects analytiques

VI.5.1.1. Mutant simple *ccr 1*

Du point de vue analytique (Tableau 2), ce mutant se caractérise par une forte réduction de la quantité de lignines, une nette diminution de la proportion de structures non-condensées, indiquée par le plus faible rendement de thioacidolyse, et par une stabilité du rapport S/G.

VI.5.1.2. Double mutant *cad-c x cad-d*

L'étude des mutants simples *cad-c* et *cad-d* (Sibout et al., 2003) a établi que l'isoforme CAD-C n'avait qu'un rôle marginal, voire aucun rôle, à la différence de CAD-D très impliquée dans la biosynthèse des précurseurs des unités G et S des lignines. Ce résultat est conforté par l'étude biochimique de Kim et al., (2002) montrant que CAD-C n'utilise que très faiblement le sinapaldéhyde comme substrat. Contrairement aux simples mutants, le double mutant *cad-c x cad-d* a un phénotype très marqué caractérisé par une perte de rigidité des hampes accompagnant une réduction de maturation et d'élongation. Du point de vue analytique (Tableau 2) le taux de lignine du double mutant est fortement diminué avec un impact très fort sur le rapport S/G qui est très déficitaire en unités S. A cela s'ajoute un rendement de thioacidolyse particulièrement faible qui indique qu'à la différence des simples

mutants *cad-c* et *cad-d*, les lignines du double mutant sont essentiellement de nature condensée.

De tout cela il a pu être conclu que les deux gènes *CAD-C* et *CAD-D* fonctionnent en synergie pour la synthèse des précurseurs des unités G et S.

VI.5.1.3. Triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*

Du point de vue analytique il est apparu (Tableau 2) que le triple mutant présente des caractères similaires à ceux du double mutant, à savoir une diminution équivalente des taux de lignines et un très faible rapport S/G accompagné par un rendement de thioacidolyse très faible également. Si l'on se reporte à la voie de biosynthèse des monolignols proposée par Sibout et al., (2005) il apparaît que le métabolisme des aldéhydes coniférylique et sinapylique est dépendant de deux enzymes: la CAD d'une part, qui réduit les aldéhydes en leurs alcools correspondants (monolignols G et S), et les aldéhydes deshydrogénases REF 1 (Nair et al., 2004) d'autre part, qui oxydent les aldéhydes en acides férulique et sinapique, respectivement. On peut donc s'attendre à ce qu'une déficience à la fois sur CAD et sur REF 1 résulte en une forte accumulation d'aldéhydes. C'est là la différence majeure comparée au blocage au niveau de CCR.

VI.5.1.4. Mutant simple *EBL 87* (*f5h*)

La mutation *f5h* a pratiquement bloqué la synthèse des unités S conduisant ainsi à des lignines entièrement G, alors que le taux global de lignines reste inchangé.

VI.5.2. Impacts sur la formation et la structure des parois

Afin d'essayer de relier les résultats analytiques aux conséquences sur la structure des parois nous avons distingué les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux du xylème. En effet, la différence de composition des lignines typique des vaisseaux (essentiellement de nature gaïacyle) et des fibres (nature gaïacyle et syringyle) est telle que les variations dans la composition des lignines en S et G ne devraient pas affecter de façon équivalente les deux types de cellules. Les résultats récapitulatifs sont présentés dans le tableau 1.

Le tableau 2 fait ressortir deux modifications ultrastructurales principales consécutives aux mutations sur la biosynthèse des lignines. L'une consiste en un collapse des vaisseaux, et l'autre en une désorganisationn interne de la paroi des fibres.

- *Vaisseaux du xylème: Evolution du «collapse» des parois*

ccr 1 > cad-c x cad-d > cad-c x cad-d + ref1 = EBL 87

Le collapse des vaisseaux constitue un élément phénotypique commun à certains mutants.

Pour ce type cellulaire principalement composé d'unités G, le collapse chez *ccr 1* et *cad-c x cad-d* apparaît associé à la perte en lignines non-condensées.

- *Fibres inter-fasciculaires: Evolution du défaut de structuration de la couche S_2*

ccr 1 > cad-c x cad-d > cad-c x cad-d + ref1 = EBL 87.

Il est important de noter que la désorganisation ne concerne que S_2 et pas S_1 et que la désorganisation de S_2 se présente sous deux aspects légèrement différents:

Chez *ccr 1* elle consiste en une délamination (= groupes de lamelles indépendantes formées de microfibrilles de cellulose).

Chez le double mutant *cad-c x cad-d*, et de façon moindre, le triple mutant *cad-c x cad-d + ref1*, elle se présente plus comme une microfibrillation (les microfibrilles de cellulose restent individualisées, mais gardent leur orientation). Une microfibrillation s'observe aussi dans le cas de *ccr 1*, où elle semble représenter un cas extrême de déstructuration car cela s'accompagne de désordre des microfibrilles qui pour la majeure partie ont perdu leur orientation.

En revanche chez le mutant simple *f5h* (*EBL 87*) on n'observe pratiquement aucune modification de morphologie et d'ultrastructure des paroi, ni pour les fibres ni pour les vaisseaux.

On constate que, là encore, c'est la mutation *ccr 1* qui a l'impact le plus marqué sur la structure interne des fibres. Puisque l'analyse montre que dans ce mutant le rapport S/G n'est pratiquement pas modifié mais que la proportion de structures non condensées est diminuée, on peut penser que c'est le déficit en ces structures non condensées qui empêcherait l'association des microfibrillles de

cellulose et des lamelles. De ce fait la forte diminution des structures non-condensées chez les mutants *cad-c x cad-d* justifierait aussi la désorganisation dans la couche S_2 des fibres. D'autres facteurs analytiques modulent certainement cet effet en agissant directement ou indirectement sur la formation de la paroi.

Autres éléments analytiques susceptibles de justifier les défauts de formation des parois:

En dehors des variations portant sur la composition monomérique des lignines et sur la fréquence des structures condensées et non-condensées d'autres éléments structuraux des lignines ont apporté des modifications propres à chacune des transformations telles que l'accumulation d'intermédiaires. C'est le cas du feruloyl CoA, substrat de la CCR, des aldéhydes coniférylique et sinapylique, substrats de la CAD et de REF1, ou du ferulate, substrat de la F5H.

Ainsi, chez *ccr 1* la perte d'activité de l'enzyme induit une accumulation du dérivé thio-ester de Co-enzyme A qui résulte en une incorporation d'acide férulique dans les lignines (Goujon et al., 2003a) et à une redirection du feruloyl-CoA vers la formation d'ester ferulate liés à la paroi (Mir Derikvand et al., 2007). L'augmentation d'esters ferulate assurant une réticulation entre polysaccharides et lignine (Iiyama et al., 1994) pourrait représenter un facteur justifiant la tendance des parois du mutant *ccr 1* à garder les microfibrilles de cellulose associées entre elles en lamelles, par opposition aux microfibrilles des doubles et triples mutants cad qui restent individualisées faute de réticulation à travers les esters féruliques.

Les résultats analytiques de Sibout et al., (2005) ont montré que les aldéhydes coniférylique et sinapylique étaient effectivement incorporés en position terminale par liaison ether en C4 dans la lignine du double mutant. Une telle position devrait laisser libre la fonction aldéhyde. Or la grande réactivité de la fonction aldéhydique pourrait lui permettre de réagir avec les fonctions alcohol des hémicelluloses et de la cellulose pour former des liaisons acétaliques. Cela représente une possibilité d'interconnexion lignine-polysaccharide additionnelle chez les mutants *cad-c x cad-d* et *cad-c x cad-d* + *ref1* propre à justifier un certain degré de cohésion entre les microfibrilles de cellulose qui expliquerait le faible relâchement des parois des fibres et vaisseaux du double mutant et celui encore plus discret du triple mutant, en dépit des taux de lignine affaiblis chez l'un et l'autre.

Dans le cas du mutant *EBL 87*, l'absence d'unités S devrait se répercuter plus sur la paroi des fibres que des vaisseaux puisque des derniers ne contiennent qu'une minorité de S. Du point de vue de la répartition des unités cela se vérifie à travers les marquages immunologiques. Par contre en ce qui concerne la cohésion des parois, il semble que dans ce cas le taux normal de lignine soit le premier facteur assurant le maintien de la cohésion et que, par de là l'absence des unités S dans les fibres, les structures non-condensées ont une importance pour l'assemblage des microfibrilles.

Il est important de noter que bien qu'ayant observé des variations dans les rendements de thioacidolyse ou d'oxydation au nitrobenzène, en aucun cas les auteurs n'ont établi de relation entre la variation (diminution dans les cas présents) du degré de condensation des lignines et la nature de la mutation. Le degré de condensation des lignines est essentiellement déterminé par le mode de couplage des monolignols lors de la polymérisation. Cela met en jeu des facteurs qui ne sont qu'indirectement liés à la nature des étapes ou à celle des métabolites intermédiaires de la voie de biosynthèse des monolignols, tels que l'environnement microfibrillaire, le flux de diffusion des monolignols ou encore le pH et la charge de la matrice (Higuchi, 1990; Terashima et al., 1996; Cathala and Monties, 2001). Or, le degré de condensation des lignines est un paramètre important qui semble avoir des répercussions sur la cohésion des parois comme il l'a été suggéré (Ruel et al., 2001; Ruel et al., 2002).

La diminution des structures non condensées, cause ou conséquence du relâchement des parois?

Ici se pose la question de savoir si la diminution des structures non condensées est la cause du relâchement entre les microfibrilles ou si, au contraire, la diminution de ces structures est une conséquence du relâchement entre les microfibrilles.

Dans la première hypothèse, ont peut avancer que lorsqu'elles sont polymérisées de façon non-condensées, ce qui induit une conformation étendue, les lignines ont plus tendance à s'aligner sur les microfibrilles de cellulose (théorie du plan d'orientation des noyaux aromatiques des lignines selon l'axe des microfibrilles (Atalla and Agarwal, 1985; Roussel and Lim, 1995). Si l'on ajoute le pouvoir de réticulation qui peut exister entre polysaccharides et lignines, alors on peut envisager

que ce mode de polymérisation joue un rôle positif dans l'association et le maintien de l'organisation des microfibrilles. En conséquence, le défaut de structures non-condensées serait la cause du relâchement des parois secondaires.

Dans la seconde hypothèse, le faible taux de lignines et le retard dans la lignification empêcheraient l'agrégation des microfibrilles qui seraient alors incapables de s'organiser en un réseau orienté. Or, il a été suggéré qu'une matrice cellulosique organisée où l'espace entre les microfibrilles est restreint induit préférentiellement un mode de polymérisation en fin de chaîne et donc des structures non condensées (Higuchi, 1990; Faulon and Hatcher, 1994; Ruel et al., 2002; Besombes and Mazeau, 2005a). En conséquence, chez les mutants qui présentent des parois où les microfibrilles sont largement désorganisées, l'absence d'orientation des microfibrilles, en n'imposant pas de contraintes spatiales, est un facteur favorable à la polymérisation en masse des monolignols. Ainsi, chez les mutants *ccr 1* et les double et triple mutants *cad* la polymérisation des lignines se ferait de façon plus anarchique, en masse («bulk polymerization») ce qui conduit à des lignines fortement condensées.

On peut admettre que chez les mutants où le taux de lignines est fortement diminué (cas de *ccr 1*, du double mutant *cad-c x cad-d* et du triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1*), le flux de monolignols jusqu'au site de polymérisation dans la paroi en formation a été également fortement ralenti. Dans ce cas, la synthèse de cellulose et des hémicelluloses se poursuit à vitesse normale et les lignines n'ont pas le temps d'être intercalées entre les microfibrilles. Du fait du défaut de lignification, ces microfibrilles restent désordonnées et les monolignols ont de plus en plus de difficulté à diffuser jusqu'à ces zones.

On a pu voir que chez tous les mutants étudiés ici, la paroi primaire (indissociable de la lamelle mitoyenne) et la sous-couche S_1 de la paroi secondaire n'étaient pas apparemment affectées par les transformations, présentant un aspect ultrastructural intact. Il faut aussi noter que dans ces zones ce sont les structures condensées qui sont prédominantes. Il est donc normal que les diminutions de structures non-condensées aient moins d'effets sur la cohésion de ces sous-couches.

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

Les approches biochimiques et les observations en microscopie électronique en transmission, associées aux techniques cytochimiques et immunologiques nous ont permis de connaître *in planta* les conséquences de la mutation de différents gènes codant pour des enzymes qui interviennent sur la lignification dans les parois secondaire des fibres inter-fasciculaires, tissus qui donnent le support, et les vaisseaux, tissus conducteurs de la sève brute, dans les hampes florales d'*Arabidopsis thaliana*. Ces enzymes ont été sélectionnées pour leur rôle clé dans la biosynthèse des lignines.

- Au point de vue biochimique, les effets de la mutation des gènes sur les hampes florales d'*A.thaliana* étudiés au cours de cette thèse se traduisent par:
  - ✓ Une réduction de la quantité totale de lignine d'environ 30 à 40 % dans les mutants: *ccr 1*, double mutant *cad-c x cad-d* et triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1*), avec des sévères altérations structurales.
  - ✓ Un effondrement de la fréquence des unités non condensées des lignines issues de la thioacidolyse (unités liées en β-O-4), plus particulièrement en unités S.
  - ✓ L'accumulation de certains monomères minoritaires, tels que l'acide ferulique pour le mutant *ccr 1* et le triple mutant *cad-c x cad-d* + *ref1* et le coniféraldéhyde dans le double mutant *cad-c x cad-d* al égale que dans le triple mutant.

- Les altérations observés à l'échelle micro-morphologique dans les mutants se traduisent par:
  - ✓ Des anomalies morphologiques qui montrent que l'assemblage pariétal ne s'est pas fait normalement, en raison des modifications de la composition chimique de leurs parois.
  - ✓ Une désorganisation et un relâchement des microfibrilles de cellulose dans les parois secondaires des hampes florales des mutants *ccr 1* et du double mutant *cad-c x cad-d*. Ceci s'exprime, à une autre échelle, par l'aspect collapsé des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux, aspect diagnostique de mauvaises propriétés mécaniques des parois.

La technique d'immunomarquage nous a permis de compléter cette étude en analysant la distribution des unités des lignines dans les parois secondaires des hampes florales des mutants d'*A.thaliana*.

- La topochimie de la répartition des unités des lignines a montré que:
  - ✓ La population des unités non condensées des lignines (plus particulièrement les unités S) a pratiquement disparu à la fois dans les fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux des mutants.
  - ✓ Les unités G condensées restent réparties de manière homogène dans les sous-couches pariétales du mutant *ccr 1*, bien que ces unités reconnues sont plus abondants que dans le témoin. En ce qui concerne au double et triple mutant, ces épitopes sont bien reconnus au sein des fibres inter-fasciculaires et des vaisseaux, avec un contrôle tissu-spécifique dans le mécanisme de polymérisation de ce type de lignine

La technique de thioacidolyse, qui permet d'identifier par CPG-SM les monomères libérés par la coupure sélective des liaisons intermonomériques non condensées, de type β-O-4, s'est montrée très sensible pour la détermination de la proportion des unités des lignines, G et S dans tous les mutants étudiés. En utilisant cette technique couplée à la LCM et suivi par une micro-analyses tissu-spécifique des lignines, nous avons pu montrer aussi pour la première fois la structure des lignines présentes dans le fibres inter-fasciculaires et les vaisseaux des hampes florales d'*Arabidopsis thaliana*

Puisque la thioacidolyse ne donne accès qu'à la partie moins condensée des lignines, l'utilisation des anticorps dirigés contre certaines structures condensées des lignines a permis de compléter les informations données par l'analyse chimique. Il nous a été possible d'identifier et de caractériser la distribution des principaux types de lignines dans les parois secondaires des hampes florales d'*A. thaliana*. La spécificité des anticorps utilisés au cours de cette thèse, a permis une caractérisation de la répartition micromorphologique des lignines en fonction de leur nature condensée et non condensée.

Finalement, grâce à la complémentarité des approches biochimiques et cytologiques (étude de l'ultrastructure et de la topochimie de la lignification) nous avons pu étudier l'impact des différents mutations sur la lignification et montrer dans un plan plus précis, que les gènes *CCR-1*, *CAD-C* et *CAD-D* seraient impliqués dans la synthèse des unités non condensées des lignines, unités essentielles dans l'assemblage et l'organisation cohérente des sous-couches pariétales chez les hampes florales d'*Arabidopsis thaliana*.

La comparaison des mutants nous a démontré que chaque mutation n'avait pas nécessairement un effect typique et unique sur l'assemblage des parois. Ceci de même que les résultats analytiques, suggère que d'autres facteurs interviennent pour moduler les effets des gènes afin que la plante puisse former une paroi cohérente. En ce sens on peut penser que l'étude des facteurs de régulations devrait apporter des réponses complémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abbott JC, Barakate A, Pincon G, Legrand M, Lapierre C, Mila I, Schuch W, Halpin C (2002) Simultaneous Suppression of Multiple Genes by Single Transgenes. Down-Regulation of Three Unrelated Lignin Biosynthetic Genes in Tobacco. *Plant Physiol*. **128:** 844-853

Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohyd. Res*. **5:** 340-345

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301:** 653-657

Alonso-Blanco C, Koornneef M (2000) Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci*. **5:** 22-29

Altamura MM, Possenti M, Matteucci A, Baima S, Ruberti I, Morelli G (2001) Development of the vascular system in the inflorescence stem of *Arabidopsis*. *New Phytol.* **151:** 381-389

Angeles G, Berrio-Sierra J, Joseleau JP, Lorimier P, Lefebvre A, Ruel K (2006) Preparative laser capture microdissection and single-pot cell wall material preparation: a novel method for tissue-specific analysis. *Planta* **224:** 228-232

Anterola AM, Lewis NG (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* **61:** 221-294

***Arabidopsis* and Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408:** 796-815

Asano T, Masumura T, Kusano H, Kikuchi S, Kurita A, Shimada H, Kadowaki K-i (2002) Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *Plant J.* **32:** 401-408

Atalla RH, Agarwal UP (1985) Raman Microprobe Evidence for Lignin Orientation in the Cell-Walls of Native Woody Tissue. *Science* **227:** 636-638

Atalla RH, Hackney JM, Uhlin I, Thompson NS (1993) Hemicelluloses as Structure Regulators in the Aggregation of Native Cellulose. *Int. J. Biol. Macromol*. **15:** 109-112

Barriere Y, Ralph J, Mechin V, Guillaumie S, Grabber JH, Argillier O, Chabbert B, Lapierre C (2004) Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability II. Lessons from brown-midrib mutants. *C. R. Biol*. **327:** 847-860

Baucher M, Chabbert B, Pilate G, Van Doorsselaere J, Tollier MT, Petit-Conil M, Cornu D, Monties B, Van Montagu M, Inze D, Jouanin L, Boerjan W (1996) Red Xylem and Higher Lignin Extractability by Down-Regulating a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Poplar. *Plant Physiol*. **112:** 1479-1490

Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sc.i* **17:** 125-197

Besombes S, Mazeau K (2005a) The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 1: adsorption of a threo guaiacyl [beta]-O-4 dimer onto a I[beta] cellulose whisker. *Plant Physiol. Bioch*. **43:** 299-308

Besombes S, Mazeau K (2005b) The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 2: seeking for evidence of organization of lignin molecules at the interface with cellulose. *Plant Physiol. Bioch*. **43:** 277-286

Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2007) Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *Plant Cell* **19:** 148-162

Bevan M, Murphy G (1999) The small, the large and the wild - the value of comparison in plant genomics. *Trends Genet*. **15:** 211-214

Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Biol*. **54:** 519-546

Boudet AM (2000) Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol. Bioch*. **38:** 81-96

Boudet AM, Lapierre C, Grimapettenati J (1995) Tansley Review No-80 - Biochemistry and Molecular-Biology of Lignification. *New Phytol*. **129:** 203-236

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorlach J (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* **13:** 1499-1510

Brunow G, Kilpelainen I, Sipila J, Syrjanen K, Karhunen P, Setala H, Rummakko P (1998) Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. *In NG Lewis, S Sarkanen*, *eds*, Lignin and Lignan Biosynthesis, Vol 697, pp 131-147

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000). *In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds,* Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp 1366

Burbulis IE, Iacobucci M, Shirley BW (1996) A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8:** 1013-1025

Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiol*. **110:** 3-13

Carpita N, McCann M (2000) The Cell Wall. *In B Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds,* Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, pp 52-108

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

Cathala B, Monties B (2001) Influence of pectins on the solubility and the molar mass distribution of dehydrogenative polymers (DHPs, lignin model compounds). *Int. J. Biol. Macromol*. **29:** 45-51

Chabannes M, Barakate A, Lapierre C, Marita JM, Ralph J, Pean M, Danoun S, Halpin C, Grima-Pettenati J, Boudet AM (2001a) Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J*. **28:** 257-270

Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A, Chabbert B, Jauneau A, Joseleau JP, Boudet AM (2001b) 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

Chambat G, Cartier N, Lefebvre A, Marais MF, Joseleau JP (1997) Changes in cell wall and extracellular polysaccharides during the culture cycle of Rubus fruticosus cells in suspension culture. *Plant Physiol. Bioch.* **35:** 655-664

Chapple C, Vogt T, Ellis BE, Somerville CR (1992) An *Arabidopsis* Mutant Defective in the General Phenylpropanoid Pathway. *Plant Cell* **4:** 1413-1424

Chiang V (2006) Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environ. Chem. Lett*. **4:** 143-146

Clair B, Thibaut B (2001) Shrinkage of the gelatinous layer of poplar and beech tension wood. *IAWA J*. **22:** 121-131

Connors WJ, Chen C-L, Pew JC (1970) Enzymic dehydrogenation of the lignin model coniferaldehyde. *J. Org. Chem*. **35:** 1920-1924

Danscher G, Norgaard J (1983) Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem*. **31:** 1394-1398

Dauwe R, Morreel K, Goeminne G, Gielen B, Rohde A, Van Beeumen J, Ralph J, Boudet AM, Kopka J, Rochange SF, Halpin C, Messens E, Boerjan W (2007) Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *Plant J*. **52:** 263-285

Demura T, Fukuda H (2007) Transcriptional regulation in wood formation. Trends in *Plant Sc*i. **12:** 64-70

Dence CW (1992) The determination of lignin. *In S Lin, Y., CW Dence, eds*, Methods in Lignin Chemistry. Springer-Verlag, pp 33-61

Dixon RA, Chen F, Guo D, Parvathi K (2001) The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **57:** 1069-1084

Donaldson LA (2001) Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57:** 859-873

Eudes A, Pollet B, Sibout R, Do C-T, Séguin A, Lapierre C, Jouanin L (2006) Evidence for a role of AtCAD 1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **225:** 23-39

Fagard M, Hofte H, Vernhettes S (2000) Cell wall mutants. *Plant Physiol. Bioch* **38:** 15-25

Faix O (1986) Investigation of lignin polymer models (DHP's) by FTIR spectroscopy. *Holzforschung*. **40:** 273-280

Faulon J-L, Hatcher PG (1994) Is There Any Order in the Structure of Lignin? *Energ. Fuel*. **8:** 402-407

Fengel D, Wegener G (1989) Distribution of the components within wood cell wall. *In Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter Inc, pp 227-239

Fournand D, Cathala B, Lapierre C (2003) Initial steps of the peroxidase-catalyzed polymerization of coniferyl alcohol and/or sinapyl aldehyde: capillary zone electrophoresis study of pH effect. *Phytochemistry* **62:** 139-146

Fukushima RS, Hatfield RD (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:** 3133-3139

Gardner SL, Burrell MM, Fry SC (2002) Screening of *Arabidopsis thaliana* stems for variation in cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* **60:** 241-254

Goffner D, Joffroy I, Grima-Pettenati J, Halpin C, Knight ME, Schuch W, Boudet AM (1992) Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. *Planta* **188:** 48-53

Goujon T, Ferret V, Mila I, Pollet B, Ruel K, Burlat V, Joseleau JP, Barriere Y, Lapierre C, Jouanin L (2003a) Down-regulation of the *AtCCR1* gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* **217:** 218-228

Goujon T, Sibout R, Eudes A, MacKay J, Jouanin L (2003b) Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Bioch*. **41:** 677-687

Graham TL (1998) Flavonoids and flavonol glycoside metabolims in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Bioch.* **36:** 135-144

Halpin C, Holt K, Chojecki J, Oliver D, Chabbert B, Monties B, Edwards K, Barakate A, Foxon GA (1998) Brown-midrib maize (bm1) - a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J*. **14:** 545-553

Halpin C, Knight ME, Foxon GA, Campbell MM, Boudet AM, Boon JJ, Chabbert B, Tollier M-T, Schuch W (1994) Manipulation of lignin quality by down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.* **6:** 339-350

Halpin C, Knight ME, Grima-Pettenati J, Goffner D, Boudet A, Schuch W (1992) Purification and Characterization of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from Tobacco Stems *Plant Physiol*. **98:** 12-16

Hepworth DG, Vincent JFV (1998) The mechanical properties of xylem tissue from tobacco plants (Nicotiana tabacum 'Samsun'). *Ann. Bot-London* **81:** 751-759

Heux L, Dinand E, Vignon MR (1999) Structural aspects in ultrathin cellulose microfibrils followed by C-13 CP-MAS NMR. *Carbohyd. Polym*. **40:** 115-124

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

Higuchi T, Ito T, Umezawa T, Hibino T, Shibata D (1994) Red-Brown Color of Lignified Tissues of Transgenic Plants with Antisense Cad Gene - Wine-Red Lignin from Coniferyl Aldehyde. *J. Biotechnol*. **37:** 151-158

Hoffmann L (2003a) Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-*O*-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle

acyltransférase,l'HydroxyCinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur

Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M (2003b) Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. *J. Biol. Chem*. **278:** 95-103

Hoffmann MH, Tomiuk J, Schmuths H, Koch C, Bachmann K (2005) Phenological and morphological responses to different temperature treatments differ among a world-wide sample of accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Oecol*. **28:** 181-187

Holgate C, Jackson P, Cowen P, Bird C (1983) Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J. Histochem. Cytochem*. **31:** 938-944

Houtman CJ, Atalla RH (1995) Cellulose-lignin interactions. A computational study. *Plant Physiol*. **107:** 977-984

Hu WJ, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, Tsai CJ, Chiang VL (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat. Biotechnol*. **17:** 808-812

Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic. Acids Res*. **29:** 102-105

Iiyama K, Lam TBT, Stone BA (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol*. **104:** 315-320

Iiyama K, Wallis AFA (1990) Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agr*. **51:** 145-161

Izumi A, Kuroda K (1997) Pyrolysis-mass spectrometry analysis of dehydrogenation lignin polymers with various syringyl/guaiacyl ratios. *Rapid Commun. Mass Sp*. **11:** 1709-1715

Jacquet G (1997a) Structure et réactivité des lignines de graminées et des acides phénoliques associés: développement des méthodologies d'investigation. Thèse de doctorat. Université Aix-Marseille III

Jacquet G, Pollet B, Lapierre C, Franscesch C, Rolando C, Faix O (1997b) Thioacidolysis of enzymatic dehydrogenation polymers from p-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl precusors. *Holzforschung*. **51:** 349-354

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

Joseleau J-P, Comtat J, Ruel K (1992) Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. *In J Visser, G Beldman, MA Kusters-van Someren, AGJ Voragen, eds*, Xylans and xylanases, Progress in biotechnology, Vol 7. Elsevier, pp 1-16

Joseleau J-P, Faix O, Kuroda K-I, Ruel K (2004a) A polyclonal antibody directed against syringylpropane epitopes of native lignins. *C. R. Biol*. **327:** 809-815

Joseleau J-P, Imai K, Kuroda K-I, Ruel K. (2004b)**.** Detection in situ and characterization of lignin in a G-layer of tension wood fibers of *Populus deltoides*. *Planta* **219**: 338-345

Joseleau JP, Ruel K (1997) Study of lignification by non-invasive 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:** 1123-1133

Jouanin L, Lapierre C (2006) Avantages et limites d'*Arabidopsis thaliana* pour l'étude des premières étapes de la lignification. *Cah. Agric*. **15:** 179-185

Jourdes M, Cardenas CL, Laskar DD, Moinuddin SGA, Davin LB, Lewis NG (2007) Plant cell walls are enfeebled when attempting to preserve native lignin configuration with poly-p-hydroxycinnamaldehydes: Evolutionary implications. *Phytochemistry* **68:** 1932-1956

Karhunen P, Rummakko P, Sipila J, Brunow G, Kilpelainen I (1995) Dibenzodioxocins - a Novel Type of Linkage in Softwood Lignins. *Tetrahedron Lett*. **36:** 169-170

Kim H, Ralph J, Lu FC, Pilate G, Leple JC, Pollet B, Lapierre C (2002) Identification of the structure and origin of thioacidolysis marker compounds for cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in angiosperms. *J. Biol. Chem*. **277:** 47412-47419

Kirch H-H, Nair A, Bartels D (2001) Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant Craterostigma plantagineum and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **28:** 555-567

Kukkola EM, Koutaniemi S, Gustafsson M, Karhunen P, Ruel K, Lundell TK, Saranpää P, Brunow G, Teeri TH, Fagerstedt KV (2003) Localization of dibenzodioxocin substructures in lignifying Norway spruce xylem by transmission electron microscopy-immunogold labeling. *Planta* **217:** 229-237

Lacombe E, Hawkins S, Van Doorsselaere J, Piquemal J, Goffner D, Poeydomenge O, Boudet AM, 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:** 429-441

Lapierre C (1993) Applications of new methods for the investigation of lignin structure. *In HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield, J Ralph, eds*, Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy Inc., Madison, pp 133-163

Lapierre C, Monties B, Rolando C (1986a) Preparative thioacidolysis of spruce lignin : isolation and identification of main monomeric products. *Holzforschung* **40:** 47-50.

Lapierre C, Monties B, Rolando C (1986b) Thioacidolysis of Poplar lignins : identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions. *Holzforschung* **40:** 113-118

Lapierre C, Pilate G, Pollet B, Mila I, Leple JC, Jouanin L, Kim H, Ralph J (2004) Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins. *Phytochemistry* **65:** 313-321

Lapierre C, Pollet B, MacKay JJ, Sederoff RR (2000) Lignin structure in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *J. Agr. Food Chem*. **48:** 2326-2331

Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leple JC, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, 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:** 153-163

Lapierre C, Pollet B, Rolando C (1995) New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res. Chem. Intermediat*. **21:** 397-412.

Lapierre C, Rolando C (1988) Thioacidolysis of pre-methylated lignin samples from pine compression and poplar woods. *Holzforschung*. **42:** 1-4

Laskar DD, Jourdes M, Patten AM, Helms GL, Davin LB, Lewis NG (2006) The *Arabidopsis* cinnamoyl CoA reductase *irx4* mutant has a delayed but coherent (normal) program of lignification. *Plant J*. **48:** 674-686

Lawoko M, Henriksson G, Gellerstedt G (2005) Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules* **6:** 3467-3473

Lewis NG, Davin LB (1994) Evolution of Lignan and Neolignan Biochemical Pathways. *In Isopentenoids and Other Natural Products*, Vol 562, pp 202-246

Li LG, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, Chiang VL (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13:** 1567-1585

MacKay JJ, O'Malley DM, Presnell T, Booker FL, Campbell MM, Whetten RW, Sederoff RR (1997) Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *P. Natl Acad. Sci. USA.* **94:** 8255-8260

Marita JM, Ralph J, Hatfield RD, Chapple C (1999) NMR characterization of lignins in *Arabidopsis* altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *P. Natl Acad. Sci. USA.* **96:** 12328-12332

Matsunaga S, Schutze K, Donnison IS, Grant SR, Kuroiwa T, Kawano S (1999) Single pollen typing combined with laser-mediated manipulation. *Plant J*. **20:** 371-378

Mayhew TM, Griffiths G, Lucocq JM (2004) Applications of an efficient method for comparing immunogold labelling patterns in the same sets of compartments in different groups of cells. *Histochem Cell Biol*. **122:** 171-177

Meyer K, Kohler A, Kauss H (1991) Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS Lett* **290:** 209-212

Mir Derikvand M, Berrio-Sierra J, Ruel K, Pollet B, Do CT, Thévenin J, Buffard D, Jouanin L, Lapierre C. (2007). Redirection of the phenylpropanoid Pathway to Feruloyl Malate in *Arabidopsis* mutants deficient for Cinnamoyl-CoA reductase 1. *Planta* (on line)

Monties B (1989) Lignins. *In PM Dey, JB Harborne, eds*, Methods in Plant Biochemistry, Vol 1. Academic Press, London, pp 113-157

Morrison IM (1972) A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *J. Sci. Food Agr*. **23:** 455-463

Nair RB, Bastress KL, Ruegger MO, Denault JW, Chapple C (2004) The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 Gene Encodes an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Ferulic Acid and Sinapic Acid Biosynthesis. *Plant Cell* **16:** 544-554

O'Connell A, Holt K, Piquemal J, Grima-Pettenati J, Boudet A, Pollet B, Lapierre C, Petit-Conil M, Schuch W, Halpin C (2002) Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res*. **11:** 495-503

O'Malley DM, Porter S, Sederoff RR (1992) Purification, Characterization, and Cloning of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiol*. **98:** 1364-1371

Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chiang VL (1999) Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *P. Natl Acad. Sci. USA.* **96:** 8955-8960

Passardi F, Dobias J, Valerio L, Guimil S, Penel C, Dunand C (2007) Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *J. Plant Physiol*. **164:** 980-992

Patten AM, Cardenas CL, Cochrane FC, Laskar DD, Bedgar DL, Davin LB, Lewis NG (2005) Reassessment of effects on lignification and vascular development in the *irx4 Arabidopsis* mutant. *Phytochemistry* **66:** 2092-2107

Pilate G, Guiney E, Holt K, Petit-Conil M, Lapierre C, Leple JC, Pollet B, Mila I, Webster EA, Marstorp HG, Hopkins DW, Jouanin L, Boerjan W, Schuch W, Cornu D, Halpin C (2002) Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat. Biotechnol*. **20:** 607-612

Pinçon G, Chabannes M, Lapierre C, Pollet B, Ruel K, Joseleau J-P, Boudet AM, Legrand M (2001) 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:** 145-155

Piquemal J, Lapierre C, Myton K, O'Connell A, Schuch W, Grima-Pettenati J, Boudet AM (1998) Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J*. **13:** 71-83

Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001) Wood Formation in Trees. *Plant Physiol*. **127:** 1513-1523

Ralph J, Hatfield RD, Piquemal J, Yahiaoui N, Pean M, Lapierre C, Boudet AM (1998) NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *P. Natl Acad. Sci. USA.* **95:** 12803-12808

Ralph J, Lapierre C, Marita JM, Kim H, Lu FC, Hatfield RD, Ralph S, Chapple C, Franke R, Hemm MR, Van Doorsselaere J, Sederoff RR, O'Malley DM, Scott JT, MacKay JJ, Yahiaoui N, Boudet AM, Pean M, Pilate G, Jouanin L, Boerjan W (2001) Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* **57:** 993-1003

Ralph J, Lundquist K, Brunow Gs, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JrH, Boerjan W (2004) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Rev*. **3:** 29-60

Ralph J, MacKay JJ, Hatfield RD, O'Malley DM, Whetten RW, Sederoff RR (1997) Abnormal Lignin in a Loblolly Pine Mutant. *Science* **277:** 235-239

Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber J, Leplé J-C, Berrio Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Boerjan W, Lapierre C. (2008). Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperms lignins (and a pseudo marker compound for cinnamoyl-CoA reductase deficiency). *Plant J* **53:** 368-379

Reis D, Roland JC (1974) Mise en évidence de l'organisation des parois des cellules en croissance par extractions ménagées des polysacchrides associées à la cytochimie ultrastructurale. *J. Microsc-Paris* **20:** 271-284

Roberts K (2001) How the Cell Wall Acquired a Cellular Context. *Plant Physiol*. **125:** 127-130

Rolando C, Monties B, Lapierre C (1992) Thioacidolysis. *In C Dence, SY Lin, eds*, Methods in lignin chemistry. Springer Verlag, pp 334-349

Roussel MR, Lim C (1995) Dynamic Model of Lignin Growing in Restricted Spaces. *Macromolecules* **28:** 370-376

Ruel K, Barnoud F, Eriksson KE (1981) Micromorphological and ultrastructural aspects of spruce wood degradation by wild-type Sporotrichum pulverulentum and its cellulase-less mutant Cel 44. *Holzforschung* **35:** 157-171

Ruel K, Chabannes M, Boudet AM, Legrand M, Joseleau JP (2001) Reassessment of qualitative changes in lignification of transgenic tobacco plants and their impact on cell wall assembly. *Phytochemistry* **57:** 875-882

Ruel K, Comtat J, Barnoud F (1977) Localisation histologique et ultrastructurale des xylanes dans les parois primaires des tissus d'*Arundo donax*. *C.R. Acad. Sci.III-Vie* **284:** 1421-1424

Ruel K, Faix O, Joseleau J-P (1994) New immunogold probes for studying the distribution of the different lignin types during plant cell wall biogenesis. *J. Trace Microprobe T*. **12:** 247-265

Ruel K, Montiel MD, Goujon T, Jouanin L, Burlat V, Joseleau JP (2002) Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. *Plant Biology* **4:** 2-8

Saeman JF, Moore WE, Mitchell RL, Millet MA (1954) Technique for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *TAPPI* **37:** 336-343

Salmen L (2004) Micromechanical understanding of the cell-wall structure. *C. R. Biol*. **327:** 873-880

Sarkanen KV (1971) [Lignin] Precursors and their polymerization. *In KV Sarkanen, CH Ludwig, eds*, Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience, New York, pp 95-164

Sarni F, Grand C, Boudet AM (1984) Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus* X *euramericana*). *Eur. J. Biochem*. **139:** 259-265

Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Seguin A (2005) CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17:** 2059-2076

Sibout R, Eudes A, Pollet B, Goujon T, Mila I, Granier F, Seguin A, Lapierre C, Jouanin L (2003) Expression Pattern of Two Paralogs Encoding Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and Characterization of the Corresponding Mutants. *Plant Physiol*. **132:** 848-860

Sjöström E (1993) Wood chemistry: Fundamental and Applications. *In E Sjöström, ed*, Ed 2nd. Academic Press, San Diego, pp 71-89

Skibbe DS, Liu F, Wen T-J, Yandeau MD, Cui X, Cao J, Simmons CR, Schnable PS (2002) Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of Zea mays and *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol*. **48:** 751-764

Somerville C, Koornneef M (2002) Timeline - A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Genet*. **3:** 883-889

Stewart D, Yahiaoui N, McDougall GJ, Myton K, Marque C, Boudet AM, Haigh J (1997) Fourier-transform infrared and Raman spectroscopic evidence for the incorporation of cinnamaldehydes into the lignin of transgenic tobacco (Nicotiana tabacum L.) plants with reduced expression of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Planta* **201:** 311-318

Syrjanen K, Brunow G (1998) Oxidative cross coupling of p-hydroxycinnamic alcohols with dimeric arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds. The effect of oxidation potentials. *J. Chem. Soc. Perk T. 1*: 3425-3429

Taylor JG, Owen TP, Koonce LT, Haigler CH (1992) Dispersed lignin in tracheary elements treated with cellulose synthesis inhibitors provides evidence that molecules of the secondary cell wall mediate wall patterning. *Plant J*. **2:** 959-970

Taylor JG, Haigler CH (1993) Patterned secondary wall assembly in tracheary elements occurs as a self-perpetuating cascade. *Acta Bot. Neerl.* 42: 153-163

Terashima N (1989) Biogenesis and structure of macromolecular lignin in the cell of tree xylem as studied by microautoradiography. *In NJ Lewis, MG Paice, eds*, Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation. American Chemical Society (ACS), Washington D.C., pp 160-168

Terashima N, Fukushima K, Takabe K (1993) Comprehensive model of the lignified plant cell wall. *In HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield, J Ralph, eds*, Forage cell wall structure and digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp 247-270

Terashima N, Ralph SA, Landucci LL (1996) New facile syntheses of monolignol glucosides: p-glucocoumaryl alcohol, coniferin and syringin. *Holzforschung* **50**

Thiery JP (1967) Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc-Paris* **6:** 987-1017

Turner S, Sieburth LE (2002) Vascular Patterning. *In C Somerville, E Meyerowitz, eds*, The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, Rockville

Turner SR, Somerville CR (1997) Collapsed Xylem Phenotype of *Arabidopsis* Identifies Mutants Deficient in Cellulose Deposition in the Secondary Cell Wall. *Plant Cell* **9:** 689-701

Yahiaoui N, Marque C, Myton KE, Negrel J, Boudet AM (1997) Impact of different levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants. *Planta* **204:** 8-15

Zhong R, Pena MJ, Zhou G-K, Nairn CJ, Wood-Jones A, Richardson EA, Morrison WH, III, Darvill AG, York WS, Ye Z-H (2005) *Arabidopsis* Fragile Fiber8, Which Encodes a Putative Glucuronyltransferase, Is Essential for Normal Secondary Wall Synthesis. *Plant Cell* **17:** 3390-3408

ANNEXES

ANNEXES

Publications

Angeles G, Berrio-Sierra J, Joseleau JP, Lorimier P, Lefebvre A, Ruel K (2006) Preparative laser capture microdissection and single-pot cell wall material preparation: a novel method for tissue-specific analysis. *Planta* **224:** 228-232.

Ruel K, Billosta Valérie, Guillemin F, Berrio-Sierra J, Joseleau JP. (2006) The wood cell wall at the ultrastructural scale - formation and topochemical organization. *Maderas, Cienc. tecnol* **8:** 107-116

Berrio-Sierra J, Pollet B, Thévenin J, Lapierre C, Jouanin L, Joseleau JP, Ruel K. (2007) IMPACT of CCR1-silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* (**soumise**)

Mir Derikvand M, Berrio-Sierra J, Ruel K, Pollet B, Do CT, Thévenin J, Buffard D, Jouanin L, Lapierre C. (2007). Redirection of the phenylpropanoid Pathway to Feruloyl Malate in *Arabidopsis* mutants deficient for Cinnamoyl-CoA reductase 1. *Planta* (**on line**)

Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber J, Leplé J-C, Berrio Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Boerjan W, Lapierre C. (2008). Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperms lignins (and a pseudo marker compound for cinnamoyl-CoA reductase deficiency). *Plant J* **53:** 368-379

Communications orales

Berrio-Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Lapierre C, Ruel K. Impact du gène *CCR1* sur la formation des parois secondaires chez *Arabidopsis thaliana*. *Colloque annuel du GDR, AMV. 5 - 7 Décembre 2005, Pessac France*

Berrio-Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Lapierre C, Ruel K. Impact of genetic transformation of lignin on secondary wall assembly in *Arabidopsis thaliana*. WorkShop on Cell Biology and Microscopy. *7 - 11 Décembre 2005, Altleiningen Allemagne*

Communications par affiches

Berrio-Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Lapierre C, Ruel K. Impact du gène *CCR1* sur la formation des parois secondaires chez *Arabidopsis thaliana*. *Journées du Réseau Français des Parois (RFP), 5 - 7 Septembre 2005, Rouen France.*

Berrio-Sierra J, Mir Derikvand M, Jouanin L, Lapierre C, Ruel K. Impact of genetic transformation of lignin on secondary wall assembly in *Arabidopsis thaliana*. 9th European Training Course on Carbohydrates*, 6 - 9 Juin 2005, Wageningen Pay Bas.*

RESUME

La biomasse végétale suscite un intérêt accru en raison de son potentiel pour les énergies de remplacement du pétrole. Dans toutes ces formes d'utilisation et de valorisation, la paroi cellulaire lignocellulosique occupe un rôle central. C'est dans ce contexte d'une meilleure connaissance de la structure fine de la paroi secondaire lignifiée et de la fonction des polymères constitutifs dans l'élaboration du biocomposite qu'est la paroi que se situent les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

Plusieurs mutants nuls de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, dont un ou plusieurs gènes (cinnamoyl-CoA-réductase, mutant *ccr1* ; cinnamyl alcohol deshydrogénase, mutants *cad-c* et *cad-d* ; aldéhyde déshydrogénase, mutant *ref1* ; férulate 5-hydroxylase, mutant *f5h*) impliqués dans la synthèse des alcools coniférylique et sinapylique, précurseurs des unités G et S des lignines, ont été totalement réprimés, ont constitué les modèles utilisés pour étudier les effets de la mutation sur la composition et la structure des parois. L'analyse biochimique des lignines des plantes mutantes par thioacidolyse, d'une part, et l'étude à l'échelle ultrastructurale par immunomarquage en microscopie électronique, d'autre part, ont constitué les deux principales approches complémentaires privilégiées par lesquelles il a été possible de décrire les impacts des mutations sur la structure des lignines et par là sur l'assemblage macromoléculaire des parois. Les conséquences des mutations se sont avérées tissu-spécifiques et suggèrent une régulation spatio-temporelle de la lignification accompagnant la différenciation. La comparaison des altérations induites dans l'assemblage des parois par les différentes mutations a permis de déduire que les structures non-condensées des lignines assuraient un rôle important dans la cohésion du composite cellulose-hémicelluloses-lignines. L'analyse des impacts des mutations simples ou multiples des différents gènes montre que les effets sur les lignines et les parois ne correspondent pas à la simple sommation des effets de chacune des mutations des gènes, suggérant des régulations croisées. Le développement d'une nouvelle approche de microanalyse impliquant la microdissection à capture laser a permis de préciser pour la première fois les différences analytiques des lignines des fibres par rapport aux vaisseaux, et a montré tout son potentiel pour l'analyse de l'impact des mutations à l'échelle tissulaire.

Mots clés : *Arabidopsis thaliana*; paroi cellulaire; lignine; immuno-cytochimie; thioacidolyse; microscopie électronique

ABSTRACT

In recent years plant biomass has become the subject of a large interest for the industrial uses of wood and agricultural residues and for its potential use for new energy sources. For all these utilisations the lignocellulosic cell wall plays a central role. The work of this thesis was undertaken to gain an improved knowledge of the detailed structure and organisation of the lignified secondary wall and of the function of the polymer constituents in the edification of the plant cell wall biocomposite.

Several knock-out mutants of the model plant *Arabidopsis thaliana* deficient for one or more genes involved in lignin monomers biosynthesis (cinnamoyl-CoA-reductase, *ccr1*; cinnamyl alcohol dehydrogenase, *cad*-c and *cad*-d; aldehyde dehydrogenase, *ref1* ; ferulate 5-hydroxylase, *f5h*) were investigated for the analysis of the consequences of the mutation on the composition and the structure of the cell walls. Biochemical analysis of the mutant lines by thioacidolysis, and immuno-topochemistry in electron microscopy, respectively, constituted the two main approaches implemented to characterise the impacts of the mutations on the structure of lignins and on the macromolecular assembly of the cell walls. Our results revealed that the consequences of the mutations were tissue-specific, suggesting that lignification is spatio-temporally regulated during differentiation. The analysis of the alterations induced by the different mutations in the assembly of the cell walls suggested that the non-condensed structures of lignin had an important role in the cohesion of the cell wall composite. The comparison of the impacts of the different genes and gene combinations showed that the effects on the lignins and on the walls are not the simple summation of the effect of each individual gene. The development of a new approach of microanalysis involving the technique of laser capture microdissection allowed to precise for the first time the analytical differences of the lignins from fibres and vessels, and showed a great potential for the characterisation of the effects of mutations at the tissue scale.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; cell walls; lignin; immunolabelling; thioacidolysis; electron microscopy